



*ugr*

**Universidad  
de Granada**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E  
INMUNOLOGÍA**

**PROGRAMA DE BIOMEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PRO B DEL LACTANTE MLL-AF4+:  
AVANCES EN LA ETIOLOGÍA Y ORIGEN CELULAR MEDIANTE EL USO DE  
CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS Y MESENQUIMALES**

**Memoria presentada por PURIFICACIÓN CATALINA CARMONA para optar al  
grado de DOCTOR.**

**Granada, 2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Purificación Catalina Carmona  
D.L.: GR 879-2014  
ISBN: 978-84-9028-928-0

El doctorando Purificación Catalina Carmona y los directores de la tesis D. Pablo Menéndez Buján, Dña. Paola E. Leone Campo y D. Juan Antonio Marchal Corrales garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 4 Septiembre 2013

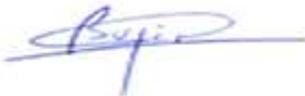
Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

*Paola E. Leone*

Fdo



## RESUMEN PREVIO

Cada vez es más evidente la relación entre células madre y cáncer, sugiriéndose que el cáncer tiene su origen en una población de células madre. Esta teoría se fundamenta mayoritariamente en dos explicaciones biológicas: i) las células madre viven y crecen durante largos periodos de tiempo por lo que son más susceptibles a acumular lesiones genéticas a lo largo de los años y ii) debido a su escasez, a su estado de quiescencia y a la expresión de proteínas de resistencia a drogas son difícilmente destruidas con agentes citotóxicos, es decir, con ciclos de quimioterapia y/o radioterapia.

La leucemia del lactante (niños < 1 año) representa mayoritariamente una leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linfocitos en estadio pro-B. La LLA pro-B del lactante MLL-AF4+, se caracteriza por su extremada corta latencia y gran agresividad. En los últimos años hemos avanzado vertiginosamente en la comprensión de la etiología de dicha LLA del lactante. El desencadenante molecular de dicha leucemia es el reordenamiento del gen MLL (localizado en el cromosoma 11q23). Dicho gen, se rompe entre el exón 6-9 y se reordena por NHEJ (non-homologous end joining) con el factor de transcripción AF4. En consecuencia, en las células sanguíneas del embrión o feto se origina el gen de fusión MLL-AF4. Dicha fusión origina la proteína de fusión MLL-AF4 que pasa a ser un dominante negativo y represor transcripcional de todo el programa de diferenciación hematopoyético.

En esta memoria se desarrolla la metodología para determinar la estabilidad genómica de las hESCs mediante técnicas de citogenética convencional y molecular. Aquellas hESCs cariotípicamente euploides serán expuestas a bajas dosis de etopósido para analizar si el etopósido es capaz de promover rupturas en el locus MLL en estas células madre pluripotentes pre-natales. Dada la corta latencia de la LLA-B pro-B MLL-AF4+ del lactante, su comportamiento bifenotípico y su origen pre-

natal, pretendemos analizar también si puede tener un origen pre-hematopoyético de forma que el oncogén de fusión MLL-AF4 ya esté presente al diagnóstico en células no hematopoyéticas de la médula ósea, en concreto MSCs.

Aunque se reconoce el origen pre-natal de la fusión MLL-AF4, desconocemos por completo el origen jerárquico de MLL-AF4. En realidad, el origen celular a nivel jerárquico donde ocurre dicha aberración cromosómica es difícil de descifrar debido a que el impacto funcional del oncogén de fusión y la expansión clonal resultante puede ocurrir aguas abajo del propio origen físico de la translocación. Lo que sí parece evidente y constituye parte de la hipótesis perseguida en este trabajo es que la célula diana donde aparece dicho oncogén de fusión debe de ser una célula madre con capacidad de auto-renovación, diferenciación a múltiples líneas y proliferación a largo plazo.

### **Objetivos:**

(i) Determinar la estabilidad génica de las hESCs mediante técnicas de citogenética convencional y molecular. Determinar en que grado la predisposición a inestabilidad cariotípica en hESCs es debida a las condiciones de cultivo empleadas o a propiedades intrínsecas de cada línea celular.

(ii) Determinar si a bajas dosis de etopósido son capaces de romper y provocar reordenamientos del locus hESCs y célula CD34+ de cordón umbilical y si dichos reordenamientos son suficientes para inducir transformación oncogénica en las hESCs.

(iii) Analizar en distintos subtipos citogenéticos de leucemias agudas si las translocaciones cromosómicas presentes en los blastos están también presentes en el estroma medular, sugiriendo que la translocación cromosómica tendría un posible origen pre-hematopoyético.

## ÍNDICE

---

I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. CÉLULAS TRONCALES O <i>STEM CELLS</i> .....	5
1.1. Características de las células troncales o <i>stem cells</i> .....	5
1.2. Tipos de células troncales .....	8
1.2.1. Células troncales adultas .....	10
1.2.1.1. Células troncales hematopoyéticas.....	11
1.2.2. Células troncales embrionarias humanas.....	16
1.3. Estabilidad genética de las hESCs.....	20
1.3.1. Métodos de Estudio .....	26
1.3.1.1. Cariotipo convencional.....	26
1.3.1.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	28
1.3.1.3. Multi FISH (M-FISH) y cariotipo espectral.....	29
1.3.1.4. Hibridación genómica comparada .....	30
1.3.1.5. Técnicas de alta resolución basadas en <i>Arrays</i> de mapeo.....	32
1.4. Células troncales, cáncer y desarrollo.....	36
2. LEUCEMIA: Concepto y tipos .....	41
2.1. Leucemia Aguda .....	42
2.1.2. Leucemia linfoblástica aguda .....	44
2.1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda pediátrica .....	47
2.1.3. Origen prenatal de la LLA con reordenamiento MLL-AF4. ....	48

2.1.4. Etiología de la LLA del lactante con reordenamiento MLL-AF4.....	51
2.1.5. Desarrollo de un modelo de LLA infantil MLL-AF4+ basado en el uso hESCs .....	55
II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO REALIZADO.....	61
III. OBJETIVOS .....	67
IV. MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS .....	71
<b>ARTICULO 1:</b> Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? <i>Mol Cancer</i> <b>7</b> (2008), p. 76-84.....	73
Catalina, P., Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., de la Cueva, T., Bueno, C., Leone, P.E. and Menendez, P.	
<b>ARTICULO 2:</b> Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. <i>Leuk Res</i> <b>33</b> (2009), pp. 980-990.....	89
Catalina, P., Bueno, C., Montes, R., Nieto, A., Ligeró, G., Sanchez, L., Jara, M., Rasillo, A., Orfao, A., Cigudosa, J., Hovatta, O., Greaves, M. and Menendez, P.	
<b>ARTICULO 3:</b> Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. <i>Carcinogenesis</i> <b>30</b> (2009), pp. 1628-1637.....	105
Bueno, C., Catalina, P., Melen, G.J., Montes, R., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia- Perez, J.L. and Menendez, P.	

**ARTICULO 4:.** Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* **206 (2009), pp. 3131-3141..... 119**

Menendez, P., **Catalina, P.**, Rodriguez, R., Melen, G.J., Bueno, C., Arriero, M., Garcia-Sanchez, F., Lassaletta, A., Garcia-Sanz, R. and Garcia-Castro, J.

**V. DISCUSIÓN ..... 137**

**VI. CONCLUSIONES..... 153**

**VII. ESTUDIOS EN CURSO Y DE FUTURO..... 157**

**VIII. OTROS ESTUDIOS EN LOS QUE HA PARTICIPADO LA DOCTORANDA... 163**

**IX. BIBLIOGRAFIA..... 167**





## **INTRODUCCIÓN**

---



## INTRODUCCIÓN

A pesar de los innumerables avances acontecidos en las cuatro últimas décadas, el cáncer continúa siendo una enfermedad compleja que encierra numerosos enigmas aún hoy sin descifrar. La investigación biomédica nos ofrece la posibilidad de desentrañar algunos de estos enigmas y avanzar en el conocimiento de su origen y progresión. Cada vez existe una relación más estrecha entre cáncer infantil, células troncales y desarrollo. Es importante destacar que nuestro conocimiento sobre aspectos etiológicos del cáncer es limitado si trabajamos con muestras primarias procedentes de pacientes, ya que en el momento del diagnóstico, todos los eventos oncogénicos responsables están ya presentes, impidiéndonos descifrar los factores que desencadenan la aparición de dichos eventos, así como la patogénesis y la evolución de la enfermedad. Es por ello necesario desarrollar modelos *in vivo* e *in vitro* que de alguna manera reproduzcan la enfermedad, con el objetivo de ampliar nuestros conocimientos sobre la etiología y fisiopatología de la enfermedad y permitir el desarrollo de futuros tratamientos.

La mayoría de estudios oncológicos se centran en tumores de origen adulto, en parte porque su incidencia es mayor. Sin embargo, el cáncer infantil presenta unas características biológicas y epidemiológicas distintas a las de los adultos, lo que hace que sea necesario su estudio como un grupo aparte. Estos niños no desarrollan la enfermedad como respuesta a una exposición inadecuada a agentes carcinogénicos medioambientales o dietéticos (alcohol, tabaco, alimentación inadecuada o incluso por la exposición prolongada a radiaciones), sino que por el contrario, más del 75% de los niños con cáncer ya presentan en el momento del nacimiento los eventos oncogénicos ocurridos en el útero. Además, en algún subtipo de cáncer infantil la edad en la que irrumpe es dramáticamente temprana, avalando la idea de que el cáncer infantil puede ser el resultado de una alteración en el desarrollo embrionario (Greaves, 2002).

Existen dificultades éticas y logísticas para estudiar los eventos oncogénicos que alteran el desarrollo mesodérmico y hematopoyético embrionario humano *in situ*. Es factible sin embargo, diseñar modelos humanos o murinos para estudiar el cáncer adulto utilizando células troncales adultas. Sin embargo, estas células troncales adultas no representan una diana terapéutica ideal para reproducir el cáncer infantil. Si partimos de la hipótesis de que el cáncer infantil tiene un origen embrionario/fetal (Greaves, 2005), necesitaríamos utilizar células en estadios ontogénicos muy tempranos como son las células troncales embrionarias humanas (en adelante, hESC, siglas inglesas de *Human Embryonic Stem Cells*), fetales o neonatales, y así poder estudiar y poder llegar, incluso, a reproducir esta enfermedad en células en un estadio de desarrollo muy cercanas al origen celular/temporal del cáncer infantil.

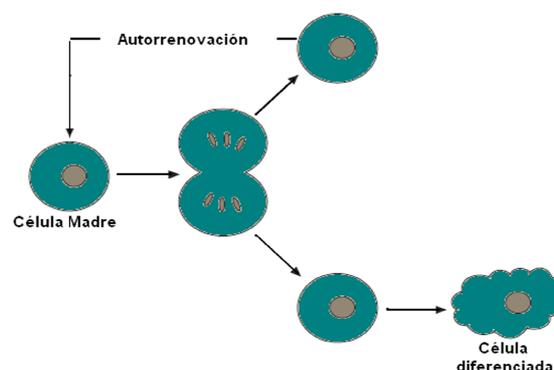
En este trabajo introducimos primero las células troncales o *stem cells*, y los tipos y características de cada una de ellas. Así también, presentamos los diferentes métodos de estudio que se han empleado en esta tesis para estudiar la estabilidad genética de estas células en diferentes condiciones de cultivo, con objeto de poderlas utilizar como una herramienta sólida en el estudio de leucemias infantiles, que abordaremos en la segunda parte de esta memoria.

## 1. CÉLULAS TRONCALES O *STEM CELLS*

### 1.1 Características de las células troncales o *stem cells*

Llamamos células troncales o *stem cells* a un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades de diferenciación a múltiples estirpes celulares tanto morfológica como funcionalmente (Weissman, 2000a, b). Las células troncales poseen una serie de rasgos que permite identificarlas, como la expresión de ciertos marcadores de superficie celular, la expresión de factores de transcripción específicos, y receptores de factores de crecimiento. Mientras algunas características son comunes a distintos tipos de células troncales, en general, las células *stem* de distintos tejidos poseen características específicas que permiten distinguirlas. A pesar de su diferente origen tisular y ontogénico, todas las células troncales comparten las dos características comunes mencionadas aunque pueden expresarlas en distinto grado (Liew et al., 2005):

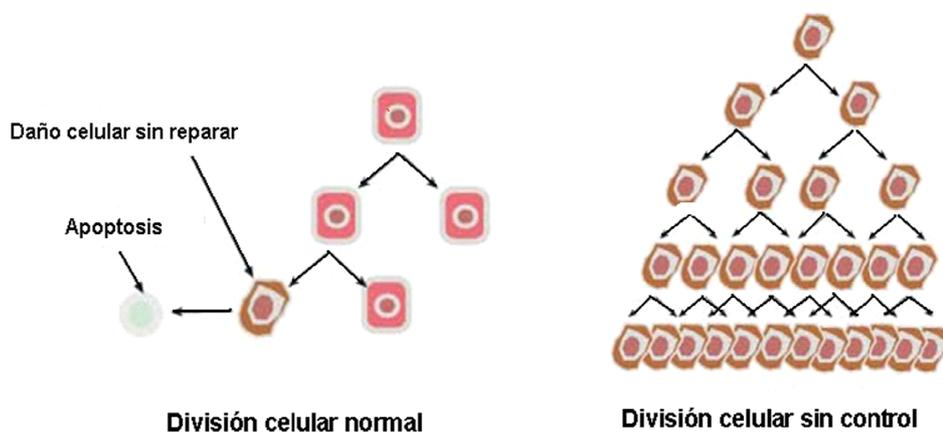
Capacidad de auto-renovación: Capacidad que poseen las células de perpetuarse a través de sucesivas divisiones mitóticas simétricas dando lugar a células hijas con características idénticas a las de su progenitora. Esta característica es la que permite a las células troncales mantenerse en estado indiferenciado durante tiempo ilimitado, actuando de reservorio ante distintas necesidades fisiológicas/homeostáticas. Este hecho convierte a la célula troncal en una fuente importante para la generación de distintos tipos celulares (Figura1)



**Figura 1:** División de una Célula Madre o troncal.

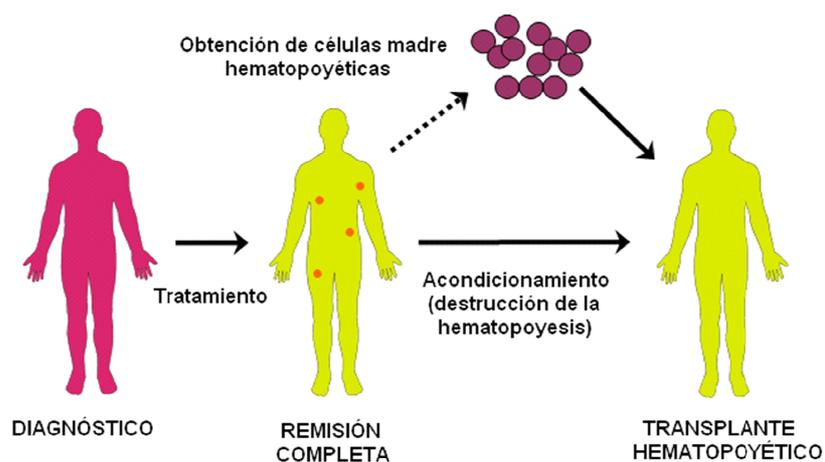
Capacidad de diferenciación: Las células troncales son capaces de diferenciarse a múltiples tipos celulares bajo diferentes estímulos. En un momento determinado, abandonan su estado indiferenciado y mediante un proceso de diferenciación regulado, dan lugar a distintos tipos celulares de su tejido o de otros tejidos adquiriendo las características morfológicas y funcionales correspondientes. Por ejemplo, ante condiciones fisiológicas adversas como daño tisular, las células troncales comienzan un proceso de división asimétrica produciendo una célula idéntica a la célula progenitora y otra diferente que inicia el proceso de diferenciación celular (Inaba and Yamashita, 2012). Este proceso es complejo y está mediado por múltiples factores tanto a nivel molecular como a nivel de microambiente celular. Mediante este proceso las células troncales van produciendo progenitores con capacidad pluripotente decreciente que poco a poco van perdiendo su capacidad de auto-renovación convirtiéndose en células funcionales maduras (Merok and Sherley, 2001).

A medida que la célula troncal prolifera y se diferencia, va perdiendo esta capacidad pluripotente, siendo esta más restringida y comprometándose a diferentes linajes. En este sentido, cuando el balance entre proliferación y diferenciación se altera puede desencadenar la aparición de cáncer, situación caracterizada por un bloqueo de la diferenciación y un aumento de la proliferación de manera descontrolada (Figura 2).



**Figura 2:** División celular normal (izquierda) y división incontrolada de una célula tumoral que ha perdido la capacidad de diferenciación y aumentado la de proliferación (derecha). El proceso de división de las células está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuando comenzar a dividirse o mantenerse quiescente. Cuando estos mecanismos de control se alteran en una célula, ésta y sus descendientes pueden iniciar una división incontrolada.

Las primeras evidencias científicas de que en el organismo humano había células troncales, provienen de experimentos realizados por Till y McCulloch a finales de los años 50, centrados en las células troncales hematopoyéticas (en adelante, HSCs, siglas inglesas de *Haematopoietic Stem Cells*) (McCulloch and Till 1960; Till and McCulloch 1961). En clínica, se han explotado las propiedades de las células troncales adultas, en concreto de las HSCs, desde hace más de 50 años. Prueba de ello es el trasplante de progenitores hematopoyéticos de médula ósea, realizado con éxito por primera vez por el Prof. E. Donnall Thomas (galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1990), quien demostró el potencial de las HSCs para reconstituir la hematopoyesis de pacientes afectados de leucemia (Figura 3). El trasplante de progenitores hematopoyéticos lejos de constituir un tratamiento curativo, representa en la actualidad una terapia de rescate de inmenso valor para reconstituir el sistema linfohematopoyético de pacientes aplasiados tras el tratamiento con citostáticos.



**Figura 3.** Imagen representativa del primer trasplante de médula ósea realizado con éxito del Profesor E. Donnall Thomas.

El interés en las células troncales ha crecido de forma exponencial a partir de la identificación, caracterización, y aislamiento de las hESCs (Thomson et al., 1998), y también del potencial de uso de las mismas como alternativa terapéutica en multitud de patologías. Las hESCs, además de su posible aplicación clínica en el futuro, hoy en día, representan una herramienta biológica de inmenso valor para aplicaciones más inmediatas, como *screening* de moléculas y toxicidad embrionaria, biología del desarrollo y desarrollo de modelos de enfermedad.

## 1.2. Tipos de células troncales

Como ya se ha descrito, la célula troncal se caracteriza por dos propiedades fundamentalmente: auto-renovación y capacidad de diferenciación (Jordan et al., 2006). Estas células además, se pueden clasificar según su capacidad o potencial de diferenciación en cuatro tipos, (Prosper and Verfaillie, 2003):

- Célula troncal totipotente: célula capaz de originar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios, como tejidos extraembrionarios. Se puede considerar que el cigoto es la única célula troncal totipotente.
- Célula troncal pluripotente: aquella que puede formar cualquier tipo de célula procedente de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), pero no tejido extraembrionario, trofoectodermo.
- Célula troncal multipotente: aquella que sólo puede generar células de su misma capa o linaje embrionario. Por ejemplo, una célula troncal sanguínea será capaz de originar diferentes tipos celulares maduros y funcionales hematopoyéticos.
- Célula troncal unipotente o progenitor: célula que forma únicamente un tipo de célula particular (Sell, 2004). A medida que las células troncales van

perdiendo potencial y se van comprometiendo a una línea específica se conocen como progenitores.

También, se puede hacer otra clasificación de las células troncales atendiendo al momento de desarrollo (ontogenia):

- Célula troncal embrionaria: esta célula deriva de la masa celular interna del blastocisto (hasta día 14 de desarrollo). Son células pluripotentes y pueden dar origen a todos los tejidos del embrión.
- Célula troncal fetal: Este tipo celular está presente en múltiples tejidos durante el desarrollo fetal (entre el día 14 hasta el momento del nacimiento). Por ejemplo, las células hematopoyéticas son muy activas en el hígado fetal.
- Célula troncal neonatal: son las células troncales obtenidas de la sangre del cordón umbilical y/o placenta. Existen evidencias científicas de que hay diferentes tipos de células troncales en el cordón umbilical, siendo por tanto una de las fuentes más aceptadas para la obtención de células con capacidad regenerativa de múltiples tejidos, puesto que no plantea controversia ética alguna.
- Célula troncal adulta: son aquellas células obtenidas de diferentes tejidos adultos como médula ósea, cerebro, piel, glándula mamaria, colon, grasa etc. Las células troncales adultas regeneran tejidos que están sometidos a un continuo desgaste fisiológico.

Mención aparte merece la pena que tengamos en cuenta un tipo de célula con capacidad pluripotente de enorme valor en el campo de la investigación y cuya utilización se ha extendido ya por todo el mundo en los últimos años, son las células

troncales pluripotentes inducidas (en adelante, iPSCs, siglas inglesas de *induced pluripotent stem cells*). Quizás, estas células junto con las hESCs son las únicas células troncales que se pueden considerar pluripotentes. Las iPSCs constituyen un tipo de células troncales pluripotentes derivadas a partir de una célula diana somática que inicialmente no es pluripotente. El procedimiento por el cual se obtienen estas células, es estocástico en general. Sobre una célula adulta diferenciada procedente de un tejido adulto, se induce la expresión ectópica de varios factores de transcripción, tales como Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, capaces de de-diferenciarla. Las células iPSCs son capaces de de-diferenciarse a células de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales (pluripotentes) y de formar teratomas *in vivo* (Yamanaka and Takahashi, 2006). Se denomina reprogramación a esta de-diferenciación, y los factores de transcripción utilizados pueden variar en función del grado de maduración de la célula que se quiere reprogramar, y parece que cuanto más inmadura sea la célula de partida menor número de factores de “reprogramación” son necesarios. Los factores de transcripción ectópicos deben estar silenciados posteriormente para conseguir que la capacidad de diferenciación de las iPSCs no se vea restringida y que las iPSCs sean reales y no dependientes de factores exógenos (Ramos-Mejia et al., 2012).

### **1.2.1. Células troncales adultas**

Las células troncales adultas son células indiferenciadas con capacidad de auto-renovación y con posibilidad de diferenciarse hacia tipos celulares especializados del tejido origen (Clarke and Frisen, 2001; Weissman, 2000a). Esta subpoblación de células que se encuentra en los tejidos adultos, son las encargadas de mantener una reserva funcional para reemplazar a células diferenciadas sometidas a un desgaste continuo. Se han identificado y caracterizado células troncales adultas en la mayoría de tejidos aunque en un porcentaje muy pequeño. En condiciones de homeostasia fisiológica, las células troncales adultas se encuentran en estado latente hasta que proliferan en respuesta a un estímulo fisiológico. Las células troncales adultas tienen

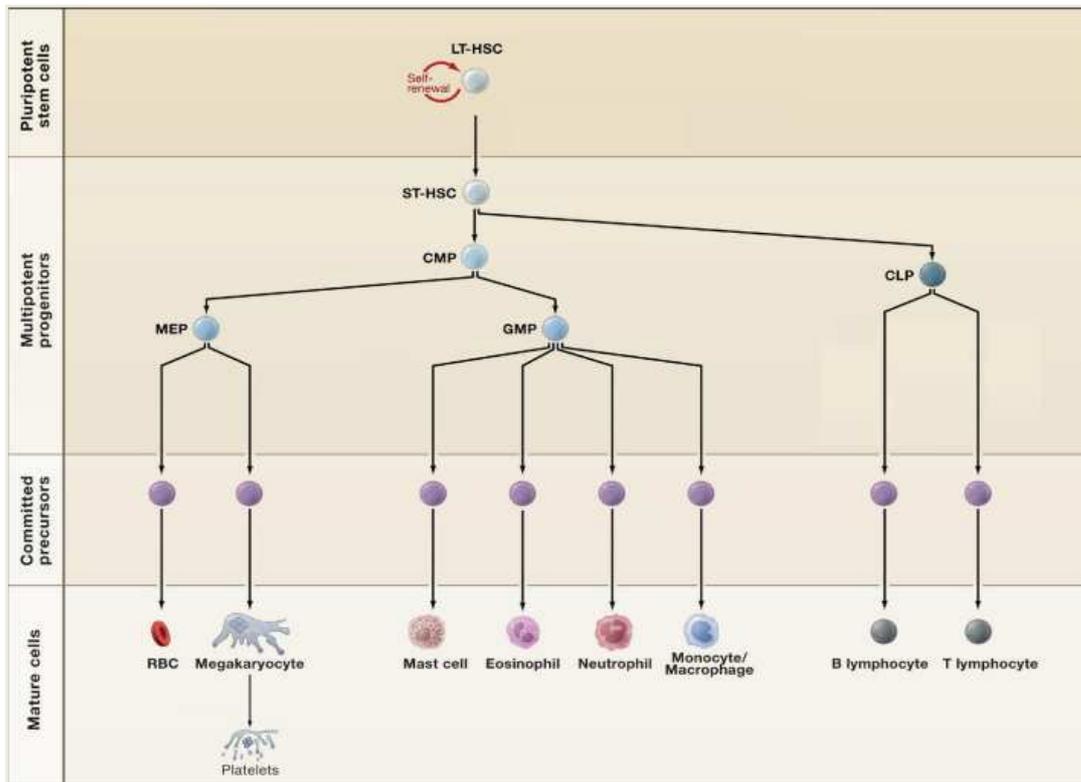
capacidad de renovación y de diferenciación hacia otros tipos celulares, pero en general de su mismo linaje embrionario (multipotentes). Sin embargo, existen varios estudios que aportan datos sugiriendo que la potencialidad de algunos tipos de células troncales adultas es mayor que la que en un principio se esperaría. Por ejemplo, las HSCs han demostrado capacidad para diferenciarse hacia diversos tejidos como hepatocitos (Lagasse et al., 2000), músculo cardíaco (Orlic et al., 2001), endotelio o tejidos derivados de las tres capas embrionarias (Daley et al., 2003; Grant et al., 2002; Krause et al., 2001; Priller et al., 2001). Este fenómeno por el que una célula troncal adulta de un tejido específico se diferencia a células de tejidos de otras capas germinales, se conoce como transdiferenciación o plasticidad celular, y no está exento de controversia, ya que mientras algunos estudios lo apoyan, otros trabajos cuestionan la existencia de dicha versatilidad celular, inclinándose por la idea de que es el resultado de fusiones celulares (Alvarez-Dolado et al., 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002). Esta capacidad también se ha demostrado en el caso de las células troncales mesenquimales (en adelante, MSCs, siglas inglesas de *Mesenchymal stem cells*) ya que las MSC han sido diferenciadas a tejido no mesodérmico como hepatocitos o células del sistema nervioso central (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2003).

A pesar de que existen células troncales en la gran mayoría de tejidos adultos, las células troncales adultas que mejor se conocen y que se usan en la actualidad en terapias celulares son las HSCs y MSCs.

#### **1.2.1.1. Células troncales hematopoyéticas**

La hematopoyesis es el proceso fisiológico por el cual se produce la síntesis de todos los tipos celulares que componen la sangre. Su funcionamiento correcto permite la formación de células responsables del transporte de oxígeno, coagulación sanguínea y de la inmunidad. Es un sistema celular organizado jerárquicamente (Figura 4),

dónde las HSCs se encuentran en la cúspide, en los niveles intermedios se encuentran los progenitores hematopoyéticos (en adelante, HPCs, siglas inglesas de *Hematopoietic Progenitor Cell*), y en la base las células maduras de los diferentes linajes.



**Figura 4:** Esquema representativo de la hematopoyesis. La HSCs tiene capacidad de auto-renovación y comprende a las células troncales hematopoyéticas con capacidad de repoblación a largo plazo (en adelante, LT-HSC, siglas inglesas de *Long Term Hematopoietic Stem Cell*), y a corto plazo (en adelante, ST-HSC, siglas inglesas de *Short Term Hematopietic Stem Cell*), que constituyen los progenitores multipotentes. Los progenitores multipotente tienen menor capacidad de auto-renovarse y se diferencian a progenitor linfoide común (CLP) y progenitor mieloide común (CPM) que a su vez originan progenitores granulocito-monocíticos (GMP) y progenitores eritroides megacariocíticos (MEP), los cuales continúan con su proceso de diferenciación generando las células maduras circulantes: eritrocitos, megacariocitos, mastocitos, eosinofilos, neutrofilos, monocitos, linfocitos B y linfocitos T (Adaptada de Stuart H Orkin y Leonard I. Zon, Cell 2008, Vol 132, pg 712).

Las HSCs son las que tienen mayor capacidad de auto-renovación y de diferenciación, son capaces de generar todas las clases de HPCs y de células maduras de los dos linajes principales de células hematopoyéticas: mieloide y linfoide. Sin embargo, su tasa de proliferación es baja ya que son los progenitores los

que tienen una alta capacidad proliferativa que va disminuyendo en estadios maduros.

Las HSCs se utilizan en clínica desde hace décadas en trasplantes de progenitores hematopoyéticos provenientes de médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre de cordón umbilical, ya que como hemos señalado, contribuyen a reconstruir todos los linajes celulares hematopoyéticos. Son células multipotentes, las únicas responsables de regenerar a largo plazo el sistema hematopoyético del receptor post trasplante, por ello se denominan LT-HSCs. Habitualmente se reconocen por un perfil de marcadores de superficie consistente en la expresión de la molécula CD34 y la falta de expresión del antígeno CD38, y de marcadores de distintos linajes (Lin), es decir son Lin-CD34+CD38-. El CD34 es uno de los antígenos mejor caracterizados que se expresa en las HSCs, en el 0,1% al 2% de las células de la médula ósea normal, incluyendo las unidades formadoras de colonias de todos los linajes y sus precursores, y esta expresión se va perdiendo durante el desarrollo hematopoyético, de tal modo que no aparece en las células maduras de sangre periférica (Civin et al., 1984; Greaves et al., 1985; Katz et al., 1985; Menendez et al., 1998; Satterthwaite et al., 1990). Las HSCs son capaces de contribuir a la angiogénesis y vasculogénesis *in vivo*, de tal manera que la fracción celular CD34+ no sólo contiene progenitores hematopoyéticos, sino también células progenitoras endoteliales (Yoder and Ingram, 2009). Existen evidencias sólidas que apoyan la hipótesis de His, que ya por el año 1900 defendía la existencia de un precursor común hematopoyético y endotelial denominado hemangioblasto, [His, *Abhandl. Math.-Phys. Ges. Wiss.*, **26**:171 (1900)]. Este término actualmente se usa de forma similar al término precursor hemogénico, que parece ser una célula mesodérmica embrionaria capaz de originar el endotelio vascular y células hematopoyéticas. Este precursor hemogénico es temprano en el desarrollo y es capaz de originar de forma clonal linaje hematopoyético y endotelial (Menendez et al., 2004; Rafii and Lyden, 2003; Wang et al., 2004; Wang et al., 2005b).

### 1.2.1.2. Células troncales mesenquimales

Las MSCs han sido definidas como células multipotentes presentes en la médula ósea que constituye una fuente de progenitores mesodérmicos (Pittenger et al., 1999). Los primeros estudios que se llevaron a cabo con estas células, comenzaron en la década de los sesenta y se extendieron hasta los setenta con los trabajos realizados por Friedenstein y colaboradores. (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1978; Friedenstein et al., 1968). Este grupo utilizó ratones para describir por vez primera una población de células adherentes de la médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daba origen al microambiente hematopoyético. A estas células se les denominó por primera vez unidades formadoras de colonias de fibroblastos (en adelante, CFU-F, siglas inglesas de *Colony Forming Units Feeders*).

La caracterización de estas células se realiza en base a criterios morfológicos, funcionales y fenotípicos propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (en adelante, ISCT siglas inglesas de *International Society for Cellular Therapy*) (Dominici et al., 2006). Según estos criterios, las poblaciones de MSCs deben: i) adherirse al plástico cuando se mantienen en cultivo; ii) expresar los marcadores de superficie CD105, CD73, CD90, CD166, y no expresar marcadores hematoendoteliales tales como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79b, HLA-DR y CD19; y iii) ser capaces de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Pittenger et al., 1999). Además de las MSCs derivadas de la médula ósea, existen células que cumplen estas propiedades en muchos otros tejidos. Así, se han podido aislar o derivar MSCs a partir de tejido adiposo, cordón umbilical, hígado, músculo, pulpa dental o hESCs, (da Silva Meirelles et al., 2006; Gonzalez-Rey et al., 2009; Kern et al., 2006; Sanchez et al., 2011; Yanez et al., 2006). En cualquier caso, parecen existir importantes diferencias entre propiedades de diferenciación *in vivo* de las MSCs derivadas de médula ósea y de otros tejidos (Bianco et al., 2008). Igualmente, no está claro aún si todas ellas mantienen el mismo potencial

inmunogénico/inmunomodulador.

El uso potencial de las MSCs en terapia celular, radica en algunas características claves: i) la capacidad de diferenciarse en células de varias estirpes, está establecido que las MSCs tiene capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica, (Pittenger et al., 1999), y además, está reportado que pueden diferenciarse a otros tejidos mesodérmicos como musculo esquelético, miocardio o tejido endotelial (Mosna et al., 2010; Salem and Thiemermann, 2010), e incluso se ha descrito la capacidad de algunas sub-poblaciones de MSCs para diferenciarse a tejido no mesodérmicos como hígado, páncreas y cerebro, (Dezawa et al., 2004), aunque este hecho es controvertido; ii) propiedades inmunomoduladoras de las MSCs con capacidad inmunosupresiva, ya que son capaces de inhibir la respuesta inmune generada en un organismo por otra causa (Le Blanc and Mougiakakos, 2012); iii) falta de inmunogenicidad, es decir, apenas provoca respuesta inmune, es decir son capaces de escapar al reconocimiento del sistema inmune de un organismo (Ringden et al., 2006); iv) capacidad de expansión *ex vivo*; v) capacidad para secretar factores solubles que modulan la capacidad proliferativa y la diferenciación de un amplio espectro de otras células diana y, vi) habilidad de migrar e injertar en tejidos dañados o tumorales. Todas estas características y sus propiedades inmunoprivilegiadas están siendo explotadas para distintas aplicaciones clínicas en terapia génica y celular, incluyendo la reparación de tejidos, el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped o de enfermedades autoinmunes, así como su uso como vehículo para drogas antitumorales (Garcia-Castro et al., 2008; Rodriguez et al., 2012).

Por otra parte, la obtención y cultivo de las MSCs puede llevarse a cabo sin demasiada dificultad en laboratorios con experiencia en cultivos celulares. Sin embargo, la estabilidad genética de estas células puede verse afectada tras permanecer en cultivo *in vitro* de forma prolongada. La estabilidad genética es crucial

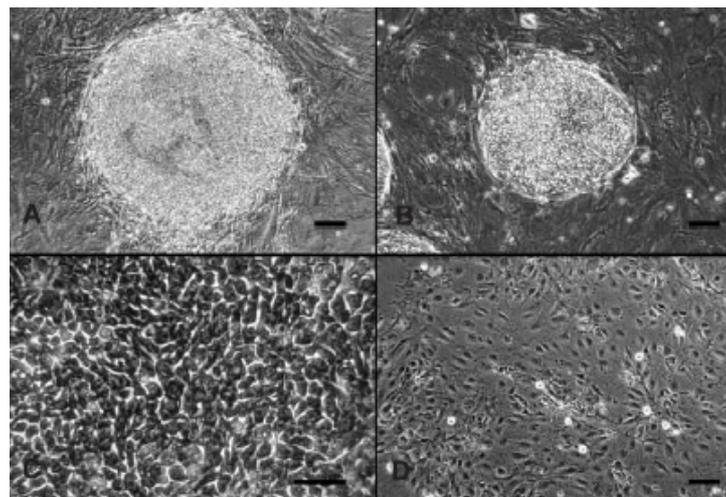
a la hora de utilizar las MSCs en aplicaciones clínicas concretas, ya que posibles alteraciones genéticas podrían comprometer su empleo con fines terapéuticos. En principio, fueron muchas las evidencias que ponían de manifiesto que estas células se mantienen euploides después de largo tiempo de cultivo, no detectándose anomalías cromosómicas ni mediante citogenética convencional ni tampoco por *arrays* de hibridación genómica comparada (en adelante, aCGH, siglas inglesas de *arrays Comparative Genomic Hybridization*) (Bernardo et al., 2007). No obstante, también se han reportado casos de aneuploidias dependientes de donante en el cultivo a largo plazo de MSCs, sin observarse en cualquier caso signos de transformación celular (Tarte et al., 2010). Incluso, trabajos que inicialmente describían transformaciones espontáneas en cultivos de MSCs de médula ósea o tejido adiposo (en adelante, ASCs, siglas inglesas de *Adipose Stem Cells*) determinaron que las alteraciones descritas en estos estudios se debieron a contaminaciones cruzadas de los cultivos de MSCs con líneas celulares epiteliales (Garcia et al., 2010; Torsvik et al., 2010). Por tanto, en principio todo ello sugeriría que el cultivo *ex vivo* de MSCs se mantiene estable sin que existan evidencias sólidas de transformación espontánea de las células *in vitro*, lo que apoyaría el uso seguro de las MSCs en aplicación clínica. Sin embargo, hoy en día este aspecto resulta controvertido, pues estudios recientes revelan la aparición de alteraciones cromosómicas en cultivos *in vitro* de MSCs a partir del quinto pase (Ferreira et al., 2012) y alteraciones en los cromosomas 6, 8 y 11 en cultivo de MSCs a partir del pase once y doce (Nikitina et al., 2011), por lo que numerosos trabajos sugieren que es necesario realizar análisis más completos para asegurar el empleo de estas células en terapia génica y celular (Binato et al., 2013).

### **1.2.2. Células troncales embrionarias humanas**

Las primeras ESCs se derivaron en 1981 a partir de blastocitos murinos (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), sentando las bases biológicas y metodológicas para la derivación de hESCs en 1998 a partir de la masa celular interna (en adelante, ICM,

siglas inglesas de *Inner Cell Mass*) de embriones sobrantes de ciclos de fecundación *in vitro* (Thomson et al., 1998) (Figura 5). Este hecho cobró gran relevancia en toda la comunidad científica puesto que albergaba esperanza para la curación de enfermedades que hasta el momento no tenían tratamiento. Este grupo consiguió derivar cinco líneas de hESCs utilizando un cultivo de fibroblastos de origen murino (en adelante, MEFs, sigla inglesa de *Mouse Embryonic Fibroblast*), como capa de células de soporte o también llamados *feeders*. Las cinco líneas denominadas H1, H7, H9, H13 y H14, fueron caracterizadas mediante técnicas fenotípicas y moleculares en estudios funcionales tanto *in vivo* como *in vitro* (Thomson et al., 1998).

Las hESCs constituyen una herramienta biológica sin precedentes no sólo para posibles aplicaciones en terapia celular, sino también para el *screening* de fármacos, modelo de estudio en el desarrollo embrionario y especificación tisular, y para el estudio de la etiología y patogénesis de enfermedades que se desarrollan en estadios prenatales (Jones and Thomson, 2000; Menendez et al., 2006; Reubinoff et al., 2000; Thomson and Odorico, 2000).



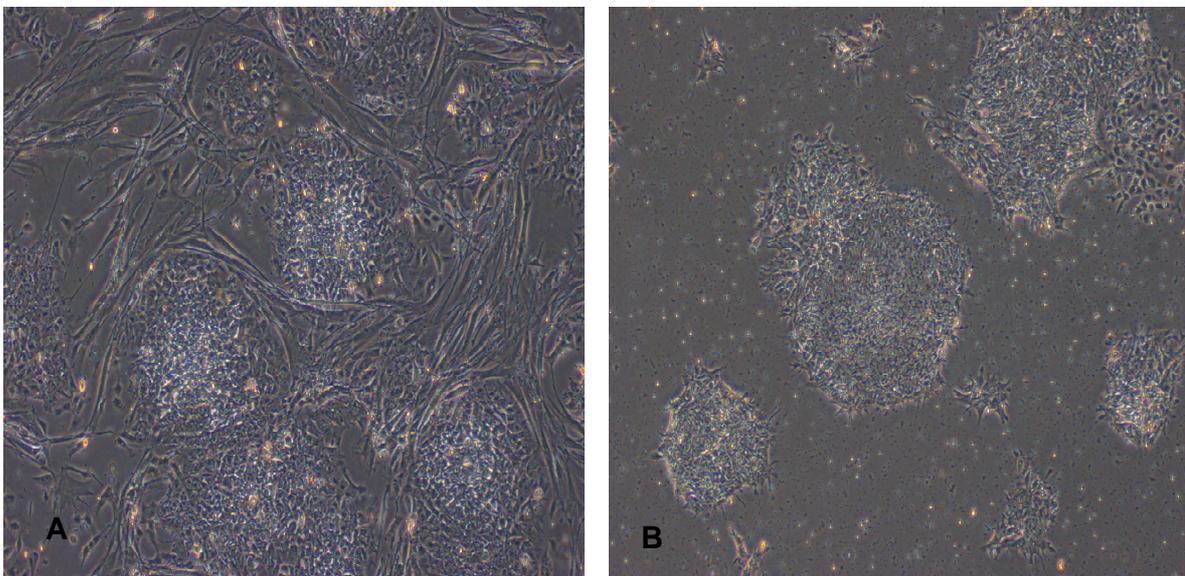
**Figura 5:** A. Colonia de células derivadas de la masa celular interna sobre fibroblastos de ratón ocho horas antes de disociarla por primera vez. B. Colonia celular de la línea embrionaria H9. C. Detalle de las células de la línea embrionaria H9 escalada a 50  $\mu\text{m}$ . D. Células diferenciadas de la línea embrionaria H9 a los cinco días de ser cultivadas sin fibroblastos de ratón. (Adaptada de Thomson et al 1998 Science, Vol. 282)

Las hESCs que se originan de cultivos celulares derivados a partir de la ICM del blastocisto además de la capacidad de auto-renovación, tienen capacidad de diferenciarse hacia células de cualquier linaje, lo que en definitiva significa, capacidad de formar las células de todos los tejidos del organismo (pluripotencia). Las hESCs además, deben de cumplir una serie de requisitos para que puedan ser consideradas como pluripotentes. Estos requisitos los podemos resumir en: i) capacidad para propagarse en estado indiferenciado, pudiendo experimentar un número ilimitado de divisiones simétricas sin diferenciarse; y ii) demostrar capacidad de diferenciación hacia todos los tejidos pertenecientes a las tres capas germinales, tanto *in vitro*, como *in vivo*. En cuanto a la capacidad de diferenciación *in vitro*, la forma común es mediante formación de cuerpos embriones (en adelante, EB, siglas inglesas de *Embryoid Bodies*). *In vivo* se manifiesta la capacidad de diferenciación mediante la formación de teratomas al inyectar las hESCs en ratones inmunodeprimidos. Esta metodología demuestra la capacidad de las células para diferenciarse hacia las tres capas embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo (Reubinoff et al., 2000). En la actualidad ya hay grupos trabajando en el desarrollo de una metodología basada en plataformas bioinformáticas para medir la expresión de ciertos mRNAs característicos en células pluripotentes, como es el caso del “Pluritest”, que consiste en un plataforma bioinformática que predice el grado de pluripotencialidad de un cultivo celular sin necesidad de generar teratomas. Este ensayo cada vez está mas consolidado en el campo (Muller et al., 2008).

Además, cobra importancia en la derivación, el mantenimiento y la estandarización de los cultivos de hESCs, mantenerlos estables genéticamente tras cultivarlos durante largos periodos, ya que si no es así las hESCs no resultarían seguras en el posible uso terapeutico o al ser utilizadas como herramienta para modelos de enfermedad (Draper et al., 2004a; Menendez et al., 2006). Las hESCs crecen en colonias con una morfología epitelial y presentan positividad para los antígenos de pluripotencia SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81. Además, expresan factores de transcripción que

demuestran su estado pluripotente como son Oct3/4, Nanog, Rex-1, DMNT1 y Sox-2 (Chambers et al., 2003; Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000).

La ausencia de alteraciones genéticas es una cualidad buscada en las hESCs para cualquiera de sus posibles aplicaciones. En alguna de las líneas celulares con las que se trabaja en la actualidad, a nivel mundial, se han observado cambios cromosómicos gruesos, como trisomias, y en muchas otras se han observado alteraciones más finas como microdeleciones, amplificaciones, o variaciones en el número de copias de un gen. Estos cambios genéticos menores se conocen como variación en el número de copias (en adelante, CNV, siglas inglesas de *Copy Number Variation*). Algunas de estas alteraciones se han relacionado con fenómenos de oncogénesis (Draper et al., 2004b), mientras que la relevancia funcional de muchas otras hoy en día se desconoce. Estas alteraciones se han asociado a la adaptación de las células a las condiciones de cultivo (con o sin *feeder*) (Figura 6) o al uso de diferentes métodos enzimáticos en las prácticas de cultivo (Imreh et al., 2006).



**Figura 6:** A. Colonias de hESCs cultivadas sobre *feeders*. B. Colonia de hESCS cultivadas en un sistema libre de *feeders*. Ambos tipos de colonias son de la línea celular AND1, derivada en el Banco Andaluz de Células Madre (BACM) en el año 2008. (Imagen cedida por el BACM).

Por todo ello, es importante controlar la estabilidad cariotípica y genética de las células tanto *in vivo* como *in vitro*, estableciendo protocolos de actuación con todas aquellas técnicas a nuestro alcance que nos permitan obtener la más precisa información del estatus genético de las hESCs (Meisner and Johnson, 2008; Zucchelli et al., 2012).

### **1.3. Estabilidad genética de las hESCs**

Las hESCs han supuesto un considerable avance, no sólo en medicina regenerativa y terapia celular, sino también en biología básica. El potencial uso terapéutico y como herramienta biológica de las hESCs requiere garantías de calidad, seguridad y trazabilidad mediante la implantación de exhaustivos programas de control de calidad, como quedó de manifiesto en las directrices propuestas por una iniciativa internacional de banco de células troncales (en adelante, ISCBI siglas inglesas de *International Stem Cell Banking Initiative*) (Adewumi et al., 2007). Esta directrices tenían como objeto establecer unos estándares de calidad de aplicación mundial en el ámbito de las hESCs, para la derivación, caracterización, y mantenimiento de las mismas para su uso en investigación (Andrews et al., 2009).

Uno de los principales problemas de las hESCs es la aparición de alteraciones cromosómicas e inestabilidad genómica tras periodos de cultivo extenso (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004b; Imreh et al., 2006; Inzunza et al., 2004; Maitra et al., 2005; Menendez et al., 2005a; Menendez et al., 2005b; Mitalipova et al., 2005; Moralli et al., 2010; Ringden et al., 2003; Rosler et al., 2004). Por esta razón es necesario analizar el estatus cromosómico y, por supuesto, emplear técnicas de alta resolución para su evaluación. De otro modo, difícilmente podremos desarrollar modelos de enfermedad fiables, entender mecanismos reales que regulen el balance entre pluripotencia y especificación celular, o avanzar hacia futuras aplicaciones terapéuticas con hESCs o su progenie (Buzzard et al., 2004; Mandal et al., 2006; Ringden et al., 2003). No debemos olvidar que las anomalías genéticas pueden

actuar como eventos oncogénicos que cooperan con las mutaciones o genes de fusión ectópicos que se pretenden estudiar.

La estabilidad cromosómica en una línea celular consiste, en el mantenimiento de un cariotipo normal tanto numérica como estructuralmente. Muchas hESCs desarrollan, tras sucesivos pases en cultivos, aberraciones cromosómicas, adquiriendo un estatus genético inestable (Allegrucci and Young, 2007; Andrews et al., 2005; Baker et al., 2007; Brimble et al., 2004; Caisander et al., 2006; Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004b; Hanson and Caisander, 2005; Inzunza et al., 2004; Laurent et al., 2011; Ludwig et al., 2006; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005; Moon et al., 2011; Moore et al., 2010; Moralli et al., 2010; Narva et al., 2010; Rosler et al., 2004; Spits et al., 2008; Stephenson et al., 2010; Zucchelli et al., 2012). Esto podría deberse a las características propias del cultivo de las hESCs. Algunos trabajos han revelado sin embargo, la posibilidad de que esto ocurra debido al método de sub-cultivo utilizado, de forma que, la disección mecánica de las células preservaría su integridad genética mejor que los métodos enzimáticos (Brimble et al., 2004; Buzzard et al., 2004; Cowan et al., 2004; Meisner and Johnson, 2008; Mitalipova et al., 2005), aunque se ha encontrado alguna aneuploidía esporádica en cultivos sometidos a pases mecánicos (Buzzard et al., 2004; Caisander et al., 2006). No podemos obviar que estas alteraciones cromosómicas más o menos groseras que se han descrito en las hESCs no son exclusivas en células humanas, y en iPSCs, ya que también se ha descrito la aparición de alteraciones cromosómicas en ESCs derivadas de embriones de ratón, lo cual demuestra que las células troncales de otras especies también son susceptibles de generar inestabilidad genética (Cortes et al., 2008; Guo et al., 2005; Miura et al., 2006; Rebuzzini et al., 2008).

En muchos casos las alteraciones cromosómicas que adquieren las hESCs afectan a unos cromosomas en concreto. Es el caso de los cromosomas 12, 17 y X, cuyas aneuploidías han sido reportadas de modo recurrente (Blum and Benvenisty, 2009;

Brimble et al., 2004; Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004b; Hanson and Caisander, 2005; Inzunza et al., 2004; Lakshmiopathy et al., 2004; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005; Rosler et al., 2004). Es importante resaltar, que las alteraciones cromosómicas observadas en hESCs, son comunes a las observadas en sus homólogos tumorales, las células madre de carcinoma embrionario (Brimble et al., 2004; Clark et al., 2004). De hecho, el extra cromosoma 12p, es común en células primitivas de teratocarcinoma (Clark et al., 2004; Draper et al., 2004b; Skotheim et al., 2002) y la amplificación del 17q, está asociada a un tumor infantil con posible origen prenatal, el neuroblastoma (Westermann and Schwab, 2002). Además, genes que controlan la auto-renovación, pluripotencia, diferenciación y apoptosis tales como, STELLAR, NANOG, GDF3, GRB2, BIRC5 y NT3, están localizados en estos cromosomas (Burdon et al., 2002; Clark et al., 2004; Chiou et al., 2003; Pyle et al., 2006), y el cultivo *in vitro* como *in vivo* puede posibilitar la selección de las células con mayor número de copias de estos genes.

Otros estudios revelan la aparición de anomalías cromosómicas en aproximadamente el 20% de las células que componen el cultivo, apareciendo en la mayoría de los casos alteraciones en mosaico (Hoffman and Carpenter, 2005). Es posible, incluso, que los métodos enzimáticos puedan favorecer la selección de clones portadores de mutaciones o translocaciones cromosómicas que les confiera alguna ventaja proliferativa (Mikkola et al., 2006). Sin embargo, las hESCs expandidas por cultivo mecánico mantenidas de forma prolongada han sido cromosómicamente estables después de procesos de congelación-descongelación tras más de 35 meses (Hanson and Caisander, 2005). Otros autores proponen que los cultivos con disgregación mecánica, deberían usarse inicialmente para los primeros 20-30 pases, para asegurarse de este modo, el establecimiento de un stock de congelación cromosómicamente correcto (Crook et al., 2010). Sin embargo, no podemos olvidar que las características intrínsecas de la línea celular desde el momento de la derivación pueden jugar un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad

cromosómica, ya que líneas diferentes sometidas a las mismas condiciones de cultivo, pueden manifestar distinto grado de inestabilidad indicando variaciones en cuanto a la adaptación al medio y diferentes grados de predisposición a adquirir cierta inestabilidad cromosómica. Incluso, el origen del embrión del que procede la línea, puede condicionar esta inestabilidad, ya que entorno al 50% de los embriones generados por fecundación *in vitro* (en adelante, FIV), tienen alteraciones cromosómicas como aneuploidías, poliploidías y haploidías (Hanson and Caisander, 2005; Harper et al., 1995; Ilic et al., 2010; Marquez et al., 2000; Munne et al., 1994; Voullaire et al., 2002; Wilton, 2002), y muchas de estas alteraciones no son compatibles con el desarrollo embrionario.

Por tanto, con los datos recopilados hasta ahora (Tabla 1), parece que existen alteraciones cromosómicas capaces de tener una relevancia en la homeostasis/estabilidad de los cultivos, pero en el caso de otras alteraciones, principalmente las pequeñas deleciones, amplificaciones o CNVs, el efecto sobre la homeostasis y el fenotipo de los cultivos estaría aún por determinar. Algunos trabajos publicados describen alteraciones genéticas de las hESCs determinadas mediante técnicas de alta resolución (Elliott et al., 2010; Narva et al., 2010; Wu et al., 2008; Zucchelli et al., 2012). Sin embargo, no se establece el efecto directo de dichas alteraciones en el comportamiento de las líneas de hESC estudiadas. Puede ser que afecten el genotipo de las células, alterando la regulación de secuencias concretas mediante la amplificación de genes o eliminación de copias. Si se ha descrito, que los CNVs alteran el nivel de expresión de alrededor del 30% de los genes en los que se presentan, y casi la mitad de ellos están relacionados con procesos oncológicos (Narva et al., 2010).

Referencia	Tipo celular	Pases de cultivo	Método de análisis	Alteración cromosómica encontrada
Amit et al 2000	hESCs	175	SKY Cariotipo	Ninguna
(Brimble et al., 2004)	hESCs	84	Cariotipo	Trisomia de 1,7,8,12,14,17, X
(Buzzard et al., 2004)	hESCs	134	Cariotipo	46,Y,t(X;17)(p11;p13)
(Cowan et al., 2004)	hESCs	46	Cariotipo	Trisomia 12, (2q+)
(Draper et al., 2004b)	hESCs	65	Cariotipo FISH	Trisomia 12,17q y17; Isocromosoma 12p
Inzunza et al. 2004	hESCs	61	Cariotipo, CGH, FISH	Amplificación Xqter-Xq21; Delección Xq21-Xter 46,X, idic(X)(q21)
Rosler et al 2004	hESCs	~99	Cariotipo	Trisomia 20 (anomalía más frecuentemente encontrada )
Heins et al 2004	hESCs	~78	Cariotipo FISH	Trisomia 13 Triploidia
Mitalipova et al. 2005	hESCs	105	Cariotipo FISH	Trisomia 12,14,17,20 y X
Sjogren-Jansson et al. 2005	hESCs	35	Cariotipo FISH	Ninguna
Maitra et al. 2005	hESCs	205	SNP, FISH, Q-PCR	Amplificación 1,8,17q,20 Delección 13,18
Imreh et al. 2006	hESCs	86	Cariotipo FISH	Trisomia12 Isocromosoma 12p Delección 7q,18
Xiao et al 2006	hESCs	>20	Cariotipo SKY	Extra copia 17q Traslocación t(10;17)
Caisander et al. 2006	hESCs	148	Cariotipo, CGH, FISH	Trisomia 13
Prokhorovich et al. 2007	hESCs	53	Cariotipo	Ninguna
Lefort et al.	hESCs	150	FISH,	Trisomia 12,

2008			aCGH SNP	Duplicación 20q11.21
Spits et al. 2008	hESCs	276	aCGH	Duplicación 3q26.33q27.2; 5q14.qter, 7q33qter; 8q24.21, 11q24.2q25 y 20q11.21. Trisomía 17 y 22 Deleción 18, Monosomía 18
Wu et al. 2008	hESCs	120	aCGH	Amplificación 1q21.3, 11p15.5 y 20q11.21. Deleción 4q13.2, 6p21.32, 7q34, 19p12 y 22q11.23
Katayama et al 2001	hESCs	N.D	Cariotipo	Ninguna
Tian et al 2005	hESCs	N.D.	Cariotipo	Ninguna
Mollamoham madii et al.2009	iPSCs hESCs	8 ND	Cariotipo	Ninguna
Pakzad et al 2010	iPSCs	16	Cariotipo	Ninguna
Totonchi et al 2010	iPSCs	24	Cariotipo	Ninguna
Elliot et al. 2010	iPSCs	N.D.	Cariotipo aCGH	Trisomía 1, 20 Duplicación 5q23.1-q33.2, 22q13.31
Mayshar et al 2010	iPSCs hESCs	63	Gene Expressio n Profiling CGH, Cariotipo	Trisomía 1,3,9,12,17, y 20 Duplicación parcial 1p, 3,6,8,9p11,12,16. Deleción parcial 1,2,3,4,8,9,11,15,16q,17,1 9,21
Laurent et al 2011	iPSCs hESCs	5-34 21-28	SNP	Trisomía 1, 3, 5, 12, 15,16, 17, 20, 21, y X Duplicación 5, 12, 17 y 20. Deleción 7q
Ramos-Mejia	iPSCs	7	Cariotipo	Traslocación t(1;17)

et al. 2010			SKY	Trisomia 5
Werbowski-Ogilvie et al. 2009	hESCs	20-24	Cariotipo, SKY, aCGH	Amplificación 20q11.1-11.2 Delección 5q34a-5q34b;5q3 Trisomia en mosaico 12
Moon et al 2011	hESCs	N.D	Cariotipo	Trisomia 12
Moore et al 2010	hESCs	40	aCGH Cariotipo	Ninguna
Narva et al 2010	hESCs	N.D	SNPs	CNV LOH
Elliot et al 2010	hESCs iPSCs	N.D	aCGH	Pequeñas duplicaciones y alteraciones estructurales
Martins-Taylor et al 2011	iPSCs	>13	Cariotipo FISH aCGH	Alteración 17, 21 Amplificación 20q11.1-11.2 CNVs 1q31.3, 17q21.1 Traslocación t(17;21)
Zuchelli et al 2012	hESCs	N.D	SNP	Ganancia parcial X

**Tabla 1:** Resumen de las alteraciones citogenéticas descritas en hESCs y iPSCs con diferentes técnicas de detección. (N.D: pases de cultivo no determinado)

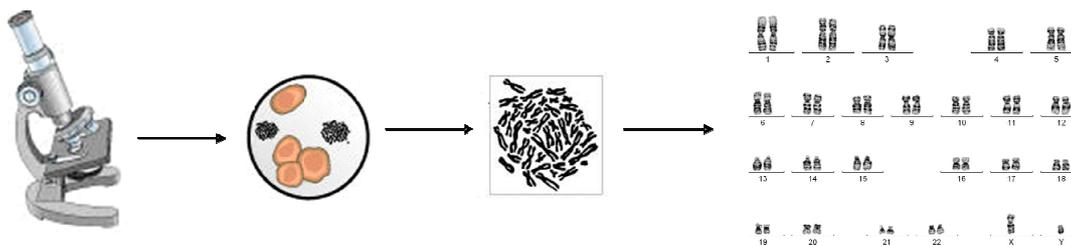
A continuación se describen las técnicas de citogenética empleadas para la evaluación de la estabilidad cromosómica, principalmente de hESCs y MSCs, utilizadas en esta tesis doctoral. Se han utilizado diferentes métodos que han aportado resultados complementarios en cada uno de los casos estudiados, ya que no todas las técnicas empleadas tienen la misma resolución, hemos conseguido al combinarlas, un análisis más detallado del estatus cromosómico de los tipos celulares utilizados en nuestros trabajos.

### 1.3.1. Métodos de Estudio

#### 1.3.1.1. Cariotipo convencional

En los últimos cincuenta años, el análisis del cariotipo ha sido una prueba estándar

para la detección de anomalías cromosómicas. La extensión de la muestra, previamente tratada, para obtener cromosomas que posteriormente se les aplica una tinción para poner de manifiesto las bandas cromosómicas y comparar las parejas de homólogos, ha sido la metodología empleada desde hace años (Seabright, 1971; Yunis, 1976). Esta técnica descrita a principios de los años setenta (Figura 7), es aún hoy informativa y se sigue utilizando para la detección de anomalías en innumerables patologías, con una sensibilidad estimada entre 5-20 Mb. Sin embargo, bajo las mejores condiciones, la resolución de la técnica es considerada aproximadamente de 5 Mb, mientras que en algunas regiones del genoma, alteraciones de 10 Mb pueden ser muy difíciles de detectar.

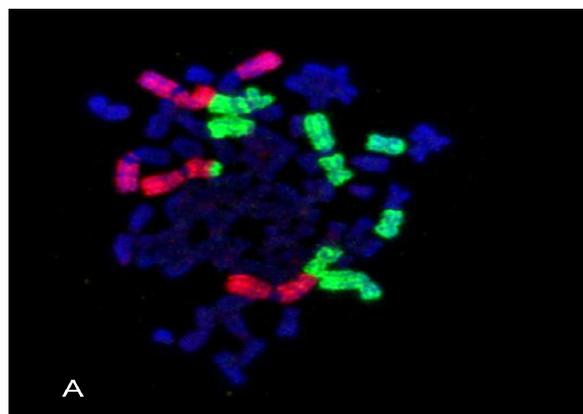


**Figura 7:** Metodología realizada desde los años 70 para el estudio de la dotación cromosómica de una muestra. Los cromosomas son obtenidos después de detener el ciclo celular en mitosis, lisar y fijar los núcleos y posteriormente estudiar los cromosomas una vez teñidos adecuadamente.

A pesar de todo ello, el cariotipo convencional, se ha utilizado para la detección de cromosopatías como test mínimo recomendado en el depósito de una línea celular embrionaria por el consenso de ISCBI. No obstante, las recomendaciones de esta organización en su última reunión de Junio de 2013 es utilizar además, técnicas de mayor resolución como los *arrays* de hibridación genómica comparada (en adelante, aCGH, siglas inglesas de *Arrays Comparative Genomic Hybridization*) y polimorfismos de un solo nucleótido (en adelante, SNP, siglas inglesas de *Single Nucleotide Polymorphism*).

### 1.3.1.2. Hibridación *in situ* fluorescente

A finales de 1980, las tecnologías de clonaje y el aumento en la sensibilidad de los anticuerpos, facilitaron el rápido desarrollo de las metodologías basadas en hibridación *in situ* fluorescente (en adelante, FISH, siglas inglesas de *Fluorescence in situ hybridization*). El fundamento de la FISH es la hibridación de una sonda de ADN marcada con un fluorocromo sobre una secuencia complementaria del genoma, bien en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase, lo que representa una ventaja sobre el cariotipo convencional, ya que no se necesita células en crecimiento (Figura 8). Las alteraciones cromosómicas de un tamaño menor a 5 Mb o las reorganizaciones crípticas son difíciles de identificar mediante la técnica de bandeo cromosómico debido a que la sensibilidad de la técnica no permite su detección. Las técnicas de citogenética molecular basadas en FISH y que combinan la citogenética convencional con la genética molecular intentan paliar, dichas limitaciones. Estas técnicas aportan una mayor información que permite una completa caracterización del cariotipo. La técnica de FISH permite detectar anomalías numéricas y estructurales que con frecuencia pueden pasar desapercibidas con técnicas de bandeo cromosómico (Catalina et al., 2007). Sin embargo, es importante remarcar que la técnica de FISH se elige cuando queremos poner de manifiesto alguna alteración que se sospecha previamente. No se trata de una técnica para estudiar el genoma completo, ya que el fundamento es la elección de una sonda o sondas determinadas para la evaluación del estatus de genes o cromosomas concretos.



**Figura 8:** A) Marcaje de FISH sobre el cromosoma 1 (rojo) y 5 (verde) en un núcleo en metafase de un cultivo de la línea celular HELA.

En investigación con hESCs, la técnica de FISH ha sido utilizada con éxito para la detección de anomalías cromosómicas, confirmando trisomía parcial o completa de los cromosomas 12 y 17, trisomía en el cromosoma 13 y otras alteraciones en la que se ven implicados los cromosomas sexuales (Caisander et al., 2006; Draper et al., 2004b; Heins et al., 2004; Ludwig et al., 2006; Mitalipova et al., 2005; Sjogren-Jansson et al., 2005). También es utilizada de rutina en el diagnóstico, pronóstico e incluso indicador terapéutico en neoplasias hematológicas de muy diversa índole.

### 1.3.1.3. Multi FISH (M-FISH) y cariotipo espectral

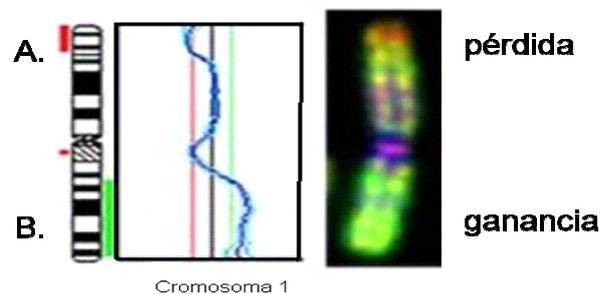
Basadas en el fundamento de las técnicas de fluorescencia, en 1996 se desarrollaron dos tecnologías diferentes en metodología pero similares en cuanto a objetivo, sensibilidad y resolución: hibridación *in situ* fluorescente multicolor (en adelante, M-FISH, siglas inglesas de *Multicolor Fluorescence in situ Hybridization*) (Speicher et al., 1996) y el cariotipo espectral (en adelante, SKY, siglas inglesas de *Spectral Karyotyping*) (Schrock et al., 1996). Ambas técnicas permiten la detección e identificación simultánea de todos los cromosomas humanos, (también está desarrollada la técnica para la detección de alteraciones cromosómicas en ratón), mediante la combinación de cinco fluorocromos, las diferentes sondas de ADN se hibridan simultáneamente sobre los cromosomas en metafase, consiguiendo de esta forma que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás, de este modo, cada pareja queda “pintado” en un solo color. La principal diferencia entre las dos técnicas es la manera en la que las imágenes de color son capturadas. Estas técnicas poseen una resolución de aproximadamente 1 Mb, necesita células en cultivo para obtener las metafases, y tanto el M-FISH como el SKY, se han mostrado muy útiles, principalmente, en neoplasias hematológicas donde no es difícil obtener metafases tumorales, lo que ha propiciado la

caracterización de traslocaciones complejas, y la detección de alteraciones cromosómicas crípticas en cariotipos aparentemente normales, combinando la sensibilidad de la técnica de FISH con la ventaja del análisis citogenético convencional, se obtiene una visión global de todas las alteraciones cromosómicas en un único experimento. Esto ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas, lo que ha facilitado la búsqueda de nuevos genes implicados en esas alteraciones (Rao et al., 1998; Sawyer et al., 1998; Veldman et al., 1997). En investigación con hESCs, se ha usado el SKY, ya que junto con otras técnicas más sensibles, tratan de paliar las limitaciones de la técnica clásica de bandeado cromosómico, con objeto de garantizar un análisis más riguroso de la estabilidad cromosómica de hESCs (Amit et al., 2000; Imreh et al., 2006; Xiao et al., 2006).

#### **1.3.1.4. Hibridación genómica comparada**

Otra técnica de citogenética molecular descrita en esta década, es la hibridación genómica comparada CGH (Kallioniemi et al., 1992). En esta técnica se emplea ADN de la muestra objeto de estudio, no es necesario obtener metafases, y por tanto, obviamos la necesidad de células en crecimiento. La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento de las alteraciones genéticas en neoplasias humanas. La metodología se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs, ADN de referencia y ADN problema, marcados con diferentes fluorocromos, rojo y verde respectivamente, e hibridados sobre metafases normales. El principio fundamental de la CGH es que la cantidad de ADN que hibrida sobre la metafase es proporcional al número de copias de cada secuencia, de tal modo que una vez se excita la muestra a diferente longitud de onda se comparan los resultados obtenidos para cada fluorocromo. De esta forma si una zona del cromosoma reporta una mayor cantidad de fluorescencia verde, se interpretará como mayor proporción de ADN problema, interpretándose como una ganancia de material genómico en esa región. Si por el contrario, la mayor excitación se reporta en color rojo en una zona del cromosoma, se

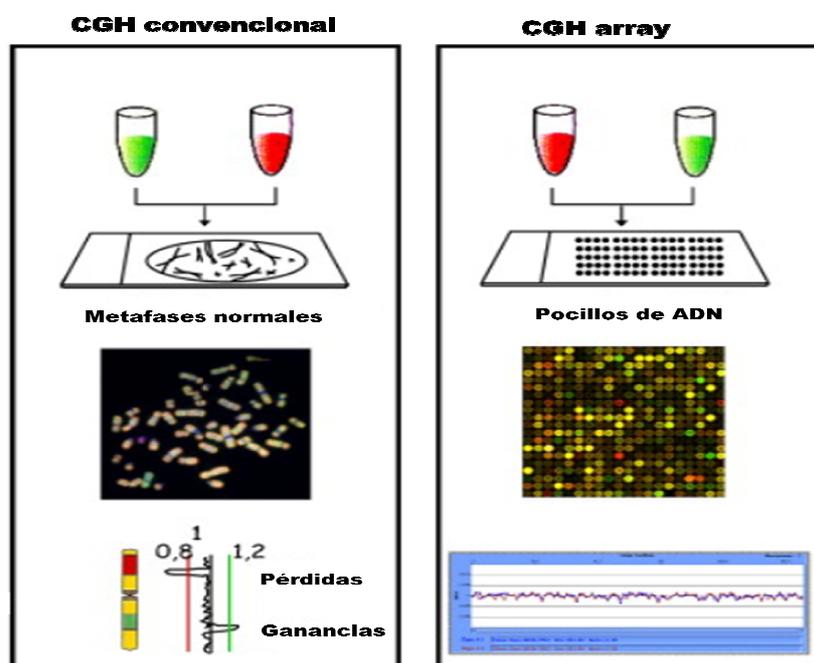
identificará con una mayor proporción de ADN control. Como este ADN control tiene una dotación genética normal, no se interpretaría como una mayor proporción de ADN control, sino como una menor proporción de ADN muestra, o lo que es lo mismo, como una delección. Finalmente, una relación 1:1 en la excitación de ambas muestras, indica una misma cantidad de ADN. Por tanto esta técnica además de definir patrones de ganancias y pérdidas específicas (Figura 9), proporciona información para la identificación de nuevos genes implicados en procesos oncológicos.



**Figura 9:** El principio básico de la CGH es que la cantidad de ADN que hibrida sobre la metafase es proporcional al número de copias de cada secuencia. A. Pérdida de material en 1p terminal presentando un espectro rojo en ese fragmento. B. Ganancia prácticamente completa de 1q con un espectro totalmente verde.

En tan sólo 8 años desde su aparición, se publicaron más de 3800 trabajos de CGH en tumores (Forozan et al., 1997; Gebhart and Liehr, 2000; Knuutila et al., 1999; Knuutila et al., 1998; Zitzelsberger et al., 1997), de los que 1 de cada 10 corresponden a leucemias y linfomas (Lichter et al., 2000). En el campo de las hESCs, también ha sido utilizada aportando información más precisa en cuanto al estatus genético de estas células, encontrando alteraciones que hubieran pasado desapercibidas (Caisander et al., 2006; Inzunza et al., 2004; Lefort et al., 2008; Pickering et al., 2003). Sin embargo, la vigencia de esta técnica ha sido muy breve y su uso se limita apenas a una década, pues ha sido prácticamente desplazada por los *arrays* de CGH, cuya metodología es parecida pero varía en la resolución, y además la hibridación se realiza sobre pocillos, no sobre metafases, y cada pocillo contiene fragmentos genómicos inmovilizados, aumentándose de este modo el número de

copias diana (Figura 10). Como ocurría con la técnica convencional, se marcan ambos ADN y se hibridan sobre los pocillos. Los *arrays* de CGH son mucho más precisos que la CGH en metafase pudiéndose distinguir con precisión los puntos de corte de las alteraciones cromosómicas, así como pequeñas deleciones o duplicaciones que con los de metafase no podían ser distinguibles, por su menor resolución.



**Figura 10:** Esquema simplificado de CGH convencional y CGH *arrays*. En la figura se representan las principales diferencias tanto en la hibridación (metafases y pocillos de ADN) como en el análisis de los resultados.

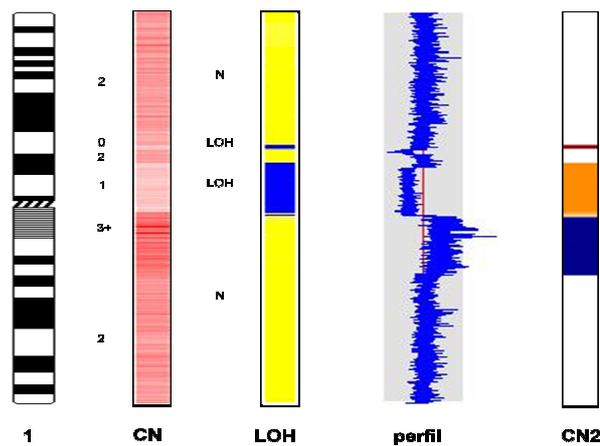
### 1.3.1.5. Técnicas de alta resolución basadas en *Arrays* de mapeo

La secuenciación del genoma humano, los avances en las técnicas de miniaturización y el desarrollo de la bioinformática, han permitido el desarrollo de los *microarrays* o biochips de ADN. Esta tecnología permite el análisis comparado y simultáneo del estado de miles de genes en diferentes condiciones biológicas mediante ensayos de hibridación. Desde el desarrollo del primer *chip* de ADN en 1995 (Schena et al.,

1995), la comunidad científica ha especulado sobre las distintas posibilidades que esta tecnología puede ofrecer en el campo de la biomedicina. Combinando la tecnología de los *microarrays* y la CGH convencional, se describió en 1997 (Solinas-Toldo et al., 1997) los *arrays* de CGH en la que la hibridación se realiza sobre fragmentos de ADN de menor tamaño. Hoy en día, se han consolidado en el área de la biomedicina y hay más de 15000 *arrays* depositados en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en adelante, NCBI, siglas en inglés de *National Center for Biotechnology Information*).

Los *arrays* de mapeo genético basados en la hibridación genómica comparada (*arrays*-CGH o aCGH) o en la tecnología de SNPs, representan una técnica de mapeo de alta resolución que permite estudiar el genoma completo detectando alteraciones numéricas. Los *arrays* ofrecen numerosas ventajas respecto a las técnicas de cariotipo convencional e incluso de citogenética molecular debido a su reproducibilidad, su rapidez y, por supuesto, su resolución que permite el mapeo preciso y exacto de los cromosomas ya que incrementan la resolución de Mb a Kb. Estos *arrays* de mapeo permiten analizar detalladamente el perfil de todos los cromosomas, (Figura 11), determinar el número de copias cromosómicas, el estado de heterocigosidad de los alelos para cada gen y la identificación de regiones homocigóticas resultantes de la pérdida de heterozigosis (en adelante, LOH, siglas inglesas de *Loss heterozygosity*) (Narva et al., 2010; Shinawi and Cheung, 2008).

La resolución de los *arrays* de mapeo es aparentemente ilimitada, dependiendo únicamente del tamaño y del espaciamiento de las sondas de nucleótidos en el propio *array*. Sin embargo, esta técnica como cualquier otra, tiene algunas limitaciones como es la incapacidad para detectar reordenamientos tales como traslocaciones e inversiones o alteraciones con un nivel de mosaicismo próximo o menor al 10% (Scott et al., 2010).



**Figura 10:** Figura representativa del estado del cromosoma 1 por *array* de mapeo genético. A la derecha del ideograma se presentan las ventanas de número de copias cromosómicas (en adelante, CN, siglas inglesas de *copy number*); LOH, pérdida de heterocigosis; N, normal; y perfil del cromosoma según el *array* de SNP. Las tres primeras ventanas se obtuvieron con el software dChip. Para CN, los grados de rosa pálido a rojo oscuro reflejan el número de copias desde cero a tres respectivamente; para LOH, lo normal está en amarillo y LOH en azul. El perfil muestra el CN normal con la línea umbral (azul) localizada en el centro sobre la línea roja, la distribución de la línea umbral a la izquierda o a la derecha se presenta en situaciones de pérdida y ganancia respectivamente. La cuarta ventana, CN2, representa la imagen del número de copias cromosómicas interpretada por el software BedStudio; donde los colores naranja y marrón representan pérdida de una y dos copias respectivamente, el color azul representa ganancia cromosómica, y el resto del patrón en blanco hace referencia a número copias igual a dos. El perfil y los datos de CN evidencian pérdida de 1p12-p21 y 1p22 con LOH de estas mismas regiones, y ganancias en 1q12-q23 de tres o más copias cromosómicas. (Imagen del BACM).

Hoy en día, no son pocos los laboratorios que han introducido para el análisis genómico de hESCs los *arrays* de mapeo genético, detectando alteraciones subcariotípicas que potencialmente pueden afectar al fenotipo celular de las líneas estudiadas. Se han utilizado *arrays* de SNPs de diferente densidad variando desde *arrays* con una resolución de 25 kb (Josephson et al., 2006; Lefort et al., 2008; Maitra et al., 2005) hasta *arrays* de 0.7 kb (Hovatta et al., 2010; Narva et al., 2010). También se han empleado *arrays* de CGH con una resolución entre 1 Mb a 6,4 kb (Elliott et al., 2010; Lefort et al., 2008; Liang et al., 2008; Spits et al., 2008; Werbowetski-Ogilvie et al., 2009; Wu et al., 2008). Además, se han empleado conjuntamente los *arrays* de CGH y de SNPs, estos últimos evidenciando mayor resolución (Hovatta et al., 2010;

Lefort et al., 2008). Por ejemplo, se han detectado zonas en el genoma en las hESCs en donde la inestabilidad cromosómica es recurrente para un fragmento concreto del brazo q del cromosoma 20 (20q11.21) que abarca hasta 80 genes (Lefort et al., 2008; Maitra et al., 2005; Spits et al., 2008; Werbowetski-Ogilvie et al., 2009; Wu et al., 2008), y además también se ha encontrado esta alteración en iPSCs (Elliott et al., 2010; Laurent et al., 2011; Martins-Taylor et al., 2011). Concretamente esta amplificación de 20q11 está ampliamente reportada desde hace años en gran variedad de tumores como carcinoma de mama (Guan et al., 1996; Tanner et al., 1996), cáncer de pulmón (Tonon et al., 2005), melanoma (Koynova et al., 2007), carcinoma hepatocelular (Midorikawa et al., 2006) y de vejiga (Hurst et al., 2004), síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda (Mackinnon et al., 2010). Sin embargo, no está claro que gen o genes son los responsables de conferir ciertas ventajas evolutivas a aquellas células que han adquirido esta alteración (Lefort et al., 2009). No obstante, hoy en día ya hay estudios que revelan la existencia de un grupo de genes, en concreto tres en este fragmento, expresados en hESCs, *ID1*, *Bcl2l1* y *HM13*, en al menos > 20% de las líneas. De estos genes, *BCL2L1*, parece ser, un fuerte candidato para la conducción de la adaptación del cultivo de hESCs (Amps et al., 2011). Otros genes pueden modular la proliferación celular, proporcionando así una ventaja de crecimiento o supervivencia a las células mutadas.

Está por tanto muy bien establecido que las hESCs sufren cambios cromosómicos/genómicos durante su adaptación al cultivo, y estas alteraciones pueden proporcionar ventaja selectiva a las células anormales en el crecimiento. Obviamente, este hecho concierne a los posibles usos de estas células. Por todo ello, es necesario realizar en los cultivos celulares de hESCs estudios de estabilidad genómica. Por tanto, las técnicas de baja resolución como el Bandeo-G pueden servir para un primer *screening* y así detectar las anomalías de mayor tamaño tales como inversiones y traslocaciones. Sin embargo, las técnicas de alta resolución como

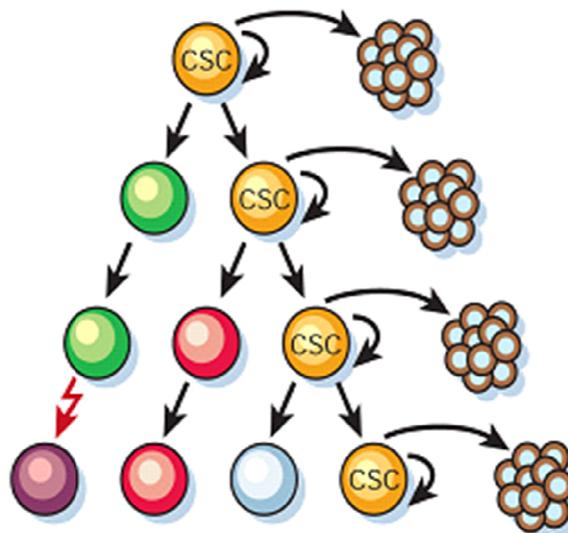
aCGH o SNP han demostrado ser óptimas para la caracterización global de la estabilidad genómica de las hESCs y también de las iPSCs (Moore et al., 2010).

#### **1.4. Células troncales, cáncer y desarrollo**

En cáncer, muchas vías de señalización y factores de transcripción importantes en el desarrollo embrionario y la homeostasis de las células troncales están alteradas, y cada vez hay más evidencias que apoyan la conexión entre célula troncal y cáncer. La primera propuesta del origen del cáncer a partir de una célula troncal, fue realizada por Cohenheim en 1875 (Polyak and Hahn, 2006), que proponía que el cáncer era una réplica de una célula troncal embrionaria que se encontraba desubicada en el organismo adulto lo que derivaba en un proceso neoplásico. Durante los últimos años, multitud de trabajos han sugerido que el cáncer tiene su origen en un subtipo celular muy concreto: la célula troncal del tejido afectado por la enfermedad. Esto se ha sugerido en el caso concreto de la leucemia aguda (Bonnet and Dick, 1997), cáncer de colon (O'Brien et al., 2007), tumores cerebrales (Singh et al., 2004), cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003) y cáncer de piel e intestino (Merlos-Suarez et al., 2011; Vries et al., 2010), entre otros. Este hecho está avalado por dos explicaciones biológicas: i) las células troncales son altamente longevas, lo cual propicia la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas a lo largo de los años y ii) debido a su escasez y al estado quiescente en el que se encuentran, son muy difíciles de destruir con agentes citotóxicos como la quimioterapia o radioterapia, ya que sobreexpresan proteínas transportadoras ABC (siglas inglesas de *ATP-binding cassette*) y proteínas MDR (siglas inglesas de *Multi Drug Resistance*) que les hace resistentes a citotóxicos. La célula troncal cancerosa sufre un bloqueo en la diferenciación y además no prolifera, por ello no es susceptible a la quimioterapia. Existe también, cierta controversia acerca de si las células troncales cancerosas se originan a partir de células troncales normales que han perdido la habilidad de regular la proliferación y auto-renovación, o si provienen de poblaciones más diferenciadas de células progenitoras que han adquirido habilidades de auto-renovación.

Se han descrito muchos oncogenes y genes supresores tumorales que participan en la iniciación y progresión tumoral (Vogelstein and Kinzler, 2004; Weinberg, 1995). En este sentido, se han propuesto varios modelos para la explicación de la génesis del cáncer que explicarían tres posibles patrones de proliferación celular y clonalidad dentro del tumor: el modelo estocástico, el modelo jerárquico y el modelo subclonal.

i) En el modelo estocástico todas las células del tumor poseen en principio, la misma capacidad de iniciar y mantener el tumor, es decir, es un modelo “horizontal” dónde todas las células son funcionalmente similares y por ello, los agentes citotóxicos deberían ir dirigidos contra la masa tumoral en su globalidad (Dick, 2008; O'Brien et al., 2009; Visvader, 2011). ii) En el modelo jerárquico, sin embargo, sólo una pequeña subpoblación celular dentro del tumor es la encargada de iniciar y mantener el tumor. Estas células pueden explicar la heterogeneidad celular presente en los procesos neoplásicos a partir de la diferenciación celular de las células hijas (Figura 12).



**Figura 12:** Según el modelo jerárquico sólo una sub-población celular dentro del tumor con características de CSC es capaz de formar nuevos tumores. Adaptada de Reya et al., Nature, 2001, Vol. 414 ,pg. 105.

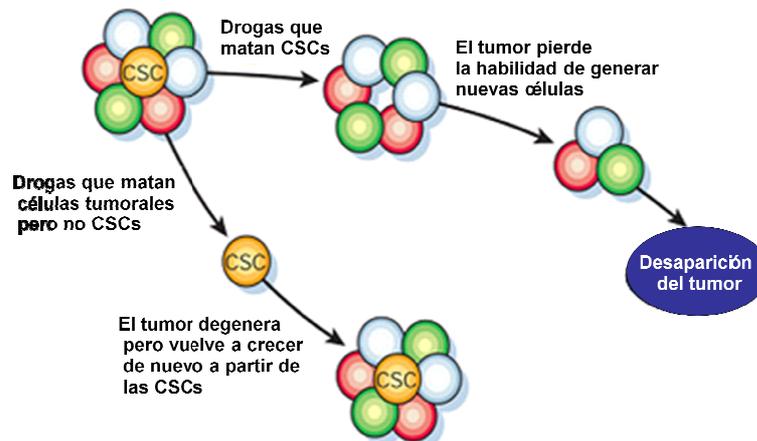
Según este modelo, las células progenitoras no son capaces de generar un nuevo tumor primario, ya que esta función está acotada al compartimento de células troncales con capacidad iniciadora del tumor (en adelante, CSC, siglas inglesas de

*Cancer Stem Cell*) (Dick, 2008; O'Brien et al., 2009; Pardal et al., 2003; Reya et al., 2001). La primera evidencia concluyente de un modelo jerárquico del cáncer que apoya la existencia de células troncales cancerosas fue publicada en 1997 por Bonnet y Dick (Bonnet and Dick, 1997). Estos autores, aislaron una subpoblación de células leucémicas que expresan CD34, un marcador de superficie específico de células progenitoras hematopoyéticas, pero que carecen del marcador CD38. Los autores demostraron que la subpoblación CD34+/CD38-, pero no la población CD34+/CD38+, es capaz de iniciar tumores primarios y secundarios que son histológicamente similares al tumor humano, en ratones inmunodeprimidos NOD/SCID.

Poblaciones celulares con estas características han sido detectadas en múltiples tipos histológicos de cáncer, entre ellos leucemias (Lapidot et al., 1994), tumores cerebrales (Singh et al., 2003), cáncer de mama (Dontu et al., 2003), cáncer de próstata (Collins et al., 2005), y se propone que podrían estar presentes en todo tipo de tumor (Collins et al., 2005; Maitland and Collins, 2005).

Es muy importante destacar, que la célula que origina el tumor, la célula normal que adquiere la primera mutación iniciadora del cáncer, no tiene por que estar necesariamente relacionada con la CSC que es un subtipo celular dentro del tumor que mantiene el crecimiento maligno. Es decir, es obligado diferenciar entre dos conceptos: *cancer-initiating cell* y *cancer-stem cell*. El primer concepto, hace referencia a la célula diana de las primeras mutaciones oncogénicas resultantes en transformación celular e iniciación del proceso neoplásico. El segundo, hace referencia a una pequeña fracción celular, (resistente a citostáticos), capaz de mantener el tumor en transplantes seriados. La *cancer-initiating cell* y la *cancer stem cell* pueden coincidir o no, en función del tipo de tumor (Rodríguez et al., 2012; Visvader, 2011). Desde un punto de vista etiológico y patológico, la identificación de ambas células es igual de relevante para la biología del cáncer. Sin embargo, quizás

la identificación y caracterización de la CSC es más relevante en estudios dirigidos hacia el tratamiento y curación de la enfermedad, permitiendo el desarrollo de tratamientos personalizados y evitando la destrucción de todos los tejidos en proliferación con cócteles complejos de quimioterapia (Figura 13).

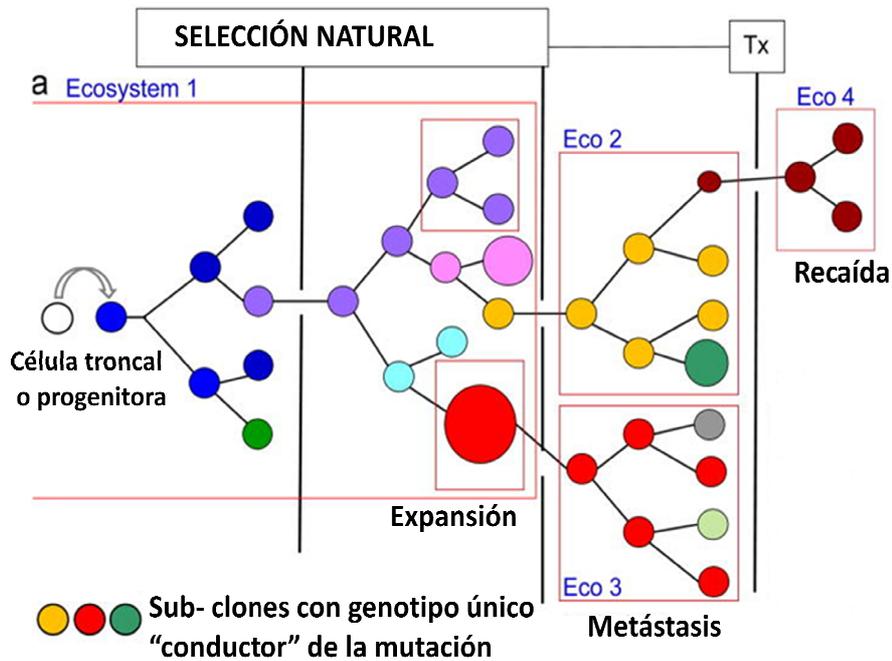


**Figura 13:** Sólo los tratamientos que afecten a las CSCs del tumor serán capaces de destruir el tumor evitando el riesgo de recaídas. (Adaptada de Reya et al., Nature, 2001, Vol. 414, pg. 105.)

Estos tratamientos destruyen el tumor a corto plazo pero son incapaces de evitar, en la mayoría de los casos, las recaídas a largo plazo observadas después de tratamientos de quimioterapia convencional dirigidos contra la masa tumoral, pero que rara vez afecta a las CSCs menos proliferativas (Al-Hajj et al., 2004; Zhang and Rosen, 2006). Por tanto, un mayor conocimiento de estas células, puede ayudar a generar aproximaciones terapéuticas más dirigidas y eficaces.

De otra parte, hay estudios recientes de secuenciación masiva y estudios clonales que demuestran que el número y tipo de mutaciones en las células de un tumor puede variar (Stratton, 2011). Esto ha permitido el desarrollo de un nuevo modelo llamado “diversidad subclonal del cáncer” (Greaves and Maley, 2012). En este modelo, las células tumorales aunque de origen clonal, tienen unas diferencias evolutivas que propician que algunas de ellas tengan una ventaja competitiva a través de sus características físicas en relación con la presión selectiva que ejerce el

microambiente, de esta forma algunos clones proliferarían mientras que otros se extinguen (Figura 14). En este contexto, la acumulación de mutaciones no es lineal sino que sigue un patrón derivativo desigual, de tal forma que se originan subclones genéticamente distintos dentro del tumor lo que hace que esta evolución clonal y el posible tratamiento individualizado sea mucho más complejo que lo que inicialmente se había pensado. (Greaves, 2013).



**Figura 14:** Representación del modelo subclonal del cáncer en la que se aprecia una arquitectura ramificada de esta evolución clonal. La presión que ejerce el medio a lo largo del tiempo permite a algunos sub-clones evolucionar en cada etapa de la enfermedad, mientras que otros subclones se extinguen. (Adaptada de Greaves and Maley, Nature. 2012 Vol 481, pg 306-13)

Por lo tanto, cada vez es más estrecha la relación que parece existir entre cáncer y células troncales, como origen de diferentes tumores. Al respecto, numerosos grupos sugieren que el inicio de muchas alteraciones que conllevan al desarrollo de tumores, ocurren a nivel de células troncales, de tal forma que estas, debido a sus propiedades de auto-renovación y diferenciación son capaces de sostener el crecimiento incontrolado de los tumores (Clevers, 2011). Las hESCs son células pluripotentes capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* y de diferenciarse en múltiples tejidos celulares. Las células tumorales se caracterizan por presentar una proliferación

celular incontrolada asociada en muchos casos a un bloqueo en su capacidad de diferenciación. Estas premisas sugieren el empleo de las hESCs como una valiosa herramienta de trabajo con objeto de explorar como mutaciones puntuales, sobreexpresión o eliminación de genes, etc. pueden alterar el desarrollo y diferenciación a nivel embrionario. Este hecho, proporcionaría datos cruciales para comprender los mecanismos involucrados en la transformación y progresión tumoral, con especial énfasis en cáncer pediátrico/infantil dado que las hESCs están ontogénicamente próximas a la célula diana dónde se origina en útero el tumor.

## **2. LEUCEMIA: Concepto y tipos**

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias de células de la sangre que consisten en el crecimiento descontrolado de células hematopoyéticas incapaces de madurar adecuadamente y en las que se produce un bloqueo en la diferenciación y una proliferación descontrolada de células leucémicas (Sachs, 1996). Estas células se acumulan en la médula ósea y tejidos linfoides hasta que finalmente alcanzan la sangre periférica e infiltran otros órganos como bazo e hígado, provocando esplenomegalia y hepatomegalia, respectivamente. Además, como consecuencia de la proliferación incontrolada de las células leucémicas, las células hematopoyéticas sanas, maduras y funcionales se ven relegadas comprometiendo su funcionalidad y como consecuencia de ello aparecen otros síntomas como anemia, defectos de coagulación y afecciones del sistema inmune que aumentan el riesgo de infecciones.

Las leucemias se pueden clasificar en agudas y crónicas. En las leucemias agudas las células que se acumulan son indiferenciadas linfoblastos (blastos) y la progresión de la enfermedad suele ser rápida. Sin embargo, las leucemias crónicas se caracterizan por la proliferación descontrolada de los precursores en estadios más avanzados de maduración, observándose en sangre periférica todos los estadios de

maduración correspondiente a la línea celular afectada. En este caso, generalmente, la progresión de la enfermedad es más lenta (Foon and Todd, 1986). Además, atendiendo a la estirpe hematopoyética que afecte, las leucemias agudas y crónicas se pueden clasificar a su vez en linfoides o linfoblástica, cuando afecta al linaje linfoide, y mieloide o mieloblástica si afecta al linaje mieloide.

En esta memoria nos centraremos en leucemias agudas sin profundizar en ninguna hemopatía mas por alejarse de la temática de nuestro estudio.

## **2.1. Leucemia Aguda**

Las leucemias agudas, como hemos dicho, son un grupo de enfermedades neoplásicas originadas por una proliferación de progenitores inmaduros denominados linfoblastos (blastos) que han perdido su capacidad de diferenciación reemplazando la hematopoyesis normal. La célula dónde se produce la transformación tumoral puede ser un precursor linfoide, leucemia linfoblástica aguda (en adelante, LLA), un precursor mieloide, leucemia mieloblástica aguda (en adelante, LMA), o una célula troncal primitiva con potencial de diferenciación multilínea (Bain and Catovsky, 1990). De forma general, las leucemias agudas suponen el 10% de todos los procesos cancerosos, sin embargo, en niños el 30% son leucemias agudas y dentro de ellas el 80% corresponden a LLA y el 20% LMA.

Las leucemias agudas comprenden un grupo muy heterogéneo. Por ello, la clasificación es compleja y se hace en base a numerosos criterios como morfología, parámetros citoquímicos, citogenéticos, inmunológicos, etc. La clasificación más utilizada en las últimas cuatro décadas es la del Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (en adelante, FAB) (Bennett et al., 1976). Este sistema estableció un sistema de clasificación de las leucemias agudas que se utiliza aún, aunque actualmente también se usa la clasificación propuesta por la Organización

Mundial de la Salud (en adelante, OMS), que tiene en cuenta criterios citogenéticos e inmunofenotípicos (Campo et al., 2011).

### **2.1.1 Leucemia mieloblástica aguda**

Este tipo de leucemia, LMA, es la más común en adultos, sin embargo, es un tipo de cáncer hematológico infrecuente en menores de 40 años. Por ello representa alrededor del 20% de casos de leucemias infantiles y un 80% de leucemias en adultos, siendo incluso más común en hombres que en mujeres.

La FAB clasifica la LMA en ocho subtipos basados en el tipo de célula leucémica y en el grado de maduración y linaje mielóide afectado (granulocitos, monocitos, eritrocitos o megacariocitos). Las ocho variedades de LMA según la clasificación de la FAB son: M0 (leucemia mielóide aguda indiferenciada), M1 (leucemia mielóide aguda pobremente diferenciada), M2 (leucemia mielóide aguda diferenciada), M3 (leucemia mielóide promielocítica), M4 (leucemia mielomonocítica aguda), M5 (leucemia monocítica), M6 (eritroleucemia aguda), y M7 (leucemia megacariocítica aguda).

Entre 50% y 60% de los niños con LMA se clasifican según los subtipos M1, M2, M3, M6 o M7; alrededor de 40% tiene subtipos M4 o M5. Cerca de 80% de los niños menores de 2 años con LMA tienen un subtipo M4 o M5. La respuesta a la quimioterapia citotóxica entre los niños con los diferentes subtipos de LMA es relativamente similar. A este respecto, el subtipo M3 de la FAB es una excepción, dado que entre 70% y 80% de los niños con ese subtipo de LMA se logra la remisión y curación con ácido retinoico más quimioterapia.

En 2002, la OMS propuso un sistema de clasificación nuevo que incorpora información citogenética diagnóstica que se correlaciona de forma más fiable con el pronóstico. Esta clasificación está más dirigida a uso clínico y cada una de estas categorías a su vez se divide en otros subtipos atendiendo a criterios pronósticos de gran utilidad. Dicho sistema de clasificación con base genética, vincula el tipo de LMA

con la evolución y proporciona información biológica y pronóstica. Esta clasificación distingue las siguientes variantes para la LMA: i) LMA con anomalías genéticas recurrentes como son: t(8; 21), inversión del cromosoma 16, t(15;17), alteraciones a nivel de 11q23, inversiones del cromosoma 3, t(1;22), y además, en 2008, la OMS amplió el número de anomalías genéticas ligadas a la clasificación LMA, y por primera vez incluyó mutaciones genéticas específicas introduciendo LMA con mutaciones del *FLT3*, *CEBPA* y *NPM1*; ii) LMA con displasia multilineaje (con al menos afectación de dos o más líneas celulares mieloides), que aparece comúnmente en pacientes que previamente han sufrido un síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo; iii) LMA y síndromes mielodisplásicos asociadas a tratamientos con agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II; iv) LMA sin otra especificación, la cual se hace en base en las características morfológicas, citoquímicas y de la maduración de las células leucémicas; v) sarcoma mieloides; vi) proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down y por último vii) neoplasma celular dendrítico plasmacitoide blástico.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías que apuntan a la clasificación genética, epigenética, proteómica e inmunofenotípica, la clasificación LMA posiblemente evolucione y provea nuevos pronósticos informativos y pautas biológicas a corto plazo.

### **2.1.2. Leucemia linfoblástica aguda**

Como hemos mencionado anteriormente, el 80% de las leucemias que aparecen en niños son LLA. En este tipo de leucemia se produce un bloqueo en la diferenciación a nivel de progenitores linfoides B o T, de tal forma que estos no maduran para convertirse en linfocitos, acumulándose en la médula ósea y en tejido linfoide. En la medida que aumenta la cantidad de linfoblastos B o T en sangre y médula ósea, hay menos lugar físico para otras poblaciones leucocitarias, glóbulos rojos y plaquetas, lo

que conlleva a un desequilibrio global de la homeostasis hematopoyética. Como consecuencia de ello va disminuyendo la capacidad funcional de estos tipos celulares cuya merma funcional desencadena procesos infecciosos, hemorrágicos y anemia, dependiendo en cada caso del tipo celular afectado.

De acuerdo con los datos epidemiológicos en ACCIS (siglas inglesas de *Automated Childhood Cancer Information Systems*), las leucemias representan el cáncer más prevalente en menores de 15 años (~30%) seguidos de tumores del sistema nervioso central (~23%) como astrocitoma y neuroblastoma. Entre las leucemias agudas, la LLA-B representa la hemopatía maligna más común. Las LLAs de tipo B constituyen el 80% de los casos, las LLAs tipo T representan el 25% de las LLAs de adulto y el 15% en niños (Pui et al., 2004). Actualmente, con los tratamientos vigentes, la probabilidad de supervivencia global libre de enfermedad a los cinco años es aproximadamente el 80% para LLA pediátrica y el 60% para LMA (Kaatsch, 2010; Pui et al., 2011), lo que supone un notable avance durante los últimos treinta años, ya que las cifras han experimentado un aumento del 60% a ~80% en niños menores de 15 años, y del 28% al 50% en adolescentes de 15 a 19 años (Pui et al., 2011; Smith et al., 2010). Sin embargo, y a pesar de los avances acontecidos en los últimos años, todavía existe un porcentaje de pacientes (~20%) que fracasan en el tratamiento. Además, este grupo está polarizado y engloba subgrupos específicos de fatal pronóstico. Por esta razón, es necesario seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad, ya que aún quedan por contestar numerosas preguntas de tipo biológico antes de alcanzar la meta de desarrollar mejores, más eficaces y seguros agentes terapéuticos.

En este sentido, los avances en técnicas genéticas de alta resolución han propiciado nuevos conocimientos acerca del proceso leucémico y la identificación de nuevos subtipos de leucemias que están ayudando a desarrollar terapias, como la quimioterapia personalizada, que supone un considerable avance en la mejora de la

enfermedad, y en la calidad de vida de los pacientes, llegando a un porcentaje cercano al 90% de curación para LLA pediátrica (Pui et al., 2011; Pui et al., 2012).

En cuanto a la clasificación, el grupo cooperativo de la FAB clasifica la LLA atendiendo fundamentalmente a la morfología de los blastos, y en base a ello distingue tres subtipos: L1, presentan blastos pequeños, escaso citoplasma, nucléolos poco visibles y cromatina homogénea. Es la más común dentro de las leucemias linfoblásticas en niños, constituyendo el 85%. EL subtipo L2, presenta dos tipos de blastos, unos grandes de núcleo irregular con uno o dos nucléolos visibles y citoplasma con basofilia variable, y otros blastos pequeños parecidos a los de la L1. Este subtipo es más frecuente en adultos. Por último L3, también llamada tipo Burkitt, esta leucemia presenta unos blastos característicos y con un citoplasma muy basófilo con vacuolas abundantes y núcleo grande con vacuolas visibles.

Por otra parte, el perfil citogenético que presenta la LLA no sólo es un indicador de la patogénesis, sino que también aporta marcadores diagnósticos y terapéuticos. Así, en función de alteraciones cromosómicas que presentan se clasifican, por el número modal de cromosomas en hipodiploides (menos de 46 cromosomas) e hiperdiploides (más de 50 cromosomas), siendo las hiperdiploides las de mejor pronóstico (Holmfeldt 2012). Por otra parte, la aparición de alteraciones estructurales en el cariotipo es lo más frecuente en la LLA, y entre ellas las traslocaciones que afectan a factores de transcripción o quinasas que tienen un papel clave en el curso de la enfermedad y correlaciona con el pronóstico de la misma (Bloomfield et al., 1986; Ribera et al., 2002). A continuación se esquematizan las alteraciones estructurales y numéricas más comunes presentes en LLA asociándolas al pronóstico (Tabla 2).

<b>Anomalia Cromosómica</b>	<b>Genes implicados</b>	<b>Pronóstico</b>
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML1</i>	Bueno
t(8;14)(q24;q32)	<i>c-myc/IgH</i>	Mal pronóstico con tratamiento convencional
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	Mal pronóstico con quimioterapia convencional
t(4;11)(q21;q23)	<i>AF4/MLL</i>	Mal pronóstico con cualquier tratamiento
t(1;19)(q23;p13)	<i>PBX1/E2A</i>	Mal pronóstico con tratamiento convencional
t(11;14)(p13;q11)	<i>RHOM2/TCR-delta</i>	Pronóstico intermedio
t(9;12)(q34;p13)	<i>ABL/TEL</i>	Buen pronóstico
Hiperdiploidía	>50 cromosomas	Buen pronóstico
Hipodiploidía	<46 cromosomas	Mal pronóstico

**Tabla 2:** Alteraciones citogenéticas comunes asociadas a LLA

### 2.1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda pediátrica

La LLA se origina a partir de un progenitor linfoblástico inmaduro que puede ser de linaje T (LLA-T) o puede ser de linaje B (LLA-B). Representa el 80% de los casos en niños (Pui et al., 2004) y la más frecuente en edad infantil, es la LLA pre-B, y la LLA común, que se diagnostica entre los 2 y 15 años de edad y tiene un pronóstico favorable, presentando un ~ 90% de supervivencia libre de enfermedad a los cinco años (Greaves, 2006; Greaves and Wiemels, 2003; Pui et al., 2011). La LLA pre-B y LLA común suelen estar asociadas al reordenamiento de TEL-AML1 e hiperdiploidías. Por el contrario, la LLA del lactante diagnosticada antes del primer año de vida afecta a un estadio más precoz del desarrollo B (estadio pro-B). Esta LLA pro-B se

caracteriza por la ausencia del antígeno CALLA (CD10) y por una latencia extremadamente corta, así como por un pronóstico fatal con una supervivencia a los cinco años inferior al 30% (Pui et al., 2011; Pui and Evans, 2006). Citogenéticamente, la LLA pro-B del lactante se caracteriza por la presencia del reordenamiento *MLL* (siglas inglesas de *Mixed Lineage Leukemia*) resultante de la traslocación t(4;11)(q21;q23). El producto proteico es una oncoproteína quimérica MLL-AF4 que contribuye a la patogénesis de la leucemia y se considera el evento iniciador del proceso leucémico. A pesar de ser esta LLA pro-B una de las de peor pronóstico, existen LLA pro-B infantiles que no son MLL-AF4, aunque si suelen estar asociadas con reordenamientos de *MLL* (por ejemplo MLL-ENL).

### **2.1.3. Origen prenatal de la LLA con reordenamiento MLL-AF4**

Existen distintos tipos de leucemias agudas definidas por la presencia de traslocaciones cromosómicas específicas que codifican oncogenes de fusión concretos que marcan la evolución y pronóstico de la enfermedad. Estudios muy sólidos indican que los niños diagnosticados de LLA ya expresan los genes de fusión al nacimiento, lo que sugiere un origen prenatal de las traslocaciones. Este es el caso de la leucemia aguda con traslocación TEL-AML1, AML1-ETO y de la MLL-AF4 (Biondi et al., 2000; Eguchi et al., 2005; Greaves and Wiemels, 2003; Kersey, 1997). En las últimas tres décadas han aparecido estudios rigurosos que demuestran este origen prenatal como son:

i) La concordancia del mismo tipo de traslocación en gemelos monocigóticos. Cuando uno de los gemelos desarrolla leucemia, su hermano gemelo acaba desarrollando el mismo tipo de tumor en cuestión de meses o años. Lo más interesante es que los estudios moleculares realizados han demostrado que el punto de rotura para la traslocación cromosómica es idéntico, lo que sugiere inequívocamente que ambos gemelos han compartido la misma célula diana dónde ha ocurrido la traslocación

(Ford et al., 1998; Ford et al., 1993; Greaves et al., 2003). En función del tipo de leucemia infantil, el grado de concordancia entre gemelos puede variar entre el 50% para la LLA pre-B con traslocación TEL-AML1, hasta un 100% en el caso de niños con LLA pro-B con traslocación MLL-AF4 (Ford et al., 1998; Greaves, 2002; Greaves et al., 2003). La excepcionalmente elevada concordancia de padecer LLA pro-B MLL-AF4+ en gemelos monocigóticos, sugiere que todos los eventos oncogénicos necesarios para el desarrollo postnatal de esta leucemia podría tener lugar en particular, antes del nacimiento, es decir en estadios embrionarios o fetales (Bueno C., 2008; Gale et al., 1997; Greaves and Wiemels, 2003). Esto viene avalado por datos preliminares de secuenciación global del genoma, que ponen de manifiesto que la LLA pro-B MLL-AF4+, a diferencia de otras leucemias pediátricas, carece de mutaciones somáticas recurrentes y/o polimorfismos identificables como alteraciones en CNV o pérdida de heterocigosidad (Bardini et al., 2011; Bardini et al., 2010; Dobbins et al., 2013). De hecho, existen diferencias substanciales en la frecuencia de CNVs entre los diferentes subtipos de leucemias. Así, los casos con reordenamiento de *MLL* tienen menos de un CNV por caso, lo que sugiere que *MLL* es un potente oncogén que requiere de muy pocos eventos cooperantes para inducir la transformación leucémica. Recientemente, se ha visto que a diferencia de lo que ocurre con otro tipo de tumores, la LLA pro-B con t(4;11) MLL-AF4 presenta hipermetilación del genoma, lo que se asocia a estabilidad genética, explicando en parte, la ausencia de eventos oncogénicos secundarios (Stumpel et al., 2013). Por el contrario, los casos de leucemias TEL-AML y BCR-ABL presentan más de seis alteraciones (CNVs) por paciente, es decir, necesitan de mas eventos para el desarrollo de la enfermedad (Mullighan et al., 2007). Además, el que ambos gemelos desarrollen el mismo tipo de leucemia y con idéntico punto de rotura, constituye una prueba irrefutable de que el origen de la traslocación es embrionario/fetal. Este fenómeno se explicaría con la aparición de la traslocación en una célula embrionaria de uno de los gemelos, de tal forma, que el clon portador de la mutación, migraría de un gemelo al otro vía circulación sanguínea por anastomosis intraplacental (Clarkson

and Boyse, 1971).

ii) Detección retrospectiva de la alteración genética en las tarjetas de Guthrie archivadas (prueba del talón), de niños que han desarrollado una LLA. El estudio molecular mediante *long-distance* PCR inversa de la sangre depositada en estas tarjetas ha puesto de manifiesto que los niños ya portaban dicha alteración genética en el momento del nacimiento (Gale et al., 1997). Esta prueba del talón (tarjetas de Guthrie) es una prueba rutinaria que se hace a todos los recién nacidos para la detección temprana de metabolopatías (Guthrie and Susi, 1963). Dichos estudios han revelado la presencia del oncogén de fusión MLL-AF4 en el 100% de las tarjetas de niños diagnosticados con dicha leucemia (Greaves, 2005). En el caso de los oncogenes de fusión TEL-AML1 y AML1-ETO su presencia en dichas tarjetas de Guthrie es del 75% y 50%, respectivamente (Wiemels et al., 1999a; Wiemels et al., 2002). Por tanto, estos estudios constituyen una prueba más que corrobora que el oncogén de fusión ya está presente en la hematopoyesis de estos niños en el momento del nacimiento, y que probablemente es necesaria la presencia de otras mutaciones secundarias para desarrollar la leucemia sintomática (Kempski et al., 2003; Maia et al., 2001).

iii) Estudios prospectivos en un gran número de muestras de cordón umbilical. La presencia de dichas traslocaciones cromosómicas ocurre en 1 de cada 100 cordones umbilicales estudiados, confirmando el origen prenatal de estas traslocaciones responsables de la leucemia pediátrica pre-B y la leucemia pro-B del lactante. El hecho de que la presencia de la traslocación cromosómica en muestras de cordón umbilical sea 50-100 veces superior a la presencia de la enfermedad, (1 de cada 100 cordones portadores del oncogén de fusión versus 1 de cada 10000 niños desarrollan la leucemia), confirma la necesidad de eventos secundarios necesarios para desarrollar la leucemia (Maia et al., 2004a; Maia et al., 2004b; Mori et al., 2002). En resumen, con todos estos trabajos se evidencia el origen prenatal de las

traslocaciones responsables de la leucemia pediátrica pre-B y la leucemia pro-B del lactante (Figura 15).

**CONCORDANCIA EN GEMELOS MONOCIGÓTICOS:**

**Concordancia 50%-100%**

**Traslocación cromosómica en gemelos monocigóticos**

**Latencia de hasta 14 años**

**PRUEBA DEL TALÓN:**

**LLA Pro-B: MLL-AF4: 100%**

**LLA-Pre-B: TEL-AML1: 75%**

**LMA: AML1-ETO: 50%**

**TRASLOCACIONES CROMOSÓMICAS EM MUESTRAS  
DE CORDÓN UMBILICAL:**

**1:100 cordones presentan la traslocación**

**1:10.000 cordones desencadenan la enfermedad**

**Figura 15:** Esquema de las diferentes evidencias que abalan el origen prenatal del evento inicial de la leucemia aguda infantil.

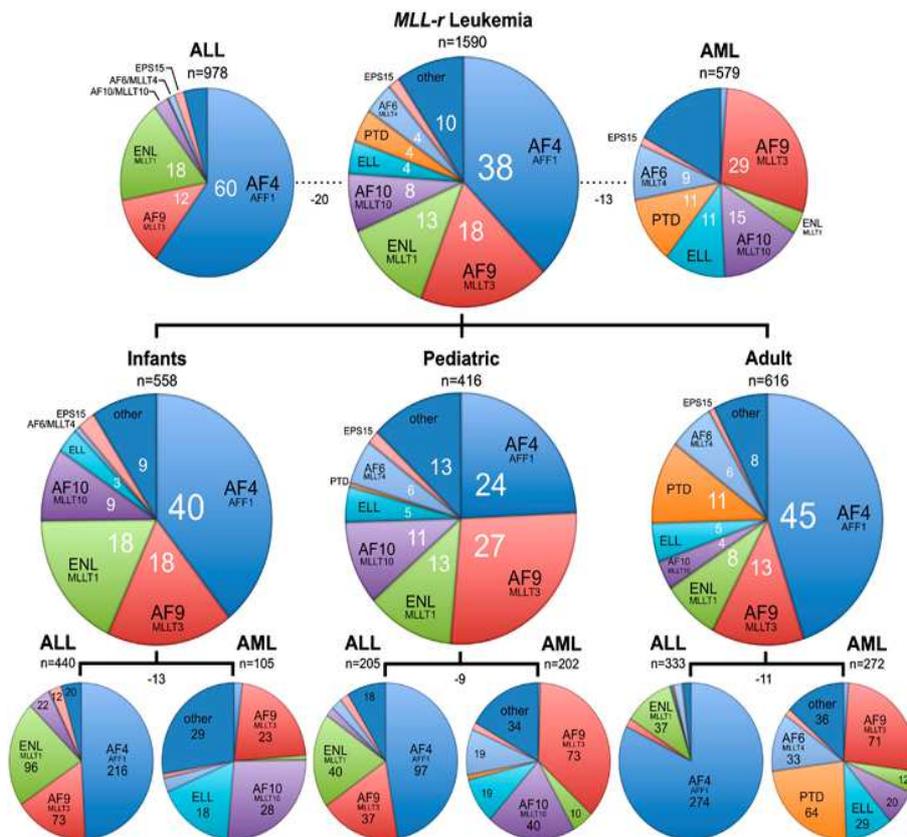
Sin embargo, aún desconocemos el origen celular de dichas traslocaciones, es decir, cual es la célula diana en la que se origina la alteración cromosómica. Este punto no es fácil de determinar puesto que es factible que la célula donde se origina la traslocación cromosómica sea diferente a la célula donde dicha traslocación cromosómica tiene un efecto biológico, e incluso distinto a la célula leucémica que se comporta como *leukemia initiating cell*.

#### **2.1.4. Etiología de la LLA del lactante con reordenamiento MLL-AF4**

En los últimos años varios estudios han desentrañado el origen molecular de esta leucemia y se conoce que se trata del reordenamiento del gen *MLL*, que constituye el marcador genético común de este tipo de leucemias (Caslini et al., 2000; Eguchi et al., 2006). Este gen se encuentra en el cromosoma 11q23 y contiene 36 exones. La región de rotura se localiza entre los exones 6-9 reordenándose mediante recombinación no homóloga (en adelante, NHEJ, siglas inglesas de *non-homologous*

*end joining*) con el factor de transcripción AF4 localizado en 4q21 (Eguchi et al., 2005; Krivtsov and Armstrong, 2007). De esa forma las células hematopoyéticas del paciente ya no tienen dos alelos salvajes de cada uno de estos dos genes *MLL* y *AF4*, sino que sólo tienen uno de cada, y los otros dos originan un gen de fusión *MLL-AF4*, que funciona como un dominante negativo de los alelos no reordenados y como un activador transcripcional de todo el programa de diferenciación hematopoyética. En consecuencia, la diferenciación linfocítica B temprana se bloquea en un estadio pro-B (CD10-) anterior al reordenamiento de las inmunoglobulinas. Los reordenamientos del gen *MLL* ocurren en leucemias agudas tanto linfocíticas y mieloides como de linaje mixto, lo que indica que es altamente promiscuo, ya que es capaz de fusionarse con más de 110 genes que codifican proteínas quiméricas presentes en diferentes tipos de leucemia (Huret et al., 2001; Marschalek, 2010; Meyer et al., 2009; Meyer et al., 2006; Rowley, 1999). Más del 80% de todos los reordenamientos del gen *MLL* se producen con *AF4* (42%), *AF9* (16%), *ENL* (11%), *AF10* (7%) y *ELL* (4%) (Wang et al., 2011). El restante 20% de reordenamientos de *MLL* se produce con genes menos representados, la mayoría de estos genes sólo han podido ser detectados en un sólo paciente afecto de leucemia (Marschalek, 2010).

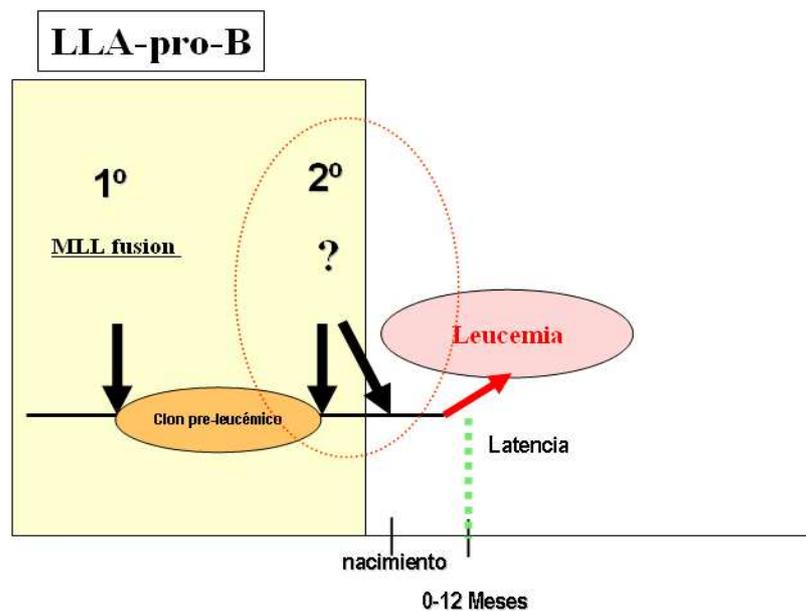
En esta línea se han publicado datos recientemente más concretos resultado del estudio de una cohorte de más de 1590 pacientes afectados de diversos tipos de leucemias agudas, recopilados a lo largo de una década (2003-2013) en diferentes países del mundo (Meyer et al., 2013). Las muestras de estos pacientes han sido distribuidas en tres grupos de edad; infantiles (0-12 meses), pediátricos (13 meses a 18 años) y adultos (más de 18 años). A su vez, para cada grupo de edad se estableció dos subgrupos LLA y LMA. El estudio analiza de forma pormenorizada el porcentaje de reordenamientos que sufre *MLL* con los genes con los que más frecuentemente se reordena y otros de mucha menor representación, y se establece variaciones considerables en función de la edad y el tipo de leucemia que se trate (Figura 16).



**Figura 16:** Clasificación de los pacientes según grupos de edad y tipo de enfermedad. Frecuencia de genes *partner* en la cohorte de pacientes de LA con reordenamiento de *MLL* estudiados. Esta cohorte de pacientes se divide en pacientes de LLA (dcha.) y pacientes de LMA (izq.). En cada sección del diagrama se representa los genes con los que se trasloca y el porcentaje en que lo hace (nº blanco). Treinta y tres pacientes no fueron incluidos en el estudio y se indican con número negativos en el diagrama correspondiente. (Adaptado de Meyer et al. 2013, *Leukemia*, pg 1-12).

El hecho de que la LLA pro-B del lactante MLL-AF4+, posea un pronóstico fatal (supervivencia libre de enfermedad tras 5 años <30 %) y una latencia extremadamente corta (Biondi et al., 2000) nos hace plantearnos preguntas tales como: i) ¿Cómo la enfermedad evoluciona tan rápidamente?, ii) ¿Es necesario la presencia de mutaciones que cooperen con MLL-AF4 o es la capacidad oncogénica de MLL-AF4 suficientemente robusta para no requerir de alteraciones genéticas adicionales?, y iii) En caso de requerir mutaciones secundarias, ¿tienen estas su origen en útero o son post-natales?. Lo que sí parece claro, de los estudios que ya se han llevado a cabo, es que el reordenamiento del gen *MLL* no es suficiente para desarrollar la transformación leucémica (Figura 16), siendo necesaria la aparición de

alteraciones secundarias o adicionales para desencadenar la enfermedad (Eguchi et al., 2006; Moorman et al., 1998). En este sentido, se ha visto que en LLA pro-B MLL-AF4+, hay genes con un estado de expresión alterado que están presentes con cierta frecuencia, es el caso *K-Ras*, mutado en el 20-40% de los casos de leucemia MLL-AF4+ (Driessen et al., 2013; Liang et al., 2006; Prella et al., 2012), y también *FLT3*, mutado entre el 3 y 20% de los casos de LLA pro-B MLL-AF4+ (Armstrong et al., 2004).



**Figura 16:** Esquema representativo de los al menos dos eventos oncogénicos necesarios para el desarrollo de leucemia. El primer evento prenatal es la aparición del oncogén de fusión y se sospecha la necesidad de un segundo evento oncogénico necesario para el desarrollo de la enfermedad el cual debe ocurrir muy cerca del nacimiento. (Adaptada de Greaves et al 2003 Nat Rev Cancer Vol.3 pg 639-49)

En los últimos años se han llevado a cabo estudios genéticos y epidemiológicos que sostienen la idea de que el origen del gen de fusión *MLL* en la leucemia del lactante ocurre en el útero, y puede ser resultado de una exposición trasplacental durante el desarrollo embrionario a sustancias genotóxicas presentes, probablemente en la dieta materna (Blanco et al., 2004; de la Chica et al., 2011; Libura et al., 2005; Libura et al., 2008; Moneyppenny et al., 2006; Zandvliet et al., 1996). Dichos productos podrían inducir roturas en el gen *MLL* en el embrión/feto, pero no en la madre, dado que la

madre presenta todos los mecanismos de reparación del ADN funcionales (Alexander et al., 2001; Ross et al., 1996; Wiemels et al., 1999b). De los posibles agentes genotóxicos conocidos, uno de los más estudiados es el etopósido (VP16). El etopósido es un inhibidor de la topoisomerasa II de uso común en los protocolos de quimioterapia y responsable de un 10%-15% de las leucemias agudas secundarias a tratamiento (Felix et al., 1998). En estudios recientes, se sugiere que dietas ricas en bioflavonoides durante el embarazo, una fuente de inhibidores de la topoisomerasa II en la alimentación, pudiera causar roturas del gen *MLL*, dando lugar al gen de fusión *MLL-AF4*, teniendo un papel decisivo en el desarrollo de un estado pre-leucémico (Spector et al., 2005; Strick et al., 2000). De hecho, se ha demostrado *in vitro* que la exposición a altas dosis de etopósido puede originar roturas en el gen *MLL* en células embrionarias de ratón (Blanco et al., 2004), HSCs de origen fetal (Moneyppenny et al., 2006) y de células CD34+ de cordón umbilical (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2007; Libura et al., 2005; Libura et al., 2008).

#### **2.1.5. Desarrollo de un modelo de LLA infantil *MLL-AF4+* basado en el uso hESCs**

A pesar de lo mencionado, aún desconocemos la naturaleza de la célula diana donde ocurre el reordenamiento y los mecanismos responsables que desencadenan la LLA pro-B *MLL-AF4+*. Los estudios que se han llevado a cabo para desarrollar un modelo de enfermedad *MLL-AF4* en ratón, en células transformadas, en células CD34+ de cordón umbilical y en hESCs no han sido concluyentes, ya que se ha obtenido un fenotipo y una latencia de la enfermedad que en absoluto tiene que ver con la observada en la leucemia del lactante (Bueno et al., 2013; Bueno et al., 2012; Bursen et al., 2010; Chen et al., 2006; Krivtsov et al., 2008; Metzler et al., 2006; Montes et al., 2011). Los modelos murinos difieren significativamente en el fenotipo y latencia de la enfermedad de la que se produce en el humano en dos aspectos claves: i) la latencia es excepcionalmente prolongada (Bursen et al., 2010; Metzler et al., 2006) ii) el tipo

de enfermedad desarrollada puede clasificarse como una hiperplasia mieloproliferativa o linfoma folicular B (Chen et al., 2006; Krivtsov et al., 2008; Metzler et al., 2006). Por todo ello, creemos que sería muy importante desarrollar un modelo que nos permita comprender los mecanismos celulares y moleculares que hay detrás del origen y patogénesis de esta enfermedad, y así poder realizar ensayos de *screening* de fármacos encaminados a encontrar mejores dianas terapéuticas de un modo más certero.

Por otra parte, otros grupos han demostrado recientemente como la expresión de la proteína de fusión AF4-MLL es capaz de inducir LLA en ratón, incluso en ausencia de expresión de la proteína MLL-AF4. Además, para el desarrollo del fenotipo leucémico en el ratón es necesario además el alelo salvaje AF4 (Benedikt et al., 2011). De acuerdo con estos hallazgos, se puede determinar que la leucemia con t(4;11) puede necesitar de la participación de ambas proteínas, proporcionando una explicación a la aparición tan temprana de la enfermedad en humanos, ya que cada una de estas proteínas confiere propiedades específicas respecto a ciclo celular, apoptosis, menor inhibición por contacto, y además, en combinación puede tener un efecto sinérgico para el desarrollo del fenotipo leucémico (Bursen et al., 2010; Gaussmann et al., 2007).

La hipótesis que se baraja es que en estos modelos, *in vivo* e *in vitro* (líneas celulares transformadas o progenitores hematopoyéticos), las células transducidas con el gen de fusión MLL-AF4 y otros eventos oncogénicos que se están testando en la actualidad, pueden estar en un estadio ontogénico de diferenciación hematopoyética inadecuado. Por este motivo, proponemos utilizar hESCs o células progenitoras hematopoyéticas procedentes de hígado fetal debido a que ontogénicamente están más cercanas al estadio en el que debe encontrarse la célula diana en la que ocurre la rotura del gen *MLL*. Pero el uso de hESCs como modelo de enfermedad, requiere que dichas células sean genéticamente lo más estables posible o de otra manera,

podrían presentar alteraciones genéticas que pueden cooperar con MLL-AF4 en la transformación de dichas células o alterar la homeostasis del cultivo. Por ello, la caracterización genética de las distintas líneas de hESCs y avances acerca de cómo las diferentes condiciones de cultivo afectan esta estabilidad de las hESCs, debe ser el punto de partida en toda investigación encaminada a usar las hESCs como modelo experimental de modelos de enfermedad.



**JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS  
DEL ESTUDIO REALIZADO**

---



## I. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO REALIZADO

Cada vez es más evidente la relación entre células troncales y cáncer, sugiriéndose que el cáncer tiene su origen en una población de células troncales.

Las hESCs se caracterizan por su capacidad de diferenciación hacia múltiples tejidos y su alta tasa proliferativa. Representan un sistema experimental sin precedentes para reproducir modelos de enfermedad de origen prenatal que de otra manera no podrían ser estudiados en muestras primarias de pacientes por la imposibilidad de acceso a muestras de origen prenatal. Sin embargo, cualquier intento de emplear las hESCs como herramienta biológica para el desarrollo de modelos de cáncer requiere que dichas hESCs sean genéticamente lo más estables posibles, para evitar la acumulación basal de eventos oncogénicos y alteraciones cromosómicas que harían a dichas células vulnerables a transformación celular. Por ello, creemos importante conocer de forma prospectiva, y empleando técnicas citogenéticas y moleculares, la estabilidad genética de las hESCs y como afectan las condiciones de cultivo, el número de pases, y las propias propiedades biológicas intrínsecas a la estabilidad genética de las hESCs.

En los últimos años hemos avanzado en la comprensión de la etiología de la LLA pro-B del lactante MLL-AF4+, y se conoce que los niños nacen con el reordenamiento del gen *MLL*. Dicho gen, se rompe entre el exón 6-9 y se reordena con el factor de transcripción *AF4* originándose el gen de fusión MLL-AF4. Dicha fusión codifica la proteína quimérica MLL-AF4 que se cree que pasa a ser un activador transcripcional dentro del programa de diferenciación hematopoyético. Aunque se reconoce el origen pre-natal de la fusión MLL-AF4, desconocemos por completo el origen celular de MLL-AF4. En realidad, el origen celular a nivel jerárquico dónde ocurre dicha aberración cromosómica es difícil de descifrar, debido a que el impacto funcional del oncogén de fusión y la expansión clonal resultante, puede ocurrir aguas abajo del

propio origen físico de la traslocación. Lo que sí parece evidente, es que la célula diana donde aparece dicho oncogén de fusión debe de ser una célula troncal ontogénicamente temprana.

El objetivo de este trabajo es determinar dónde, cómo y por qué se rompe *MLL* para fusionarse con *AF4* de forma específica en esta leucemia tan agresiva y con tan mal pronóstico. En los últimos años, estudios epidemiológicos y celulares han demostrado que existe un claro componente genotóxico capaz de romper específicamente el factor de transcripción hematopoyético *MLL* en el embrión o feto, pero no en la madre embarazada (Moneypenny et al., 2006). Entre los posibles agentes genotóxicos, el más estudiado es el etopósido. El etopósido es un inhibidor de la topoisomerasa II que está presente en dietas ricas en bioflavonoides. La hipótesis barajada consiste en que la exposición durante el embarazo a dichas dietas puede provocar la rotura del gen *MLL* y originar el reordenamiento de este gen. El etopósido, llamativamente, no afecta a la madre dado que esta tiene todos los mecanismos de reparación del ADN funcionales, pero es capaz de difundir vía transplacentar y actuar en el embrión/feto desencadenando la rotura del gen *MLL* y formación de la proteína de fusión *MLL-AF4*. El resultado es el desarrollo de una fase de pre-leucemia asintomática en útero, que continúa como fase de pre-leucemia tras el nacimiento unas semanas o meses.

Para entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen la patogénesis de la enfermedad, es imprescindible disponer de modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad. La génesis leucémica se estudia generalmente en muestras clínicas de pacientes dónde ya han tenido lugar todos los eventos oncogénicos desencadenantes del proceso leucémico, por lo que no permiten descifrar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la rápida transformación mediada por *MLL-AF4*. Además, muchos modelos animales desarrollados para reproducir *in vivo* esta enfermedad no aportan una información fidedigna sobre la etiología y patogénesis de la enfermedad al no reproducir el mismo fenotipo y la misma latencia observados en

el humano. Esto sugiere que estos modelos animales carecen de algunos componentes etiológicos claves, (por ejemplo el etoposido), presentes durante el desarrollo embrionario y/o fetal humano. Sería coherente establecer modelos *in vitro* e *in vivo* que reproduzcan este tipo de leucemia infantil, usando células en un estadio ontogénico lo más próximo posible al momento donde esta leucemia se genera en el humano, es decir a nivel prenatal (hESCs). Por el contrario, el uso de HSCs somáticas tendría una prioridad menor y de hecho podría explicar, al menos en parte, el fracaso que hasta la fecha ha tenido a la hora de desarrollar modelos que reproduzcan esta leucemia (Montes et al., 2011).

Finalmente, se ha sugerido la existencia durante el desarrollo embrionario de precursores mesodérmicos capaces de originar diferentes tejidos de origen mesodérmico tales como sangre y mesénquima (estroma medular). De hecho, es de reseñar la implicación del estroma medular en la patogénesis de una amplia variedad de tumores hematopoyéticos. Las MSCs son componentes claves del microambiente hematopoyético y se están realizando esfuerzos importantes para evaluar su, hasta ahora desconocida, implicación en el origen y patogénesis de tumores hematopoyéticos. Pensamos que las traslocaciones cromosómicas asociadas a leucemias infantiles podrían estar presentes en las MSCs de la médula ósea de estos pacientes pediátricos, de forma que durante el desarrollo embrionario humano los oncogenes de fusión pueden emerger en una población de precursores pre-hematopoyéticos mesodérmicos capaces de originar tanto HSCs como MSCs. Fundamentamos esta hipótesis en los siguientes puntos:

1. Una proporción de leucemias agudas carecen de expresión del marcador pan-leucocitario CD45, indicando que la leucemia podría tener un origen pre-hematopoyético.

2. Un porcentaje de los tumores secundarios a leucemias infantiles son tumores mesenquimales (Kersun et al., 2004), sugiriendo que el tratamiento citotóxico destruye el clon tumoral hematopoyético pero no las posibles MSCs que forman parte del clon maligno.

3. Las MSCs son más resistentes a la quimioterapia como indica el hecho de que la reconstitución del estroma post-transplante alogénico procede del receptor y muy infrecuentemente del donante (Garcia-Castro et al., 2007; Rieger et al., 2005)

## **OBJETIVOS**

---



### III. OBJETIVOS

1º Determinar mediante técnicas de citogenética convencional y molecular en qué grado la predisposición a inestabilidad genética en hESCs es debida a las condiciones de cultivo empleadas o a propiedades intrínsecas de cada línea celular.

2º Determinar si el etopósido es capaz de romper y provocar reordenamiento del locus *MLL* en hESCs, la progenie hematopoyética derivada de hESCs y en células CD34+ de cordón umbilical, y si dichos reordenamientos son suficientes para inducir transformación oncogénica en las hESCs.

3º Analizar en distintos subtipos citogenéticos de leucemias agudas infantiles y pediátricas si las traslocaciones cromosómicas presentes en los blastos están también presentes en el estroma medular, lo que sugeriría que la traslocación cromosómica tendría un posible origen pre-hematopoyético.



## **MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS**

---



#### IV. MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS

La descripción pormenorizada de los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos, se encuentran reflejados en los artículos científicos originales publicados en revistas internacionales indexadas en relación con cada uno de los objetivos planteados y que han sido incluidos en esta sección. Cada una de estas publicaciones científicas va precedida por un breve resumen en castellano que pretende facilitar una revisión rápida de la información más relevante contenida en los mismos. Las publicaciones científicas fruto de este trabajo incluyen los siguientes trabajos

##### **En relación al objetivo 1º planteado y relacionado con la estabilidad genética de las hESCs y propensión a diferenciación hematopoyética:**

1. **Catalina, P.**, Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., de la Cueva, T., Bueno, C., Leone, P.E. and Menendez, P. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Mol Cancer* 7 (2008), p. 76-84.
2. **Catalina, P.**, Bueno, C., Montes, R., Nieto, A., Ligeró, G., Sanchez, L., Jara, M., Rasillo, A., Orfao, A., Cigudosa, J., Hovatta, O., Greaves, M. and Menendez, P. Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leuk Res* 33 (2009), pp. 980-90.

##### **En relación al objetivo 2º relacionado con la vulnerabilidad de las hESCs y células fetales CD34+ a un agente genotóxico:**

3. Bueno, C., **Catalina, P.**, Melen, G.J., Montes, R., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia-Perez, J.L. and Menendez, P. Etoposide induces MLL rearrangements and other

chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Carcinogenesis* 30 (2009), pp. 1628-37.

**En relación al objetivo 3º dirigido a profundizar sobre el origen de la traslocación MLL-AF4**

4. Menendez, P., **Catalina, P.**, Rodriguez, R., Melen, G.J., Bueno, C., Arriero, M., Garcia-Sanchez, F., Lassaletta, A., Garcia-Sanz, R. and Garcia-Castro, J. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* 206 (2009), pp. 3131-41.

ARTICULO 1: Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? ***Mol Cancer* 7 (2008), p. 76-84.**

**Catalina, P.**, Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., de la Cueva, T., Bueno, C., Leone, P.E. and Menendez, P.



**Introducción:** El uso de las hESCs en investigación ha crecido en la última década ya que suponen una prometedora herramienta para muchos estudios biológicos y toxicológicos. Sin embargo, el comportamiento ideal que esperamos de estas células es que se mantuvieran estables cromosómicamente, ya que cualquier alteración adquirida puede comprometer seriamente futuras aplicaciones. Recientemente, en varios estudios publicados se ha analizado la estabilidad cromosómica de algunas líneas de hESCs después de haber sido cultivadas de forma prolongada, siendo los datos obtenidos ciertamente controvertidos, ya que diferentes laboratorios han reportado datos en los que ponen de manifiesto la existencia de alteraciones cromosómicas en algunas de las líneas cultivadas, mientras que otras se mantienen largos periodos de tiempo sin alteración alguna. Esta controversia parece tener su origen en tres aspectos del cultivo celular: i) el método empleado para realizar los pases de cultivo, bien mecánico o bien enzimático; ii) presencia o ausencia de *feeders* como células de soporte; y iii) duración del cultivo.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo es comparar la estabilidad cromosómica de tres líneas de hESCs: HS181, SHEF-1 y SHEF-3, mantenidas en el mismo laboratorio bajo las mismas condiciones de cultivo y utilizando idéntica metodología para realizar el mantenimiento del cultivo.

**Materiales y Métodos:** Cultivamos tres líneas de hESCs, HS181, SHEF-1 y SHEF-3 en *feeders* como soporte de crecimiento durante un largo periodo de tiempo utilizando para su expansión a largo plazo tanto métodos mecánicos como enzimáticos. Posteriormente estas células fueron transferidas a un medio de cultivo sin *feeders* para evaluar si se mantenían estables bajo las diferentes condiciones en las que habían sido cultivadas. Para esta evaluación se realizó en las tres líneas de hESCs cariotipo convencional, CGH convencional y SKY en los pases 10, 17, 21 y 30 sin *feeders*.

**Resultados:** Los datos obtenidos tras los análisis de citogenética convencional y molecular efectuados a estas tres líneas de hESCs, revelan diferencias significativas entre ellas en cuanto a su integridad cromosómica. Así, las tres líneas HS181, SHEF-1 y SHEF-3 mantenidas en *feeders* como soporte de crecimiento, se mantuvieron estables cromosómicamente durante 185 pases de cultivo usando tanto métodos enzimáticos como mecánicos para realizar los pases. A pesar de que las tres líneas fueron mantenidas en las mismas condiciones, se comportaron de forma diferente al transferirlas a un sistema de cultivo sin *feeders*. A partir de ese momento, dos de ellas (curiosamente las más jóvenes, las que tenían menor número de pases), HS181 (71 pases) y SHEF-3 (51 pases), mostraron un cariotipo inestable poco después de empezar a cultivarlas sin *feeders*. La línea HS181 ganó un extra-cromosoma 12 a partir del pase 17 y un cromosoma marcador en el pase 21, que posteriormente fue identificado mediante SKY como parte de cromosoma 20. Es importante resaltar que la aparición del extra 12 fue en mosaico, incrementándose este evento hasta un 89% en el pase 30. Este hecho nos hizo plantearnos que posiblemente la adquisición de un cromosoma 12 proporciona a la línea una ventaja selectiva con respecto a las células que no lo presentan, ya que la tendencia es a perpetuarse en el cultivo conforme van avanzando los pases. Similar fue el comportamiento de la línea SHEF-3 cuando se pasó a cultivo sin *feeders*, ya que adquirió una trisomía 14 en el pase 10, sin embargo esta trisomía aparentemente no le proporcionó ninguna ventaja selectiva a las células que la adquirieron, ya que el mosaicismo para esta alteración se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo entre un 15% y un 36% de las células. Sorprendentemente la línea con más pases, la SHEF-1, se mantuvo estable cromosómicamente durante 185 pases de cultivo en *feeders* y 30 pases más en cultivo libre de *feeders*, sin adquirir ninguna anomalía cromosómica en un total de 215 pases de cultivo.

**Conclusión:** Este resultado apoya la idea de que el cultivo sin *feeders* puede propiciar la adquisición de anomalías cromosómicas, pero por otra parte, los

resultados obtenidos confirman la hipótesis de que con independencia de las condiciones de cultivo y la duración del mismo, algunas líneas de hESCs son más propensas a adquirir alteraciones cromosómicas que otras y este hecho es inherente a la propia línea celular.



Short communication

Open Access

## Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?

Puri Catalina, Rosa Montes, Gertru Ligeró, Laura Sanchez, Teresa de la Cueva, Clara Bueno, Paola E Leone and Pablo Menéndez\*

Address: Andalusian Stem Cell Bank/University of Granada, Instituto de Investigación Biomédica, Granada, Spain

Email: Puri Catalina - purificacion.catalina@juntadeandalucia.es; Rosa Montes - rosa.montes@juntadeandalucia.es; Gertru Ligeró - gertrudis.ligeroc@juntadeandalucia.es; Laura Sanchez - laura.sanchez@juntadeandalucia.es; Teresa de la Cueva - teresa.cueva@juntadeandalucia.es; Clara Bueno - clara.bueno@juntadeandalucia.es; Paola E Leone - paola.leone@juntadeandalucia.es; Pablo Menéndez\* - pablo.menendez@juntadeandalucia.es

\* Corresponding author

Published: 3 October 2008

Received: 7 July 2008

Molecular Cancer 2008, 7:76 doi:10.1186/1476-4598-7-76

Accepted: 3 October 2008

This article is available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/7/1/76>

© 2008 Catalina et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The use of human embryonic stem cells (hESCs) in research is increasing and hESCs hold the promise for many biological, clinical and toxicological studies. Human ESCs are expected to be chromosomally stable since karyotypic changes represent a pitfall for potential future applications. Recently, several studies have analysed the genomic stability of several hESC lines maintained after prolonged *in vitro* culture but controversial data has been reported. Here, we prompted to compare the chromosomal stability of three hESC lines maintained in the same laboratory using identical culture conditions and passaging methods.

**Results:** Molecular cytogenetic analyses performed in three different hESC lines maintained in parallel in identical culture conditions revealed significant differences among them in regard to their chromosomal integrity. In feeders, the HS181, SHEF-1 and SHEF-3 hESC lines were chromosomally stable up to 185 passages using either mechanical or enzymatic dissection methods. Despite the three hESC lines were maintained under identical conditions, each hESC line behaved differently upon being transferred to a feeder-free culture system. The two younger hESC lines, HS181 (71 passages) and SHEF-3 (51 passages) became chromosomally unstable shortly after being cultured in feeder-free conditions. The HS181 line gained a chromosome 12 by passage 17 and a marker by passage 21, characterized as a gain of chromosome 20 by SKY. Importantly, the mosaicism for trisomy 12 gradually increased up to 89% by passage 30, suggesting that this karyotypic abnormality provides a selective advantage. Similarly, the SHEF-3 line also acquired a trisomy of chromosome 14 as early as passage 10. However, this karyotypic aberration did not confer selective advantage to the genetically abnormal cells within the bulk culture and the level of mosaicism for the trisomy 14 remained overtime between 15%–36%. Strikingly, however, a much older hESC line, SHEF-1, which was maintained for 185 passages in feeders did not undergo any numerical or structural chromosomal change after 30 passages in feeder-free culture and over 215 passages in total.

**Conclusion:** These results support the concept that feeder-free conditions may partially contribute to hESC chromosomal changes but also confirm the hypothesis that: regardless of the culture conditions, culture duration or splitting methods, some hESC lines are inherently more prone than others to karyotypic instability.

## Background

Human embryonic stem cells (hESCs) hold the promise not only in cell replacement therapies but also in basic research in a variety of fields ranging from developmental biology, drug screening and toxicology, nutritional reprogramming and disease modelling [1,2]. Human ESCs are derived from the inner cell mass of surplus embryos [1,2]. Once established, hESC lines are desired to be chromosomally stable. The existence of chromosomal abnormalities in hESCs is an important concern, given that karyotypic changes are often associated with carcinogenesis and impaired *in vitro* and *in vivo* cellular behaviour, compromising hESC-based downstream applications. Thus, for the potential of hESC-based therapy to be realized, it is essential that these valuable cells be proven safe and stable.

Over the last 3–4 years controversial data has been reported regarding the chromosomal integrity of hESCs maintained after prolonged *in vitro* culture [3–11]. Some laboratories [3–3] independently showed chromosome changes in H1, H7, H14, HS181, HS237, SA002.5, hESC5 and BC01 hESC lines: the changes emerged in most cases beyond passage 13. In contrast, other studies [4,9–11] reported a lack of karyotypic changes in a variety of hESC lines (SA001, hES1-6, BG02, EG03, SA003, SA121, SA461, HS235) grown between 34 and 140 passages. This cytogenetic resilience of some hESC lines [4,9–11] clearly differs from previous studies [3–8]. These controversial findings are believed to stem from particular aspects of cell culture methods: i) passage methods; ii) presence versus absence of feeders and iii) duration of the long-term culture.

Regarding the passage method, it has been hypothesized that mechanical passage of hESCs by cutting the colonies into small pieces may contribute to the perpetuation of the euploid population, reducing the appearance of aneuploid clones which seem more common upon enzymatic or chemical passage methodology [9,10]. The mechanism/rationale behind the idea that mechanical cutting of the hESC colonies with subsequent destruction of many single cells within the colony is less stressful and detrimental for the hESC culture than enzymatic-based passage methods widely used with multiple stable primary stem cell subsets including hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells or neural progenitors among others, still needs to be proven and elucidated. Similarly, the culture adaptation of hESCs maintained over a feeder layer upon being transferred to a feeder-free culture system has been proposed as an alternative variable which may, to some extent, favour the appearance of chromosomal changes. As for the duration of the long-term culture, it has also been proposed that older (that is, later passage) cells are more susceptible to karyotypic changes than ear-

lier passage cultures. The question of how many passages hESCs may be expanded without undergoing chromosomal abnormalities seems, however, somewhat academic: in some hESC lines (i.e. hESC5) karyotypic insults have been shown to occur at relatively very early passages. Therefore, the relevance and actual biological effects of different culture conditions and the duration of the culture on the chromosomal stability of hESCs still remains to be elucidated.

It must be taken into account that *in vitro* culture of hESCs is an abnormal condition. *In vivo*, the cells of the late inner cell mass to which hESCs correspond to, do not persist but disappear as embryogenesis progresses. Importantly, hESCs are derived from the inner cell mass of surplus embryos which commonly harbour chromosomal abnormalities [12–14]. Recent studies [13,14] reported high rates (about 50%) of aneuploidy observed in human blastocysts originating from preimplantation surplus embryos. Among these abnormal human embryos, most are mosaic (mixture of diploid and aneuploid cells). Blastocysts donated for establishment of hESC lines are commonly derived either from fresh preimplantation embryos of suboptimal quality which are not used for *in utero* transfer or, more commonly from frozen embryos.

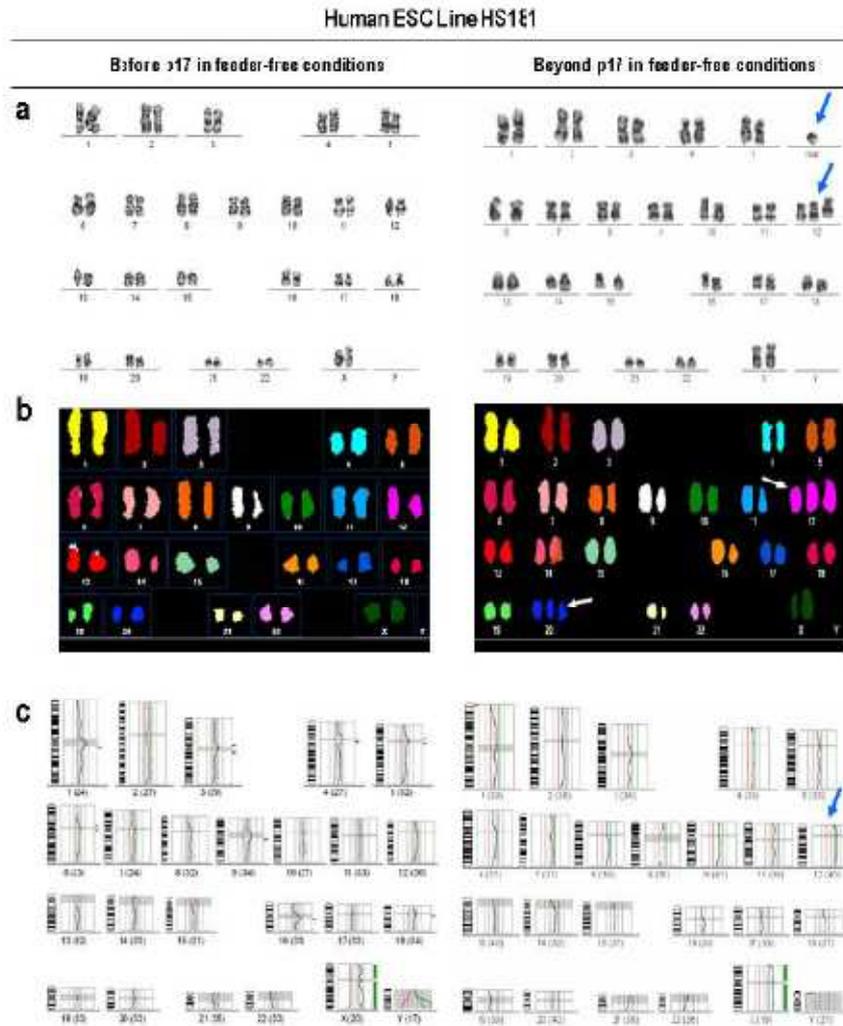
We hypothesize that, the existence of over 50% of aneuploid human blastocysts, along with the emergence of karyotypic changes in only about 20% of the hESC lines available and grown in a number of different experienced laboratories suggests that some hESC lines may be more prone to karyotypic instability than others.

In the present study, we have prospectively compared using molecular cytogenetic tools the chromosomal integrity of three hESC lines, HS181, SHEF-1 and SHEF-3, maintained in the same laboratory using identical culture conditions and passage methods. Although feeder-free culture conditions may partially contribute to hESC chromosomal changes, we provide evidence supporting the proof-of-principle that regardless of the culture conditions, culture duration or passage methods, some hESCs are inherently more vulnerable than others to karyotypic instability.

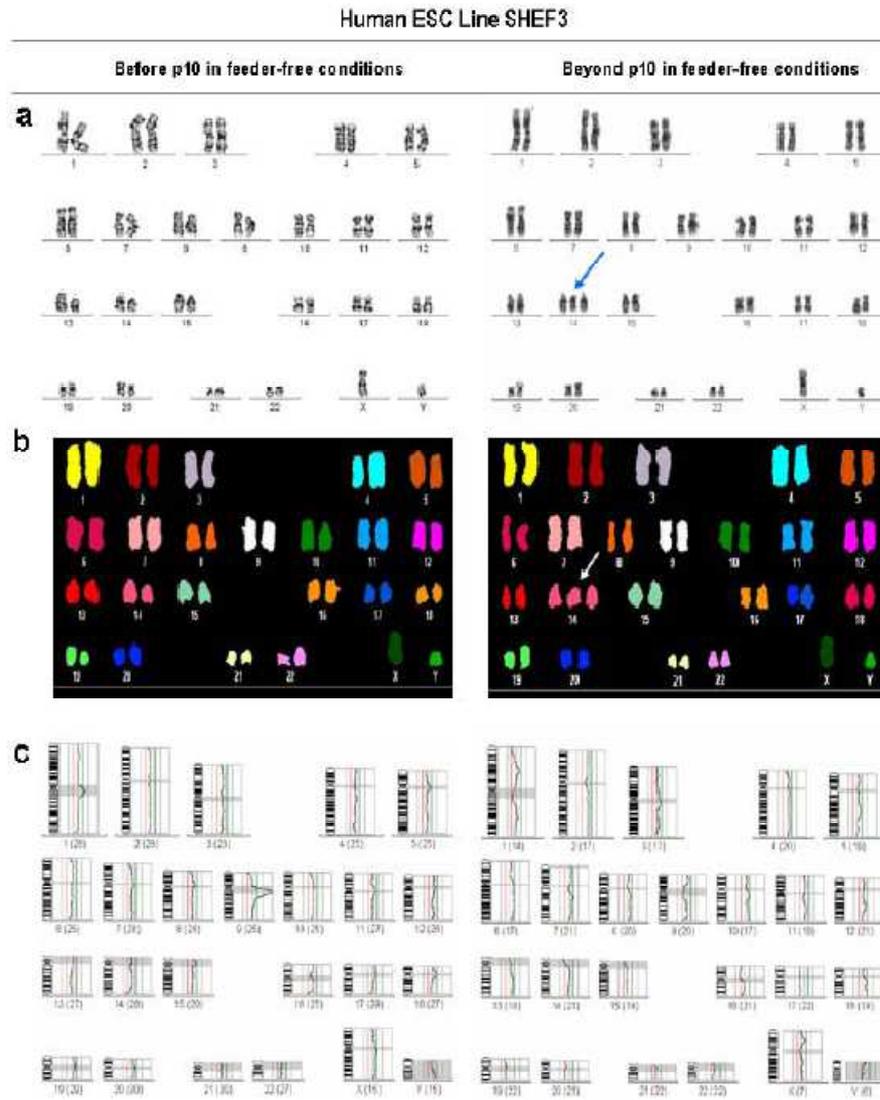
## Results

In the present study, we show by means of molecular cytogenetics (G-Banding, Spectral Karyotyping [SKY] and Comparative Genomic Hybridization [CGH]) that both, HS181 and SHEF-3 hESC lines [5,6,15] maintained over a layer of irradiated human foreskin fibroblasts (HFFs) feeder cells and split using mechanical methods proved to be karyotypically stable upon 71 and 51 passages, respectively (Figure 1 & 2 and Additional File 1). Both hESC lines were euploid and neither structural chromosome changes

Figure 1. Catalina et al.



**Figure 1**  
**Molecular cytogenetic analysis of HS181 hESC line.** HS181 hESC line was genetically stable for 71 passages in feeders. Upon being transferred to feeder-free conditions and split using enzymatic methods, the HS181 hESC line gained a chromosome 12 as early as passage 17 and an additional marker, shown by SKY to be an extra chromosome 20 by passage 21. The level of mosaicism gradually increased from 26% (p17) to 89% (p30). In conventional karyotyping analysis (A) and CGH (C), the blue arrows indicate chromosomal gains. In the SKY images (B), the white arrows confirm the gain of chromosome 12 and characterized the marker seen by G-banding as a partial gain of chromosome 20.



**Figure 2**

**Molecular cytogenetic analysis of SHEF-3 hESC line.** SHEF-3 hESC line was genetically stable for 51 passages in feeders. Upon being transferred to feeder-free conditions and passaged using enzymatic methods, it quickly gained a trisomy of chromosome 14 as early as in p10. Opposite to the HS181 line, the degree of mosaicism for the extra chromosome 14 did not increase overtime in feeder-free conditions and remained between 23%–36% over the culture (see Table I). In conventional karyotyping analysis (A), the blue arrows indicate chromosomal gains. B,C: SKY and CGH analyses showing the absence of further structural or numerical abnormalities.

nor gains/losses of DNA content were observed (Figure 1 & Additional File 1). These cells were then transferred to a feeder-free culture (matrigel-coated surface and HFF-conditioned media [HFF-CM]) and were enzymatically split by using Collagenase IV. The chromosome integrity was determined at different culture time points (p10, p17, p21 and p30). In a feeder-free culture system, the HS181 cells were cytogenetically normal up to p10. Afterwards, they gained an extra chromosome 12 as early as p17 in 26% of the cells comprising the culture. By p21 a marker was detected by conventional karyotyping, characterized as a partial gain of chromosome 20 by SKY (Figure 1 & Additional File 1). Moreover, the trisomy 12 was found in 31% of the cells by p21. The mosaicism for trisomy 12 gradually increased and by p30, 39% of the cells within the HS181 hESC culture were 47XX + 12, although the extra chromosome 20 eventually disappeared (Figure 1 and Additional File 1). The chromosomal abnormalities seem to be in line with the ones previously reported in other hESC lines affecting chromosomes 12 and, at a lesser extent chromosome 20. The cytogenetic analysis carried out at different culture passages (p10, p17, p21 and p30) provided evidence that key genes in specific chromosomes (i.e. chromosome 12) may promote stem cell self-renewal at the expense of differentiation, providing a selective proliferative/survival advantage as it is shown by the outgrowth of the karyotypically abnormal HS181 hESCs over their karyotypically stable counterparts, eventually taking over the hESC culture. In contrast, other karyotypic changes in distinct chromosomes (i.e. an extra chromosome 20 observed in HS181 hESCs) may result in a delayed cell cycle and hence a slower proliferation rate, with those abnormal cells within the hESC cultures eventually disappearing. Similarly, the SHEF-3 line also acquired a trisomy of chromosome 14 as early as passage 10. However, this karyotypic aberration does not seem to confer selective advantage to the genetically abnormal cells within the bulk culture and the level of mosaicism for the trisomy 14 remained over time between 15%–36%. Importantly, these chromosomally unstable hESC lines retained the canonical undifferentiated hESC phenotype (SSEA3+, SSEA4+, Tra-1-60+, Tra-1-81+, Oct3/4+, Nanog+, Rex-1-, Sox-2+), and the ability to differentiate into tissues representing the three germ layers *in vivo* by teratoma formation (data not shown).

Despite the fact that these data may throw more light on the genetic stability of hESCs and its relation to how cells are maintained in culture, caution is required when arguing that culture conditions/duration may promote chromosomal aberrations. For instance, Inzunza et al [8], Buzzard et al [9] and Caisander et al [11] showed karyotypic changes in 4 out of 13 hESC lines maintained on mouse or human feeders by mechanical dissociation. Moreover, Draper et al [3] reported karyotypic changes in

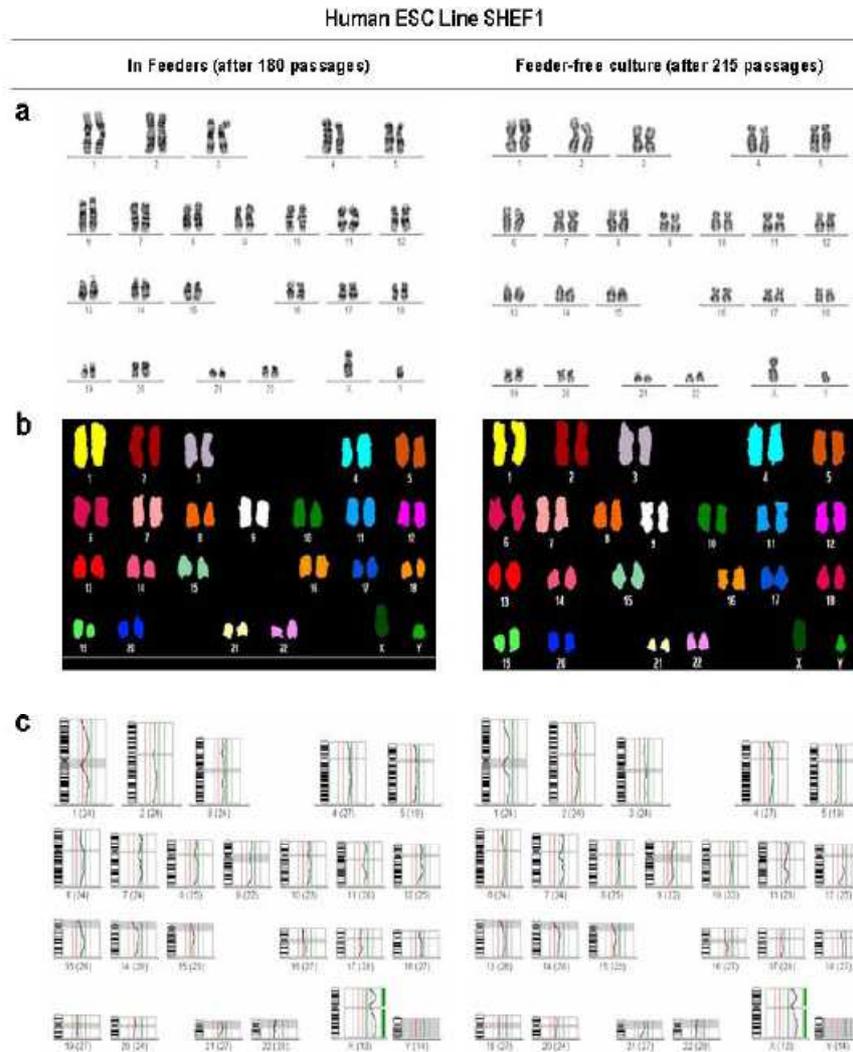
hESCs maintained with or without MEFs and split either mechanically or enzymatically [3]. Imrreh et al [5] also reported the gain of trisomy 12 in HS181 hESC line maintained in HFFs but passaged using enzymatic methods. Interestingly, we show that in contrast to the HS181 and SHEF-3 hESC lines, a much older hESC line, SHEF-1, which had been maintained for 185 passages in feeders (130 passages in MEFs and 55 passages in HFFs) displayed no karyotypic changes as determined by G-banding, SKY and CGH even after 30 passages in feeder-free conditions despite being split by means of enzymatic methods throughout a total of 215 passages (almost during 4 years) (Figure 3 and Additional File 1). This data indicates that although culture conditions might partially contribute to chromosomal instability, some hESC lines are inherently more predisposed than others to karyotypic changes, being susceptible to karyotypic abnormalities regardless the presence/absence of feeders, splitting techniques and the duration of the culture. Therefore, this suggests that some hESCs are inherently more prone than others to genomic instability.

#### Discussion

Human ESCs have been hailed as a unique tool for biomedical applications such as cell replacement therapy, developmental biology, drug discovery and disease modeling [2,20]. They have the potential to become a powerful tool for modeling different aspects of cancer biology that cannot otherwise be addressed by patient sample analyses or animal models [2,20]. Many hESC downstream applications, however, warrant their culture under feeder-free conditions while retaining pluripotency and genomic integrity; otherwise, cooperating mutations already present could prime hESCs susceptible to cellular transformation [2,20]. Our observations of chromosomal changes occurring only in specific hESC lines not only suggest caution when designing novel culture conditions, and especially feeder-free conditions but should encourage hESC researchers to perform regular high-resolution molecular and cytogenetic studies to verify the chromosome integrity in hESCs using not only G-banding but also CGH, SKY and more precise techniques such as SNP assays to be able to detect tiny but biologically relevant single nucleotide polymorphisms.

Over the last years controversial data has been reported regarding the chromosomal integrity of hESCs maintained after prolonged *in vitro* culture [3-11]. Some laboratories [3-8] independently showed chromosome changes in several hESC lines whereas other studies [4,9-11] reported a lack of karyotypic changes in a variety of hESC lines. These controversial findings are believed to stem from particular aspects of cell culture methods: i) mechanical versus enzymatic passage methods; ii) presence versus absence of feeders and iii) duration of the

Figure 3. Catalina et al



**Figure 3**  
**Molecular cytogenetic analysis of SHEF-1 hESC line.** In contrast to HSI81 and SHEF-3 hESC lines, the SHEF-1 hESC line was genetically stable after as many as 185 passages in feeders. Upon being transferred to feeder-free conditions, the SHEF-1 hESC line displayed no karyotypic changes assessed by G-banding (A), SKY (B) and CGH (C) after further 30 passages in feeder-free conditions despite being split by means of enzymatic methods throughout over 215 passages (almost 4 years in *in vitro* culture). This data suggests that although culture conditions may partially contribute to chromosome stability, some hESC lines are inherently more predisposed than others to karyotypic changes.

long-term culture. In the present study, we have compared side-by-side three different hESC lines maintained in identical culture conditions and found significant differences among them in regards to their chromosomal integrity. All three hESC lines were chromosomally stable when grown in feeders. However, despite being maintained under identical conditions, each hESC line behaved differently upon being transferred to a feeder-free culture system. The two younger hESC lines, became chromosomally unstable shortly after being cultured on feeder-free conditions whereas a much older hESC line did not undergo any numerical or structural chromosomal change after >215 passages. While these results are in line with the idea that feeder-free conditions may partially contribute to hESC chromosomal changes they also confirm the hypothesis that regardless of the culture conditions, culture duration or splitting methods, some hESC lines are inherently more prone than others to karyotypic instability. Importantly, the fact that two relatively 'young' hESC lines became karyotypically abnormal by passage 61–87 coupled to the genomic stability retained by a much older (over 215 passages) hESC line is clear evidence that the duration of the *in vitro* culture does not seem to contribute to hESC genomic instability.

These data support the notion that chromosomal aberrations seem to occur when hESCs are transferred to and maintained in a feeder-free culture system and that this phenomenon seems to vary among different hESC lines, suggesting that hESC predisposition to karyotypic instability depends on differential vulnerability of distinct hESC lines due to inherent properties rather than just a cell culture adaptation process. Much work is still required in order to identify the scope of the problem underlying the karyotypic instability and to unravel the intrinsic and/or extrinsic features which contribute to making some hESCs more prone to chromosomal instability than others. Systematic inter-laboratory comparisons about to what extent inherent intrinsic properties among multiple hESC lines, cytogenetic makeup of the human pre-implantational embryos and hESC derivation methods may contribute to the propensity to karyotypic changes are required. We should bear in mind that *in vitro* culture of hESCs is an abnormal condition. *In vivo*, the cells of the late inner cell mass to which hESCs correspond to, do not persist but disappear as embryogenesis progresses. However, hESCs are derived from the inner cell mass of surplus embryos which commonly harbour chromosomal abnormalities [12-14]. Recent studies [13,14] reported 50% rates of aneuploidy observed in human blastocysts originating from preimplantation surplus embryos. Among these abnormal human embryos, most are mosaic (mixture of diploid and aneuploid cells). Blastocysts donated for establishment of hESC lines are commonly derived either from fresh preimplantation

embryos of suboptimal quality which are not used for *in utero* transfer or, more commonly from frozen embryos. This poses many unresolved questions about hESC *in vitro* culture and genomic stability: i) Are hESCs derived from frozen embryos more prone to genomic instability than those derived from fresh embryos? ii) If 40%–50% of the human IVF embryos are karyotypically abnormal, why almost 100% of the newly derived hESC lines are euploid? Is this because karyotypically abnormal embryos cannot progress *in vitro* into a hESC line? iii) Are only the euploid blastomeres in IVF mosaic embryos responsible for colony outgrowth and hESC establishment? iv) Are hESC lines originally derived in a feeder-free system more vulnerable to chromosomal changes than those derived on feeders?

Recent elegant work indicates that cancer may arise from tissue stem cells in adults, and that many cell-signalling pathways essential for normal development (e.g. BMP, Notch, Wnt and Hedgehog) are involved in cancer progression, suggesting a link between embryonic cells and cancer cells [2,22]. The fact that cellular transformation manifests as a blockage or altered cell differentiation suggests that *in vitro* hESC differentiation could become a promising tool for studying cancer biology and the emergence of transformation events by characterizing the genetic and epigenetic mechanisms that drive cell transformation rather than normal cell specification. Accordingly, it is worth mentioning that the derivation and/or establishment of hESCs carrying specific chromosome abnormalities or characterized mutations may represent an unprecedented tool to dissecting cellular and molecular mechanisms underlying cancer biology by likely disrupting the balance between self-renewal, differentiation and cell death. In fact, our data reveal how distinct cytogenetic abnormalities result in different biological effect. For instance, extra copies of key genes in specific chromosomes (i.e. chromosome 12) may promote hESC self-renewal at the expense of differentiation, providing a selective proliferative/survival advantage as shown by the outgrowth of the karyotypically abnormal hESCs over their karyotypically stable counterparts, eventually taking over the hESC culture. In contrast, extra copies of genes in other chromosomes (i.e. chromosome 14 or 20) might result in either no effect or a delayed cell cycle and hence a slower proliferation rate, with those abnormal cells within the hESC cultures eventually disappearing.

## Methods

### Human ESC culture

The human ESC lines HS181, SHEF-1 and SHEF-3 were maintained either in tissue-treated T25 flasks (BD Biosciences, Bedford, MA) over a confluent ( $0.5-1 \times 10^5$  feeder cells/cm<sup>2</sup>) layer of X-ray inactivated (4000 rads) HFFs (ATCC; SCD-1112SK) or MEFs in hESC media con-

sisting of 80% KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum replacement, 1% nonessential amino acids, 1 mM L-Glutamine, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 8 ng/mL of basic fibroblast growth factor (bFGF) (all from Invitrogen, CA) [16] or cultured in Matrigel (BD Biosciences)-coated T25 flasks in human foreskin fibroblast (HFF)-conditioned medium (HFF-CM) supplemented with 8 ng/mL bFGF [17]. To maintain undifferentiated growth, the media (hESC media or HFF-CM) was changed daily, and the cells were split (1:2) weekly by dissociation with 200 U/mL of collagenase IV (Invitrogen).

#### Conventional karyotyping

hESCs were cultured in medium supplemented with 0,1 mg/mL colcemid (Biological Industries) for up to 3–4 hours. The cells were then washed in Versene solution (Gibco) and subsequently trypsinized and spun down. The pellet was resuspended carefully in a KCL hypotonic solution (0,075 mol/L), rinsed to remove the cytoplasm, and then fixed in methanol/acetic acid 3:1. The fixing procedure was repeated three times. Finally, the pellet was resuspended in a final volume of 1 mL of fixative, and the cells were dropped onto glass slides. Chromosomes were visualized by using a modified Wright's staining. At least 25 metaphases were analyzed for each cell line using a conventional microscope and the IKAROS-software (Metasystems) [18,19].

#### Comparative genomic hybridization

Genomic DNA from hESCs was obtained using the Qiagen DNA isolation kit. Human ESC DNA labeling with fluorescent (Spectrum Green) dUTP was performed using Nick Translation according to Vysis's protocol. Human male gDNA labeled with Spectrum Red was used as reference. After labeling, the length of the DNA fragments were verified by gel electrophoresis to ensure they ranged from 300–3000 bp.

Human ESC labeled-DNA and the reference labeled-DNA were simultaneously hybridized to normal metaphase chromosomes in the presence of Cot-1 DNA to block repetitive sequences. After CGH hybridization in a moist chamber for 48 h, the slides were washed once in 0,4 × SSC/0,3% NP-40 at 73 °C for 2 minutes, followed by 2 × SSC/0,1% NP-40 at RT for 1 minute. The slides were air-dried in the darkness and the chromosomes counterstained with DAPI. Twenty metaphases were captured and evaluated for each cell sample [18]. Red/Green ratios higher than 1.25 indicated deleted regions and ratios below 0.80 indicated amplified regions. The CGH quality control test was analyzed using a 99.5% confidence interval. For data analysis, an automated fluorescence microscope system (Nikon Eclipse 50i) equipped with appropriate filters and Metasystem CGH software program was used [8,18,19].

#### Spectral karyotyping

For SKY analysis, slides were hybridized using the SKY method according to the manufacturer's protocol (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Images were acquired with an SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging) mounted on a Zeiss Axioplan microscope using a custom-designed optical filter (SKY-1; Chroma Technology, Brattleboro, VT). Twenty metaphases were analyzed for each sample. SKY is somewhat limited in the determination of breakpoints and in the identification of intrachromosomal changes such as duplications, deletions, and inversions [8,18-21]. As a result, breakpoints on the SKY-painted chromosomes were determined by comparison of corresponding DAPI banding and by comparison with G-banding karyotype of the hESC line.

#### List of abbreviations

hESC: Human Embryonic Stem Cell; CGH: Comparative Genomic Hybridization; SKY: Spectral Karyotyping; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; HFF: Human Foreskin Fibroblast; bFGF: basic Fibroblast Growth Factor.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

PC designed and performed experiments and analyzed the data. RM, GL, LS, TdIC and CB performed experiments and analyzed data. PEL provided critical insights, assist in experiments and partially supported the study. PM conceived and supported the study, designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper. All authors revised and gave feedback to the last draft.

#### Additional material

##### Additional file 1

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-7-76-S1.doc>]

#### Acknowledgements

This work was funded by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (project 0030/2006 to PM), CICE de la Junta de Andalucía (P08-CTS-3678 to PM), The International Jose Carreras Foundation against the Leukemia to PM/CB (EDThomas-05) and, The Spanish Ministry of Health to PM (FIS PI070026). C.B is supported by ISCIII-FIS (Ref: CP07/00059). P.E.L is supported by ISCIII-CSJA Junior Team Leader Tenure Track Programme. We are especially indebted Prof. Peter Andrews (Sheffield University, UK) and Outi Hovatta (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden) for providing hESC lines. We also thank Dr. Juan Cigudosa (CNIO, Madrid).

## References

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: *Science* 1998, **282**:1145-1147.
2. Bueno C, Montes R, García-Castro J, Greaves M, Menendez P: *Drug Discovery Today: Disease Models* 2008, **4**:53-60.
3. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW: *Nat Biotech* 2004, **22**:53-54.
4. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A: *Nat Genetics* 2005, **37**:1099-1103.
5. Imreh MP, Gertow K, Cedervall J, Unger C, Holmberg K, Szöke K, Csöregyh L, Fried G, Dilber S, Blennow E, Ahrlund-Richter L: *J Cell Biochem* 2006, **99**:508-516.
6. Gertow K, Cedervall J, Unger C, Szöke K, Blennow E, Imreh MP, Ahrlund-Richter L: *J Cell Biochem* 2007, **100**:1518-1525.
7. Pera MF: *Nat Biotech* 2004, **22**:42.
8. Inzunza J, Sahlen S, Holmberg K, Strömberg AM, Teerijoki H, Blennow E, Hovatta O, Malmgren H: *Mol Hum Reprod* 2004, **10**:461-466.
9. Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A: *Nat Biotech* 2004, **22**:381-382.
10. Mitalipova M, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, Dalton S, Stice SL: *Nat Biotech* 2005, **23**:19-20.
11. Caisander G, Park H, Frej K, Lindqvist J, Bergh C, Lundin K, Hanson C: *Chromosome Res* 2006, **14**:131-137.
12. Hardarson T, Caisander G, Sjogren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K: *Hum Reprod* 2003, **18**:399-407.
13. Hanson C, Caisander G: *APMIS* 2005, **113**:751-755.
14. Wilton L: *Prenat Diagn* 2002, **22**:512-518.
15. Inzunza J, Gertow K, Stromberg AM, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, Wolbank S, Ahrlund-Richter L, Hovatta O: *Stem Cells* 2005, **23**:544-549.
16. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsón J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Ahrlund-Richter L: *A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells*. *Hum Reprod* 2003, **18**(7):1404-1409.
17. Menendez P, Wang L, Chadwick K, Li L, Bhatia M: *Retroviral transduction of hematopoietic cells differentiated from human embryonic stem cell-derived CD45(neg)PFV hemogenic precursors*. *Mol Ther* 2004, **10**:1109-1120.
18. Catalina P, Cobo F, Cortes J, Nieto A, Cabrera C, Montes R, Concha A, Menendez P: *Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review*. *Cell Biol Int* 2007, **31**:861-869.
19. Menendez P, Wang L, Bhatia M: *Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications*. *Curr Gene Ther* 2005, **5**:375-385.
20. Catalina P, Montes R, Nieto A, Ligeró G, Sanchez L, Jara M, Rasillo A, Orfao A, Cigudosa J, Hovatta A, Greaves M, Menendez P: *Scientific and clinical opportunity for modeling infant/childhood leukemia using genetically stable human embryonic stem cells*. *Leuk Res* 2008. doi:10.1016/j.leukres.2008.08.028
21. Gale RE, Hills R, Kottaridis P, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, Linch DC: *No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials*. *Blood* 2005, **106**:3658-3665.
22. Menendez P, Bueno C, Wang L: *Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies*. *Cytotherapy* 2006, **8**:530-541.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



**Table 1: Summary of the karyotypic changes observed overtime in the HS181, SHEF-1 and SHEF-3 hESC lines and its potential relation to the culture conditions.**

Human ESC Line	Passages under <b>feeders</b> conditions	Passages under <b>feeder-free</b> conditions	Karyotype (G-Banding)	% Mosaicism	SKY / CGH
<b>HS181</b>	71*	0	46,XX	n.a	normal/normal
	71*	10	46,XX	n.a	normal/normal
	71*	17	47,XX, +12	25 %	n.d
	71*	21	48,XX, +12, +mar	31%	48,XX, +12, +mar
	71*	30	47,XX, +12	89 %	47,XX, +12
<b>SHEF-3</b>	29** + 22*	0	46,XY	n.a	Normal/normal
	29** + 22*	10	47,XY+14	36%	47,XY+14
	29** + 22*	17	47,XY+14	24%	n.d
	29** + 22*	21	47,XY+14	23%	n.d
	29** + 22*	26	47,XY+14	13%	47,XY+14
<b>SHEF-1</b>	130** + 55*	0	46,XY	n.a	Normal/normal
	130** + 55*	10	46,XY	n.a	Normal/normal
	130** + 55*	17	46,XY	n.a	n.d
	130** + 55*	21	46,XY	n.a	n.d
	130** + 55*	30	46,XY	n.a	normal/normal
	130** + 55*				

\*Feeders were Human Embryonic Fibroblast (HFFs). \*\*Feeders were Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs).

Abbreviations: n.a: not applicable; n.d: not done; SKY: Spectral Karyotyping; CGH: Comparative Genomic Hybridization

**ARTICULO 2:** Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leuk Res* **33** (2009), pp. 980-990.

**Catalina, P.**, Bueno, C., Montes, R., Nieto, A., Ligeró, G., Sanchez, L., Jara, M., Rasillo, A., Orfao, A., Cigudosa, J., Hovatta, O., Greaves, M. and Menendez, P.



**Introducción:** Las hESCs proporcionan una oportunidad de desarrollar modelos celulares para estudiar los eventos tempranos que ocurren durante el desarrollo humano y que conducen a la diferenciación hematopoyética normal frente a la transformación leucémica. Son de gran interés los oncogenes de fusión tales como MLL-AF4, TEL-AML1 o BCR-ABL con origen prenatal. Antes de usar las hESCs como modelo celular para entender mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo leucémico, es importante garantizar la estabilidad genética de las células, ya que alteraciones presentes en estas células pueden actuar como eventos oncogénicos colaboradores y hacerlas más susceptibles de transformarse.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo es determinar si las líneas de hESCs, HS181 y HS293, son estables cromosómicamente, analizando si presentan de base alguna anomalía genética asociada a leucemias pediátricas, y determinar si las líneas objeto del estudio, presentan potencial de diferenciación hematopoyético.

**Materiales y Métodos:** Las líneas de hESCs HS181 y HS293 fueron mantenidas en cultivo durante más de 70 pases sobre *feeders* humanos inactivados por irradiación. Se realizaron todos los ensayos necesarios para la comprobación de sus propiedades pluripotentes, incluyendo la diferenciación *in vitro* e *in vivo*, expresión de los marcadores SSEA-3 y TRA-1-60 por inmunohistoquímica, expresión por RT-PCR de factores de transcripción asociados a pluripotencia como Sox-2, Nanog, Oct-3 y Rex-1. También hemos analizado el cariotipo de las hESCs y la presencia de reordenamientos cromosómicos característicos en LLA-B pediátricas tales como TEL-AML1, BCR-ABL y MLL-AF4, utilizando técnicas de citogenética convencional y molecular como FISH, CGH convencional, SKY. Además hemos analizado la presencia de, mutaciones activadoras en los genes tirosina-quinasa *FLT3* y *c-KIT* conocidos por conferir una ventaja proliferativa a los blastos leucémicos. Por último, se comprobó mediante citometría y ensayos semisólidos de metilcelulosa la predisposición de estas hESCs a diferenciarse a linaje hematopoyético.

**Resultados:** Las líneas de hESCs HS181 y HS293 mantienen durante largos periodos de tiempo en cultivo sus propiedades de pluripotencia: *in vitro*, mostrando la morfología típica de las hESCs, la expresión de los marcadores de indiferenciación característicos tanto por inmunohistoquímica como por RT-PCR; *in vivo*, formando teratomas una vez que se han inyectado las hESCs en ratones inmunodeprimidos, presentando tejidos característicos de las tres capas germinales. Los análisis citogenéticos convencionales y moleculares revelan que estas células son estables cromosómicamente durante el cultivo en *feeders* humanos. También demostramos la ausencia de reordenamientos cromosómicos típicos de las LLA infantiles y de mutaciones tanto en *FLT3* como en *c-KIT* y la ausencia de expresión del marcador CD30, que se expresa en las hESCs transformadas y no en las normales. Además, la línea de hESCs HS181 es capaz de diferenciarse hacia linaje hematopoyético pero no la HS293.

**Conclusión:** Estos datos pueden servir para estimular estudios encaminados a implementar técnicas citogenéticas con el fin de detectar pequeñas, pero relevantes, anomalías cromosómicas, que pueden tener un impacto funcional negativo sobre la biología de las hESCs. En base a estos antecedentes, pensamos que se podrían generar hESCs transgénicas desprovistas de las anomalías genéticas descritas, que sobreexpresen oncogenes de fusión leucémicos con el objetivo de evaluar el efecto funcional que dichos oncogenes tienen sobre la diferenciación hematopoyética de las hESCs.



## Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia

P. Catalina<sup>a,1</sup>, C. Bueno<sup>a,1</sup>, R. Montes<sup>a,1</sup>, A. Nieto<sup>a</sup>, G. Ligeró<sup>a</sup>, L. Sánchez<sup>a</sup>, M. Jara<sup>b</sup>, A. Rasillo<sup>b</sup>, A. Orfao<sup>b</sup>, J. Cigudosa<sup>c</sup>, O. Hovatta<sup>d</sup>, M. Greaves<sup>e</sup>, P. Menéndez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Andalusian Stem Cell Bank, University of Granada, Granada, Spain

<sup>b</sup> Cancer Research Centre (IBMCC-USAL/CSIC), Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>c</sup> CNIO, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Division of Gynecology, Karolinska Hospital, Stockholm, Spain

<sup>e</sup> Haemato-Oncology Department, Institute of Cancer Research, Sutton, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2008

Received in revised form 27 August 2008

Accepted 28 August 2008

Available online 17 October 2008

#### Keywords:

hESCs

Infant/childhood leukemia

Disease modeling

Genomic stability

### ABSTRACT

Human ESCs provide an opportunity for modeling human-specific strategies to study the earliest events leading to normal hematopoietic specification versus leukemic transformation. Of interest, are the human childhood acute leukemias harboring specific fusion oncogenes such as MLL-AF4, TEL-AML1 or BCR-ABL wherein clinically significant manifestations arise *in utero*. The mechanisms of transformation are not amenable to analysis with patient samples and, many mouse models for pediatric leukemias have fallen short in illuminating the human disease because they do not recapitulate key aspects of the actual disease, suggesting that the mouse models are missing essential components of oncogenesis present in the human embryo. Prior to using hESCs as a tentative system for modeling leukemia, robust studies aimed at demonstrating their genetic stability are required; otherwise, cooperating mutations already present could prime hESCs susceptible to transformation. We performed an extensive molecular cytogenetic and cellular *in vitro* and *in vivo* analysis which reveals an overall genomic stability of HS181 and HS293 hESCs maintained long-term by mechanical dissociation in human feeders. Importantly, we show for the first time that the genetically stable HS181 hESC line differentiates into CD45+ hematopoietic cells and clonogenic hematopoietic progenitors. This data should encourage stem cell researchers to implement robust cytogenetic tools when assessing hESC genetic stability, in order to detect tiny but relevant biological functional or structural chromosome abnormalities and, paves the way for generating fusion oncogene-expressing transgenic hESCs as a human-specific system for studying the early *in utero* events leading to normal hematopoietic specification versus childhood leukemic transformation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human ESCs have been hailed as a unique tool for biomedical applications such as cell replacement therapy, developmental biology, drug discovery and disease modeling [1–9]. They have the potential to become a powerful tool for modeling different aspects of cancer biology that cannot otherwise be addressed by patient sample analyses or animal models [2,6,10–12].

There are different subtypes of infant/childhood acute leukemias wherein clinically significant manifestations arise *in utero* [13,14]. These leukemias commonly harbor aberrant fusion oncogenes (resulting from chromosomal translocations) such as MLL-AF4 (present in pro-B acute lymphoblastic leukemia (ALL)) and TEL-AML1 or BCR-ABL (present in pre-B ALL).

Previous studies [13,15] have indicated that cancer results from two classes of cooperating mutations: (i) gene rearrangements (such as fusion oncogenes) which primarily impair lineage differentiation programs characterized by a lack of maturation and (ii) mutations (such as constitutively activated tyrosine kinase receptor [TKR]) which confer a proliferative and/or survival advantage. For instance, infant MLL-AF4-expressing pro-B ALL usually displays activating *FLT-3* point mutations [16–18]. Similarly, the pre-B-ALL is associated with TEL-AML or BCR-ABL fusion genes [19–22]. More-

\* Corresponding author at: Andalusian Stem Cell Bank, University of Granada, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Parque Tecnológico de la Salud, Avda del Conocimiento, Granada 18100, Spain. Tel.: +34 697 956939; fax: +34 958 894 652. E-mail address: [pablo.menendez@juntadeandalucia.es](mailto:pablo.menendez@juntadeandalucia.es) (P. Menéndez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

over, acute myeloid leukemias (AML) harbor mutations in the *TKR FLT3* [15] and *KIT* [23,24], resulting in a constitutive activation which leads to a proliferative advantage.

Unfortunately, the actual mechanisms of transformation are not amenable to analysis with patient samples because cancer is studied once the transformation events have already occurred *in utero* [13,14]. Furthermore, many mouse models for pediatric leukemia have fallen short in achieving the goal of illuminating the human disease because they do not recapitulate key aspects of the actual human disease, indicating that the mouse model is missing essential components of leukemogenesis present in the human embryo/fetus [4,13,14].

This link between embryonic and cancer cells is further supported by an increasing evidence indicating that cancer arise from stem cells, and that many cell signaling pathways essential for normal development are dysregulated in cancer [25–28]. The fact that cellular transformation manifests as an altered cell differentiation suggests that hESC differentiation may become a promising human-based system for studying leukemogenesis and the emergence of early/initiating events leading to cell transformation rather than normal hematopoietic specification. Additionally, CD30 has recently been identified as a transformation biomarker that is expressed on transformed hESCs but not in normal diploid hESCs, highlighting the scientific opportunity for modeling cell transformation with hESCs [29].

However, before hESCs may be claimed as a potential tool for modeling human infant cancer, robust cellular, molecular and cytogenetic analyses need to be performed to ensure an overall genomic stability of hESCs; otherwise, cooperating mutations already in place could obscure potential genomic insults which would easily render hESCs vulnerable to transformation.

Existing culture conditions for the routine maintenance of hESCs remain suboptimal and chromosomal alterations, sometimes difficult to detect by G-banding analysis, are observed frequently [30]. These chromosomal alterations seem more common when hESCs are maintained in feeder-free conditions using enzymatic rather than mechanical dissociation methods [5,30–34]. The occurrence and detrimental effect of genomic alterations must be addressed in depth over an extended period of time before using hESCs as a tool for modeling human diseases. In addition to conventional G-banding, the use of robust molecular cytogenetic tools is anticipated to throw light into the genomic stability of hESCs.

Here, we have carried out an extensive cytogenetic, molecular and cellular analysis of two hESC lines (HS181 and HS293) cultured for over 70 passages in human postnatal foreskin fibroblast (HEFs) and maintained weekly by mechanical dissection of hESC colonies [31,34]. Our data reveals an overall genomic stability whilst maintaining typical hESC morphology, expression of transcription factors and markers associated with undifferentiated status and, *in vitro* and *in vivo* pluripotency properties with the potential to differentiate into the three germ layers. Importantly, the genetically stable HS181 hESC differentiate into CD45+ hematopoietic cells and progenitors with *in vitro* clonogenic capacity. This data should encourage stem cell researchers to implement robust cytogenetic tools when assessing hESC genetic stability, in order to detect tiny but relevant biological functional or structural chromosome abnormalities. Additionally, it paves the way for generating transgenic hESCs harboring fusion oncogenes occurring in infant/childhood leukemias as an unprecedented system for modeling human pediatric leukemia that could provide new insights into the etiology and pathogenesis of these leukemias, eventually, leading to a molecular-oriented screening of new therapeutic drugs targeting leukemic stem cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. hESC maintenance

Human ESCs HS181 and HS293 [34] were maintained for over 70 passages in culture over a confluent layer of X-ray inactivated HEFs ( $1 \times 10^6$  feeder cells/well) in hESC media consisting of 80% KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 8 ng/mL of bFGF (all from Invitrogen, CA). To maintain undifferentiated growth, the hESC media was changed daily and hESCs were split (1:2) weekly by mechanical dissection of the entire hESC culture colonies into small pieces [31,34].

### 2.2. Embryoid body (EB) formation and differentiation

Human ESC colonies were harvested, transferred to low-attachment plates and allowed to differentiate spontaneously through EB formation in KO-DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum (Invitrogen), 1% L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol but without bFGF with media changes every 4 days. After 21 days, EBs were transferred to a tissue-treated plate where they grew and gave rise to a confluent monolayer. Differentiation potential was determined by immunocytochemistry. EB cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. Then, the cells were incubated (1 h at RT) with primary antibodies for anti-*nestin* and anti-smooth muscle actin (Chemicon, 1:100). Slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (30 min at RT) and a streptavidin peroxidase complex (30 min at RT) (Vector Laboratories Inc.). The immunostaining was visualized using diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. The washing steps were done in PBS. Negative controls were prepared by replacing the primary antibody by PBS.

To induce hematopoietic differentiation the same differentiation medium supplemented with hematopoietic cytokines (300 ng/mL of stem cell factor (SCF), 300 ng/mL of Flt-3L, 10 ng/mL of IL3, 10 ng/mL of IL6, 50 ng/mL of G-CSF, and 25 ng/mL of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) [all from Peprotech, Rocky Hill, NJ]) was used [35]. The hEBs were cultured for 22 days with changes of media supplemented with cytokines + BMP-4 every 4 days.

### 2.3. *In vivo* teratoma formation

Animal protocols were approved by the Karolinska University Hospital Council On Animal Care. *In vivo* pluripotency was tested as previously described [36]. The ability to form teratomas is the gold-standard assay to demonstrate the pluripotency of a hESC line. Upon injection in the testis of an immunodeficient mouse, the ESCs must differentiate randomly *in vivo* and give rise to tissues representing the three germ layers: endoderm, mesoderm and ectoderm. In brief, HS181 and HS293 cells were harvested by mechanical treatment. Five colonies ( $10^3$  to  $10^4$  hESCs) were implanted beneath the testicular capsule of a young (6-week) severe combined immunodeficiency (SCID)/beige male mouse (C.B.-17/GbmsTac-scid-bgDF N7, M&B, Ry, Denmark). Teratoma growth was determined by palpation every week, and the mice were sacrificed 11 weeks after implantation. Teratomas were fixed, and sections were stained with hematoxylin and eosin.

### 2.4. Immunocytochemistry characterization of hESCs

Human ESCs were characterized by immunocytochemistry using antibodies against SSEA-4 and TRA-1-60 (Chemicon). Briefly, hESCs were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min followed by 30 min incubation in 10% normal goat serum in PBS. Colonies were incubated with primary antibodies (1:100 dilution) for 1 h at RT. Conjugated secondary antibodies were used for 30 min at RT as follows: goat anti-rat IgG AMCA-conjugated for SSEA-4 and goat anti-mouse IgM-FITC-conjugated for TRA-1-60. The slides were mounted in Vectashield containing DAPI. An irrelevant isotype-matched antibody was used as a control. Alkaline phosphatase expression was demonstrated using the AP Detection Kit (Chemicon).

### 2.5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of undifferentiated stem cell markers

Total RNA from hESCs colonies was obtained using the Cells-to-cDNA™ II Cell Lysis Buffer (Ambion). The first strand cDNA was synthesized with 10  $\mu$ L of total RNA, using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) in a final volume of 25  $\mu$ L. The samples were incubated at 42 °C for 60 min and the reaction was stopped at 70 °C for 10 min. The *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox-2*, and *Rex-1* genes were amplified by RT-PCR (Lightcycler, Roche). GAPDH was used as a housekeeping gene. The primers used were as follows: *Oct3/4*: 5'-TCTGCAGAAAGAAGCTCGAGCA-3', and 5'-AGATGGTCTGTTGGCTGAACAC-3'; *Nanog*: 5'-TGCAGTCCAGCCAAATTC-3', and 5'-CCTAGTGGTCTGCTGATTACATAAGG-3'; *Sox-2*: 5'-CCCCGGCGGCAATAGCA-3', and 5'-TCGGGGCGGGGAGATACAT-3'; *Rex-1*: 5'-CAGATCCTAAACAGCTCGGCAAT-3', and 5'-GCGTACGCAAAATTAAGTCAGA-3' and GAPDH 5'-GAAGTGAAGGTCGGAGTC-3', and 5'-CAAGATGCTGATGGATTTC-3'. Same PCR conditions were used for all the genes: 40 cycles of 35 s at 95 °C followed by 30 s at 60 °C and 40 s at 72 °C.

## 2.6. FLT3 gene mutation analysis

The three most common activating mutations of the FLT-3 TK receptor (D835Y, I836del and ITD) present in a variety of pediatric and adult acute leukemias were assessed by PCR, as previously described in detail [37,38]. The primers used were as follows: FLT3-ITD 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' and 5'-CTTTGAGCATTGACGGCAACC-3'; FLT3-D835/I836del 5'-CCGCCAGGAACGCTTG-3' and 5'-CACAGTAATATTCATATGACCAGACATC-3'. For FLT3-ITD, gDNA was amplified to produce a fragment of 238 bp from germline alleles, and a slightly higher (260 bp) fragment from mutated FLT3-ITD alleles. PCR conditions were as follows: 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, and 30 s at 72 °C. FLT3 point mutations at codon D835Y or I836del, were detected by PCR amplification followed by EcoRV digestion. PCR followed by EcoRV digestion produces in the germline alleles two bands of 131 and 68 bp. The D835Y and I836del point mutations, however, abrogate this restriction site and the EcoRV digestion of the PCR product produces a unique 199 bp fragment. The PCR conditions were as above, but the annealing temperature was of 60 °C.

## 2.7. Genomic DNA extraction and detection of KIT gene mutations

Genomic DNA was extracted from hESCs using the QIAamp mini-DNA extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA) and used to detect activating D816V, D816Y and D816H KIT mutations usually observed in exon 17 of KIT gene in a variety of acute leukemias [24]. In all cases a peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping technique (LightCycler) with the DNA Master Hybridization probes Kit (Roche Diagnostics) was used, as previously described [24]. Hybridization probes and PNA-oligomer were purchased from TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) and Applied Biosystems (Foster City, CA), respectively. The presence of D816V, D816Y and D816H activating mutations was confirmed by sequencing the PCR products in both directions, using the 5'-CAG CCA GAA ATA TCC TCC TTA CT-3' and 5'-TTG CAG GACTGT CAA GCA GAG-3' primers and the dye-deoxy terminator method, in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer.

## 2.8. Conventional karyotyping

Human ESCs were exposed to 0.1 mg/mL colcemid (Biological Industries) for up to 3–4 h. The cells were then washed in Versene solution (Gibco) and subsequently trypsinized and spun down. The pellet was resuspended carefully in a KCl hypotonic solution (0.075 mol/L), rinsed to remove the cytoplasm and fixed in methanol/acetic acid 3:1. The pellet was resuspended in 1 mL of fixative and the cells were dropped onto glass slides. Chromosomes were visualized using a modified Wright's staining. At least 20 metaphases were analyzed [39,40] using a conventional microscope and the IKAROS-software (Metasystems, GmbH, Altlußheim, Germany).

## 2.9. Interphase-fluorescence in situ hybridization (FISH) studies

FISH was performed on HS181 and HS293 hESC lines using a commercially available kit containing probes for chromosomes 13, 18, 21, X and Y (Multivision™ PCT Multicolour Probe Panel, Vysis, Inc.). The probe was pipetted on top of the cells and denatured at 73 °C for 3 min. The slides were then incubated at 37 °C for 4 h in a moist chamber; afterwards the cover glasses were removed and the slides washed at 73 °C for 5 min in 0.4× SSC/0.1% NP-40 followed by 2× SSC/0.1% NP-40 at RT for 1 min. The slides were air-dried in the darkness, covered with the anti-fade solution and sealed with a cover-glass. At least 100 nuclei were analyzed as previously suggested [39,40]. The slides were analyzed in a fluorescence microscope equipped with appropriate filters using the ISIS-software (Metasystems, Germany).

Additionally, BCR-ABL fusions were detected using a locus-specific probe "LSI BCR/ABL Dual Color Translocation Probe". TEL-AML1 fusions were detected using a locus-specific probe "LSI TEL/AML1 Dual Color Translocation Probe". MLL rearrangements were analyzed using the "LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe".

## 2.10. Comparative genomic hybridization (CGH) studies

Genomic DNA from hESCs was obtained using the Qiagen DNA isolation kit. Human ESC DNA labeling with fluorescent (Spectrum Green) dUTP was performed using Nick Translation according to Vysis's protocol. Human male gDNA labeled with Spectrum Red was used as reference. After labeling, the length of the DNA fragments were verified by gel electrophoresis to ensure they ranged from 300 to 3000 bp.

Human ESC labeled-DNA and the reference labeled-DNA were simultaneously hybridized to normal metaphase chromosomes in the presence of Cot-1 DNA to block repetitive sequences. After CGH hybridization in a moist chamber for 48 h, the slides were washed once in 0.4× SSC/0.3% NP-40 at 73 °C for 2 min, followed by 2× SSC/0.1% NP-40 at RT for 1 min. The slides were air-dried in the darkness and the chromosomes counterstained with DAPI. Twenty metaphases were captured and evaluated for each cell sample [39]. The Red/Green ratios higher than 1.25 indicates DNA gains and below 0.80 deleted regions. The CGH quality control test was analyzed using a 99.5% confidence interval. For data analysis, an automated fluorescence microscope system (Nikon Eclipse 50i) equipped with appropriate filters and Metasystem CGH software program was used [39,41].

## 2.11. Spectral karyotyping (SKY) analyses

For SKY analysis, slides were hybridized using the SKY method according to the manufacturer's protocol (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Images were acquired with an SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging) mounted on a Zeiss Axioplan microscope using a custom-designed optical filter (SKY-1; Chroma Technology, Brattleboro, VT). Twenty metaphases were analyzed for each sample. SKY is somewhat limited in the determination of breakpoints and in the identification of intrachromosomal changes such as duplications, deletions, and inversions [38,42]. As a result, breakpoints on the SKY-painted chromosomes were determined by comparison of corresponding DAPI banding and by comparison with G-banding karyotype of the hESC line.

## 2.12. Flow cytometry detection of CD30 and Tra-1-60 expression

For detection of CD30 and Tra-1-60 expression, primary Tra-1-60 monoclonal antibody (Chemicon) was pre-incubated for 30 min at 4 °C with 2.5 µL FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Immunotech, Marseille, France) in 100 µL PBS + 3%FBS. Dissociated HS181, HS293 and BG01V hESCs [29,34] were suspended in PBS + 3%FBS at a concentration of (2–5) × 10<sup>4</sup> cells per 100 µL and added to the pre-incubated Tra-1-60 antibody. After 30 min at 4 °C, the cells were washed and resuspended in PBS + 3%FBS. Cells were then incubated for 30 min at 4 °C with 5 µL of PE-conjugated anti-CD30 antibody (BDB). Finally, the cells were washed and stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) viability dye (Immunotech) for 15 min at RT. Live cells identified by 7-AAD exclusion were analyzed for expression of Tra-1-60 and CD30 using a FACSCanto II flow cytometer equipped with the FACSDiva software (BDB).

## 2.13. Preparation of single cells from hEBs

Human EBs were dissociated with 0.4 U/mL of collagenase B (Roche) for 2 h in a 37 °C incubator, followed by treatment with cell dissociation buffer (Invitrogen) for 10 min in a 37 °C water bath, and then dissociated by gentle pipetting and passage through a 40 µm cell strainer [35].

## 2.14. Flow cytometry detection of hESC-derived hematopoietic cells

Single cells dissociated from 22-day hEBs were stained at a concentration of 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL with an APC-conjugated anti-CD45 monoclonal antibody or their corresponding IgG isotype control at a concentration of 5 µg/mL for 30 min at 4 °C. Then, the cells were washed and stained with the 7-AAD for 15 min at RT. Live cells identified by 7-AAD exclusion were analyzed for expression of CD45 using a FACSCanto II flow cytometer.

## 2.15. Colony-forming unit (CFU) assays

Human clonogenic progenitor assays were performed by plating 1000 cells into methylcellulose H4230 (Stem Cell Technologies) supplemented with recombinant human growth factors: 50 ng/mL SCF, 3 U/mL erythropoietin, 10 ng/mL GM-CSF, and 10 ng/mL IL-3. Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere and colonies counted at day 14 of CFU assay using standard morphological criteria [35].

## 2.16. Short tandem repeat (STR) typing

STR analysis was carried out using the Geneprint® Fluorescent STR Multiplex-GammaSTR® kit (Promega, Madison, WI). Loci analyzed with this system were D5S18, D13S317, D7S820, and D16S539. Electropherogram data were collected with the ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems), and analyzed using the Genotyper® 3.7 software (Applied Biosystems).

## 2.17. MEFs and HEFs processing for electron microscopy

The presence of viruses was assessed in MEFs and HEFs. MEFs (n = 9) from CF-1 mouse strain were harvested as previously described [43]. HEFs were purchased from ATCC. The cells were stained by means of an inclusion and ultramicrotomy technique as recently described in detailed [43]. The electron microscope used for specimen analysis was the Carl Zeiss Oberkochen® model IEM 10C. Work voltage was 80 kV and the film photograph was Kodak® Electron microscope film. A hundred cells were independently analyzed for each sample.

## 3. Results

### 3.1. Human ESCs maintained long-term in HEFs by mechanical dissociation retain in vitro and in vivo pluripotency properties

The hESC lines HS181 and HS293 were grown for over 70 passages on inactivated HEFs using mechanical dissociation. After

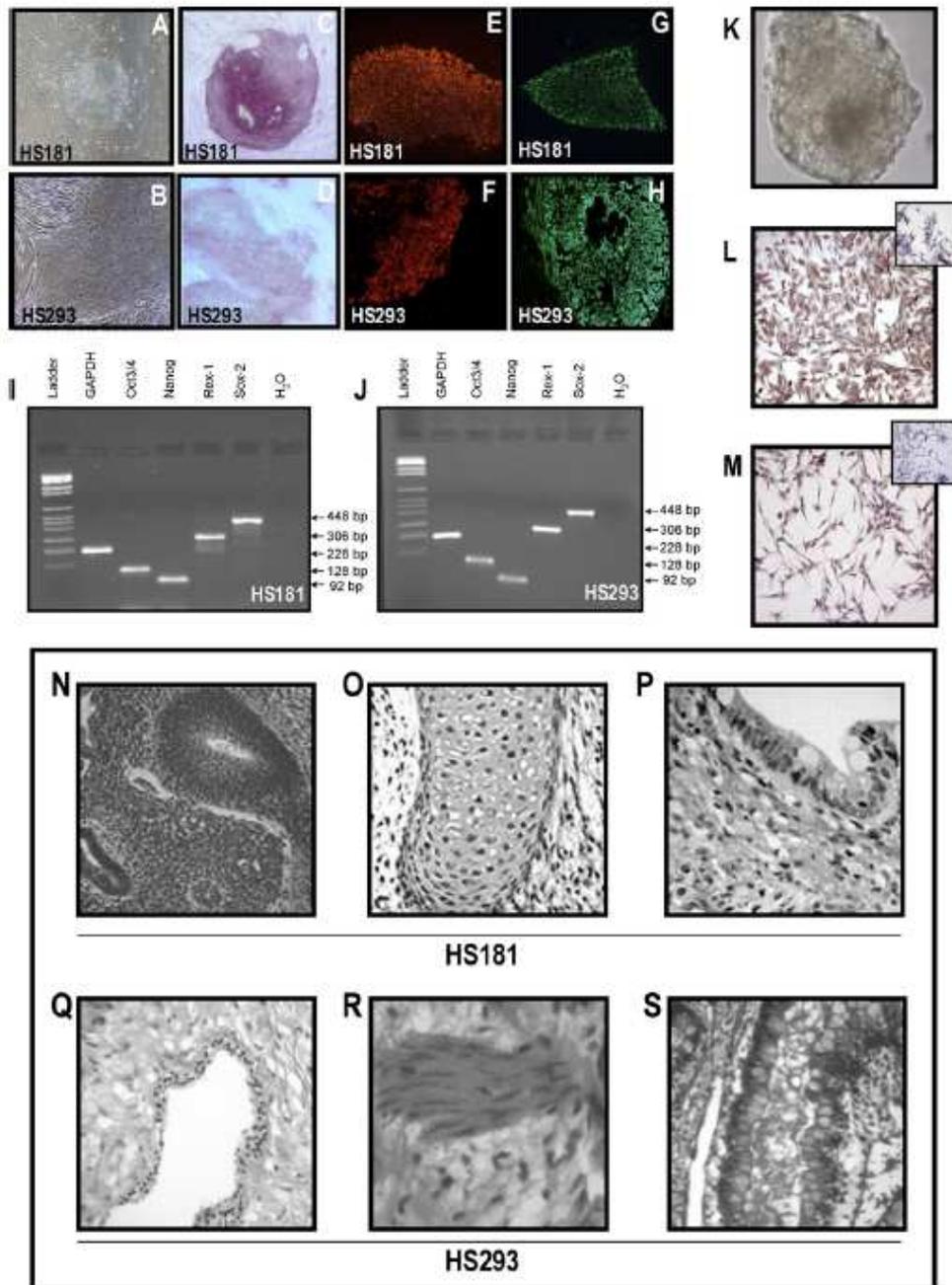


Fig. 1. *In vitro* and *in vivo* phenotypic, molecular and functional characterization of undifferentiated hESC lines maintained in HEFs for long-term culture. Phase-contrast photomicrographs showing typical hESC morphology (A and B). Immunocytochemistry detection of alkaline phosphatase (C and D), SSEA3 antigen (E and F) and Tra-1-60 (G and H). RT-PCR analysis of undifferentiated markers including Oct3/4, Nanog, Rex-1 and Sox-2 (I and J). GAPDH was used as a housekeeping gene. Representative photo of a hEB (K). Expression of β-actin (L) and nestin (M). Insets show negative controls. *In vivo* teratomas formed upon injection of the HS181 (N–P) and HS293 (Q–S) hESC into immunodeficient mice showing tissues representing the three germ layers: ectoderm [epithelium (N and Q)], mesoderm [cartilage and smooth muscle (O and R)] and endoderm [intestinal mucosa (P and S)].

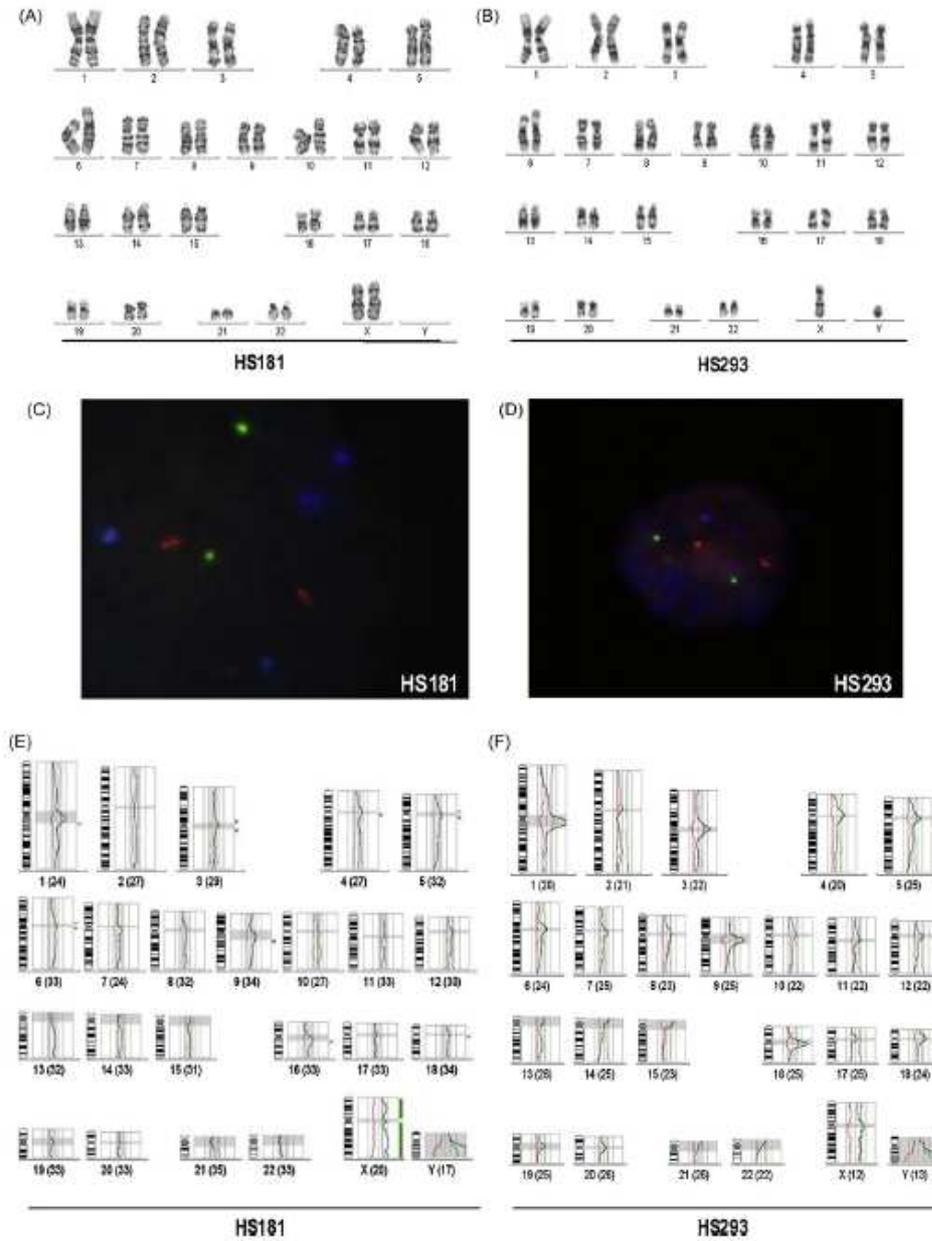


Fig. 2. Conventional and molecular cytogenetic analyses reveal an overall genomic stability in hESC lines HS181 and HS293 maintained in HEFs for long-term culture by mechanical passing. (A and B) Representative diploid karyotype of HS181 (A) and HS293 (B) maintained for over 70 passages. (C and D) Confirmation of diploid chromosomal status by iFISH for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in HS181 (C) and HS293 (D) cells. Green signals identify two chromosomes 21. Red signals show diploidy for chromosomes 13. Light blue dots show diploidy for chromosomes 18 and dark blue dots for chromosome X. (E and F) CGH ideogram profiles for all the chromosomes in HS181 (E) and HS293 (F). The CGH analyses show a balanced chromosomal content for all chromosomes.

70 passages, both hESC lines showed a typical undifferentiated ESC morphology (Fig. 1A and B). Immunocytochemistry staining revealed the expression in both cell lines of markers associated with an undifferentiated state such as alkaline phosphatase (Fig. 1C and

D), Tra-1-60 (Fig. 1E and F) and SSEA-3 (Fig. 1G and H). By RT-PCR, both lines expressed high levels of the ESC-associated transcription factors Oct3/4, Nanog, Rex-1 and Sox-2 (Fig. 1I and J). *In vitro*, these hESC lines grown under the current conditions are capable of

forming hEB (Fig. 1K) which differentiate into tissues representing mesoderm (positive for actin; Fig. 1L) and ectoderm (nestin positive; Fig. 1M). *In vivo*, both hESC lines formed teratomas upon intratesticular injection into immunodeficient mice. When these tumors were analyzed, tissues representing the three germ layers were observed: ectoderm [epithelium (Fig. 1N and Q)], mesoderm [cartilage or smooth muscle (Fig. 1O and R)] and endoderm [intestinal mucosa (Fig. 1P and S)].

3.2. Molecular cytogenetic analyses reveal overall genetic stability of hESCs grown in HEFs

During the last 2–3 years several groups have reported abnormal karyotypes when hESCs are maintained for extended periods [30,44]. Such chromosomal abnormalities appear to occur more commonly among hESCs maintained in feeder-free conditions using enzymatic rather than mechanical methods [5,31–34]. We performed an extensive molecular cytogenetic analyses to determine the overall genomic stability of hESC lines and ensure that

neither numerical nor structural chromosomal abnormalities are present.

We show that HS181 and HS293 lines cultured in HEFs by mechanical dissociation for long periods of time display a normal diploid karyotype detected by conventional G-banding (Fig. 2A and B). The diploid chromosomal status was confirmed by iFISH for chromosomes 13, 18, 21, X and Y (Fig. 2C and D). In order to confirm the chromosomal stability of these hESCs and identify potential chromosome losses and gains, we challenged the hESCs under study to Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis [5,39]. CGH analyses revealed normal ideogram profiles with balanced chromosomal content for all chromosomes in HS181 and HS293 lines (Fig. 2E and F).

In order to hasten the utility of hESCs for modeling childhood leukemia, their genomic integrity needs to be assessed using multiple assays; otherwise, mutations already present may obscure potential cooperating genomic insults which would easily make hESCs vulnerable to transformation. There are different types of pediatric acute leukemias wherein clinically significant

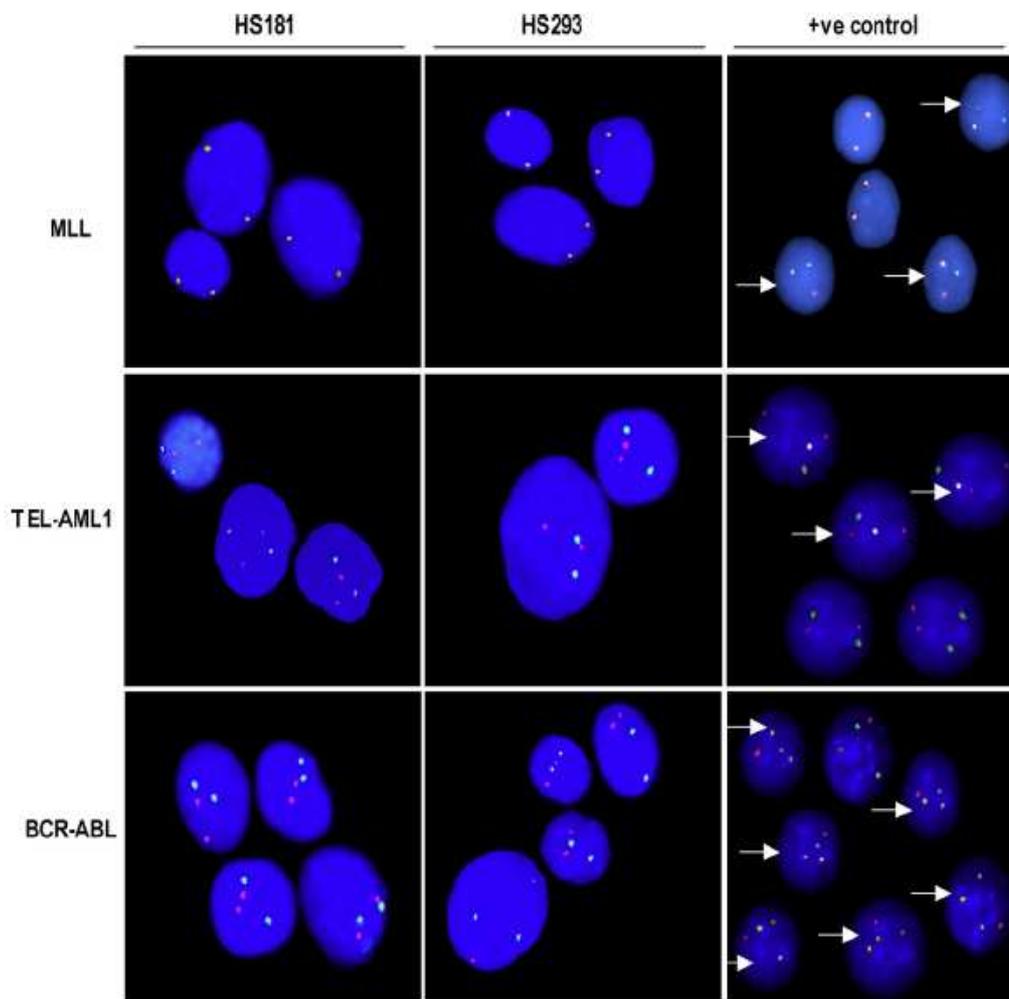


Fig. 3. HS181 and HS293 hESC lines maintained for extended periods lack MLL, TEL-AML1 and BCR-ABL translocations. Using a MLL split-apart probe, MLL rearrangements are identified by the presence of one red signal, one green signal and one yellow signal (gemline). Using locus-specific probes, the fusions TEL-AML1 or BCR-ABL are determined by the presence of yellow fusion signals whereas wild-type cells have two green signals (either BCR or TEL) and two red signals (either ABL or AML1). As positive controls (right panels), translocation-carrying cells from different pediatric B-ALL are pointed with a white arrow.

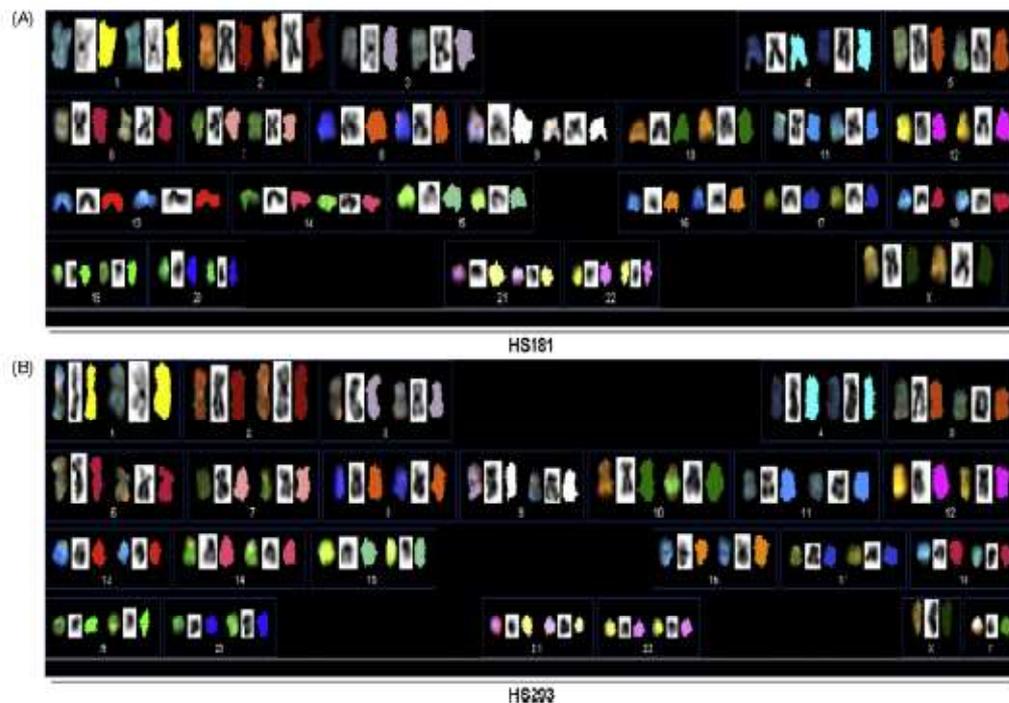


Fig. 4. Multicolor SKY analyses of hESC lines HS181 and HS293. Neither numerical nor structural chromosomal abnormalities were observed using this high-resolution molecular cytogenetic methodology in HS181 (A) and HS293 (B) cell lines.

manifestations arise *in vitro* [4,13,14]. These leukemias commonly harbor aberrant fusion oncogenes including MLL-*AF4*, TBL-*1*/MLL or BCR-*ABL*. The absence of these chromosomal translocations is a pre-requisite for hESCs to be used in pediatric leukemia disease modeling. The absence of such fusion oncogenes in HS181 and HS293 was confirmed by interphase-FISH (iFISH), using break-apart probes for MLL rearrangements (Fig. 3 top panels) or locus-specific probes for TEL-*AML1* (Fig. 3 middle panels) and BCR-*ABL* (Fig. 3 bottom panels). As positive controls, mononuclear cells from pediatric leukemic patients were used (Fig. 3 right panels).

SKY is a high-resolution molecular cytogenetic tool which has not been applied to hESC cultures [45]. Here, our successful SKY analyses revealed an overall genetic integrity of both HS181 (Fig. 4A) and HS293 (Fig. 4B) cells maintained in HEFs by mechanical dissociation.

### 3.3. Absence of mutations in FLT-3 and KIT TKRs and lack of CD30 expression in hESC lines maintained in HEFs by mechanical dissociation

Cell transformation results from two classes of cooperating mutations: gene rearrangements which primarily impact tissue differentiation programs and, mutations (i.e. constitutively activated TKRs) which confer a proliferative/survival advantage. Among these TKRs, FLT3 and KIT represent two common TKR genes displaying activating mutations in acute leukemias [15,24,37]. HS181 and HS293 hESC lines grown in HEFs for over 70 passages maintained by mechanical dissociation shown neither FLT3-FLT3-D835Y (Fig. 5A), FLT3-ITD (Fig. 5B) and, FLT3-ITD (Fig. 5C), nor KIT-KIT-D816V

(Fig. 5D), KIT-D816Y (Fig. 5E), and KIT-D816H (Fig. 5F) activating mutations [24]. To further verify the genetic stability of these hESCs, we analyzed by flow cytometry the expression of CD30 within the Tra-1-60+ undifferentiated cells. CD30 has been claimed to be a survival factor and a biomarker for transformed hESCs [29]. While the transformed hESC line 3G01V expressed CD30, the Tra-1-60+ cells present in HS181 or HS293 cultures did not express CD30 (Fig. 5G). Taken together, HS181 and HS293 hESC lines maintained long-term in HEFs by mechanical methods lack the presence of fusion oncogenes and activating mutations in TKRs genes frequently detected in childhood acute leukemias as well as CD30 expression. These genetically stable hESCs may represent a potential scientific and clinical opportunity for modeling infant/childhood leukemia.

### 3.4. Genetically stable hESCs differentiate towards hematopoietic lineage

Before generating transgenic hESC lines expressing specific fusion oncogenes observed in infant/childhood leukemia, as a potential unique system for modeling human pediatric leukemia, it still remains to be demonstrated the ability of the hESCs to differentiate into hematopoietic lineage. To date, it has been reported hematopoietic differentiation only from the hESC lines H9 and H1 [9,35,46–48]. We sought to determine whether the HS181 and HS293 lines are capable of hematopoietic differentiation *in vitro*. Human EBs were formed from confluent hESCs and were treated, as previously described [9,35,46–48]. In contrast to HS293 hESC line, the genetically stable HS181 hESC line maintained in HEFs

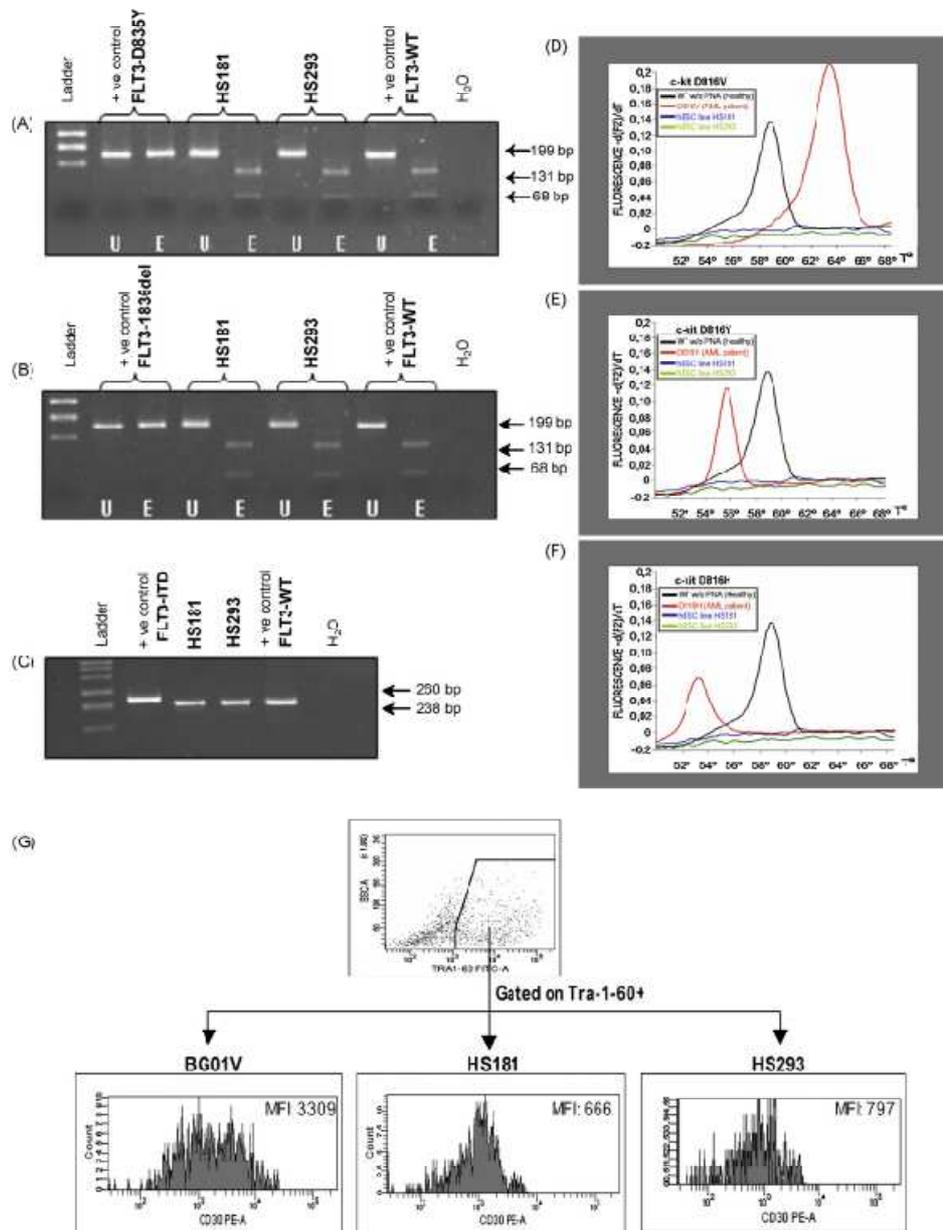


Fig. 5. Human ESC lines HSI181 and HS293 maintained in HEFs for long-term culture lack common activating mutations in FLT-3 and KIT genes frequently observed in acute leukemias and do not express CD30. Absence of FLT3 point mutations D835Y (A), R36del (B) and, FLT3-ITD (C). Absence of KIT point mutations D816V (D), D816Y (E) and D816H (F). The black line (real-time PCR control) represents the wild type DNA without PNA treatment. The red line represents the positive control for each mutation (cDNA from a patient suffering from acute myeloblastic leukemia). The blue and green lines (note the absence of amplification) correspond to the hESC lines HSI181 and HS293, respectively, lacking KIT mutations. Abbreviations: U, uncut PCR product, E, EcoRV digestion of the PCR product, WT, Wild Type FLT3 (G) CD30 expression by flow cytometry in BG01V (transformed hESC line used as positive control), HSI181 and HS293. Abbreviations: MFI, mean fluorescence intensity.

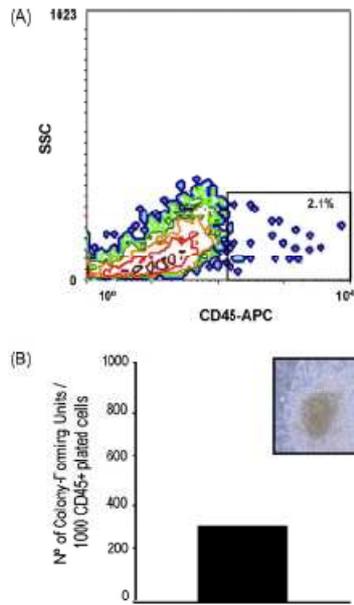


Fig. 6. Hematopoietic differentiation of stable hESC lines maintained in HEFs by mechanical dissociation. EBs formed from confluent hESC lines were allowed to differentiate in the presence of BMP-4 and hematopoietic cytokines as previously described [35]. By day 22, the EBs were dissociated and the presence of CD45+ hematopoietic cells was assessed by flow cytometry. The inset represents the IgG isotype control (A). Additionally, the ability of hematopoietic progenitors with clonogenic capacity to give rise to colony-forming units in methylcellulose assays was analyzed (a representative G-CFU is shown) (B).

has the potential to differentiate into CD45+ hematopoietic cells (Fig. 5A) and hematopoietic progenitors with *in vitro* clonogenic capacity (1 hematopoietic CFU/5 CD45+ cells) (Fig. 5B). Taken together, these genetically stable hESC lines can be differentiated into hematopoietic cells, highlighting the potential to develop transgenic hESCs expressing specific fusion oncogenes observed in pediatric leukemias as a tentative system for modeling childhood cancer.

#### 4. Discussion

Cultures of hESCs represent a theoretically inexhaustible source of pluripotent cells that can be differentiated into multiple cell types and therefore have been hailed as a unique tool for a range of biomedical applications [1–8]. Human ESCs represent a potentially unique scientific and clinical opportunity for modeling infant/childhood leukemia carrying specific fusion oncogenes known to be early/initiating leukemic events which arise *in utero* during embryonic development. Noteworthy, the mechanisms of transformation are not amenable to analysis with patient samples because cancer is studied once the transformation events have already occurred. Additionally, many mouse models for infant leukemia have also fallen short in helping to dissect the molecular mechanisms underlying the disease pathogenesis because they do not recapitulate key aspects of the actual human disease, indicating that the mouse model is missing essential components of leukemogenesis present in the human embryo. Leukemia-associated fusion oncogenes-expressing transgenic hESCs may be developed

and then, differentiated towards the hematopoietic lineage. These hematopoietic derivatives carrying chromosomal abnormalities could therefore, serve as a novel system to study the etiology and pathogenesis of pediatric acute leukemias with a prenatal origin which lack suitable *in vitro* and *in vivo* models owing to, at least in part, the lack of access to embryonic/fetal human tissue due to ethical and logistic issues.

However, existing culture conditions for the routine maintenance of hESCs remain suboptimal and recurrent chromosomal alterations, usually difficult to detect by conventional karyotypic analysis, are commonly observed. These chromosomal alterations seem to be more common when hESCs are grown in feeder free conditions and maintained using enzymatic rather than mechanical dissociation methods [31–34,49]. Before hESCs may be claimed as a potential tool for modeling human cancer, robust cellular, molecular and cytogenetic analyses remain to be performed to determine the overall genomic stability of these hESCs; otherwise, mutations already present may obscure potential cooperating genomic insults which would make hESCs vulnerable to transformation. Accordingly, there is an urgency to have genetically stable hESCs available prior to establishing a disease model.

Here, two hESC lines maintained for long-term culture by mechanical dissociation in HEFs retain *in vitro* and *in vivo* pluripotency and genetic stability with neither numerical nor structural chromosomal abnormalities found using relatively high-resolution molecular cytogenetic methodologies such as CGH and SKY. Furthermore, iFISH and molecular studies revealed an overall genetic stability of these hESC lines with regard to those molecular cytogenetic abnormalities more commonly associated with pediatric ALL including absence of fusion oncogenes and activating mutations in the TKRs FLT3 and KIT. These hESC lines also lack expression of CD30, a marker associated with ESC transformation [29].

Our STR typing profile (Supplementary Fig. 1) clearly differs between HS181 and HS293 confirming lack of cross-contamination between both hESC lines. In addition, in order to gain further insights which could help us explain the apparent lack of genetic instability in hESC lines maintained for over 70 passages by mechanical dissociation in HEFs, we compared by electron microscopy-based microbiological studies mouse versus human feeders. A massive viral (orthoretroviridae family) load was detected within the MEFs but never in the HEFs (Supplementary Fig. 2) [43]. We therefore hypothesize that the growth of hESCs in MEFs-free culture system may prevent the biological transmission of potentially oncogenic infectious pathogens to the hESCs and their differentiated progeny, reducing the likelihood of hESC transformation.

Most importantly, in the present study we address for the first time the potential of these two hESC lines to differentiate into blood using previously well-established methods [2,5,6,8,9,35,46–48]. Whereas the HS293 hESC line was unable to give rise to hematopoietic cells in multiple independent experiments, the HS181 hESC line displayed differentiation potential toward CD45+ hematopoietic cells and hematopoietic progenitors with *in vitro* clonogenic capacity (Fig. 6). However, we must recognize the need to improve the differentiation methodologies available so far, in order to achieve prospective hematopoietic differentiation levels as high as those commonly reported for the hESC lines H9 and H1, which clearly seem to be the “gold-standard” hESC lines prone to hematopoietic differentiation [9,35,46–48].

Our work confirms genomic stability of two hESC lines maintained long-term *in vitro*. We propose that the occurrence and detrimental effect of genomic alterations must be addressed in depth over a long period of time when designing culture conditions for hESC maintenance. We suggest the need to avoid the sole use of conventional karyotyping since this approach

only addresses numerical or gross structural chromosome abnormalities. In addition to G-banding, the use of robust molecular techniques (gene mutation analyses and single nucleotide polymorphisms) and molecular cytogenetic tools such as iFISH, SKY and CGH should be implemented to facilitate a reliable detection of tiny chromosomal aberrations and gene point mutations which are very likely to affect proliferation, differentiation and survival. In summary, this data supports the proof-of-principle highlighting the potential use of hESCs as a tentative system for modeling human pediatric leukemia characterized by the presence of specific chromosomal translocations with prenatal origin and should encourage researchers to develop transgenic hESC lines expressing specific fusion oncogenes observed in pediatric leukemias. We envision this system might be instrumental for modeling not only pediatric leukemias but also other diseases, providing new insights into the etiology and pathogenesis of the disease, eventually, leading to a molecular-oriented screening of new therapeutic drugs.

#### Conflict of interest statement

None.

#### Acknowledgments

This work was funded by the Andalusian Health Government (refs: 0028, 0029 and, 0030/2006 to PM), The International Jose Carreras Foundation against the Leukemia to PM/CB (EDThomas-05), The UK Leukemia Research Fund to MG/PM (06039) and, the Spanish Ministry of Health to PM (FIS PI070026) and CB (CP07/00059). We thank C. Cabrera, F. Cobo and J.L. Cortés for their technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.leukres.2008.08.028.

#### References

- [1] Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko T. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 2004;79:214–23.
- [2] Bueno C, Montes R, Garcia-Castro J, Greaves M, Menéndez P. Human embryonic stem cells: a potential system for modeling infant leukemia harboring MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discov Today Dis Models* 2008;2:53–60.
- [3] Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005;19:1129–55.
- [4] Lensch MW, Daley GQ. Scientific and clinical opportunities for modeling blood disorders with embryonic stem cells. *Blood* 2006;107:2605–12.
- [5] Menendez P, Wang L, Bhatia M. Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Curr Gene Ther* 2005;5:375–85.
- [6] Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: a journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy* 2006;8:530–41.
- [7] Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, et al. Embryonic stem cells derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
- [8] Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menéndez P, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 2004;21:31–41.
- [9] Wang L, Menendez P, Shojaei F, Li L, Mazurier F, Dick JE, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med* 2005;201:1603–14.
- [10] Allegretti C, Denning CN, Burridge P, Steele W, Sinclair KD, Young LE. Human embryonic stem cells as a model for nutritional programming: an evaluation. *Reprod Toxicol* 2005;20:353–67.
- [11] Gluckman P, Cutfield W, Hofman P, Hanson M. The fetal, neonatal, and infant environments—the long-term consequences for disease risk. *Early Hum Dev* 2005;81:15–9.
- [12] Lau C, Rogers JM. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004;72:300–12.
- [13] Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2003;7:233–45.
- [14] Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3:639–49.
- [15] Gilliland DG, Griffin JD. The role of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100:1532–42.
- [16] De Zen I, Biccato S, Te KG, Basso G. Computational analysis of flow-cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003;17:1557–65.
- [17] Gale KB, Ford AM, Repp R, Borikhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13950–4.
- [18] Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 1999;59:4095–9.
- [19] Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8443–8.
- [20] Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999;94:1057–62.
- [21] Ford A, Bennett C, Price C, Bruin M, Van Wering E, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4584–8.
- [22] Hotfilder M, Rottgers S, Rosemann A, Schrauder A, Schrappe M, Pieters R, et al. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+ cells. *Cancer Res* 2005;65:1442–9.
- [23] Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, et al. Incidence and prognostic impact of c-KIT, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006;20:965–70.
- [24] Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366–72.
- [25] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432:324–31.
- [26] Pierce GB. Relationship between differentiation and carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 2007;2:1335–42.
- [27] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:1–28.
- [28] Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Luuizen M. Stem cells and cancer: the polycomb connection. *Cell* 2004;118:409–18.
- [29] Herszfeld D, Wolvetang E, Langton-Bunker E, Chung TL, Filipczyk AA, Housami S, et al. CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:351–7.
- [30] Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:53–4.
- [31] Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer D, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:19–20.
- [32] Buzzard JJ, Gough NM, Crook J, Coldman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 2005;22:381–2.
- [33] Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2005;37:1099–103.
- [34] Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003;18:1404–9.
- [35] Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003;102:906–15.
- [36] Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA, Stromberg AM, Teerijoki H, Blennow E, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005;23:544–9.
- [37] Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt M, Grudler R, Rensinghoff M, et al. FLT3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 2007;110:1004–12.
- [38] Gale RE, Hills R, Kottaridis P, Srirangan S, Wheatley K, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005;106:3658–65.
- [39] Catalina P, Cobo F, Cortes J, Nieto A, Cabrera C, Montes R, et al. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol Int* 2007;31:861–9.
- [40] ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger; 1995.
- [41] Inzunza J, Sahlen S, Holmberg, Stromberg AM, Teerijoki H, Blennow E, et al. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol Hum Reprod* 2004;10:461–6.
- [42] Saenz B, Martin-Subero JL, Largo C, Martin MC, Otero MD, Prosper F, et al. Identification of recurrent chromosomal breakpoints in multiple myeloma with complex karyotypes by combined G-banding, spectral karyotyping,

- and fluorescence in situ hybridization analyses. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; **169**:143–9.
- [43] Cobo F, Navarro J, Herrera I, Vivo A, Portel D, Hernandez C, et al. Electron microscopy reveals the presence of viruses in MEFs but neither in HEP3 nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance. *Cloning Stem Cells* 2008; **10**:65–74.
- [44] Imreh MP, Gertow K, Cedervall J, Unger C, Holmberg K, Szoke K, et al. In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem* 2006; **99**:508–16.
- [45] Speicher MK, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005; **6**:782–92.
- [46] Menendez P, Wang T, Chadwick K, Li T, Faria M. Retroviral transduction of hematopoietic cells differentiated from human embryonic stem cell-derived CD45(neg)PFV hemogenic precursors. *Mol Ther* 2004; **10**:1109–20.
- [47] Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:10716–21.
- [48] Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, Tian X, Kaufman DS, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood* 2006; **107**:2140–3.
- [49] Adewuni O, Allatoujian B, Ahlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; **25**:603–6.



ARTICULO 3: Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells.

***Carcinogenesis* 30 (2009), pp. 1628-1637.**

Bueno, C., **Catalina, P.**, Melen, G.J., Montes, R., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia-Perez, J.L. and Menendez, P.



**Introducción:** El reordenamiento del gen *MLL* es una alteración genética característica de las leucemias infantiles con origen en el útero. Este evento puede ser inducido durante el desarrollo prenatal por una exposición prolongada a inhibidores de la enzima DNA-topoisomera II como el etopósido.

**Objetivo:** En este trabajo queremos comprobar si la exposición, tanto puntual como crónica, de las hESCs al inhibidor de la enzima DNA-topoisomerasa II hace a las células más susceptibles de adquirir otras alteraciones genéticas, para así poder evaluar los posibles efectos de este agente en el desarrollo embrionario humano. Comprobaremos también el efecto que tiene el etopósido en células CD34+, derivadas de cordón umbilical, para comparar la vulnerabilidad a etopósido de células neonatales frente a embrionarias. En concreto quisimos determinar si: i) bajas dosis de etopósido promueven el reordenamiento y rotura del gen *MLL* tanto en hESCs como en células hematopoyéticas derivadas de las hESCs; ii) si es el reordenamiento del gen *MLL* es suficiente para conferir a las hESCs ventaja proliferativa o aumento de la supervivencia celular, iii) si exposiciones crónicas a bajas dosis de etopósido puede inducir en las hESCs no sólo rotura del gen *MLL*, sino también daños genéticos adicionales resultantes de la vulnerabilidad genética ocasionada bajo estas condiciones. Además del efecto del etopósido en las hESCs, también pretendimos valorar el efecto de la exposición a etopósido tanto puntual como crónica, en células CD34+ derivadas de cordón umbilical (células neonatales), con el objetivo de determinar si manifiestan un comportamiento similar a las hESCs.

**Materiales y métodos:** Para comprobar el efecto del etopósido se ha realizado el estudio del estatus cromosómico en hESCs y CD34+ de cordón umbilical bajo las condiciones planteadas, utilizando cariotipo convencional, FISH y SKY. Además analizamos las mutaciones de *FLT3* por PCR y realizamos estudios de PCR inversa para determinar la región reordenada con *MLL*. Finalmente, analizamos ciclo celular e inmunofenotipo por citometría de flujo.

**Resultados:** El etopósido induce roturas del gen *MLL* en hESCs y en células hematopoyéticas diferenciadas a partir de las hESCs. Además, después de largo tiempo de cultivo, la proporción de células que presentan roturas de *MLL* disminuye y no se observan cambios en el ciclo celular, ni tampoco, alteraciones cromosómicas en estas hESCs tratadas. Por otra parte, la exposición crónica a etopósido, induce la rotura de *MLL* y provoca otras alteraciones cromosómicas adicionales. También se ha comprobado el mismo efecto tras una exposición puntual a etopósido en células CD34+ derivadas de cordón umbilical, es decir, células neonatales, observándose que en estas células, a penas se produce muerte celular y si que presentan un porcentaje de roturas de *MLL* ligeramente inferior al que se comprobó en las hESCs expuestas a las mismas condiciones. En cuanto al efecto de una exposición crónica al genotóxico en células CD34+ derivadas de cordón umbilical, los datos evidencian un porcentaje de roturas de *MLL* muy parecido al manifestado en las hESCs, sin embargo a diferencia de las hESCs en células CD34+ de cordón umbilical, los datos de citogenética convencional y SKY revelan que la continua exposición crónica a etopósido no induce alteraciones cromosómicas adicionales como sí ocurría en las hESCs.

**Conclusión:** Con este trabajo podemos concluir que el etopósido induce roturas en el gen *MLL* en hESCs y en células hematopoyéticas diferenciadas a partir de las hESCs. El reordenamiento de *MLL* es insuficiente para conferir a las células cierta ventaja de supervivencia y proliferación. Sin embargo, la exposición continuada a etopósido si induce la rotura de *MLL* y provoca otras alteraciones cromosómicas, lo que pondría de manifiesto que una exposición crónica a etopósido durante el desarrollo embrionario temprano, induce reordenamientos de *MLL* y hace a las hESCs más propensas a la adquisición de alteraciones cromosómicas que en células CD34+ derivadas de cordón umbilical. Se establece, por tanto, una relación directa entre la inestabilidad cromosómica y la exposición a genotóxicos durante el desarrollo embrionario.

Carcinogenesis vol.30 no.9 pp.1628–1637, 2009  
doi:10.1093/carcin/bgp169  
Advance Access publication July 8, 2009

## Etoposide induces *MLL* rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells

Clara Bueno, Purificación Catalina, Gustavo J.Melen, Rosa Montes, Laura Sánchez, Gertrudis Ligeró, José L.García-Pérez and Pablo Menéndez\*

Andalusian Stem Cell Bank, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, University of Granada, Granada 18100 Spain

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 958 894 672; Fax: +34 958 894 652; Email: pablo.menendez@juntadeandalucia.es  
Correspondence may also be addressed to Clara Bueno. Tel: +34 958 894 672; Fax: +34 958 894 652; Email: clara.bueno.exts@juntadeandalucia.es

*MLL* rearrangements are hallmark genetic abnormalities in infant leukemia known to arise *in utero*. They can be induced during human prenatal development upon exposure to etoposide. We also hypothesize that chronic exposure to etoposide might render cells more susceptible to other genomic insults. Here, for the first time, human embryonic stem cells (hESCs) were used as a model to test the effects of etoposide on human early embryonic development. We addressed whether: (i) low doses of etoposide promote *MLL* rearrangements in hESCs and hESC-derived hematopoietic cells; (ii) *MLL* rearrangements are sufficient to confer hESCs with a selective growth advantage and (iii) continuous exposure to low doses of etoposide induces hESCs to acquire other chromosomal abnormalities. In contrast to cord blood-derived CD34<sup>+</sup> and hESC-derived hematopoietic cells, exposure of undifferentiated hESCs to a single low dose of etoposide induced a pronounced cell death. Etoposide induced *MLL* rearrangements in hESCs and their hematopoietic derivatives. After long-term culture, the proportion of hESCs harboring *MLL* rearrangements diminished and neither cell cycle variations nor genomic abnormalities were observed in the etoposide-treated hESCs, suggesting that *MLL* rearrangements are insufficient to confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage. However, continuous exposure to etoposide induced *MLL* breaks and primed hESCs to acquire other major karyotypic abnormalities. These data show that chronic exposure of developmentally early stem cells to etoposide induces *MLL* rearrangements and make hESCs more prone to acquire other chromosomal abnormalities than postnatal CD34<sup>+</sup> cells, linking embryonic genotoxic exposure to genomic instability.

### Introduction

The *MLL* gene located in chromosome 11q23 fuses to generate chimeric genes with >50 partners in human leukemia (1–5). *MLL* rearrangements are particularly common in infant acute leukemias (6,7) and in secondary therapy-related acute leukemias (t-AL) associated with prior exposure to DNA topoisomerase II inhibitors (8). Elegant studies on identical twins with concordant *MLL*-AF4+ leukemia and retrospective analyses of the clonotypic *MLL*-rearranged sequence of leukemic cells from young patients in their neonatal blood spots revealed a *in utero* origin of the *MLL* rearrangements (9,10). *MLL*-rearranged leukemias are associated with poor prognosis and very brief latency for *MLL*-AF4+ infant B ALL. This raises the question of how this disease can evolve so quickly, particularly, if additional

Abbreviations: CB, cord blood; DMSO, dimethyl sulfoxide; FLT-3, FMS-like tyrosine kinase 3; hESC, human embryonic stem cell; HSC, hematopoietic stem cells; IL, interleukin; ITD, internal tandem duplication; LDI, long distance inverse; mESC, mouse embryonic stem cells; PCR, polymerase chain reaction; SKY, spectral karyotyping; t-AL, therapy-related acute leukemias.

secondary mutations are required. *MLL*-rearranged leukemias commonly have activating FLT3 mutations (1,12) and ~50% of the cases have additional chromosomal abnormalities (7,13).

Epidemiological and genetic studies support the contention that the *in utero* origin of *MLL* rearrangements in infant leukemia may be the result of transplacental exposures during pregnancy, to substances that alter the function of DNA topoisomerase II (14,15). This parallels the origin of t-AL (8,15) and is supported by the finding that *MLL* rearrangements can be induced *in vitro* by etoposide, a DNA topoisomerase II inhibitor (16–20). Etoposide alters the function of the DNA topoisomerase II, which is highly expressed in developing fetuses (21). Etoposide is a widely used chemotherapy agent responsible for 5–15% of t-AL (2). Exposure of cells to topoisomerase II inhibitors increases the frequency of illegitimate recombination events (22), a physiological activity that may be related to both cytotoxicity and leukemogenicity of etoposide. Recent studies (23,24) suggest that high dietary intake of bioflavonoids, an abundant source of topoisomerase II inhibitors in the diet, could cause breaks in *MLL* and possibly in other partner genes, therefore playing an important role in the generation of the preleukemic clone in infancy and in the development of t-AL (25).

It has been shown that exposure to high doses of etoposide experimentally induces *MLL* breaks in mouse embryonic stem cells (mESCs) (16), fetal liver-derived CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (HSCs) (19) and cord blood (CB)-derived CD34<sup>+</sup> HSCs (17,18,20). However, the effects of etoposide earlier during human embryonic development remain to be determined. Human embryonic stem cells (hESCs) hold the promise to become a powerful tool for drug screening and toxicity but also to predict the onset of diseases known to begin during embryonic/fetal stages of development (26).

Here, for the first time, we have used hESCs as a model to test the effects of etoposide on human early embryonic development. We aimed at addressing whether: (i) very low doses of etoposide promote *MLL* rearrangements in hESCs and hESC-derived hematopoietic cells; (ii) *MLL* rearrangements are sufficient to confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage and (iii) continuous exposure to very low doses of etoposide predisposes hESCs to acquire other chromosomal abnormalities. Briefly, a single low dose of etoposide induced a pronounced cell death and *MLL* gene fusions in undifferentiated hESCs and their hematopoietic derivatives. The *MLL* rearrangements were insufficient to confer the hESCs with a selective growth advantage. However, continuous exposure to etoposide promotes similar vulnerability to *MLL* rearrangements and primed hESCs, but not postnatal CB-derived CD34<sup>+</sup> HSCs, for acquiring other major chromosomal abnormalities. Our findings suggest that continuous exposure to topoisomerase II inhibitors during human embryonic development induce *MLL* rearrangements and other chromosomal abnormalities in hESCs, linking embryonic genotoxic exposure to genomic instability.

### Material and methods

#### hESC culture

hESCs were maintained undifferentiated in a feeder-free culture as described previously (27–29). Briefly, hESCs were cultured in Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA)-coated T25 flasks in human foreskin fibroblast-conditioned medium supplemented with 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Human foreskin fibroblast-conditioned medium was changed daily, and the cells were split weekly by dissociation with 200 U/ml of collagenase IV (Invitrogen). Distinct hESC cultures (~70% confluent) were exposed to a single dose of 0.2 or 0.5  $\mu$ M etoposide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or dimethylsulfoxide (DMSO) as a vehicle control for 16 h. Then, etoposide was washed away and the cells were allowed to recover in human foreskin fibroblast-conditioned medium

Etoposide induces *MLL* rearrangements and other chromosomal abnormalities in hESCs

[Figure 1A]. For continuous etoposide exposure, hESCs were exposed to an initial dose of 0.2  $\mu$ M followed by pulses of 0.02  $\mu$ M of etoposide every 3 days for 40 days. Approval from the Spanish National Embryo Ethical Committee was obtained to work with hESCs.

*CB-derived CD34<sup>+</sup> isolation and culture*

Efficient fresh CB samples from healthy newborns were obtained from local hospitals upon approval by our local Ethics and Biobank Board Committee. CB samples were pooled to reduce variability between individual freshly

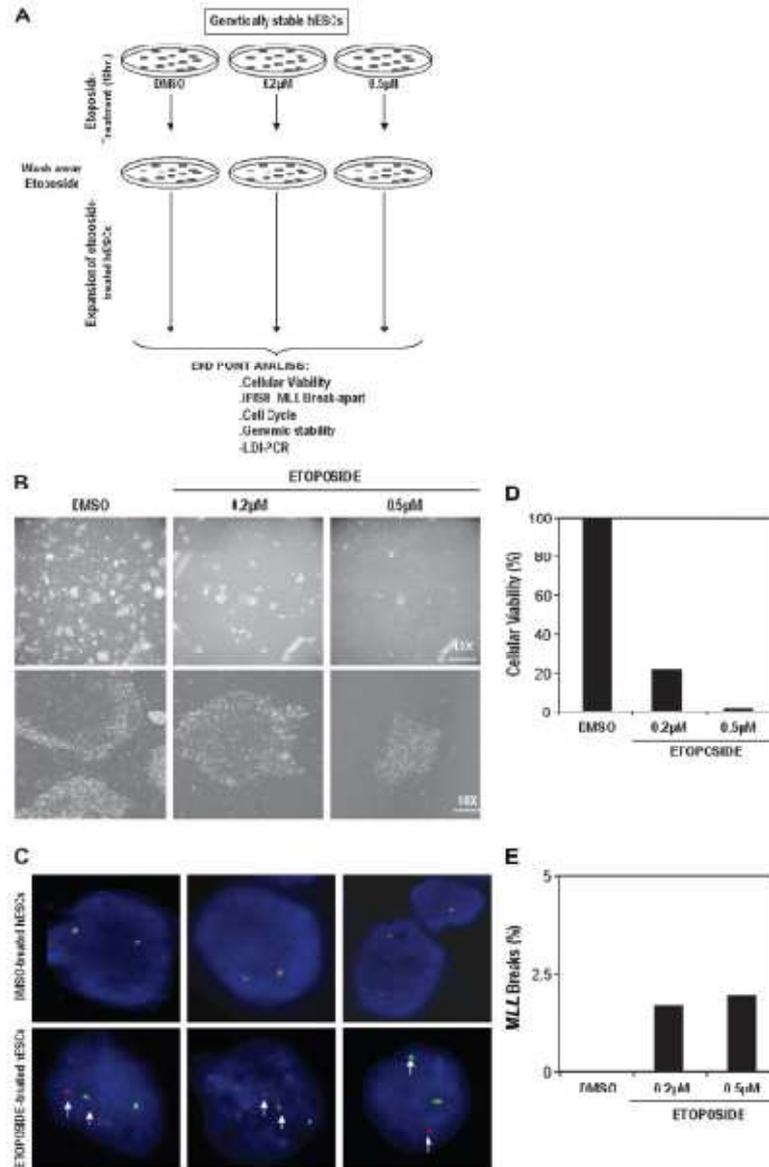


Fig. 1. Effects of a single low dose of etoposide in hESC viability and *MLL* gene rearrangements. (A) Experimental design for etoposide treatment of hESCs. Stable hESCs were exposed to either 0.2 or 0.5  $\mu$ M of etoposide for 16 h. Etoposide-treated hESCs were allowed to expand. Then, cellular viability, *MLL* breaks, cell cycle and genomic stability were assessed. (B and C) Cellular viability and morphology, as determined under the stereoscope and light microscopy, revealed 80 and 95% cellular death upon 0.2 and 0.5  $\mu$ M etoposide treatment, respectively. (D) *MLL* breaks were identified and quantified (E) by using a *MLL* split-apart probe by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH). DMSO-treated cells displayed two yellow signals corresponding to germline alleles, whereas etoposide-treated cells display one yellow signal (germline) and one green signal and one red signal representing typical *MLL* breaks in etoposide-treated hESCs.

1629

C. Bueno *et al.*

isolated CB units. Mononuclear cells were isolated using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Stockholm, Sweden). After lysing the red blood cells (Lysis solution, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), CD34<sup>+</sup> cells were purified by magnetic bead separation using the human CD34 MicroBead kit (Miltenyi, Madrid, Spain) and the AutoMACS Pro separator (Miltenyi) as per manufacturer's instructions. In four experiments, cytokine stimulated CD34<sup>+</sup>-enriched fraction was plated ( $0.2\text{--}0.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) and exposed to a single dose of 0.2 or 0.5  $\mu\text{M}$  etoposide or DMSO as vehicle for 16 h. Then, CD34<sup>+</sup>-treated cells were plated in methylcellulose supplemented with stem cell factor (50 ng/ml), granulomonocyte-colony stimulating factor (10 ng/ml), interleukin (IL)-3 (10 ng/ml) and erythropoietin (3 U/ml) (Methocult GF H4434 StemCell Technologies). After 14 days in primary colony forming unit assay, the cells were harvested and replated in secondary colony forming unit assay for another 14 days and assessed for *MLL* rearrangements. For continuous etoposide exposure, in two independent experiments, CB-derived CD34<sup>+</sup> cells ( $0.2\text{--}0.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) were pooled and cultured in serum-free medium StemSpan (StemCell Technologies) supplemented with stem cell factor (100 ng/ml), granulocyte-colony stimulating factor (50 ng/ml), FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) ligand (100 ng/ml), thrombopoietin (20 ng/ml) and IL-6 (20 ng/ml) (Peprotech, London, UK). Etoposide at 0.04  $\mu\text{M}$  was added to the media every 3 days up to 30 days, after an initial hit with 0.2  $\mu\text{M}$  of etoposide.

#### Interphase fluorescence *in situ* hybridization studies

Interphase fluorescence *in situ* hybridization was performed using a LSI *MLL* Dual Color, break-apart rearrangement probe (Izasa, Barcelona, Spain). The probe was pipetted on top of the cells and denatured at 73°C for 3 min. The slides were then incubated at 37°C for 4 h in a moist chamber; afterward, the cover glasses were removed and the slides washed at 73°C for 5 min in  $0.4 \times \text{SSC}$  0.1% NP-40 followed by  $2 \times \text{SSC}$  0.1% NP-40 at room temperature for 1 min. The slides were finally air-dried in the darkness, covered with anti-fade solution and sealed with a cover glass. For each sample, at least 500 nuclei were analyzed. The slides were analyzed in a fluorescence microscope equipped with appropriate filters using the ISIS-software, (Metasystems, Altlusheim, Germany).

#### Conventional karyotyping

Cells were cultured in medium supplemented with 0.1 mg/ml colcemid for up to 3–4 h. The cells were then washed in versene solution and subsequently trypsinized and spun down. The pellet was resuspended carefully in a KCl hypotonic solution, rinsed to remove the cytoplasm and then fixed in methanol:acetic acid 3:1. Finally, the pellet was resuspended in a final volume of 1 ml of fixative and cells dropped onto glass slides. Chromosomes were visualized by using a modified Wright's staining. At least 20 metaphases were analyzed for each cell line (30–32) using a conventional microscope and the IKAROS-software (Metasystems).

#### Spectral karyotyping analysis

For spectral karyotyping (SKY) analysis, metaphases were prepared as described above. Slides were hybridized using the SKY method according to the manufacturer's protocol (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emsk, Israel). Images were acquired with an SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging) mounted on a Zeiss Axioptan microscope using a custom-designed optical filter (SKY-1; Chroma Technology, Brattleboro, VT). Breakpoints on the SKY-painted chromosomes were determined by comparison of corresponding 4',6-diamidino-2-phenylindole banding and by comparison with G-banding karyotype (30–32).

#### FLT3 gene mutation analysis

The three most common activating mutations of the FLT-3 tyrosine kinase receptor [D835Y, I836del and internal tandem duplication (ITD)] were assessed by polymerase chain reaction (PCR) as described previously (33). The primers used were described previously (33). For FLT3-ITD, genomic DNA was amplified to produce a fragment of 238 bp from germline alleles and a longer (260 bp) fragment from mutated FLT3-ITD alleles. PCR conditions were as follows: 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 62°C and 30 s at 72°C. FLT3 point mutations at codons 835 or 836 were detected by PCR amplification followed by EcoRV digestion (31,33). PCR followed by EcoRV digestion produces two bands of 131 and 68 bp. The D835Y and I836del point mutations, however, abolish this restriction site and the PCR followed by EcoRV digestion produces a unique fragment of 199 bp. The PCR conditions used were as above, but the annealing temperature was 60°C.

#### Cell cycle analysis

hESCs were harvested and pelleted by centrifugation. Cell pellets were washed with phosphate-buffered saline, fixed in 70% ice-cold ethanol and stored for up to 2 weeks at  $-20^\circ\text{C}$ . Cells were washed with phosphate-buffered saline followed by incubation in 50  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide and 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase A (Sigma) for 30 min. Stained nuclei were analyzed on a fluorescence activated cell sorting Canto-II using the fluorescence activated cell sorting Diva software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

#### Long distance inverse-PCR studies

Long distance inverse (LDI)-PCR was used to confirm the presence of *MLL* gene fusions within the *MLL* break cluster region upon etoposide treatment. Genomic DNA was digested with either BamHI or XbaI (Figure 2). LDI-PCR reactions were performed as described previously (17,34). Germline *MLL* PCR products were eliminated by digesting the circularized DNA with NsiI (BamHI) or PvuII (XbaI), respectively. Primers used were as follows: A-5'-GACATTCCTTCTTCACTCTTTCTCTC-3'; D-5'-ATCCTGAATAA-ATGGGACCTTTCTGTGTGGTGG-3'; MF1-5'-TCTAC AAGTCCAGGGG-TCT-3'; MF2-5'-AATAGC ATGCTGCCTGCCTGCCTGCCTTA-3'; MR1-5'-CCCCGACGTGGATTCTTTTA-3' and MR2-5'-GATCGTAGGATATGT-CCCTTATAAATGACA AACTACTGCTTCC-3' (Figure 2). Although this procedure is useful for eliminating amplification from the germline *MLL* allele, it does not identify rearrangements that contain an NsiI or PvuII sites from the partner gene within the circularized DNA template. Individual LDI-PCR products ( $n = 28$ ) were excised and purified from agarose gels, cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and sequenced with M13 forward and reverse primers. Sequences were analyzed using BLAT (UCSC Genome Bioinformatics, Santa Cruz, CA) at <http://genome.ucsc.edu>

#### Etoposide treatment of hESC-derived hematopoietic progeny

Undifferentiated hESCs at confluence were treated with collagenase IV and scraped off of the Matrigel attachments. They were then transferred to low-attachment plates to allow embryoid body formation by overnight incubation in differentiation medium consisting of knock-out-Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 20% non-heat-inactivated fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine and 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. The medium was changed the next day (day 1) with the same differentiation medium supplemented with hematopoietic cytokines [300 ng/ml stem cell factor, 300 ng/ml FLT3 ligand, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 50 ng/ml granulocyte-colony stimulating factor and 25 ng/ml bone morphogenic protein-4] (29).

Single cells dissociated from 15 day hEBs were plated in fibronectin-coated plates (Becton Dickinson) and expanded up to day +22 in liquid culture (StemSpan media, StemCell Technologies) supplemented with the above cytokines. hESC-derived hematopoietic progeny was treated for 16 h with either 0.5  $\mu\text{M}$  etoposide or DMSO on day +16 or day +19 of hematopoietic differentiation. After washing away the etoposide, cells were allowed to recover in StemSpan media with cytokines. Four days later, etoposide- and DMSO-treated hESC-derived hematopoietic cells were harvested and the immunophenotype and *MLL* breaks were assessed. The proportion of CD45<sup>+</sup> hematopoietic cells on day +15 and day +22 of hESC hematopoietic development was 45 and 86%, respectively.

## Results

### A single low dose of etoposide induces *MLL* rearrangements and pronounced cell death in hESCs

We first addressed whether very low doses of etoposide induce *MLL* rearrangements on hESCs that represent the earliest stage of human embryonic development available for study. To determine the effect of etoposide, hESCs were exposed for 16 h to a single low dose of etoposide (0.2 or 0.5  $\mu\text{M}$ ). After the 16-h treatment, etoposide was washed away and the cells were allowed to recover (Figure 1A). Five days after treatment, a pronounced cell death was observed in etoposide-treated hESCs (Figure 1B). As compared with DMSO-treated hESCs, cell death was 80 and >95% in 0.2 and 0.5  $\mu\text{M}$  etoposide-treated hESC cultures, respectively (Figure 1C). hESCs that had survived the etoposide treatment and were able to expand after exposure in the recovery period displayed identical undifferentiated morphology to DMSO-treated hESCs (Figure 1B).

*MLL* gene was found rearranged by interphase fluorescence *in situ* hybridization in 1.5 and 2.4% of the cells exposed to 0.2 and 0.5  $\mu\text{M}$  of etoposide, respectively (Figure 1D and E and Table I). Using a break-apart FISH probe, a split signal with one green and one red dot represents a *MLL* break, whereas the germline *MLL* allele appears as a single yellow signal (Figure 1D and E). LDI-PCR analysis confirmed that etoposide treatment induced *MLL* gene rearrangements at intron 11 within the *MLL* break cluster region (Figure 2A and B). Cloning and sequencing of 28 LDI-PCR products revealed that the *MLL* gene rearranged with random intergenic regions such as 4q31.3 and 7q31.1 (Figure 2C). The fusion probably occurred through non-homologous end joining due to the lack of homology at the junction (supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). As both identified *MLL* rearrangements occurred within genomic regions

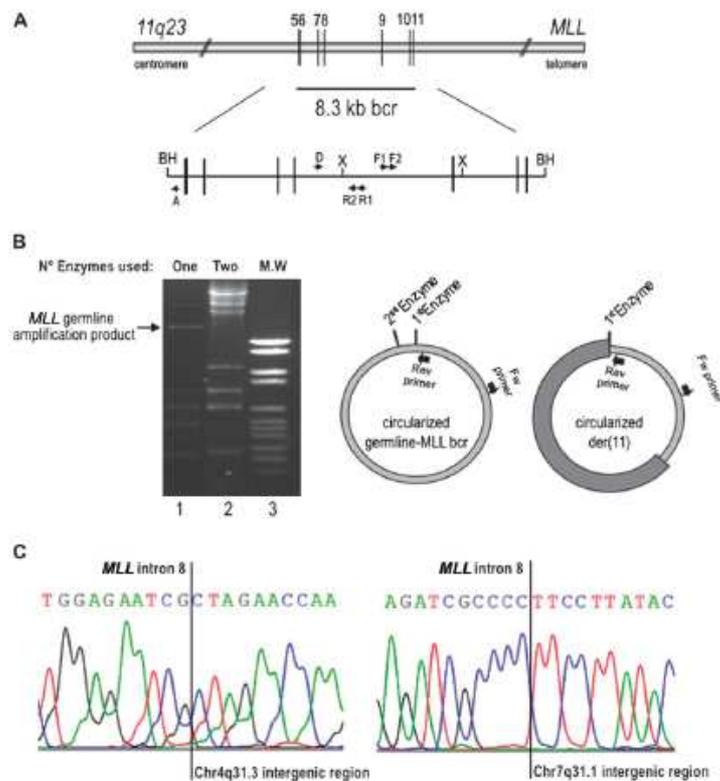


Fig. 2. LDI-PCR analysis confirming etoposide-induced *MLL* gene rearrangements within the *MLL* break cluster region. (A) Schematic representation of a fragment of the human *MLL* gene locus on chromosome band 11q23. Exons 8–14 constitute the break cluster region (bcr). The 8.3 kb bcr is flanked by BamHI (BH) sites and includes exons 8–14 and intervening introns. Two XbaI (X) sites are 2.6 kb apart each other within the bcr. Genomic DNA was digested either with BamHI or XbaI and circularized. In the case of BamHI-digested DNA, PCR reactions were carried out with A–D primer pair. When XbaI was used, nested PCR reactions were done using F1–R1 primer pair followed by F2–R2 primer pair. A, D, F1, F2, R1 and R2 primer sequences are detailed in Materials and Methods. (B) Representative LDI-PCR products generated from etoposide-treated hESCs (left panel). Lane 1, DNA digested with BamHI showing the expected germline product. Lane 2, circularized template DNA digested with a second restriction enzyme (NsiI) to overcome potential primer titration by the germline allele and depicting LDI-PCR products representing putative *MLL* rearrangements. Lane 3, molecular weight marker. Right panel represents a schematic cartoon of the two types of circularized templates generated from etoposide-treated hESCs. (C) Sequence analysis verification showing representative *MLL* fusion products between *MLL* intron 11 and intergenic regions located in chromosome 4 band q31.3 (left panel) and chromosome 7 band q31.1 (right panel).

Table I. Etoposide-induced *MLL* Breaks in hESCs and CB-derived CD34<sup>+</sup> cells after short-term and long-term recovery periods

	Short term (%)	Long term (%)
<b>hESCs</b>		
DMSO	0	0
Etoposide 0.2 μM	0.3–3	0.2–1.2
Etoposide 0.5 μM	0.7–3.2	0.5–1.4
<b>CB-derived CD34<sup>+</sup> cells</b>		
DMSO	0	0
Etoposide 0.2 μM	0.1–1.8	0.1–1.2
Etoposide 0.5 μM	0.6–2.7	0.5–2

Five hundred nuclei were analyzed in each sample.

devoid of human genes, it is very unlikely that those *MLL* fusions give rise to stable messenger RNA transcripts that would be difficult to detect by conventional expression analyses. However, this *in vitro* data support the proof-of-principle that a single very low dose of etoposide is highly toxic to hESCs and induces *MLL* rearrangements in the surviving hESCs.

*Etoposide-induced MLL* rearrangements are not sufficient to confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage

We next investigated whether etoposide-induced *MLL* rearrangements are sufficient to confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage. Four to five weeks after etoposide exposure, we assessed the overall genomic stability of surviving hESCs. We first analyzed the cell cycle distribution by flow cytometry. No differences between etoposide- and DMSO-treated hESCs were observed: 36.9 and 35.6% of the cells were in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and 63.1 and 64.4% of the cells were in S/G<sub>2</sub>/M phase, respectively (Figure 3A).

C. Buono et al.

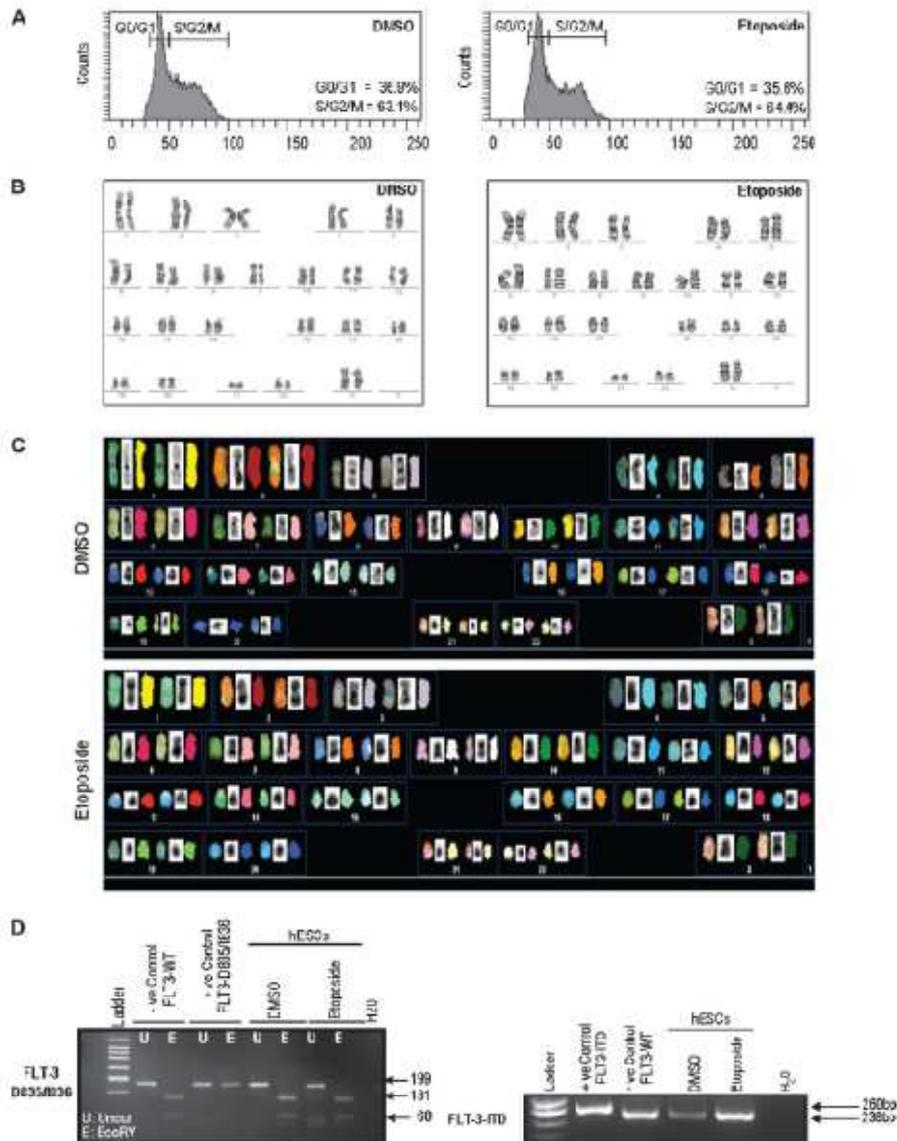


Fig. 3. Overall genomic stability of hESCs exposed to a single low dose of etoposide. (A) Analysis of the cell cycle distribution of etoposide-treated versus DMSO-treated hESCs was assessed by propidium iodide staining. No differences were found in the cell cycle distribution in etoposide-treated hESCs. (B) Conventional G-banding revealed a normal karyotype in DMSO- and etoposide-treated hESCs. (C) Using SKY, neither numerical nor structural chromosomal abnormalities were observed in etoposide-treated hESCs. (D) Etoposide-treated hESCs lack both FLT3 point mutations (left panel) and FLT3-ITD mutations (right panel).

Using molecular cytogenetics, no discernible numerical or structural chromosomal abnormalities were observed by conventional G-banding (Figure 3B) and SKY (Figure 3C) in the surviving hESCs. *MLL*-rearranged leukemias commonly present FLT3-activating mutations (I1, I2, I5). Activating FLT3 mutations were analyzed in both

DMSO- and etoposide-treated hESCs. As shown in Figure 3D, etoposide exposure did not induce FLT3 activating mutations even 5-6 weeks after exposure.

To further address whether etoposide-treated hESC subset harboring a rearranged *MLL* gene acquired proliferative and/or survival advantage, the percentage of *MLL*-rearranged cells within the bulk

hESC culture was determined short term (4 weeks) and long term (12 weeks) after exposure. As indicated in Table I, the proportion of hESCs carrying a rearranged *MLL* allele diminished from week 4 to week 12 after etoposide treatment. This loss of *MLL*-rearranged hESC clones over time along with the overall genomic stability in etoposide-treated cultures suggests that although a single very low dose of etoposide is capable of inducing *MLL* rearrangements in a subset of hESCs, it does not confer either proliferative or survival advantage and therefore it is not sufficient to promote *in vitro* cell transformation of hESCs under our experimental conditions.

*Continuous exposure of hESCs to very low doses of etoposide induces other major chromosomal abnormalities*

According to the proposed 'two-hit' model for the natural course of childhood leukemia (35), the natural history of pediatric leukemia usually involves two events. The initiating event is frequently a chromosomal translocation that occurs prenatally, followed by a secondary mutation that promotes overt disease. The very short latency observed in infant leukemias with *MLL* rearrangements suggests that the second hit might occur prenatally as a consequence of continuous exposure to the same genotoxic agent that the one which induced the *MLL* fusion

(7). We thus analyzed whether chronic exposure to extremely low doses of etoposide might promote other genomic abnormalities in hESCs. hESCs received an initial dose of 0.2  $\mu$ M of etoposide followed by a 0.02  $\mu$ M dose every 4 days for a period of 42 days. As shown in Figure 4A, the percentage of *MLL* gene fusions was similar to those observed after a single hit (2.4%; range: 1.5–2.8%). Interestingly, G-banding (Figure 4B) and SKY (Figure 4C) analyses revealed that chronic exposure to very low doses of etoposide induced other major chromosomal abnormalities, including trisomies and translocations. Representative complex karyotypes were 47 XX t(1;6)(q21;q26); i(1)(q10) or 46 XX t(4;11)(p15;q12); t(1;6)(q21;q26) (Figure 4B and C). This data represents the first *in vitro* experimental evidence supporting the proof-of-principle that chronic exposure of human prenatal stem cells to etoposide contribute to an increased incidence of chromosomal damage.

*CB-derived CD34+ cells display differential susceptibility to etoposide exposure compared with undifferentiated hESCs or hESC-derived hematopoietic derivatives*

In order to test the susceptibility of postnatal CD34+ HSC cells to single or chronic exposure to etoposide, pooled CD34+ HSCs were

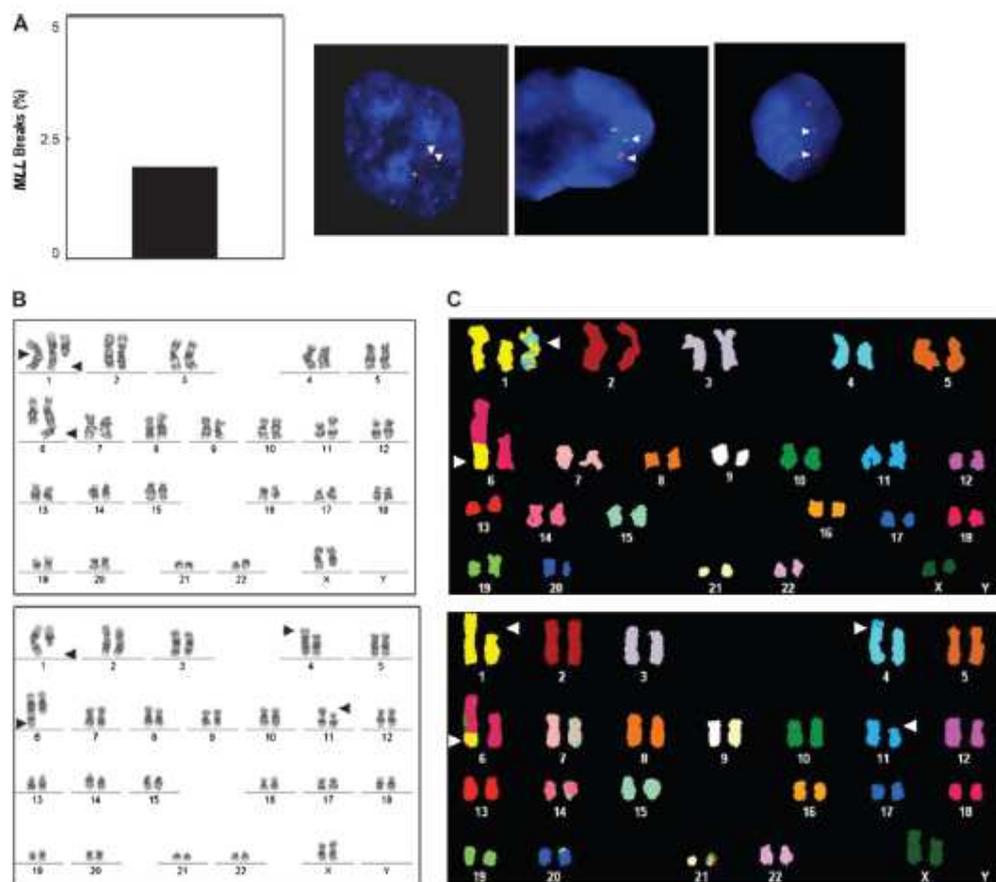


Fig. 4. Chromosomal alterations in hESCs in response to continuous exposure to etoposide. (A) The incidence of *MLL* rearrangements detected 8 weeks after continuous treatment with etoposide was 2.4% (left panel). Representative example of *MLL* breaks after continuous exposure of hESCs to etoposide (right panel). (B) Representative random chromosomal abnormalities detected by conventional G-banding karyotype: 47 XX, t(1;6)(q21;q26); i(1)(q10) (top panel) or 46 XX, t(4;11)(p15;q12); t(1;6)(q21;q26) (bottom panel). (C) Chromosomal alterations were confirmed by SKY.

C. Bueno *et al.*

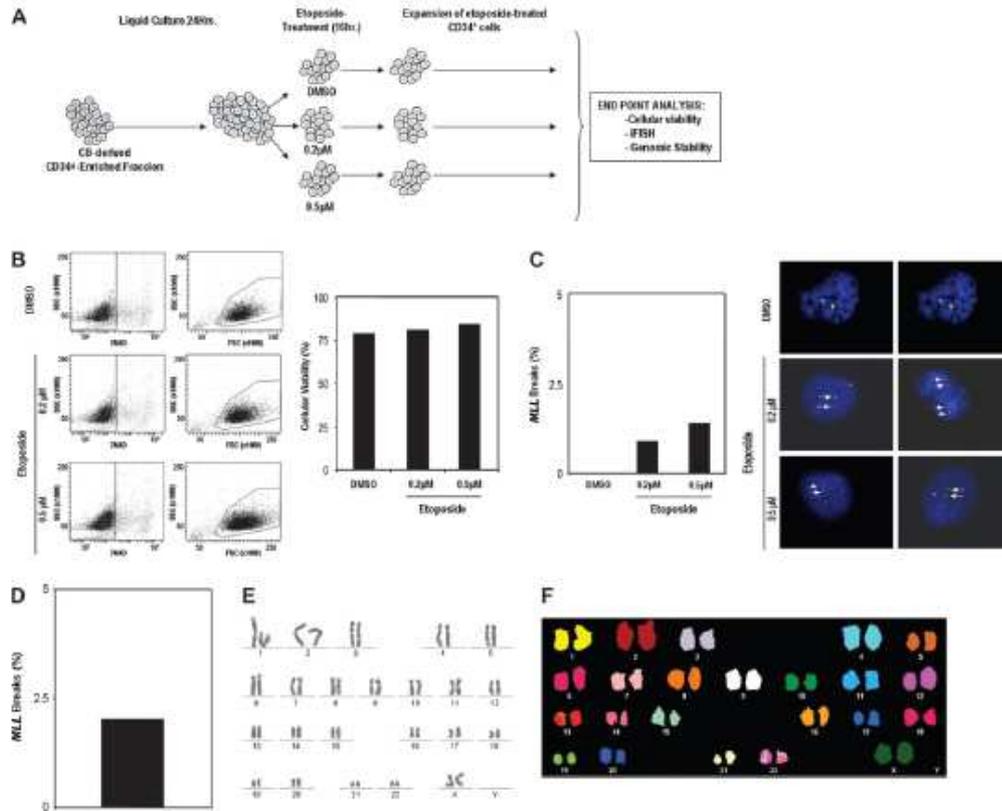


Fig. 5. Effect of single low dose or chronic exposure to etoposide in CB-derived CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells. (A) Experimental design for CB-derived CD34<sup>+</sup> cells. Detailed experimental procedures are described in Materials and Methods. (B) Cellular viability of CB-derived CD34<sup>+</sup> cells was not affected by exposure to a single low dose of etoposide as shown by 7-actinomycin staining. (C) *MLL* rearrangements were identified by using a *MLL* split-apart probe. White arrows demonstrate split signals in etoposide-treated CD34<sup>+</sup> cells. The percentage of CD34<sup>+</sup> cells harboring *MLL* rearrangements upon 0.2 and 0.5 µM etoposide treatment was 1.2 and 1.8%, respectively. (D) Chronic exposure to etoposide induces *MLL* rearrangements on 2% of the CB-derived CD34<sup>+</sup> cells. (E) G-banding and (F) SKY analysis confirming that continuous exposure of postnatal CD34<sup>+</sup> cells to etoposide does not facilitate the acquisition of further chromosomal damage.

exposed for 16 h to a single low dose of 0.2 or 0.5 µM of etoposide, respectively (Figure 5A). Treated cells were expanded in methylcellulose or liquid culture containing hematopoietic cytokines. In contrast to the pronounced cytotoxic effect that the etoposide exerted on hESCs (Figure 1B), it barely induced cell death in CB-derived CD34<sup>+</sup> cells. Cell death was always <20%, regardless the dose of etoposide (Figure 5B). Regarding the incidence of *MLL* rearrangements, the *MLL* gene was found rearranged in a slightly lower percentage of CB-derived CD34<sup>+</sup> cells as compared with hESCs: 1.2% (range: 0.1–1.8%) and 1.8% (range: 0.6–2.7%) of the CB-derived CD34<sup>+</sup> cells treated with 0.2 and 0.5 µM of etoposide, respectively (Figure 5C and Table I). Similar to hESC cultures, the percentage of *MLL*-rearranged CD34<sup>+</sup> cells slightly decreased after long term in culture (Table I).

We next addressed whether continuous exposure of CB-derived CD34<sup>+</sup> cells to low doses of etoposide facilitates further chromosomal abnormalities as observed in hESCs. CD34<sup>+</sup> cells received an initial dose of 0.2 µM of etoposide followed by a 0.04 µM dose every 3 days. Similar to CD34<sup>+</sup> cells receiving a single hit of etoposide, 2% of the CD34<sup>+</sup> cells exposed to a chronic exposure of etoposide displayed *MLL* breaks (Figure 5D). However, G-banding (Figure 5E) and SKY analyses (Figure 5F) revealed that continuous exposure to etoposide failed to induce further numerical or structural chromosomal abnormalities as observed with hESCs.

It has been suggested that early prenatal HSCs may be the target for *MLL* fusions. Therefore, using conditions previously optimized to promote hematopoietic differentiation from hESCs (29,31), we assessed to what extent etoposide induces *MLL* breaks at two different developmental stages during human embryonic hematopoietic development. As shown in Figure 6, early (day +15) hESC-derived hematopoietic derivatives seem to be slightly more susceptible to etoposide-induced *MLL* breaks than late (day +22) fully differentiated hESC-derived hematopoietic derivatives (2.9 versus 1.6%, respectively). Taken together, these results suggest that postnatal CD34<sup>+</sup> and late hESC-derived hematopoietic cells are less vulnerable to etoposide-induced *MLL* rearrangements than undifferentiated hESCs or earlier hESCs-derived hematopoietic cells.

### Discussion

A growing body of evidence supports the contention that the *in utero* origin of *MLL* rearrangements in infant leukemia may be the result of transplacental exposures during pregnancy, perhaps to substances that alter the function of DNA topoisomerase II such as etoposide (14,15,36,37). Recent studies (23,24) suggest that high dietary intake of bioflavonoids, an abundant source of topoisomerase II inhibitors, could cause breaks in *MLL*, therefore playing an important role in the

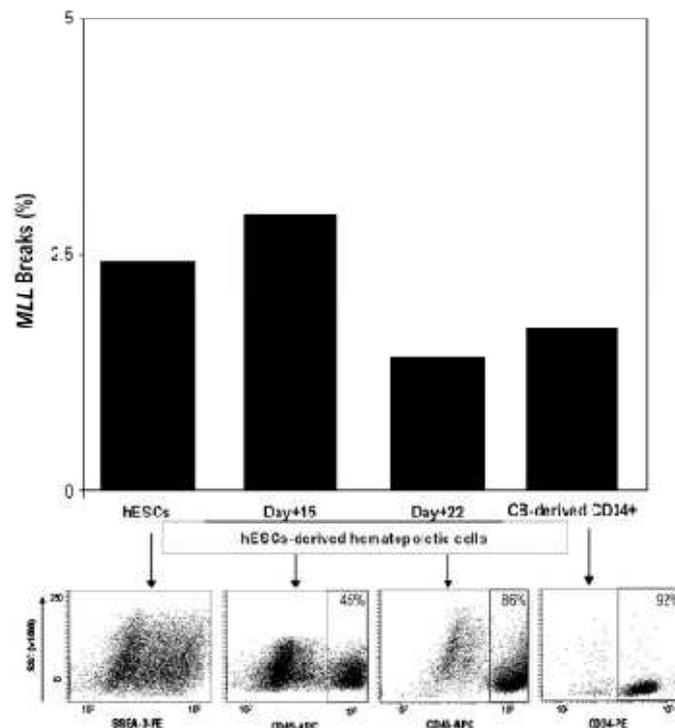


Fig. 6. Effects of etoposide on hESC-derived hematopoietic progeny *MLL* gene rearrangements. The graph compares the percentage of cells harboring *MLL* breaks upon etoposide treatment in undifferentiated hESCs, postnatal CB-CD34<sup>+</sup> HSCs and hESC-derived hematopoietic cells at two developmental stages: day 15 and day 22 of the hematopoietic differentiation. Below the immunophenotype (CD34<sup>+</sup>) of each cell subset is shown by flow cytometry.

generation of the preleukemic clone in infancy as well as in the development of t-AL (25). Exposure to high doses of etoposide induces *MLL* breaks in mESCs (16) and human postnatal CD34<sup>+</sup> HSCs (17–20). However, the potential effects of etoposide earlier during human embryonic development remain to be assessed.

In contrast to neonatal-CD34<sup>+</sup> HSCs, exposure to a single low dose of etoposide induced a pronounced cell death in hESCs. As expected, this tremendous cell death of hESCs was observed 4–5 days after etoposide treatment due to the use of very low doses of etoposide and its mechanism of action. Etoposide exerts its cytotoxic effects by inhibiting the enzyme DNA topoisomerase. The absence of DNA topoisomerase has a cumulative negative effect on DNA repair, leading to many unrepaired breaks in cellular DNA and ultimately cell death. The striking vulnerability of hESCs to etoposide-induced cell death is in line with previous studies confirming the crucial role of both DNA topoisomerase II alpha and beta in human developing tissues (21). This high susceptibility to cell death of hESCs exposed to DNA topoisomerase II inhibitors may reveal clues to further understand the relationship between *in utero* exposure to genotoxic compounds and the risk of deleterious chromosomal abnormalities and lethal birth defects, commonly incompatible with tissue/embryo normal development, leading in many occasions to embryo loss and abortions (33).

A single low dose of etoposide induced *MLL* breaks in ~2–3% of the hESCs. These data are similar to that reported in fetal and CB-derived CD34<sup>+</sup> HSC (17–20). Interestingly, however, hESCs are much more susceptible than mESCs to etoposide-induced *MLL* breaks

(16). Etoposide concentrations as high as 100  $\mu$ M barely induced *MLL* rearrangements in just one of 62 500 mESCs, whereas relatively low concentrations (0.2–0.5  $\mu$ M) induced *MLL* gene fusions in an average of three of 100 hESCs (a 1800-fold increase) (16). It is worth mentioning that physiological doses of etoposide were used because the etoposide concentration in the plasma of cancer patients treated with this drug ranges between 1–2  $\mu$ M (39), a concentration far below from the 100  $\mu$ M employed in previous studies. The LD1 PCR used by Blasco *et al.* (16) is more sensitive than the interphase fluorescence *in situ* hybridization method employed here to detect *MLL* fusions, further confirming the higher susceptibility of hESCs as compared with mESCs to etoposide-induced *MLL* breaks. Furthermore, hESCs and early hESC-derived hematopoietic derivatives seem to be more susceptible to etoposide-induced *MLL* breaks than late, fully differentiated hESC-derived hematopoietic cells.

The demonstration that hESCs and their early hematopoietic derivatives are susceptible to etoposide-induced *MLL* rearrangements indicates that embryonic exposure to DNA topoisomerase II inhibitors might expand our understanding about the cellular origin for *MLL* rearrangements that are known to arise *in utero* during embryonic/fetal development. These data also pinpoint that, at least in drug screening and toxicity studies, human cells offer an alternative to animal cells that may be more accurate and could help ferret out safety issues that animal models would fail to identify.

We next wondered whether the *MLL* rearrangements confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage. After long-term culture, the proportion of hESCs harboring *MLL* breaks diminished and

C. Bueno *et al.*

neither cell cycle variations nor karyotypic changes or FLT3 mutations were observed in the etoposide-treated hESC cultures, suggesting that the *MLL* rearrangements are insufficient to confer hESCs with a selective proliferation/survival advantage. The proportion of hESCs carrying a rearranged *MLL* allele diminished from week 4 to week 12 after etoposide treatment. This slight loss in the proportion of *MLL*-rearranged hESC clones suggests that during the hESC culture homeostasis there is a balance between DNA repair and cell death. hESCs harboring broken but not fused *MLL* alleles may be unable to repair these breaks and would probably undergo cell death. It is also plausible that DNA damage would have already been repaired through non-homologous end joining (supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). In this scenario, the hESC clones harboring a *MLL* allele would diminish because the *MLL* breaks do not allow the cells to proliferate at the same rate as the non-rearranged *MLL* cells.

Although continuous exposure to etoposide promotes similar vulnerability to *MLL* rearrangements in embryonic versus neonatal stem cells, hESCs but not CB-derived CD34<sup>+</sup> HSCs acquired other numerical and structural chromosomal abnormalities. In contrast to CD34<sup>+</sup> HSCs, hESCs showed an enhanced susceptibility to both etoposide-mediated cell death and an increased incidence of chromosomal instability upon chronic exposure. The lack of cell transformation in hESCs harboring *MLL* rearrangements along with other genomic aberrations suggest 2-fold: (i) the functional impact of the *MLL* fusion and resulting clonal expansion can occur downstream the cellular origin of the translocation and (ii) a specific *MLL* rearrangement (distinct to the *MLL* fusions we randomly induced in our experiments) with robust leukemogenic potential is required for transformation. Taken together, our data suggest that continuous exposure to topoisomerase II inhibitors during human embryonic development not only induce *MLL* rearrangements but also make hESCs more susceptible to an increased incidence of chromosomal insults, further linking embryonic chronic genotoxic exposure to genomic instability.

hESCs may become a powerful tool for drug screening and toxicity of potentially harmful drugs but also to predict the onset of diseases known to begin prenatally. This data should encourage the field to explore the potential of hESCs in drug discovery and in studies aimed at predicting the onset of diseases to unravel fundamental mechanisms underlying the etiology and pathogenesis of conditions known to arise *in utero*.

#### Supplementary material

Supplementary Figure 1 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

#### Funding

Consejería de Salud (0029/2006, 0030/2006) to P.M.; Consejería de Innovación de la Junta de Andalucía (P08-CTS-3678) to P.M.; Spanish Ministry of Health (FIS PI070026 to P.M., CP07/00059 to C.B.); ESCH-CSJA (EMER07/056); Marie Curie IRG action (FP7-PEU-PLE-2007-4-3-IRG); FIS-Miguel Servet (CP07/00065); Spanish Ministry of Health (FIS PI08171) to J.L.G.-P.

#### Acknowledgements

CB performed experiments, analyzed the data and wrote the paper. PC., G.J.M., R.M., G.L., L.S. and J.L.G.-P. performed experiments. P.M. conceived the work, analyzed the data and wrote the paper.

*Conflict of Interest Statement:* None declared.

#### References

- Huret, J.L. *et al.* (2001) An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia*, **15**, 987–989.
- Rowley, J.D. *et al.* (2002) International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 331–345.
- Meyer, C. *et al.* (2006) Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biochem. J.*, **1**, 656–663.
- Meyer, C. *et al.* (2006) The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, **20**, 777–784.
- Krivtsov, A.V. *et al.* (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 823–833.
- Cashikari, C. *et al.* (2000) The amino terminus targets the mixed lineage leukemia (MLL) protein to the nucleolus, nuclear matrix and mitotic chromosomal scaffolds. *Leukemia*, **14**, 1898–1908.
- Eguchi, M. *et al.* (2006) MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 754–760.
- Felix, C.A. *et al.* (1998) Association of germline p53 mutation with MLL segmental jumping translocation in treatment-related leukemia. *Blood*, **91**, 4451–4456.
- Ford, A.M. *et al.* (1993) *In utero* rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*, **363**, 358–360.
- Gale, K.B. *et al.* (1997) Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 13950–13954.
- Ono, R. *et al.* (2004) Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J. Clin. Invest.*, **115**, 919–929.
- Takekoshi, T. *et al.* (2004) FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*, **103**, 1085–1088.
- Moorman, A.V. *et al.* (1998) The translocations, t(11;19)(q23;p13.1) and t(11;19)(q23;p13.3): a cytogenetic and clinical profile of 53 patients. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*, **12**, 805–810.
- Alexander, F.H. *et al.* (2001) Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res.*, **61**, 2542–2546.
- Ross, J.A. *et al.* (1996) Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. *Cancer Causes Control*, **7**, 581–593.
- Bianco, G. *et al.* (2004) Etoposide induces chimeric MLL gene fusions. *FASEB J.*, **18**, 173–175.
- Libura, J. *et al.* (2005) Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34<sup>+</sup> cells and remain stable after clonal expansion. *Blood*, **105**, 2124–2131.
- Libura, J. *et al.* (2008) Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with *in vitro* and *in vivo* long-term repopulating potential. *Eur. J. Haematol.*, **81**, 185–195.
- Moneypenny, C.G. *et al.* (2006) MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis*, **27**, 874–881.
- van Waaswijk van Doorn-Khosrovani, S.B. *et al.* (2007) Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34<sup>+</sup> cells. *Carcinogenesis*, **28**, 1703–1709.
- Zandvliet, D.W. *et al.* (1996) Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by *in situ* hybridization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 239–247.
- Chatterjee, S. *et al.* (1990) Mechanism of epipodophyllotoxin-induced cell death in poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis-deficient V79 Chinese hamster cell lines. *Cancer Res.*, **50**, 2713–2718.
- Spector, L.G. *et al.* (2005) Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **14**, 651–655.
- Strick, R. *et al.* (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 4790–4793.
- Ross, J.A. *et al.* (1994) Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. *J. Natl Cancer Inst.*, **86**, 1678–1680.
- Bueno, C. *et al.* (2008) Human embryonic stem cells: a potential system for modeling infant leukemia harboring MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discov. Today Dis. Models*, **4**, 53–60.
- Corsós, J.L. *et al.* (2009) Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum. Reprod.*, in press.
- Morris, R. *et al.* (2009) Feeder-free xenotrans maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF- $\beta$  and IGF-I. *Cell Res.*, **19**, 698–709.

29. Menezes, P. *et al.* (2004) Retroviral transduction of hematopoietic cells differentiated from human embryonic stem cell-derived CD45(neg)PPV hemogenic precursors. *Mol. Ther.*, 10, 1109–1120.
30. Catalina, P. *et al.* (2007) Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol. Int.*, 31, 861–869.
31. Catalina, P. *et al.* (2008) Genetic stability of human embryonic stem cells: a first step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leuk. Res.*, 33, 980–990.
32. Catalina, P. *et al.* (2008) Human hESC: predisposition to karyotypic instability: is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Mol. Cancer*, 7, 76.
33. Gale, R.E. *et al.* (2005) No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood*, 106, 3658–3665.
34. Meyer, C. *et al.* (2005) Diagnostic tool for the identification of *MLL* rearrangements including unknown partner genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 449–454.
35. Armstrong, S.A. *et al.* (2002) *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.*, 30, 41–47.
36. Greaves, M. (2002) Childhood leukaemia. *Br. Med. J.*, 324, 283–287.
37. Wiemels, J.L. *et al.* (1999) A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have *MLL* fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res.*, 59, 4095–4099.
38. Finnell, R.H. *et al.* (2002) Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42, 181–208.
39. Edick, M.J. *et al.* (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 21, 1340–1346.

Received May 18, 2009; revised June 24, 2009; accepted June 25, 2009

**ARTICULO 4:** Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* 206 (2009), pp. 3131-3141.

Menendez, P., **Catalina, P.**, Rodriguez, R., Melen, G.J., Bueno, C., Arriero, M., Garcia-Sanchez, F., Lassaletta, A., Garcia-Sanz, R. and Garcia-Castro, J.



**Introducción:** Existen numerosas evidencias que indican que el oncogén de fusión MLL-AF4 se origina en el útero durante el desarrollo embrionario humano, pudiendo ser este oncogén de fusión el evento desencadenante de la LLA pro-B MLL-AF4+ del lactante. Esta leucemia del lactante se caracteriza por su corta latencia y un pronóstico fatal.

**Objetivo:** El microambiente celular de la médula ósea juega un papel importante en la patogénesis de numerosas enfermedades hematológicas. Sin embargo, no se ha evaluado si las MSCs de estos pacientes están implicadas en la patogénesis de esta LLA. Pretendemos determinar si MLL-AF4 está presente en las hMSCs de pacientes LLA pro-B MLL-AF4+. Este objetivo se basa en la hipótesis de que MLL-AF4 podría tener un origen pre-hematopoyético, esto fortalecería la idea de la existencia de un precursor común para los blastos leucémicos y el estroma medular compuesto en gran parte por MSCs, en el cual posiblemente se origine la traslocación.

**Materiales y métodos:** En este trabajo analizamos la presencia de genes de fusión característicos de diferentes subtipos citogenéticos de leucemias pediátricas, en hMSCs de la médula ósea de 38 pacientes diagnosticados previamente de diferentes subtipos de leucemias agudas. La presencia o ausencia de reordenamientos en el locus *MLL*, traslocaciones en BCR-ABL, TEL-AML1, AML1-ETO se ha analizado mediante FISH, usando las sondas específicas de cada una de las alteraciones. El estudio de las hiperdiploidias se ha realizado mediante cariotipo convencional. Por otra parte, se ha determinado si las hMSCs MLL-AF4+ presentan reordenamientos de las inmunoglobulinas (Ig) indicativo de de-diferenciación o transdiferenciación. Finalmente hemos analizado la expresión ectópica de MLL-AF4, TEL-AML1 y MLL-AF9, mediante transducción lentiviral en MSCs de médula ósea sana, para comprobar si se alteraba la homeostasis de estas células, produciéndose alteraciones en proliferación celular, medida por incorporación de IP (yoduro de propidio), apoptosis y senescencia.

**Resultados:** Los genes de fusión TEL-AML1, BCR-ABL, AML1-ETO, MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-ENL, o hiperdiploidía, están ausentes en la totalidad de las MSCs de pacientes portadores de dichas mutaciones. Sin embargo, MLL-AF4 está presente y se expresa en 5-10% de las MSCs de médula ósea en el 100% de los lactantes diagnosticados de LLA pro-B MLL-AF4+. Además, a diferencia de los blastos leucémicos, las MSCs MLL-AF4+ no presentan reordenamientos monoclonales de los genes de las Ig. La sobre-expresión ectópica mediante transducción lentiviral de MLL-AF4, TEL-AML1 y MLL-AF9 en MSCs de médula ósea sana no altera la homeostasis *in vitro* de las MSCs.

**Conclusión:** Todos estos datos sugieren que las MSCs constituyen parte del clon tumoral, revelando por primera vez el importante papel del estroma medular en la patogénesis de la LLA pro-B del lactante con traslocación t(4;11) MLL-AF4. Además, las MSCs MLL-AF4+ no tienen reordenamientos de las inmunoglobulinas, lo que excluye la posibilidad de que existan fenómenos de de-diferenciación celular o plasticidad de los blastos MLL-AF4+ sugiriendo un origen pre-hematopoyético de MLL-AF4+, que parece que tiene su origen en una población de precursores mesodérmicos capaces de diferenciarse hacia linaje hematopoyético y mesenquimal. Finalmente, MLL-AF4 por sí mismo no es suficiente para transformar MSCs y la expresión de MLL-AF4 en MSCs es compatible con un fenotipo mesenquimal, sugiriendo un impacto celular diferente de MLL-AF4 en el sistema hematopoyético y el mesenquimal.

## Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4<sup>+</sup> acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene

Pablo Menendez,<sup>1</sup> Purificación Catalina,<sup>1</sup> René Rodríguez,<sup>1</sup> Gustavo J. Melen,<sup>1</sup> Clara Bueno,<sup>1</sup> Mar Arriero,<sup>2</sup> Félix García-Sánchez,<sup>3</sup> Alvaro Lassaletta,<sup>2</sup> Ramón García-Sanz,<sup>4</sup> and Javier García-Castro<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Andalusian Stem Cell Bank, Centro de Investigación Biomédica, Consejería de Salud-Universidad de Granada, 18100 Granada, Spain

<sup>2</sup>Hospital Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Centro Regional de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, 28009 Madrid, Spain

<sup>4</sup>University Hospital of Salamanca, Department of Haematology, Molecular Biology and HLA Typing Unit, 37007 Salamanca, Spain

<sup>5</sup>Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Biología Celular y del Desarrollo, 28220 Madrid, Spain

MLL-AF4 fusion is a hallmark genetic abnormality in infant B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) known to arise in utero. The cellular origin of leukemic fusion genes during human development is difficult to ascertain. The bone marrow (BM) microenvironment plays an important role in the pathogenesis of several hematological malignancies. BM mesenchymal stem cells (BM-MSC) from 38 children diagnosed with cytogenetically different acute leukemias were screened for leukemic fusion genes. Fusion genes were absent in BM-MSCs of childhood leukemias carrying TEL-AML1, BCR-ABL, AML1-ETO, MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-ENL or hyperdiploidy. However, MLL-AF4 was detected and expressed in BM-MSCs from all cases of MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL. Unlike leukemic blasts, MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs did not display monoclonal Ig gene rearrangements. Endogenous or ectopic expression of MLL-AF4 exerted no effect on MSC culture homeostasis. These findings suggest that MSCs may be in part tumor-related, highlighting an unrecognized role of the BM milieu on the pathogenesis of MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL. MLL-AF4 itself is not sufficient for MSC transformation and the expression of MLL-AF4 in MSCs is compatible with a mesenchymal phenotype, suggesting a differential impact in the hematopoietic system and mesenchyme. The absence of monoclonal rearrangements in MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs precludes the possibility of cellular plasticity or de-differentiation of B-ALL blasts and suggests that MLL-AF4 might arise in a population of prehematopoietic precursors.

Pediatric leukemias possess unique biological features. They are characterized by the presence of tumor-specific chromosomal translocations that entail the generation of oncogenic fusion genes (Pui et al., 2008). These chromosome translocations contribute to the molecular pathogenesis of childhood leukemia, and many are well characterized, defining the different subtypes of childhood leukemia (Wiemels et al., 2009). There is compelling evidence that several of the common chromosome translocations (i.e., MLL-AF4, TEL-AML1, and AML1-ETO) that are seen in pediatric leukemia often originate prenatally in utero during embryonic/fetal

development (Ford et al., 1993; Greaves and Wiemels, 2003; Bueno et al., 2009).

The cellular origin of translocations within the stem cell hierarchy of the hematopoietic system is difficult to ascertain, particularly as the functional impact of the translocation and resulting clonal expansion can occur downstream of the origin of the translocation (Greaves and Wiemels, 2003). Stem cells are the main target

### CORRESPONDENCE

Pablo Menendez:  
pablo.menendez@  
juntadeandalucia.es  
OR

Javier García-Castro:  
jgcastro@isciii.es

Abbreviations used: B-ALL, B-acute lymphoblastic leukemia; FISH, fluorescence in situ hybridization; HSC, hematopoietic stem cell; MSC, mesenchymal stem cell.

The Rockefeller University Press \$30.00  
J. Exp. Med. Vol. 208 No. 13 3131-3141  
www.jem.org/cgi/doi/10.1004/jem.20091050

Supplemental Material can be found at:  
<http://jem.rupress.org/content/suppl/2009/12/07/jem.20091050.DC1.html>

3131

Published December 7, 2009

## JEM

for oncogenic events (McCulloch, 1983; Reya et al., 2001). Stem cells are essential for embryogenesis and their vulnerability to cancer development might be seen as an evolutionary trade-off for their unique properties (Wcisnar, 2000). Furthermore, many cell signaling pathways and transcription factors essential for normal embryonic development are also master regulators involved in cancer onset and progression, supporting a strong link between embryonic/fetal development and cancer (Clark et al., 2007; Deshpande and Burke, 2007; Dreesen and Brivanlou, 2007; Bueno et al., 2007, 2009; Grigoryan et al., 2008; Jiang and Hui, 2008; Laird et al., 2008).

The cellular organization and relationships among precursors that initiate embryonic angiogenesis and hematopoiesis in the human have been characterized (Wang et al., 2004; Menendez et al., 2004). A bipotent primitive hemangioblast derived from human embryonic stem cells is uniquely responsible for endothelial and hematopoietic development (Wang et al., 2004; Menendez et al., 2004). The detection of the BCR/ABL oncogene and lymphoma-specific genetic aberrations in endothelial cells from chronic myelogenous lymphoma and B cell lymphoma patients suggests that endothelial cells may be part of the neoplastic clone (Gunsilius et al., 2000; Streubel et al., 2004; Fang et al., 2005), and that hemangioblasts rather than hematopoietic stem cells (HSCs) appear to be target cells for the first oncogenic hit, which could occur during the first steps of embryonic stem cell differentiation and/or in hemangioblasts persisting in adults (Prindall, 2005).

The existence during development of mesodermal progenitors that are multipotent precursors common for the vasculature and for a variety of mesoderm-derived tissues has long been suggested (Waller et al., 1995; Minai et al., 2002; Cossu and Bianco, 2003; Tada et al., 2005; Bakke et al., 2007). Furthermore, the BM hematopoietic microenvironment plays a role in the pathogenesis of a variety of hematological malignancies, including acute leukemia, multiple myeloma, lymphomas, or myelodysplastic syndrome (Streubel et al., 2004; Blau et al., 2007; Corre et al., 2007; Walkley et al., 2007; Lopez-Villa et al., 2009). Mesenchymal stem cells (MSCs) are key components of the BM milieu, and many efforts are being undertaken to assess their role in several hematopoietic tumors (García-Castro et al., 2008).

During in utero development, leukemic fusion genes may arise in a population of mesodermal prehematopoietic precursors that would give rise throughout development to a variety of mesoderm-derived tissues, including HSCs and MSCs. However, the question of whether BM-MSCs from childhood leukemia harbor leukemia-specific fusion genes has not been addressed.

Here, fusion genes were not detected in BM-MSCs from any subtype of childhood leukemia, but in infant MLL-AF4<sup>+</sup> B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) MLL-AF4 was detected and expressed in BM-MSCs from all patients studied. MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs displayed no monoclonal Ig gene rearrangements. Expression of MLL-AF4 in normal BM-MSCs

is compatible with a mesenchymal phenotype. Our data suggest a differential impact of MLL-AF4 in the hematopoietic system and mesenchyme.

## RESULTS

## Establishment of BM-MSC cultures from children with different acute leukemias

MSC cultures were successfully established and expanded from the BM of 38 children diagnosed with distinct subtypes of childhood acute leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. Table I depicts how leukemic patients were grouped according to specific cytogenetic abnormalities. BM-MSCs displayed typical fibroblastoid morphology (Fig. 1 A) and immunophenotype (Fig. 1 B). MSC cultures were consistently devoid of contaminating hematopoietic cells, being negative for CD45, CD34, HLA-DR, CD19, and CD14, but express common MSC markers, including CD90, CD73, CD105, CD166, and CD106 (Fig. 1 B). To further characterize MSCs from pediatric acute leukemias, adipogenic and osteoblastic differentiation assays were performed as suggested (Dominici et al., 2006; Fig. 1 C). Osteoblastic and adipogenic differentiation was achieved with a similar efficiency than those of normal BM-MSCs (Fig. S1). Thus, MSCs derived from a variety of pediatric leukemic BM samples seem to be phenotypically and functionally similar to those from healthy donors.

MLL-AF4 is present and expressed in BM-MSCs from infants with MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL

We determined by fluorescence in situ hybridization (FISH), whether BM-MSCs from cytogenetically different subtypes of pediatric acute leukemias share the specific genetic aberrations present in the leukemic blasts. The corresponding leukemic fusion gene could never be detected in BM-MSCs from childhood acute leukemias carrying TEL-AML1, BCR-ABL, AML1-ETO, MLL-AF9, MLL-AF10, or MLL-ENL fusions or hyperdiploidy (Table I and Fig. 2 A). In contrast, MLL-AF4 was detected in 6.8 + 1.7% of BM-MSCs from all the cases of MLL-AF4<sup>+</sup> infant B-ALL (Table I and Fig. 2 A).

We next examined whether MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs express the MLL-AF4 transcript. MLL-AF4 was expressed in MLL-AF4-carrying BM-MSCs and in the leukemic blasts as assessed by real-time RT-PCR (Fig. 2 B), indicating that among the cytogenetically distinct pediatric acute leukemias, the leukemia-specific fusion gene is only present and expressed in the stroma microenvironment from infants with the aggressive MLL-AF4<sup>+</sup> pro-B-ALL.

V(D)JH monoclonal rearrangements were present in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blast cells, but absent in BM-MSCs from infants with MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL

Monoclonal Ig gene rearrangements were performed to exclude contamination of the MSC cultures by leukemic cells and to rule out de-differentiation of ALL blasts into MSCs. Using PCR, gene scanning, and sequencing, we characterized

Downloaded from jem.rupress.org on December 9, 2009

Table 1. Presence of leukemic fusion genes (and hyperdiploidy) in BM-MSCs from a cohort of infants/children with cytogenetically distinct acute leukemia

Patient ID	Diagnosis	Cytogenetics (fusion gene)	Age (months)	Fusion gene in MSC*	Positive cases in each diagnostic group
1	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	30	NO	
2	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	24	NO	
3	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	36	NO	
4	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	42	NO	
5	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	70	NO	
6	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	64	NO	0/12 (0%)
7	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	42	NO	
8	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	96	NO	
9	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	60	NO	
10	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	48	NO	
11	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	30	NO	
12	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	54	NO	
13	M2-AML	t(8;21) AML1-ETO	144	NO	0/1 (0%)
14	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	
15	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	48	NO	
16	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	60	NO	0/5 (0%)
17	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	
18	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	
19	T-ALL	Hyperdiploid	30	NO	
20	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	48	NO	
21	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	24	NO	
22	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	36	NO	
23	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	36	NO	0/10 (0%)
24	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	48	NO	
25	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	142	NO	
26	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	24	NO	
27	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	60	NO	
28	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	18	NO	
29	Pre-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	6	YES (1%)	
30	Pre-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	11	YES (7%)	4/4 (100%)
31	Pre-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	6	YES (7%)	
32	Pre-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	4	YES (8%)	
33	M5-AML	t(9;11) MLL-AF9	180	NO	
34	M5-AML	t(9;11) MLL-AF9	12	NO	
35	M2-AML	t(9;11) MLL-AF9	7	NO	0/6 (0%)
36	M5-AML	t(10;11) MLL-AF10	15	NO	
37	Pre-B-ALL	t(11;19) MLL-ENL	7	NO	
38	AML	t(11;19) MLL-ENL	9	NO	

\*Number in parentheses represents percentage of MSCs.

the presence of monoclonal rearrangements of the heavy chain of Ig genes in genomic DNA from MLL-AF4+ leukemic blast cells from the available cases. As expected, they displayed at least one monoclonal V(D)JH rearrangement identifiable by PCR and gene scanning. Patient A had one incomplete monoclonal DJH (DH2\*2-JH5\*02; Fig. 3 A). Patient B had two identifiable monoclonal rearrangements, one complete VDJH (VH6-1\*01/IGHD2-2\*01/IGHJ4\*03; not depicted) and one incomplete DJH (DH1-26-JH1; Fig. 3 B). Patient C had one incomplete monoclonal DJH rearrangement (DH3-9/JH4.2;

Fig. 3 C). Fig. S3 displays the electropherograms confirming products sequences.

Once such rearrangements were characterized in the MLL-AF4+ leukemic blasts, we searched for their presence in the MLL-AF4+ MSCs from BM from the same infants with MLL-AF4+ B-ALL (Fig. 3, A-C, 1). For this purpose, we tested dilutions of the MLL-AF4+ leukemic blast cells in normal MSCs by using conventional PCR amplifications with consensus primers of VH, DH, and JH segments (van Dongen et al., 2003). In both cases, the most sensitive PCR

approach was provided by DJH rearrangements. The monoclonal patterns of both monoclonal amplifications were always identifiable in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blast cell dilutions with normal MSCs with a sensitivity of 10<sup>-2</sup>-10<sup>-3</sup> (Fig. 3), sensitivity which is considered the usual standard for IgH rearrangements (van Dongen et al., 2003), especially when the nonleukemic background is composed by cells with Ig

genes in germline configuration such as normal EM-MSCs (López-Pérez et al., 2000, 2001). However, when this sensitive methodology was used in DNA from MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs, the amplification of the monoclonal PCR product was always negative. Collectively, whereas monoclonal Ig gene rearrangements were consistently detected in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blasts, no monoclonal rearrangements

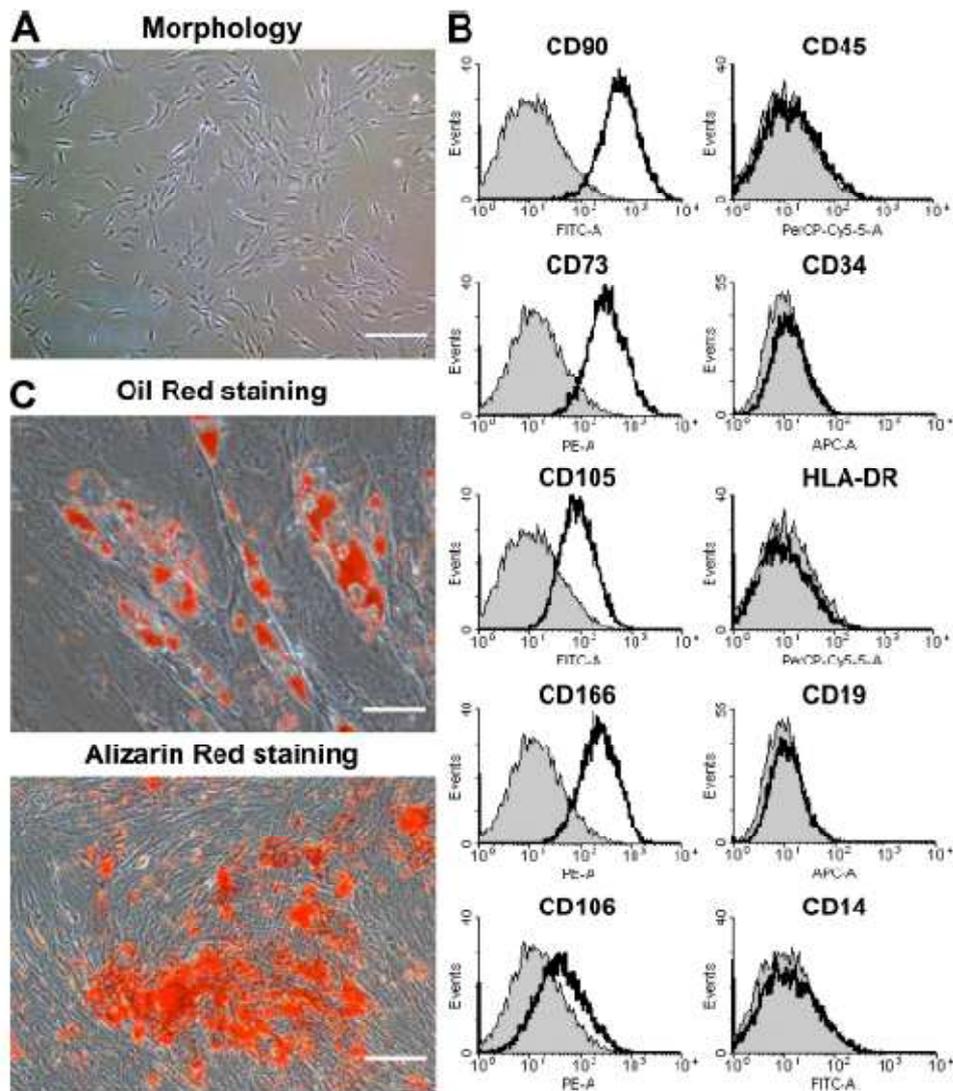


Figure 1. Characterization of MSCs derived from childhood leukemia patients. (A) Morphology. (B) FACS analysis of MSC surface markers. Gray area indicates the isotype control and the empty area shows specific antibody staining. (C) Adipogenic (oil red staining) and osteogenic (alizarin red staining) differentiation potential of MSCs. Data from *n* = 38 children suffering from acute leukemia. Bars, 100  $\mu$ m

could be detected in BM-MSCs from any MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL patient, ruling out potential contamination of the MSC cultures by leukemic cells and suggesting a close early developmental relationship between MSCs and the leukemic blasts rather than plasticity or de-differentiation of B-ALL blasts.

Ectopic expression of MLL-AF4, MLL-AF9, and TEL-AML1 in EM-MSCs exerts no effect on MSC culture homeostasis. To further explore whether leukemia-associated fusion oncogenes exert differential effects in MSC culture homeostasis, the lentiviral ectopic expression of MLL-AF4, MLL-AF9, and TEL-AML1 fusion (Fig. 4 A) in normal BM-MSC was

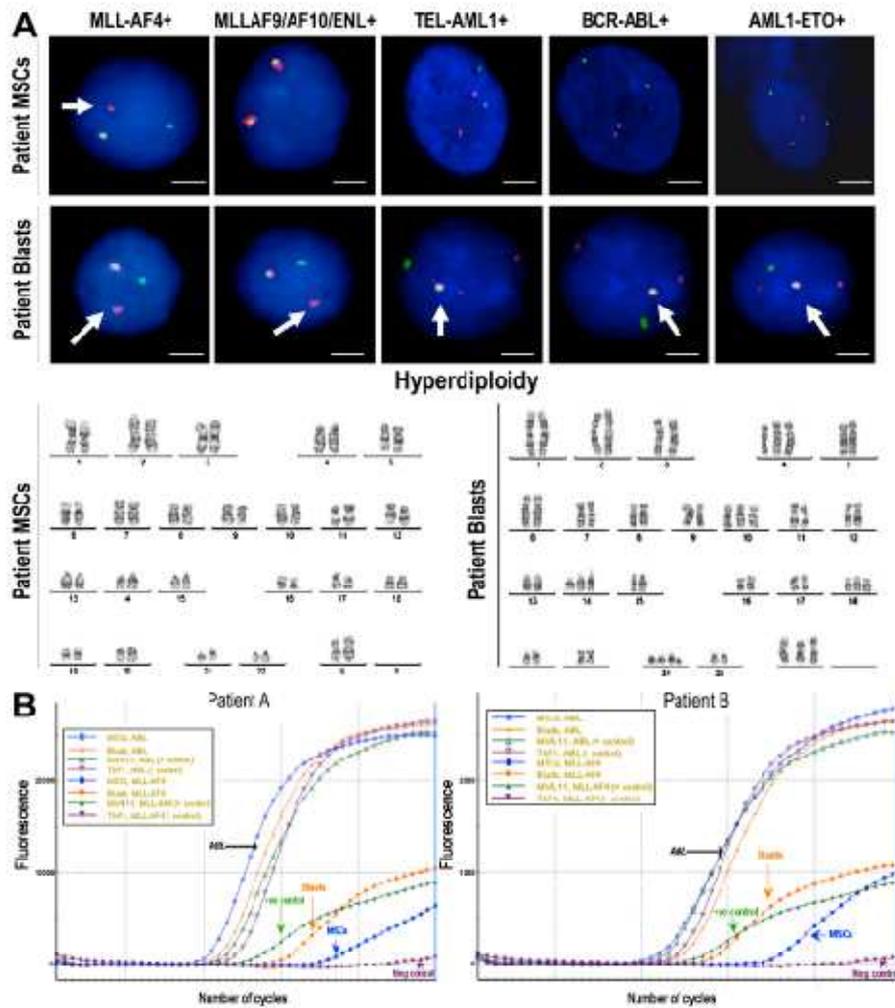


Figure 2. MLL-AF4 fusion gene is present and expressed in BM-MSCs from infants with MLL-AF4<sup>+</sup> pro-B-ALL. (A) FISH performed in patient-derived MSCs (top row) and leukemic blasts (bottom row; n = 38). Leukemia-specific fusion genes were always observed in the leukemic population. Using a split apart probe, MLL rearrangements are identified by the presence of one red signal, one green signal, and one yellow signal (germline). Using locus-specific probes, the fusions TEL-AML1, AML1-E<sub>2</sub>, and BCR-ABL are determined by the presence of yellow fusion signals (and the derivative chromosome), whereas cells without the translocation have two green (either BCR TEL, or E<sub>2</sub>) and two red signals (either ABL or AML1). The white arrows depict the rearranged allele. G-banding karyotyping was performed in the BM-MSCs from children with hyperdiploid (>51 chromosomes) B-ALL (n = 10). Bars, 100 μm. (B) Representative RT-Q-PCR experiments performed in duplicate from two patients showing MLL-AF4 transcript expression in MSCs from infants with B-ALL MLL-AF4<sup>+</sup>.

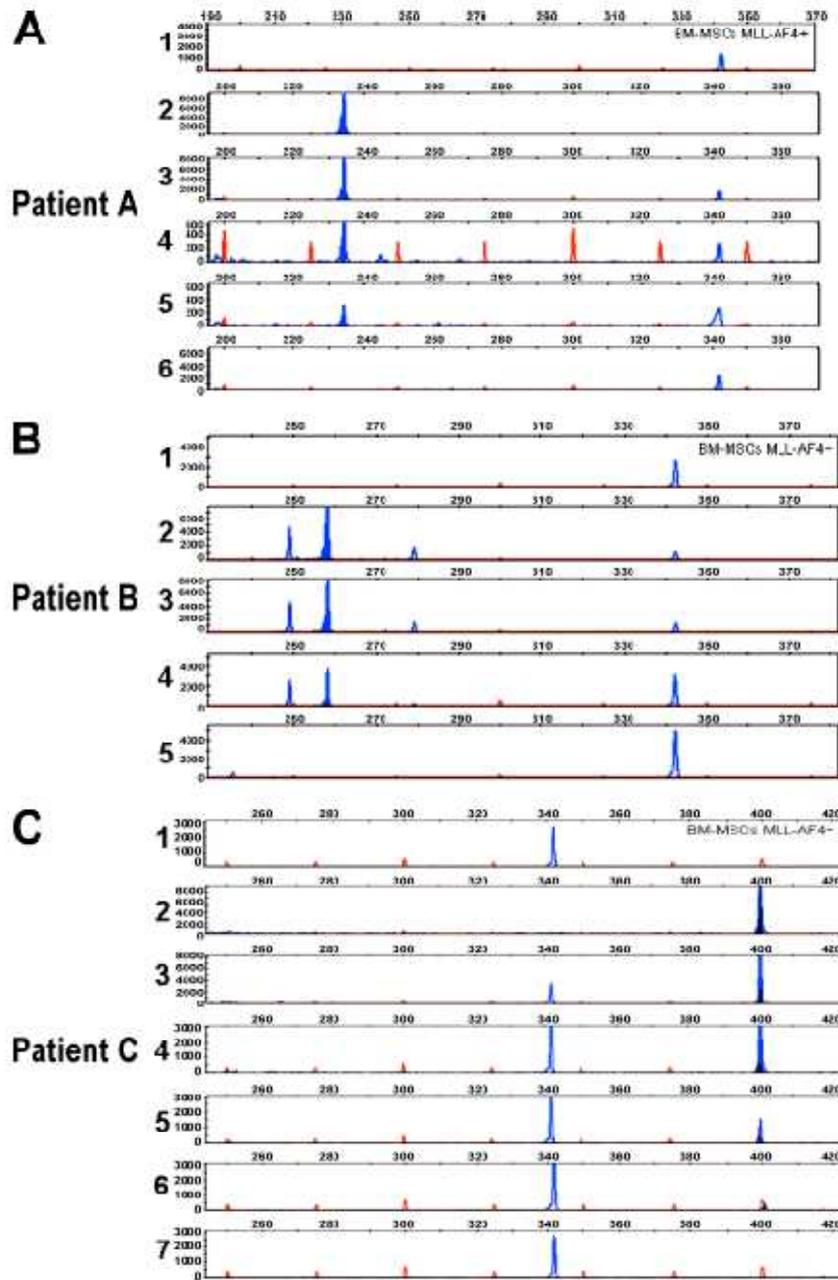


Figure 3. V(D)JH monodonal rearrangements were present in MLL-AF4+ leukemic blast cells but absent in BM-MSCs from infants with MLL-AF4+ B-ALL. (A) V(D)JH monodonal rearrangements of patient A (A, 1) DNA from MSCs from the patient (A, 2) undiluted diagnostic leukemic blast sample (A, 3-6) 10, 6, 1, and 0.1% dilution, respectively, of DNA from diagnostic leukemic blasts into DNA from normal MSCs. The monodonal rearrangement (234 bp; filled blue peak) is detectable in MLL-AF4+ leukemic blast cells whereas it is absent in MLL-AF4+ MSCs. As it can be seen in A (6), the detection

compared. Lentiviral-mediated transduction efficiency of normal BM-MSCs was between 19 and 69% for the different fusion genes and was 100% for the GFP control (Fig. 4 B). Transgene expression was demonstrated by GFP expression (Fig. 4 B), RT-PCR, and Western blot (Fig. 4 C). As expected, in contrast to HSCs, germline MLL is not expressed in MSCs (unpublished data). Transduced MSC cultures were followed up for 62 d, and culture homeostasis was analyzed for the different fusion genes. Ectopic expression of the indicated leukemic fusion oncogene did not alter the proliferation (Fig. 4 D) and cell cycle distribution (Fig. 4 E) of the BM-MSC cultures. Similarly, ectopic expression of the fusion oncogenes had no effect on cell death or apoptosis: >90% of the transduced MSCs were alive and healthy 9 wk after transduction (Fig. 4 F). Similar to normal MSCs, those transduced with fusion oncogenes underwent senescence by passage 9 (62 d) as assayed by  $\beta$ -galactosidase assays (Fig. 4 G). Additionally, MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs lacked expression of CD133, a stem cell marker previously proposed to be induced by MLL-AF4 in leukemic blasts (Thomas et al., 2005; Fig. S4). These data indicate that MLL-AF4, MLL-AF9, and TEL-AML1 expression is compatible with a mesenchymal phenotype and does not alter the culture homeostasis.

#### DISCUSSION

Previous studies have found that the BCR-ABL fusion gene and lymphoma-specific genetic aberrations are present in a proportion of endothelial cells derived from chronic myelogenous lymphoma and lymphoma patients, respectively (Gunsilius et al., 2000; Srenibel et al., 2004), claiming the existence of a bipotent hemangioblastic precursor capable of producing endothelial and blood cells. The presence of chromosomal abnormalities on MSCs from hematological malignancies is controversial. Recent studies have shown that MSCs from multiple myeloma and myelodysplastic syndrome are abnormal and display genomic aberrations identified by gene expression or CGH-based arrays (Corre et al., 2007; Lopez-Villar et al., 2005), indicating that the stroma may play a role in tumor pathogenesis.

Leukemic fusion genes may arise, during in utero development, in a population of mesodermal prehematopoietic precursors that would give rise to HSCs and MSCs. BM-MSCs from leukemic children are candidate cell targets for fusion gene screening because they are ontogenically close to in utero development. However, the question of whether BM-MSCs from childhood leukemia harbor and express leukemia-specific fusion genes has not been addressed.

Here, we searched for leukemia-specific fusion genes in BM-MSCs from children with cytogenetically different acute leukemias. Leukemic fusion genes were not detected in BM-MSCs from any subtype of childhood leukemia, but in infant MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL, where MLL-AF4 was detected and expressed in BM-MSCs from all patients studied. Our findings suggest that MSCs in infant MLL-AF4<sup>+</sup> B-ALL are tumor related. MLL-AF4 is known to arise in utero during human development, and this infant B-ALL is characterized by its dismal prognosis and very short latency, thus a close developmental relationship between the MSCs and the leukemic blasts in this subtype of infant B-ALL diagnosed shortly after birth is plausible. Whether MLL-AF4 arises in a common precursor capable of diverging into blood and mesenchyme or it occurs as an independent event in leukemic blasts and in the stroma still needs to be elucidated. Of note, it may be plausible that the alternative leukemic fusion genes may be found in MSCs not only in this subtype of infant MLL-AF4<sup>+</sup> ALL but also in other children who develop mesenchymal cancer (leukemias and sarcomas) in utero.

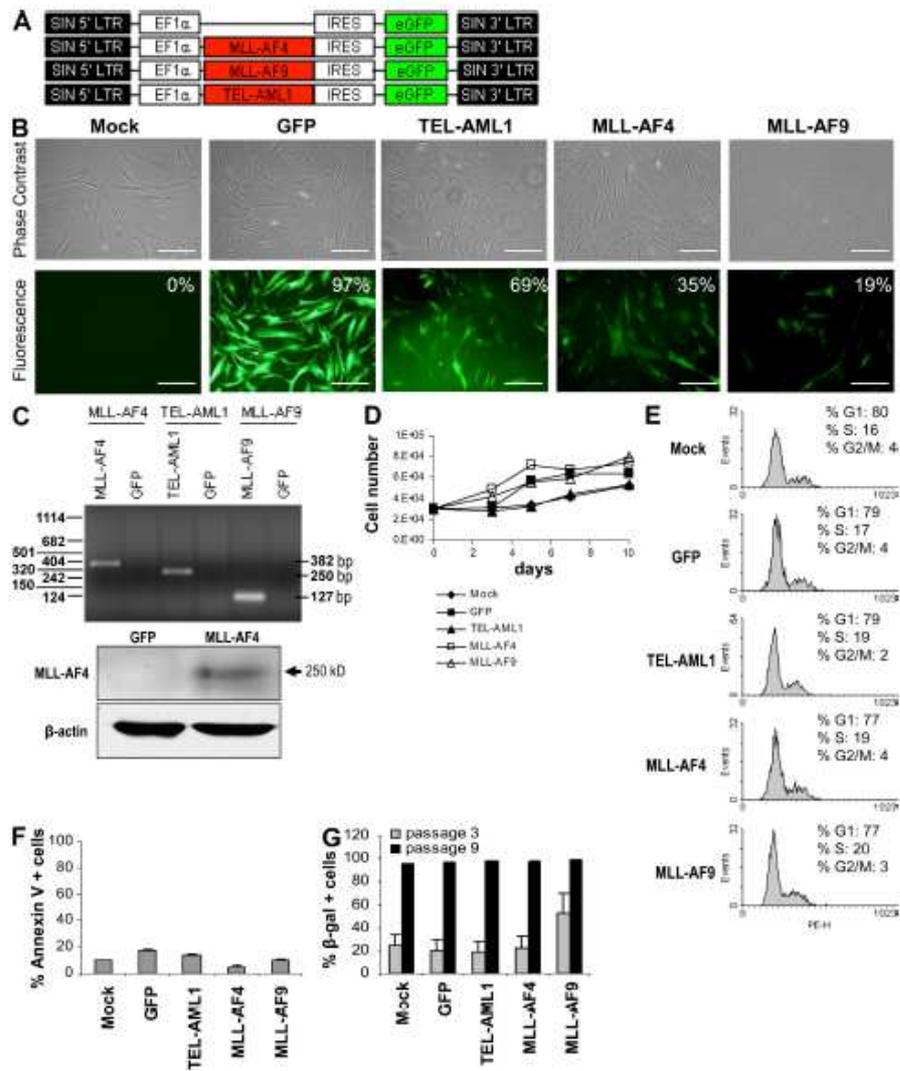
In line with the plastic behavior of cells during embryonic development, MSCs have been reported to have a promiscuous gene expression pattern, being in a standby state in which many gene families are expressed at a low level, thereby making the cell readily capable of shifting fates (Treman et al., 2001). In all samples analyzed, monoclonal Ig gene rearrangements were consistently detected in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blasts but could never be detected in MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs. The absence of monoclonal rearrangements in MLL-AF4<sup>+</sup> BM-MSCs rules out the possibility of cellular plasticity or de-differentiation of B-ALL blasts and suggests that MLL-AF4 might arise in a potential mesodermal common precursor. Additionally, the fact that all MLL-AF4<sup>+</sup> MSCs were euploid precludes the possibility of cell fusion.

Importantly, MLL-AF4<sup>+</sup> MSCs did not seem to have proliferative advantage, and ectopic expression of MLL-AF4 in normal BM-MSCs exerted no effect on MSC culture homeostasis. This indicates that MLL-AF4 expression is compatible with a mesenchymal phenotype and that MLL-AF4 itself is not sufficient for MSC transformation, suggesting the potential need for secondary cooperating oncogenic hits and a differential impact of MLL-AF4 in the hematopoietic system and mesenchyme. The mechanisms by which the BM-MSCs in infant B-ALL acquire this leukemia-specific genetic aberration remain to be elucidated. Whether the MLL-AF4 fusion is similar between BM-MSCs and leukemic blasts suggestive

sensitivity is between 0.1 and 1%. (B) DJH monoclonal rearrangements of patient B. (B, 1) DNA from MSCs from the patient (B, 2-5) 10, 6, 1, and 0.1% dilution, respectively of DNA from diagnostic leukemic blasts into DNA from normal MSCs. The DJH monoclonal rearrangement (258 bp; filled blue peak) is detectable in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blast cells whereas it is absent in MLL-AF4<sup>+</sup> MSCs. (\*) DJH monoclonal rearrangements of patient C. (C, 1) DNA from MSCs from the patient. (C, 2) undiluted diagnostic leukemic blast sample. (C, 3-7) 10, 6, 1, 0.1, and 0.01% dilution, respectively, of DNA from diagnostic leukemic blasts into DNA from normal MSCs. The DJH monoclonal rearrangement (400 bp; filled blue peak) is detectable in MLL-AF4<sup>+</sup> leukemic blast cells whereas it is absent in MLL-AF4<sup>+</sup> MSCs. As can be seen in C (5 and 6) the detection sensitivity is between 0.1 and 1% for patients A and B and between 0.01 and 0.1% for patient C. It should be noted that in all patients there is an unspecific amplification peak (empty blue peak) of 142 bp that is used as indicator (positive control) of DNA amplification (Igh germline alleles).

Published December 7, 2009

JEM



**Figure 4.** In vitro effects of ectopic expression of TEL-AML1, MLL-AF4, and MLL-AF9 in the homeostasis of normal BM-MSC cultures. (A) Schematic representation of the bicistronic lentivectors used. (B) Phase contrast morphology and GFP expression in lentiviral-transduced normal BM-MSCs. Bars, 20  $\mu$ m. Mock indicates no infection; GFP indicates transduction with an empty vector. Transduction efficiency was measured by flow cytometry as percentage of GFP<sup>+</sup> MSCs 3 d after transduction. (C) RT-PCR (top) and Western blot (bottom) showing the expression of the indicated fusion genes in transduced MSCs. (D) Growth curves showing similar growth properties among the different MSC cultures ( $n = 3$ ). (E) Cell cycle distribution of mock and fusion gene-expressing MSCs. (F) Annexin V binding assays showing low levels of apoptosis of MSCs regardless of the leukemic fusion gene overexpressed. (G) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assays of the indicated MSCs at passage 3 and 9. Experiments were performed twice with identical outcome.

of an unequivocal common precursor also remains to be elucidated. It is worth mentioning that even identical fusions might give rise to distinct transcripts through alternative splicing, whereas identical transcripts might also display dif-

ferent phenotype because the transcript/protein may exert differential effects in a cell-dependent manner, perhaps partially explaining the lack of transformation by MLL-AF4 itself in BM-MSCs.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients and samples.** 38 children diagnosed with cytogenetically different ALL or AML were enrolled in this study. Acute leukemia were grouped as follows: TEL-AML1<sup>+</sup> B-ALL (*n* = 12), BCR-ABL<sup>+</sup> B-ALL (*n* = 5), AML1-ETO<sup>+</sup> M2-AML (*n* = 1), hyperdiploid B/T-ALL (*n* = 1), MLL-AF4<sup>+</sup> pro-B-ALL (*n* = 4), MLL-AF9<sup>+</sup> AML (*n* = 2), MLL-AF10<sup>+</sup> AML (*n* = 1), and MLL-ENL<sup>+</sup> B-ALL/AML (*n* = 2). Table 1 summarizes the diagnosis, cytogenetics, and age for each patient. Median age for each group was as follows: 51 ± 16 mo for TEL-AML1<sup>+</sup>, 65 ± 13 mo for BCR-ABL<sup>+</sup>, 47 ± 35 mo for hyperdiploid, 38 ± 61 mo for MLL-rearrangements with a partner different than AF4, and 6 ± 3 mo for MLL-AF4<sup>+</sup>. BM samples were harvested at diagnosis. Leukemic blast were used for routine cytogenetic and molecular diagnostic screening and MSCs were isolated, characterized, and expanded for cytogenetic, molecular, and functional studies. This study was approved by the Institutional Review Board of Hospital Ntra Jesús, and samples were obtained upon informed consent from the parents.

**Isolation and expansion of BM-MSCs.** Mononuclear cells from BM were isolated by centrifugation (400 g, 25 min) using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) density gradient. Mononuclear cells were seeded at a density of 3 × 10<sup>4</sup> cells per cm<sup>2</sup> in MesenCult medium and MSC-supplements (STEM-CELL Technologies) and incubated at 37°C in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere. After 24 h, nonadherent cells were discarded and fresh medium was added. When cell culture achieved >85% of density, adherent cells were trypsinized, washed, and replated at a concentration of 5 × 10<sup>3</sup> cells per cm<sup>2</sup>.

**Characterization of MSC cultures.** The immunophenotype of cultured BM-MSCs was analyzed by flow cytometry as previously described (García-Castro et al., 2008). In brief, 2 × 10<sup>5</sup> cells were incubated for 30 min with the fluorescein-conjugated monoclonal antibodies CD90, CD73, CD105, CD166, CD103, CD45, CD34, HLA-DR, CD19, and CD14 (BD) or their respective isotype controls. Next, stained cells were washed in PBS and analyzed in a FACSCanto II cytometer (BD). CD133 (clone 293C3; Miltenyi Biotec) expression was also analyzed in MSCs overexpressing ectopic MLL-AF4.

**MSC differentiation studies.** were performed by plating the MSCs in specific differentiation inductive media for 2 wk, as previously described (Rodríguez et al., 2009). For adipogenic differentiation, cells were cultured in Adipogenic MSC Differentiation BulletKit (Lonza) and differentiated cultures were stained with oil red O (Sigma-Aldrich). For osteogenic differentiation, cells were cultured in Osteogenic MSC Differentiation BulletKit (Lonza) and differentiated cultures were stained with alizarin red S (Sigma-Aldrich).

**FISH and karyotyping.** FISH was performed on leukemic blast and patient-matching MSCs as described (Bueno et al., 2009; Catalina et al., 2003), using commercially available probes (Vybe Inc.). BCR-ABL, TEL-AML1, and AML1-ETO fusions were detected using locus-specific LSI Dual Color Translocation probes. MLL rearrangements were analyzed using the LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe. At least 500 nuclei were analyzed. The slides were analyzed in a fluorescence microscope equipped with appropriate filters using the ISIS-software (Metasystems).

**Aneuploidy was assessed by conventional G banding as previously described (Catalina et al., 2009). Chromosomes were visualized using a modified Wright's staining. At least 20 metaphases were analyzed using a conventional microscope and the IKAROS-software (Metasystems). The MV4:11 (MLL-AF4<sup>+</sup>), THP-1 (MLL-AF9<sup>+</sup>), and REH (TEL-AML1<sup>+</sup>) cell lines were used as positive controls for FISH studies.**

**Quantitative RT-PCR detection of MLL-AF4 transcript in patient-derived MSCs.** Real-time quantitative RT-PCR was done as previously described (Gabert et al., 2003). Primers and Taqman probes for detecting specific MLL-AF4 fusion transcripts were synthesized according to Janzen et al. (Janzen et al., 2005). In the PCR reaction, two different MLL-anchoring forward oligonucleotides (MLL-F1 and MLL-F2), two different AF4-anchoring reverse oligonucleotides (AF4-R1 and AF4-R2), and two different

probes (MLL-T1 and MLL-T2) were used simultaneously. ABL transcript was used for normalization (Reillard et al., 2003). Primers and probes sequences are described elsewhere (Beillard et al., 2003; Gabert et al., 2003; Janzen et al., 2005). The MV4:11 (MLL-AF4<sup>+</sup>) and THP1 (MLL-AF9<sup>+</sup>) cell lines were used as positive and negative controls, respectively.

**Vectors, lentiviral production, and transduction.** The following dual-promoter fusion gene-expressing lentiviruses were used in this study: pRRL-GFP, pRRL-MLLAF4-GFP (Fig. S2), pWPI-MLLAF9-GFP, and HR-SINCSGW-TELAME1 (provided by T. Eaver, Oxford University, Oxford, England, UK; Fig. 4 A). Viral particles pseudotyped with the VSV-G protein were generated on 293T cells using a standard calcium-phosphate transfection protocol and were concentrated by ultracentrifugation. Normal MSCs from healthy donors were infected overnight with concentrated viruses. The following day, the viral supernatant was removed and transduced MSCs were washed with MSC media and allowed to expand for up to 10 wk.

**MSC culture homeostasis analysis.** MSC cultures were assessed daily for changes in growth rates and morphology. Growth curves were performed by assessing the cell number in triplicate MSC cultures. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry after propidium iodide staining of 70% ethanol-fixed cells. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using PE-Anaexin V according to the manufacturer's instructions (BD). To determine senescence-associated β-galactosidase activity, MSCs were fixed and incubated overnight with X-gal solution (pH 6.0) as previously described (Wei and Sedivy, 1999).

**RT-PCR.** Total RNA extraction and RT-PCR reactions were done as previously described (McCones et al., 2009). RT-PCR conditions were as follows: cDNA synthesis at 37°C for 2 h, prePCR denaturation at 94°C for 2 min, denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s for 35 cycles. Primer sequences were as follows: TEL-AML1, 5'-ATCATG-CACCCTCTGATCCT-3' and 5'-ACGGCTCGCTCATCTTGCCT-3'; MLL-AF4, 5'-CAGAGCAAACAGAAAAAGTG-3' and 5'-GTTCTG-GAAGGGACTGTGGA-3'; and MLL-AF9, 5'-GCACTCTCTCCAAT-GGCAATA-3' and 5'-GCCTTGTACATTCAACATTC-3'.

**VDJ/JH Ig gene monoclonal rearrangements.** Genomic DNA from leukemic blast from infants diagnosed with MLL-AF4<sup>+</sup> pro-B ALL was isolated from BM samples at diagnosis using standard methods. Complete VDJH and incomplete DJH rearrangements were amplified and identified using the BICAMER-2 strategy (van Dongen et al., 2002). For amplification of complete VDJH rearrangements, a set of family-specific primers of the FR1 and FR2 regions and one JH consensus primer were used in two multiplexed PCR reactions. Amplification of incomplete DJH rearrangements was performed in two different reactions using family-specific primers for DH1 to DH6 and DH7 families, respectively, together with the consensus JH primer. All reactions were performed in 50 μL mixture containing 50–100 ng of DNA and 10 pmol of each primer. All these amplifications were performed using genomic DNA. The monoclonal nature of the rearrangements was confirmed by the identification of single amplification peaks by gene scanning analysis following described criteria (López-Pérez et al., 2001; van Dongen et al., 2003). All products were sequenced as previously described (Gonzalez et al., 2005). PCR products were separated by PAGE and visualized with ethidium bromide. Monoclonal PCR products were purified with ExoSap (USB Corp.) and directly sequenced in an ABI 3130 DNA sequence analyzer using BigDye Terminators with the v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems; Gonzalez et al., 2005; Fig. 5).

**Western blotting.** Whole-cell extracts from GFP-MSCs and MLL-AF4-MSCs were resolved on 6% SDS-PAGE gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). MLL-AF4 fusion protein (~250 kD) was detected with the enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare) using an anti-MLL antibody (1:750 dilution; clone N4.4; Millipore).

Published December 7, 2009

JEM

Online supplemental material. Fig. S1 shows representative pictures displaying adipogenic (oil red) and osteogenic (alizarin red) differentiation from normal BM-derived MSCs. Fig. S2 shows that the human MLL-AF4 cDNA has been sequenced. Fig. S3 shows electropherograms confirming the V(D)JH product sequences. Fig. S4 shows the lack of CD133 (Prominin-1) expression in primary MLL-AF4-expressing BM-MSCs. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20091050/DC1>.

The authors would like to thank Ruth Rubio and Alicia Antón for their outstanding technical support.

This work was funded by the Consejería de Salud (0029/2006 to P. Menendez and 0108/2007 to R. Rodríguez) and Comunidad de Innovación, Ciencia, y Empresa (P08-CTS-3679 to P. Menendez) de la Junta de Andalucía; The Jose Carreras Foundation against the Leukemia to P. Menendez/C. Bueno; The Spanish Ministry of Health to P. Menendez (PI070028), J. García-Castro (PI05217 and PI080029), and C. Bueno (CP0700059); Consejería de Educación de la CAM to J. García-Castro (S-BIO-0204-2008, MesenCAM); and the Ministry of Science and Innovation to P. Menendez. R. Rodríguez is supported by a fellowship from the Spanish Association against Cancer 2009.

The authors declare no financial conflict of interest.

Submitted: 13 May 2009

Accepted: 9 November 2009

## REFERENCES

- Bakre, M.M., A. Hoi, J.C. Mong, Y.Y. Koh, K.Y. Wong, and L.W. Stanton. 2007. Generation of multipotential mesodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *J. Biol. Chem.* 282:31703–31712. doi:10.1074/jbc.M704287200
- Beillard, E., N. Pallisgaard, V.H. van der Velden, W. Bi, R. Dee, E. van der Schoot, E. Delabesse, E. Macintyre, E. Gottardi, G. Saglio, et al. 2003. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia*. 17:2474–2486. doi:10.1038/sj.leu.2403136
- Blau, O., W.K. Hofmann, C.D. Baldus, G. Thiel, V. Serbent, E. Schümann, E. Thiel, and I.W. Blau. 2007. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 35:221–229. doi:10.1016/j.exphem.2006.10.012
- Bueno, C., R. Montes, J. García-Castro, M. Greaves, and P. Menendez. 2007. Human embryonic stem cells: a potential system for modelling infant leukemia harbouring MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discov. Today Dis. Models*. 4:53–60. doi:10.1016/j.ddmod.2007.10.004
- Bueno, C., P. Catalina, G.J. Melen, R. Montes, L. Sánchez, G. Ligeró, J.L. García-Pérez, and P. Menéndez. 2009. Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Carcinogenesis*. 30:1628–1637. doi:10.1093/carcin/bgp169
- Catalina, P., R. Montes, G. Ligeró, L. Sanchez, T. de la Cueva, C. Bueno, and P. Menendez. 2008. Human ESC predisposition to karyotypic instability: is a matter of cultural adaptation or differential vulnerability to man y hESC lines. *Leuk. Res.* 33:980–990. doi:10.1016/j.leukres.2008.08.028
- Catalina, P., C. Bueno, R. Montes, A. Nieto, G. Ligeró, L. Sanchez, M. Jara, A. Rasillo, A. Orfão, J. Cigudosa, et al. 2009. Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leuk. Res.* 33:980–990. doi:10.1016/j.leukres.2008.08.028
- Clark, P.A., D.M. Treisman, J. Ebben, and J.S. Kuo. 2007. Developmental signaling pathways in brain tumor-derived stem-like cells. *Dev. Dyn.* 236:3297–3308. doi:10.1002/dvdy.21381
- Corre, J., K. Mahtouk, M. Attal, M. Gadelorge, A. Huynh, S. Fleury-Cappellesso, C. Dunho, P. Laharrague, B. Klein, T. Rème, and P. Bourin. 2007. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. 21:1079–1088.
- Coscu, G., and P. Bianco. 2003. Mesoangioblasts—vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:537–542. doi:10.1016/j.gde.2003.08.001
- Deshpande, A.J., and C. Buske. 2007. Knocking the Wnt out of the sails of leukemia stem cell development. *Cell Stem Cell*. 1:597–598. doi:10.1016/j.stem.2007.11.006
- Dominiaci, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj. Prockop, and E. Horvitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dreesen, O., and A.H. Brivanlou. 2007. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 3:7–17. doi:10.1007/s12015-007-0004-8
- Fang, B., C. Zheng, L. Liao, Q. Han, Z. Sun, X. Jiang, and R.C. Zhao. 2005. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood*. 105:2733–2740. doi:10.1182/blood-2004-07-2514
- Ford, A.M., S.A. Ridge, M.E. Cabrera, H. Mahmoud, C.M. Steel, L.C. Chan, and M. Greaves. 1993. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*. 363:358–360. doi:10.1038/363358a0
- Gabert, J., E. Beillard, V.H. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J.M. Cayuela, H. Cavé, et al. 2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 17:2318–2357. doi:10.1038/sj.leu.2403135
- García-Castro, J., C. Trigueros, J. Madrenas, J.A. Pérez-Simón, R. Rodríguez, and P. Menendez. 2008. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J. Cell. Mol. Med.* 12(6B, 6B):2552–2565. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00516.x
- González, D., M. González, A. Balanzategui, M.E. Sarasquete, R. López-Pérez, M.C. Chillón, R. García-Sanz, and J.F. San Miguel. 2005. Molecular characteristics and gene segment usage in t(12;21) gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica*. 90:906–913.
- Greaves, M.F., and J. Wiemels. 2003. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 3:639–649. doi:10.1038/nrc1164
- Grigoryan, T., P. Wend, A. Klaus, and W. Birchmeier. 2008. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 22:2308–2341. doi:10.1101/gad.1686208
- Gunsilius, E., H.C. Duba, A.L. Petzer, C.M. Köhler, K. Grönwald, G. Stockhammer, C. Gabl, S. Dirnhöfer, J. Clausen, and G. Gastl. 2000. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 355:1688–1691. doi:10.1016/S0140-6736(00)2241-8
- Jansen, M.W., V.H. van der Velden, and J.J. van Dongen. 2005. Efficient and easy detection of MLL-AF4, MLL-AF9 and MLL-ENL fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler. *Leukemia*. 19:2016–2018. doi:10.1038/sj.leu.2403939
- Jiang, J., and C.C. Hui. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell*. 15:801–812. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.010
- Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers. 2008. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 132:612–630. doi:10.1016/j.cell.2008.01.041
- López-Pérez, R., R. García-Sanz, D. González, A. Balanzategui, M.C. Chillón, I. Alaejos, M.V. Mateos, M.D. Caballero, G. Mateo, M.J. Nieto, et al. 2000. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia*. 14:1493–1499. doi:10.1038/sj.leu.2401862
- López-Pérez, R., R. García-Sanz, D. González, A. Balanzategui, M.C. Chillón, I. Alaejos, M.V. Mateos, M.D. Caballero, M. Corral, A. Orfão, et al. 2001. Gene scanning of VDJH-amplified segments is a clinically relevant technique to detect contaminating tumor cells in the apheresis products of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 28:665–672. doi:10.1038/sj.bmt.1703219
- Lopez-Villar, O., J.L. Garcia, F.M. Sanchez-Guijo, C. Robledo, E.M. Villaron, P. Hernandez-Campo, N. Lopez-Holgado, M. Diez-Campelo, M.V. Barbado, J.A. Perez-Simon, et al. 2009. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically

Downloaded from jem.rupress.org on December 9, 2009

- chromosomal, showing a specific genetic profile for the *Sq. syncytiosa* leukemia 23:664–672. doi:10.1038/leu.2008.361
- McCulloch, E.A. 1983. Stem cells in normal and leukemic hematopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood*, 62:1–13.
- Menendez, P., L. Wang, L. Li, K. Chadwick, and M. Bhatia. 2004. Retroviral transduction of hematopoietic cells derived from human embryonic stem cell-derived CLN3<sup>+/B-FV</sup> hemogenic precursors. *Mol. Ther.* 10:1109–1120. doi:10.1016/j.yjmb.2004.08.016
- Minasi, M.G., M. Riminucci, L. De Angelis, U. Birello, B. Eteradacci, A. Inacenni, A. Caprioli, D. Szabella, M. Baiocchi, R. De Maria, et al. 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 129:2773–2783.
- Monica, R., G. Ligero, L. Sanchez, F. Catalina, T. de la Cueva, A. Nieto, G.J. Melen, R. Rubio, J. Garcia-Castro, C. Bueno, and P. Menendez. 2009. Feed-in-liver maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. *Cell Res.* 19:698–709. doi:10.1038/cr2009.25
- Prindull, G. 2005. Hemangioblasts representing a functional endothelio-hematopoietic entity in ontogeny, postnatal life, and CML neovascularogenesis. *Stem Cell Rev.* 1:277–284. doi:10.1385/SCR:13:277
- Pui, C.H., L.L. Robson, and A.T. Look. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371:1030–1043. doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2
- Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105–111. doi:10.1038/35102167
- Rodríguez, R., R. Rubio, M. Masip, P. Catalina, A. Nieto, T. de la Cueva, M. Arias, N. San Martín, E. de la Cueva, D. Balanzano, et al. 2008. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*, 11:397–407.
- Streibel, B., A. Chert, D. Huler, M. Exner, U. Jäger, O. Wigner, and I. Schwartziager. 2004. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cell in B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 351:250–259. doi:10.1056/NEJMoa033153
- Tada, S., T. Era, C. Furusawa, H. Saturated, S. Nishikawa, M. Kishimoto, K. Nakao, T. Chiba, and S. Nishikawa. 2005. Characterization of mesoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development*, 132:4363–4374. doi:10.1242/dev.02005
- Thomas, M., A. Grotzer, E.P. Vormlecher, P. Hadraviger, J. Greif, and O. Heidenreich. 2005. Targeting MLL-AP4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood*, 106:3559–3566. doi:10.1182/blood-2005-03-1283
- Trenxin, N., J. Korkko, E. Ibberson, G.C. Koppen, C. Digtrokmo, and D.C. Painney. 2001. MicroSAGE analysis of 1,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*, 19:408–418. doi:10.1634/stemcells.19-5-408
- van Donger, J.J., A.W. Langerak, M. Brüggermann, P.A. Evans, M. Hummel, F.L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuring, R. Garcia-Sanz, et al. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17:2257–2317. doi:10.1088/sj.leu.2403202
- Walkley, C.R., G.H. Olsen, S. Dworkin, S.A. Falb, J. Swaan, C.A. McArthur, S.V. Westmoreland, P. Chambon, D.I. Scadden, and L.E. Purton. 2007. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*, 129:1097–1110. doi:10.1016/j.cell.2007.05.014
- Waller, E.K., J. Ohwren, F. Lund-Johansen, S. Huang, M. Nguyen, G.R. Guo, and T. Teravainen. 1995. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood*, 85:2422–2435.
- Wang, L., L. Li, F. Shojaei, K. Levac, C. Cerdan, P. Menezes, T. Martin, A. Rojewski, and M. Bhatia. 2004. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 21:31–41. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.006
- Wei, W., and J.M. Sedivy. 1999. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* 253:519–522. doi:10.1006/excr.1999.4665
- Weissman, I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell*, 100:157–168. doi:10.1016/S0002-8674(00)81692-X
- Wiemels, J., M. King, and M. Greaves. 2009. Backtracking of leusemic clones to birth. *Mol. Biol. Evol.* 26:7–27. doi:10.1093/molbev/epn252



**DISCUSIÓN**

---



## V. DISCUSIÓN

### **Estabilidad genética en las hESC: premisa necesaria para su uso como herramienta biológica en estudios de modelos de enfermedad.**

Con la obtención de los primeros cultivos de ESC en ratón (en adelante, mESC, siglas inglesas de *Mouse Embryonic Stem Cells*) (Evans and Kaufman, 1981), se plasmaron las bases para desarrollar la metodología necesaria para obtener finalmente hESC. Así, en 1998 se hacen públicos los primeros datos sobre la derivación de líneas embrionarias obtenidas a partir de un blastocito humano (Thomson et al., 1998). Este hecho supuso, en ese momento, una esperanza para enfermedades que hasta entonces no tenían curación. Hoy día, tenemos la certeza de que cuanto menos, las hESC son una herramienta sin precedentes para llevar a cabo investigación básica y pueden ayudar a desentrañar aspectos hasta el momento desconocidos de la biología y patogenia de muchas enfermedades de origen embrionario/fetal, y de las fases tempranas del desarrollo humano.

Las hESC son una fuente de células pluripotentes capaces de diferenciarse a múltiples tipos celulares, abriéndose innumerables oportunidades de aplicación en el campo de la biomedicina (Davila et al., 2004; Keller, 2005; Lensch and Daley, 2006; Menendez et al., 2005b). Por ejemplo, estas células representan una oportunidad para utilizarlas como modelo en el que reproducir y estudiar el impacto funcional y molecular de los oncogenes de fusión característicos de muchos subtipos de leucemia infantil cuyo origen es prenatal. En estas patologías no sería lógico estudiar el mecanismo de transformación en muestras de pacientes, porque en muestras primarias de pacientes, todos los eventos oncogénicos ya han ocurrido y no podemos distinguir entre eventos iniciadores y eventos oncogénicos que mantienen el tumor. Los modelos animales existentes para muchas leucemias agudas pediátricas no reproducen la enfermedad, lo que indicaría que en el modelo murino, por ejemplo, se

pierden componentes esenciales del proceso leucémico que están presentes en el humano en estadio embrionario/fetal (Greaves and Wiemels, 2003; Lensch and Daley, 2006). También puede ocurrir que la célula diana utilizada en los estudios, no se encuentre en el estadio jerárquico/ontogénico adecuado. Todo ello respaldaría el uso de las hECSs para desarrollar hESC transgénicas que expresen los oncogenes de fusión característicos de leucemia, y posteriormente estas hESC transgénicas diferenciarlas a hematopoyesis para analizar si genes de fusión o factores transcripcionales asociados a leucemia, juegan un papel en la formación y bloqueo de los distintos linajes sanguíneos. Estos derivados hematopoyéticos que llevan las alteraciones cromosómicas propias de diferentes subtipos de leucemias, podrían, por tanto convertirse en un modelo novedoso para estudiar las leucemias agudas infantiles con origen prenatal que carecen de un modelo humano adecuado, debido, a la falta de acceso a tejido embrionario humano/fetal por causas de índole ética y logística.

Existen numerosas evidencias científicas que demuestran que las hECSs tienen tendencia a la inestabilidad genética cuando son mantenidas en cultivo durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, cabría preguntarse si solamente es debido a la metodología de cultivo utilizada o existen características inherentes a las propias hECSs que las haría más propensas a dicha inestabilidad. Nosotros hemos observado que las alteraciones cromosómicas detectadas, solamente ocurren en ciertas líneas de hECSs, lo que sugiere que debemos tener cierta precaución en el diseño de nuevas condiciones de cultivo, especialmente cultivos libres de *feeders*, y también que diferentes líneas presentan cierta vulnerabilidad a adquirir anomalías genéticas. Es por ello que consideramos aconsejable en la investigación y banco de las hECSs, la implementación de ensayos de detección de alteraciones genéticas, no sólo de citogenética convencional y molecular, cariotipo, SKY, FISH, (Andrews et al., 2009), sino también técnicas de alta resolución como SNP o CGH *arrays*, que permitan detectar pequeñas alteraciones que pueden tener impacto en el potencial de

desarrollo y malignidad de las células. Incluso, actualmente ya se están realizando análisis de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*) que proporcionan un conocimiento mucho más amplio del estatus genómico de la célula. Esta técnica, ha cambiado radicalmente la investigación biomédica y el conocimiento de las alteraciones genéticas. Gracias a la reducción del coste, la complejidad y el tiempo requerido para secuenciar grandes cantidades de ADN, es posible tanto la secuenciación del exoma como la de todo el genoma. Se sabe que alrededor de un 80% de las mutaciones se localizan en regiones codificantes por lo que, la secuenciación del exoma ha tenido un gran impacto científico. Esta técnica permite la captura, el enriquecimiento y la secuenciación de regiones genómicas codificantes para identificar nuevas variantes en genes conocidos o nuevos genes que estén asociadas tanto a enfermedades raras como comunes. El reto en el diagnóstico genético molecular está en saber interpretar estas variantes y dilucidar cuáles de estas variantes raras son las causantes de la enfermedad y cuales contribuyen a una variabilidad genética dentro de la normalidad.

Desde que se establecieron las primeras líneas de hESC, han sido muchos los datos reportados en torno a la inestabilidad cromosómica de las hESCs mantenidas en cultivos durante largos periodos de tiempo, y su posible causa. Algunos laboratorios sostiene que han encontrado alteraciones cromosómicas en algunas de sus líneas después de cultivarlas durante periodos largos de tiempo, (Brimble et al., 2004; Draper et al., 2004a; Draper et al., 2004b; Gertow et al., 2007; Imreh et al., 2006; Inzunza et al., 2004; Mitalipova et al., 2005; Narva et al., 2010; Rosler et al., 2004), mientras que otros estudios publican la ausencia de alteración en algunas de las líneas de hESCs que han mantenido en sus laboratorios durante largo tiempo (Caisander et al., 2006). Esta controversia aparece en torno a la metodología de crecimiento de los cultivos, en concreto se centra en tres aspectos fundamentales: i) método mecánico vs método enzimático para expandir el cultivo; ii) presencia de *feeders* vs ausencia de *feeders*; iii) duración total del cultivo.

Después de comparar tres líneas de hESCs diferentes pero mantenidas en el mismo laboratorio bajo exactamente las mismas condiciones de cultivo, el resultado de dicho estudio nos aportó datos sobre las preguntas planteadas, ya que tras el cultivo de dichas líneas el resultado obtenido para cada una de ellas es diferente en cuanto a la integridad cromosómica que mantienen a lo largo del tiempo. Así, encontramos que las tres líneas de hESCs se mantuvieron cromosómicamente estables mientras se crecieron sobre *feeders*, ya que una vez trasladadas a una matriz sin *feeders*, dos de ellas, curiosamente las más jóvenes las que tenían menos pases de cultivo, presentaron alteraciones cromosómicas. Sin embargo, la línea de hESCs que había acumulado más pases de cultivo, se mantuvo sin alteración alguna (ni numérica, ni estructural), después de más de 215 pases totales. Mientras estos resultados están en línea con la idea de que en los cultivos sin *feeders*, los métodos empleados para realizar los pases, pueden contribuir en parte a la aparición de inestabilidad de la línea, también se confirma la hipótesis, de que independientemente a las condiciones en las que se desarrolle el cultivo, algunas líneas de hESCs son inherentemente más propensas a la inestabilidad cromosómica que otras. Es importante destacar que, además, las líneas que presentan alteraciones cromosómicas lo hacen a los 61-87 pases, mientras que la tercera de las líneas se mantiene estable durante más de 215 pases. Eso es una evidencia clara de que la duración del cultivo parece condicionar la aparición de alteraciones cromosómicas en menor medida que las propiedades intrínsecas de las células, y este hecho también se ha demostrado en otro estudio parecido realizado (Caisander et al., 2006), en que después de monitorizar cinco líneas durante más de 22 meses apareció una trisomía 13 en una de las cuatro, cuando las cinco líneas se habían cultivado bajo las mismas condiciones.

Por otra parte, el resultado de la experimentación sugiere, que las alteraciones cromosómicas aparecen principalmente cuando las células son transferidas a un cultivo sin *feeders*, y ese fenómeno parece variar entre las diferentes líneas, lo que nos hace pensar que la predisposición a la inestabilidad cromosómica depende de las

características propias de cada una de ellas, que las hará más o menos capaces a adaptarse de un modo más eficaz a las nuevas condiciones de cultivo. Es importante además, identificar el alcance del problema subyacente en la inestabilidad cromosómica de las líneas, y desentrañar si son de orden intrínseco o extrínseco las características que contribuyen a hacer que unas líneas sean más propensas a la inestabilidad que otras. Hay que tener muy en cuenta, que las condiciones en las que se desarrolla un cultivo *in vitro* representan un artefacto, y las alteraciones que aparecen en este tipo de cultivos van a ser consecuencia de la adaptación a esas condiciones impuestas para el cultivo. Sin embargo, *in vivo* las alteraciones cromosómicas de las células de la masa celular interna del embrión, de las que proceden las hESCs, no persisten sino que tienden a desaparecer por evolución natural a medida que progresa la embriogénesis, ya que de otro modo malograrían el desarrollo embrionario. Además, los embriones destinados a la derivación de líneas embrionarias, son los sobrantes de programas de fecundación *in vitro*, y este hecho ya supone un sesgo, puesto que generalmente los embriones morfológicamente más adecuados y simétricos son los que son implantados, mientras que los congelados y donados a la investigación son aquellos que han sido inicialmente descartados para el propósito de la fecundación. De hecho, existen estudios que sostienen que más del 50% de los embriones destinados a fecundación poseen alguna aneuploidía, (Fragouli and Wells, 2011; Hanson, 2005; Hardarson et al., 2003; Harper and Sengupta, 2012; Mantzouratou and Delhanty, 2011; Voet et al., 2011; Wilton, 2002). Incluso, es posible que de entre estos embriones algunos de ellos presenten cierto grado de mosaicismo conviviendo dos poblaciones celulares diploides y aneuploides. De cualquier modo, lo cierto es que los embriones donados para fines científicos son aquellos que *a priori* tenían peor calidad para ser transferidos a útero. Todas estas circunstancias plantean una serie de cuestiones que están sin resolver en cuanto al cultivo *in vitro* de hESCs: i) ¿son las hESCs derivadas a partir de embriones congelados más propensas a la inestabilidad cromosómica que aquellas hESCs que derivan de embriones frescos?; ii) si hay estudios que avalan que entre el ~20-30%

de embriones humanos procedentes de ciclos de fecundación *in vitro* presentan alteraciones cromosómicas, ¿por que el ~100% de las líneas de hESCs son euploides?; iii) ¿puede existir una selección a la hora de generar líneas de hESCs?; iv) ¿son sólo las células cromosómicamente estables de las blastómeras de los embriones que presentan mosaísmo, las responsables de generar las líneas de hESCs?.

Existen multitud de estudios que sugieren que el origen del cáncer puede estar en células troncales de tejidos adultos. De hecho, muchas vías de señalización claves en la homeostasis y regulación del desarrollo embrionario (Wnt, Notch, BMP...) se han visto involucradas en la progresión del cáncer (Menendez et al., 2006), lo que sugiere la existencia de un vínculo entre las hESCs y las células cancerosas. Igualmente, no podemos olvidar que antes de la generación de hESCs se derivaron células de carcinoma embrionario (en adelante, ECC, siglas inglesas de *Embryonic Carcinoma Cells*), procedentes de teratomas y teratocarcinomas humanos (Harrison et al., 2007) y hay trabajos que sugieren que las hESCs en cultivo pueden adquirir alteraciones que imitan a los cambios que sufren las ECC durante la progresión tumoral (Andrews et al., 2005; Baker et al., 2007). Incluso al estudiar de forma más detallada las alteraciones que presentan algunas líneas de hESCs, y compararlas con las alteraciones que existen en líneas de teratocarcionas, se ha comprobado que se asemejan bastante en algunos casos concretos de líneas de hESCs, esto podría explicar el alto grado de malignidad que presentan algunas de las líneas estudiadas y además analizando y comparando estos cambios entre ambos tipos de células, hESCs y ECCs, se podrían estudiar algunos aspectos de los mecanismos que regulan la oncogénesis (Hovatta et al., 2010). De hecho la transformación celular se entiende como un bloqueo en la diferenciación y por ello, el estudio de los mecanismos de esa transformación en hESCs podría utilizarse como una herramienta única para estudiar la biología del cáncer, y la aparición de eventos transformantes que ayuden a comprender esta transformación. Existen estudios prospectivos que

reportan cambios genéticos y epigenéticos en hESCs transformadas. Estas hESCs que adquieren propiedades tumorigénicas, se comportan como clones neoplásicos y muestran propiedades tumorales clonales *in vitro* e *in vivo* en multitud de ensayos (Werbowski-Ogilvie et al., 2009; Werbowetski-Ogilvie et al., 2012; Werbowetski-Ogilvie et al., 2011). Por todo esto, cobra especial importancia el establecimiento de líneas de hESCs que presentan alteraciones cromosómicas concretas o en las que hemos detectado mutaciones, puesto que su comportamiento puede arrojar luz sobre los mecanismos celulares y moleculares que subyacen en el desarrollo del cáncer, ya que posiblemente, estas transformaciones alteren el equilibrio entre auto-renovación, diferenciación y muerte celular. De hecho, hemos comprobado que las diferentes alteraciones que presentaban las hESCs en el cultivo *in vitro*, tenían un significado biológico diferente. Así copias extra de genes situados en cromosomas como el 12 parecen promover la auto-renovación y no la diferenciación, proporcionando una ventaja proliferativa de las células que presentan dicha alteración, incrementándose el porcentaje de células trisómicas para el cromosoma 12 con el paso del tiempo. Sin embargo, el aumento de las copias de genes que están en cromosomas como el 14 ó 20 puede que no tengan ningún efecto sobre las células o incluso que proporcionen un retraso del ciclo celular, con lo cual la tasa de proliferación es menor, haciendo incluso que las células con esa alteración desaparezcan. En este sentido, hay estudios publicados que han analizado mediante SNPs alteraciones en los cromosomas 1,12, 17 y 20, y como resultado de este estudio parece haberse encontrado tres genes que se expresan en más del 20% de líneas de hESCs estudiadas, en concreto en este fragmento se han encontrado: *ID1*, *Bcl2l1* y *HM13*. De estos genes, *BCL2L1*, parece ser, un fuerte candidato para la conducción de la adaptación del cultivo de hESCs, y estarían situados en un pequeño amplicon en el fragmento 20q11.21 (Amps et al., 2011).

## **Susceptibilidad de hESCs, su progenie hematopoyética y de células CD34+ de cordón umbilical a la rotura/ reordenamiento de *MLL* tras su exposición genotóxica a etoposido**

Son muchos los datos que sostienen la idea de que el origen del reordenamiento del gen *MLL* en el útero puede ser el resultado de una exposición transplacental durante el embarazo a sustancias que alteran la actividad de la enzima DNA-topoisomera II, encargada de reparar los daños en el DNA, tales como el etopósido (Alexander et al., 2001; Greaves, 2002; Ross et al., 1996; Wiemels et al., 1999b). El reordenamiento de *MLL* es un rasgo característico en las leucemias agudas infantiles y también en LMA secundarias asociadas a tratamientos con inhibidores de la DNA-topoisomerasa II (Eguchi et al., 2006). Hoy en día se han publicado estudios que alertan sobre la alta ingesta de bioflavonoides durante el embarazo, ya que constituyen una fuente rica en inhibidores de la DNA-topoisomerasa II que podría causar rotura en el gen *MLL* en el feto, y por tanto, jugar un papel importante en el desarrollo del clon pre-leucémico (Spector et al., 2005; Strick et al., 2000).

El etopósido induce roturas del gen *MLL* en mESCs (Blanco et al., 2004) y también en HSC CD34+ de cordón umbilical, es decir postnatales (Libura et al., 2005; Libura et al., 2008; Money Penny et al., 2006). Sin embargo, la exposición a este compuesto en estadios más tempranos en humanos aún no se había evaluado. Contrariamente a lo ocurrido en la exposición puntual a etopósido de las HSCs CD34+, en hESCs se produce una muerte celular considerable a los 4 ó 5 días del tratamiento con este agente. El etopósido inhibe la actividad de la DNA-topoisomerasa II, provocando la acumulación de daños sin reparar en el DNA celular, lo que finalmente produce la muerte de las células. La vulnerabilidad que presentan las hESCs al etopósido concuerda con estudios que revelan la importancia del papel de la DNA-topoisomerasa II alfa y beta, en tejidos humanos en desarrollo (Zandvliet et al., 1996). Además, la respuesta letal de las hESCs expuestas al inhibidor de la DNA-

topoisomerasa II, nos da pistas para entender la relación entre la exposición intrauterina a agentes genotóxicos y el riesgo de adquisición de anomalías cromosómicas deletéreas y defectos congénitos letales, que provocan la pérdida de embriones y abortos, ya que son normalmente, incompatibles con un desarrollo normal (Finnell et al., 2002).

Analizando los datos comprobamos que una sola dosis baja de etopósido provocó en hESCs rotura del gen *MLL* en un ~2%-3% de las células siendo similar a lo observado para HSCs CD34+ fetales neonatales (Libura et al., 2005; Libura et al., 2008; Money Penny et al., 2006). Es destacable como la susceptibilidad a la exposición a etopósido de las hESCs es mayor que la que presentan las mESCs, ya que dosis altas de este agente (100  $\mu$ M), apenas indujo roturas de *MLL* en mESCs, mientras que concentraciones relativamente bajas (0.2-0.5 $\mu$ M) provocaron más roturas de *MLL*, del orden de 1800 veces más (Blanco et al., 2004). Vale la pena mencionar que la concentración en suero que presentan los enfermos de cáncer tratados con este fármaco, oscila entre 1-2  $\mu$ M (Edick et al., 2003), muy por debajo de lo empleado en el trabajo de Blanco et al. Además, existe una diferencia en cuanto a las roturas de *MLL* que presentan las células atendiendo a su madurez. De este modo mientras que hESCs y células hematopoyéticas derivadas de hESCs son las más vulnerables a la exposición a etopósido, conforme van madurando en la diferenciación hacia linaje hematopoyético e incluso las HSCs CD34+ de cordón umbilical, el número de roturas de *MLL* va disminuyendo. Este hecho sustenta la idea de que son más sensibles a agentes genotóxicos las células en estadios ontogénicos más tempranos. Por ello, podrían utilizarse las hESCs para hacer estudios de cribado de fármacos y toxicidad como alternativa al uso de células transformadas o *zebrafish*, como un modelo más fisiológico/traslacional que los anteriores. Además, debemos destacar que los ensayos de *Long Distance Inverse -PCR* han mostrado de *MLL* no sólo se rompe sino que se reordena. En nuestro caso hemos visto reordenamientos con regiones intergénicas lo cual tiene sentido por representar estas la mayor parte del genoma.

Asumimos que debemos desarrollar trabajos a mayor escala que evalúen si bajo alguna circunstancia, concentración, tiempo, etc. se logra reordenar *MLL* con genes *partners* comúnmente encontrados en leucemias secundarias a tratamiento.

Podemos preguntarnos, a raíz de los resultados obtenidos, si además estas roturas en el gen *MLL* proporcionan ventajas proliferativas o de supervivencia en el cultivo *in vitro* a largo plazo. Comprobamos, que la proporción de células con rotura de *MLL* va disminuyendo, no hay cambios en el ciclo celular ni aparecen nuevas alteraciones cromosómicas ni tampoco mutaciones en el gen *FLT3*. Este resultado parece indicar, que la rotura en *MLL* no parece ser suficiente para proporcionar una ventaja proliferativa o de supervivencia a las células. Es más, la proporción de células que presentaban rotura en uno de los alelos del gen *MLL*, va disminuyendo desde la cuarta semana del tratamiento hasta la semana doce, indicando que a lo largo de este tiempo después de la exposición, hay un equilibrio entre muerte celular y reparación del DNA. Puede ser que existan mecanismos que reparen la rotura en un alelo de *MLL* o incluso en este escenario, puede ocurrir que las células que tienen el alelo roto del gen *MLL* no se duplican en la misma tasa que las que no están reordenadas y, por esa razón, con el tiempo la proporción va disminuyendo.

A pesar de que la vulnerabilidad a roturas de *MLL* inducidas por etopósido que presentan las hESCs y las HSCs CD34+ derivadas de cordón umbilical, es muy similar en cuanto a la rotura provocada en *MLL*, si es cierto que la exposición crónica a etopósido provoca en las hESCs un aumento, tanto en tasa de muerte celular, como en la adquisición de nuevas alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, que no aparecen en las células neonatales. Ahora bien, la ausencia de transformación de las hESCs que presentan reordenamiento de *MLL* junto con otras alteraciones puede deberse a: i) el impacto funcional de la fusión de *MLL* puede darse aguas abajo del origen celular de la traslocación, ii) puede ser necesario otro reordenamiento específico diferente con regiones génicas o reguladoras que

provoque la expresión en el marco de una proteína quimérica de los ocurridos al azar en este experimento para que se produzca la transformación con potencial leucémico, por ejemplo, el recíproco de una traslocación balanceada y iii) son necesarios otros eventos colaboradores.

Todos estos datos pueden sugerir que la exposición continua a inhibidores de la DNA-topoisomerasa II durante el desarrollo embrionario, no sólo induce rotura en el gen *MLL*, sino también hace más susceptibles a las hESCs a adquirir otras alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, estableciéndose un vínculo entre exposición a etopósido e inestabilidad genética. Este trabajo pone en valía el uso de las hESCs como una herramienta útil para hacer *screening* de toxicidad de fármacos probados en estadios ontogénicos muy tempranos acercándonos más a lo que pudiera ocurrir en el embrión humano y utilizar el potencial que nos ofrecen las hESCs para desarrollar fármacos y estudios dirigidos a la predicción de la aparición de enfermedades.

### **Las MSCs de la médula ósea de niños afectados de LLA pro-B MLL-AF4+ presentan y expresan el gen de fusión MLL-AF4**

Hoy en día, está bien descrita la presencia en diferentes modelos experimentales de un precursor hemogénico capaz de diferenciarse tanto a hematopoyesis como a endotelio durante el desarrollo embrionario (Menendez et al., 2004; Wang et al., 2004; Wang et al., 2005a). Incluso recientemente se ha llegado a desarrollar un sistema celular humano para estudiar el desarrollo temprano hemato-endotelial en hESCs que expresen el gen de fusión MLL-AF4+, comprobando que la presencia del gen de fusión induce especificación hacia precursores hemogénicos pero inhibe la diferenciación hematopoyética en favor de la diferenciación endotelial (Bueno et al., 2012). Sin embargo, aunque el origen embrionario de las MSCs es incierto y la falta de un buen marcador dificulta su estudio, algunas publicaciones sugieren la

existencia de una célula precursora común a las HSCs y a las MSCs, llamado precursor mesodérmico (Islam et al., 1988; Singer et al., 1984).

Existe controversia en torno a la presencia de alteraciones cromosómicas en MSCs de patologías hematológicas. Hay publicados estudios en los que se describe la existencia de alteraciones cromosómicas en las MSCs de pacientes de mieloma múltiple y síndrome mielodisplásicos, que han sido identificados mediante CGH *arrays* (Corre et al., 2007; Lopez-Villar et al., 2009), lo que indicaría que el estroma medular puede jugar un papel importante en la patogénesis del tumor. De hecho, cada vez está más consolidado en la literatura que las MSC/estroma medular están estrechamente implicados en la patogénesis de enfermedades hematológicas debido a que conviven en el nicho hematopoyético, y las MSC poseen propiedades inmunes muy importantes en la regulación de la homeostasis linfohematopoyéticas.

Durante el desarrollo embrionario prenatal en útero, podrían originarse genes de fusión característicos de leucemias infantiles en una población de precursores mesodérmicos. Por esta razón, las MSCs de la médula ósea de niños afectados de estas leucemias, podrían presentar junto con los blastos dichos genes de fusión característicos de estos tipos de leucemias, lo que potenciaría la idea de que las proteínas quiméricas asociadas a leucemias infantiles podría tener un origen temprano en el desarrollo. Actualmente existen datos que demuestran que reordenamientos Ig/TCR están presentes en las células endoteliales de pacientes con distintos tipos de linfomas (Streubel et al., 2004). Igualmente se ha demostrado la presencia de la traslocación BCR-ABL en células endoteliales de pacientes en remisión completa de LMC (Gunsilius et al., 2000). Con estos antecedentes, quisimos profundizar en la presencia en MSCs de diferentes genes de fusión y alteraciones cromosómicas específicas de leucemias pediátricas. Tras analizar células mesenquimales de un total de 38 pacientes de diferentes tipos de leucemia, encontramos que de todas las muestras analizadas, únicamente en aquellas procedentes de neonatos con LLA pro-B MLL-AF4+, un porcentaje (8%) de células

mesenquimales presentaban la traslocación. Este reordenamiento se determinó mediante FISH y confirmamos la expresión de la traslocación mediante RT-PCR. No se vieron cariotipos tetraploides, y esto nos permite excluir la idea de que la detección del gen de fusión MLL-AF4 se deba a la fusión celular de un blasto y una MSCs. Con los estudios de reordenamiento VD(J)H de las inmunoglobulinas que se realizaron, no se encontró ningún reordenamiento en las MSCs, lo que demuestra que no ha habido ningún fenómeno de de-diferenciación o plasticidad celular. Todos estos datos sugieren que las MSCs de estos niños, formarían parte del clon tumoral, ya que la traslocación se produce durante el desarrollo embrionario.

Es importante destacar que los ensayos de sobreexpresión de estos oncogenes de fusión en MSCs indican que estas traslocaciones son compatibles con un fenotipo mesenquimal, y que la expresión de la proteína de fusión no altera la homeostasis de la MSCs. Esto sugiere que la presencia del oncogen no es suficiente para la transformación celular, sino que son necesarias posteriores alteraciones. Los mecanismos por los cuales las MSCs de la médula ósea de niños con LLA pro-B MLL-AF4+ adquieren esta aberración genética aún no se han dilucidado, pero, puesto que el punto de rotura a nivel molecular para la fusión MLL-AF4 es idéntico en las MSCs y en blastos leucémicos, se sugiere inequívocamente la existencia de un precursor común. Esto hubiera quedado definitivamente demostrado mediante el análisis por PCR inversa de los puntos de rotura. Desafortunadamente no se consiguieron un número de MSC suficiente para llevar a cabo el ensayo de *long distance PCR*, y los pacientes han fallecido de forma que no hemos podido confirmar a nivel molecular que ambos MSC y blastos comparten a nivel clonal la rotura de *MLL*. También es importante destacar que incluso en fusiones idénticas, como en el caso de este gen de fusión, pueden originar transcritos diferentes resultantes de procesos de *splicing* alternativo, y estos transcritos idénticos pueden tener un efecto diferente en distintos tipos celulares, debido a que la proteína resultante podría

ejercer diferente función según el tipo de célula. Esto podría explicar en parte la falta de transformación de las MSCs que presentan el gen de fusión MLL-AF4.

El resto de fusiones e hiperdiploidia, no fueron encontrados en MSC en ningún caso, lo que implica que el estroma medular no parece contribuir en la homeostasis y proceso leucémico en estos otros tipos de leucemias agudas. Tiene sentido pensar que el hecho de que MLL-AF4+ sean típicos de lactantes (< 1 año) mientras que el resto son más comunes en niños entre 2 y 15 años es clave para explicar nuestros datos, dado que la concordancia de estas traslocaciones en gemelos es del 100% sólo en el caso de MLL-AF4+ (Ford et al., 1998; Greaves, 2002; Greaves et al., 2003). La presencia de MLL-AF4 en células no hematopoyéticas (ejemplo: MSC) tiene implicaciones en clínica. Por un lado, puede explicar, si el origen de MLL-AF4 es pre-hematopoyético porque hay un porcentaje de leucemias agudas CD45- y porque generalmente los blastos presentan unos niveles de CD45 más bajos que las células normales. Además, la presencia de MLL-AF4 en MSC tiene grandes de implicaciones en la enfermedad mínima residual. En este sentido existe controversia entre la sensibilidad de las técnicas de citometría de flujo y biología molecular. La citometría de flujo es cuantitativa pero analiza por defecto células CD45+ hematopoyéticas, mientras que las técnicas moleculares son capaces de detectar el reordenamiento independientemente de que este se encuentre en un subtipo celular u otro. Esto explicaría la controversia en la sensibilidad reportada para ambas técnicas. Finalmente, datos reportados en mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos (Lopez-Villar et al., 2009), leucemia mieloide crónica Ph+ (Gunsilius et al., 2000), y en distintos tipos de linfomas (Streubel et al., 2004), apoya la contribución del estroma en la patogénesis de la enfermedad, aunque debe determinarse aún hasta que punto el estroma juega un papel biológico a nivel inmunológico o desde un punto de vista de biología del desarrollo. Animamos por tanto a continuar estudios encaminados a analizar molecular y funcionalmente la implicación del estroma medular/MSCs en distintas neoplasias hematológicas.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



## VI. CONCLUSIONES

1. El uso de hESCs como modelo de enfermedad, requiere que las células sean genéticamente lo más estables posible. Si no fuera así podrían presentar alteraciones que pueden cooperar en la transformación de las hESCs o alterar la homeostasis del cultivo.
2. Es importante implementar técnicas citogenéticas convencionales y de alta resolución con el fin de detectar pequeñas pero relevantes anomalías cromosómicas.
3. Las condiciones de cultivo de las hESCs estandarizadas, y la duración del mismo, no determinan por si solos la tendencia de algunas líneas de hESCs a ser más propensas a adquirir alteraciones cromosómicas, sino que este hecho es inherente a la naturaleza de la propia línea celular.
4. El etopósido induce roturas en el gen *MLL* en hESCs y en células hematopoyéticas diferenciadas a partir de las hESCs, pero no proporciona ninguna ventaja proliferativa ni de supervivencia en estas células, ya que incluso la proporción de células con rotura de *MLL* disminuye con el tiempo.
5. La continua exposición a etopósido, además de producir la rotura de *MLL*, provoca otras alteraciones cromosómicas en hESCs. Por lo tanto, una exposición crónica a etopósido durante el desarrollo embrionario temprano puede inducir reordenamientos de *MLL* y hacer a las hESCs más propensas a la adquisición de alteraciones cromosómicas.
6. En células CD34+ neonatales, la exposición crónica a etopósido provoca rotura de *MLL*. Sin embargo, los datos de citogenética convencional y SKY

revelan que la exposición continua a etopósido no induce alteraciones cromosómicas adicionales como sí ocurría en las hESCs.

7. El gen de fusión MLL-AF4 está presente y se expresa en las MSCs de médula ósea en el 100% de los lactantes diagnosticados con una LLA pro-B MLL-AF4+.
8. Otros genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda pediátrica no están presentes en MSCs de médula ósea, lo que apoya la especificidad de los resultados encontrados para MLL-AF4.
9. Las MSCs constituyen parte del clon tumoral, revelando por primera vez el importante papel del estroma medular en la patogénesis de la LLA pro-B del lactante con traslocación t(4;11) MLL-AF4. Además, parece plausible la sugerencia de un origen pre-hematopoyético de MLL-AF4, que tendría su origen en una población de precursores mesodérmicos capaces de diferenciarse hacia linaje hematopoyético y mesenquimal.

**ESTUDIOS EN CURSO Y DE FUTURO**

---



## VII. ESTUDIOS EN CURSO Y DE FUTURO

### Mecanismos celulares y moleculares responsables de la leucemia linfoblástica aguda del lactante con reordenamiento MLL-AF4

La existencia de modelos fidedignos que reproduzcan la LLA pro-B del lactante MLL-AF4+, es clave para entender mecanismos celulares y moleculares que se encuentran tras la etiología y patogénesis de la leucemia, ya que permitirían dirigir futuros ensayos de “screening” de fármacos. Existen diferentes razones por las que los modelos hasta ahora utilizados fallan a la hora de reproducir la enfermedad, y entre dichas razones podrían encontrarse : i) la célula diana empleada en estos estudios no es la correcta; ii) los niveles de expresión del oncogén no se corresponden con los niveles fisiológicos; iii) la capacidad de transformar de MLL-AF4 es dependiente del contexto humano en el que sea expresado; iv) la fusión recíproca AF4-MLL resultante del reordenamiento, así como otros eventos oncogénicos secundarios, pueden ser necesarios.

Está ya publicado, que la expresión de MLL-AF4 mediada por lentivirus tiene un impacto funcional tanto en estadio neonatal (CD34+ derivadas de cordón umbilical) y prenatal (hESCs y su progenie hematopoyética). En CD34+, la expresión de MLL-AF4 conlleva una mayor proliferación y una mayor supervivencia, lo que se traduce en un aumento del *engraftment* hematopoyético y un mayor potencial clonogénico, pero no es suficiente para desencadenar leucemia. En hESCs la expresión de MLL-AF4 tiene como resultado una mayor especificación a progenitores hemogénicos, y sesga su potencial de diferenciación hematopoyético-endotelial, pero tampoco es capaz de desencadenar leucemia. Estos datos indican que la dificultad para desarrollar un modelo de LLA pro-B del lactante no se debe a la necesidad de que MLL-AF4 tenga que ser expresado en un contexto humano, ni tampoco a que los niveles de expresión conseguidos difieran mucho de los fisiológicos. Más bien, sugieren que mutaciones

adicionales o la fusión recíproca AF4-MLL resultante del reordenamiento pueden ser necesarias. En línea con esto, el laboratorio del Profesor Marschalek ha mostrado como la fusión recíproca AF4-MLL es suficiente para inducir LLA pro-B en células madre murinas. Por otro lado, ~15% - 30% de los pacientes tienen mutaciones activadoras en *FLT3* y *K-RAS*. Además, es posible que las leucemias con reordenamientos *MLL* tengan mutaciones adicionales que se deban, al menos en parte, a alteraciones epigenéticas derivadas de la actividad funcional descontrolada de *MLL*, que es una histona metiltransferasa. Finalmente no podemos obviar que esta leucemia es pro-B/monocítica y los precursores B/monocíticos son muy activos en hígado fetal. Por ello, sería interesante analizar el efecto leucémico MLL-AF en HSCs/HSCs de hígado fetal como un estadio hemtopoyético complementario de las hESCs y las células troncales progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical (en adelante, HSPCs, siglas inglesas de *Hematopoietic Stem/Progenitor Cell*).

Por todo ello, el laboratorio plantea llevar a cabo los siguientes estudios que nos permitan esclarecer potenciales candidatos responsables de la transformación mediada por MLL-AF4 y así establecer un modelo humano de LLA pro-B MLL-AF4+.

1. Estudiar *in vitro* e *in vivo* si AF4-MLL y/o mutaciones activadoras de *FLT3* o *K-RAS* cooperan con MLL-AF4 en la transformación de cordón umbilical CD34+.
2. Estudiar *in vitro* e *in vivo* si AF4-MLL y/o mutaciones activadoras de *FLT3* o *K-RAS* cooperan con MLL-AF4 en la transformación de progenitores hematopoyéticos derivados de hESCs.
3. Estudiar el impacto funcional de MLL-AF4 en progenitores B/monocíticos de hígado fetal tanto en modelos murinos como en células fetales humanas CD34+.

4. Generar iPSCs de blastos procedentes de leucemias con reordenamiento MLL-AF4 con el fin de analizar i) si la reprogramación celular afecta a las alteraciones epigenéticas derivadas de la actividad funcional descontrolada del reordenamiento *MLL*; y ii) comprobar si el potencial de diferenciación hematopoyético de las iPSCs que expresan MLL-AF4 está afectado, y ver si las hESCs nos permiten reproducir la afiliación de MLL-AF4 a estadio pro-B.



**OTROS TRABAJOS EN LOS QUE HA PARTICIPADO**

**LA DOCTORANDA**

---



## VIII. OTROS ESTUDIOS EN LOS QUE HA PARTICIPADO EL DOCTORANDO

1. Bueno, C., Montes, R., Catalina, P., Rodriguez, R. and Menendez, P. **Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement.** *Leukemia* **25** (2011), pp. 400-10.
2. Cortes, J.L., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Catalina, P., Elosua, C., Leone, P.E., Montes, R., Bueno, C., Ramos-Mejia, V., Maleno, I., Garcia-Perez, J.L. and Menendez, P. **Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos.** *Hum Reprod* **24** (2009), pp. 1844-51.
3. Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., Catalina, P., de la Cueva, T., Nieto, A., Melen, G.J., Rubio, R., Garcia-Castro, J., Bueno, C. and Menendez, P. **Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II.** *Cell Res* **19** (2009), pp. 698-709.
4. Cortes, J.L., Sanchez, L., Catalina, P., Cobo, F., Bueno, C., Martinez-Ramirez, A., Barroso, A., Cabrera, C., Ligeró, G., Montes, R., Rubio, R., Nieto, A. and Menendez, P. **Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines.** *Stem Cells Dev* **17** (2008), pp. 255-67.
5. Catalina, P., Cobo, F., Cortes, J.L., Nieto, A.I., Cabrera, C., Montes, R., Concha, A. and Menendez, P. **Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review.** *Cell Biol Int* **31** (2007), pp. 861-9.

6. Catalina P, Elosua C, Cortés JL, Nieto A, Garcia-Perez JL, Menendez P, Leone PE. **Characterization of chromosomal stability of human embryonic stem cell lines.** Latin American Journal of Dysmorphology LADJ 2 (2009), pp. 5-9.

## **BIBLIOGRAFIA**

---



---

**IX. BIBLIOGRAFIA**

Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., *et al.* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.

Al-Hajj, M., Becker, M.W., Wicha, M., Weissman, I., and Clarke, M.F. (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14, 43-47.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.

Alexander, F.E., Patheal, S.L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M.E., Chan, L.C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J.C., Gu, L.J., *et al.* (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res* 61, 2542-2546.

Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.

Allegrucci, C., and Young, L.E. (2007). Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update* 13, 103-120.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.

Amps, K., Andrews, P.W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M.B., Beil, S., *et al.* (2011). Screening ethnically

diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol* 29, 1132-1144.

Andrews, P.W., Arias-Diaz J, Auerbach J, Alvarez M, Ahrlund-Richter L, Baker D, Benvenisty N, Ben-Josef D, Blin G, Borghese L, *et al.* (2009). Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Reviews and Reports* 5, 301-314.

Andrews, P.W., Matin, M.M., Bahrami, A.R., Damjanov, I., Gokhale, P., and Draper, J.S. (2005). Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 33, 1526-1530.

Armstrong, S.A., Mabon, M.E., Silverman, L.B., Li, A., Gribben, J.G., Fox, E.A., Sallan, S.E., and Korsmeyer, S.J. (2004). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 3544-3546.

Bain, B., and Catovsky, D. (1990). Current concerns in haematology. 2: Classification of acute leukaemia. *J Clin Pathol* 43, 882-887.

Baker, D.E., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25, 207-215.

Bardini, M., Galbiati, M., Lettieri, A., Bungaro, S., Gorletta, T.A., Biondi, A., and Cazzaniga, G. (2011). Implementation of array based whole-genome high-resolution technologies confirms the absence of secondary copy-number alterations in MLL-AF4-positive infant ALL patients. *Leukemia* 25, 175-178.

Bardini, M., Spinelli, R., Bungaro, S., Mangano, E., Corral, L., Cifola, I., Fazio, G., Giordan, M., Basso, G., De Rossi, G., *et al.* (2010). DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia* 24, 169-176.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Janssen, J., Maas, L.M., Godschalk, R.W., Nijhuis, J.G., and van Schooten, F.J. (2007). Dietary flavonoids

induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis* 28, 1703-1709.

Benedikt, A., Baltruschat, S., Scholz, B., Bursen, A., Arrey, T.N., Meyer, B., Varagnolo, L., Muller, A.M., Karas, M., Dingermann, T., *et al.* (2011). The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* 25, 135-144.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.

Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A.M., Avanzini, M.A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Villa, R., Daidone, M.G., *et al.* (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67, 9142-9149.

Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313-319.

Binato, R., de Souza Fernandez, T., Lazzarotto-Silva, C., Du Rocher, B., Mencialha, A., Pizzatti, L., Bouzas, L.F., and Abdelhay, E. (2013). Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. *Cell Prolif* 46, 10-22.

Biondi, A., Cimino, G., Pieters, R., and Pui, C.H. (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96, 24-33.

Blanco, J.G., Edick, M.J., and Relling, M.V. (2004). Etoposide induces chimeric Mll gene fusions. *FASEB J* 18, 173-175.

Bloomfield, C.D., Goldman, A.I., Alimena, G., Berger, R., Borgstrom, G.H., Brandt, L., Catovsky, D., de la Chapelle, A., Dewald, G.W., Garson, O.M., *et al.* (1986).

Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 67, 415-420.

Blum, B., and Benvenisty, N. (2009). The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 8, 3822-3830.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.

Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., and Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.

Brimble, S.N., Zeng, X., Weiler, D.A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I.G., Freed, W.J., Robins, A.J., Rao, M.S., and Schulz, T.C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13, 585-597.

Bueno, C., Ayllon, V., Montes, R., Navarro-Montero, O., Ramos-Mejia, V., Real, P.J., Romero-Moya, D., Arauzo-Bravo, M.J., and Menendez, P. (2013). FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs. *Blood* 121, 3867-3878, S3861-3863.

Bueno, C., Montes, R., Melen, G.J., Ramos-Mejia, V., Real, P.J., Ayllon, V., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Fernandez, A.F., *et al.* (2012). A human ESC model for MLL-AF4 leukemic fusion gene reveals an impaired early hematopoietic-endothelial specification. *Cell Res* 22, 986-1002.

Bueno C., M.R., García-Castro J., Greaves M., Menendez P. (2008). Human embryonic stem cells: A potential system for modeling infant leukemia harboring MLL-AF4 gene fusion. *Drug Discovery Today: Disease Models* 4, 53-60.

Burdon, T., Smith, A., and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12, 432-438.

Bursen, A., Schwabe, K., Ruster, B., Henschler, R., Ruthardt, M., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2010). The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115, 3570-3579.

Buzzard, J.J., Gough, N.M., Crook, J.M., and Colman, A. (2004). Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 22, 381-382; author reply 382.

Caisander, G., Park, H., Frej, K., Lindqvist, J., Bergh, C., Lundin, K., and Hanson, C. (2006). Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. *Chromosome Res* 14, 131-137.

Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E.S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019-5032.

Caslini, C., Alarcon, A.S., Hess, J.L., Tanaka, R., Murti, K.G., and Biondi, A. (2000). The amino terminus targets the mixed lineage leukemia (MLL) protein to the nucleolus, nuclear matrix and mitotic chromosomal scaffolds. *Leukemia* 14, 1898-1908.

Catalina, P., Cobo, F., Cortes, J.L., Nieto, A.I., Cabrera, C., Montes, R., Concha, A., and Menendez, P. (2007). Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol Int* 31, 861-869.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165.

Clark, A.T., Rodriguez, R.T., Bodnar, M.S., Abeyta, M.J., Cedars, M.I., Turek, P.J., Firpo, M.T., and Reijo Pera, R.A. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* 22, 169-179.

Clarke, D., and Frisen, J. (2001). Differentiation potential of adult stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11, 575-580.

Clarkson, B.D., and Boyse, E.A. (1971). Possible explanation of the high concordance for acute leukaemia in monozygotic twins. *Lancet* 1, 699-701.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313-319.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.

Corre, J., Mahtouk, K., Attal, M., Gadelorge, M., Huynh, A., Fleury-Cappellesso, S., Danho, C., Laharrague, P., Klein, B., Reme, T., *et al.* (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 21, 1079-1088.

Cortes, J.L., Sanchez, L., Catalina, P., Cobo, F., Bueno, C., Martinez-Ramirez, A., Barroso, A., Cabrera, C., Ligeró, G., Montes, R., *et al.* (2008). Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* 17, 255-267.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., *et al.* (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350, 1353-1356.

Crook, J.M., Hei, D., and Stacey, G. (2010). The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46, 169-172.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.

Chen, W., Li, Q., Hudson, W.A., Kumar, A., Kirchhof, N., and Kersey, J.H. (2006). A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 108, 669-677.

Chiou, S.K., Jones, M.K., and Tarnawski, A.S. (2003). Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 9, PI25-29.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-2213.

Daley, G.Q., Goodell, M.A., and Snyder, E.Y. (2003). Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 398-418.

Davila, J.C., Cezar, G.G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T., and Trosko, J. (2004). Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 79, 214-223.

de la Chica, R.A., Mediano, C., Salido, M., Espinet, B., Manresa, J.M., and Sole, F. (2011). Increased MLL gene rearrangements in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *Leuk Res*.

Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., *et al.* (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113, 1701-1710.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.

Dobbins, S.E., Sherborne, A.L., Ma, Y.P., Bardini, M., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lloyd, A., Chubb, D., Greaves, M.F., and Houlston, R.S. (2013). The silent mutational landscape of infant MLL-AF4 pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 52, 954-960.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36 *Suppl* 1, 59-72.

Draper, J.S., Moore, H.D., Ruban, L.N., Gokhale, P.J., and Andrews, P.W. (2004a). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 13, 325-336.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004b). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 53-54.

Driessen, E.M., van Roon, E.H., Spijkers-Hagelstein, J.A., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R., and Stam, R.W. (2013). Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica*.

Edick, M.J., Gajjar, A., Mahmoud, H.H., van de Poll, M.E., Harrison, P.L., Panetta, J.C., Rivera, G.K., Ribeiro, R.C., Sandlund, J.T., Boyett, J.M., *et al.* (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 21, 1340-1346.

Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., and Greaves, M. (2005). Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias. *Int J Hematol* 82, 9-20.

Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Knight, D., Kearney, L., Slany, R., and Greaves, M. (2006). MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 754-760.

Elliott, A.M., Elliott, K.A., and Kammesheidt, A. (2010). High resolution array-CGH characterization of human stem cells using a stem cell focused microarray. *Mol Biotechnol* 46, 234-242.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Felix, C.A., Megonigal, M.D., Chervinsky, D.S., Leonard, D.G., Tsuchida, N., Kakati, S., Block, A.M., Fisher, J., Grossi, M., Salhany, K.I., *et al.* (1998). Association of germline p53 mutation with MLL segmental jumping translocation in treatment-related leukemia. *Blood* 91, 4451-4456.

Ferreira, R.J., Irioda, A.C., Cunha, R.C., Francisco, J.C., Guarita-Souza, L.C., Srikanth, G.V., Nityanand, S., Rosati, R., Chachques, J.C., and de Carvalho, K.A. (2012). Controversies about the chromosomal stability of cultivated mesenchymal stem cells: their clinical use is it safe? *Curr Stem Cell Res Ther* 7, 356-363.

Finnell, R.H., Waes, J.G., Eudy, J.D., and Rosenquist, T.H. (2002). Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 181-208.

Foon, K.A., and Todd, R.F., 3rd (1986). Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68, 1-31.

Ford, A.M., Bennett, C.A., Price, C.M., Bruin, M.C., Van Wering, E.R., and Greaves, M. (1998). Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4584-4588.

Ford, A.M., Ridge, S.A., Cabrera, M.E., Mahmoud, H., Steel, C.M., Chan, L.C., and Greaves, M. (1993). In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 363, 358-360.

Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., and Kallioniemi, O.P. (1997). Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13, 405-409.

Fragouli, E., and Wells, D. (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenet Genome Res* 133, 149-159.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.

Friedenstein, A.J., Ivanov-Smolenski, A.A., Chajlakjan, R.K., Gorskaya, U.F., Kuralesova, A.I., Latzinik, N.W., and Gerasimow, U.W. (1978). Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol* 6, 440-444.

Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247.

Gale, K.B., Ford, A.M., Repp, R., Borkhardt, A., Keller, C., Eden, O.B., and Greaves, M.F. (1997). Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13950-13954.

Garcia-Castro, J., Balas, A., Ramirez, M., Perez-Martinez, A., Madero, L., Gonzalez-Vicent, M., and Diaz, M.A. (2007). Mesenchymal stem cells are of recipient origin in pediatric transplantations using umbilical cord blood, peripheral blood, or bone marrow. *J Pediatr Hematol Oncol* 29, 388-392.

Garcia-Castro, J., Trigueros, C., Madrenas, J., Perez-Simon, J.A., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2008). Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med* 12, 2552-2565.

Garcia, S., Bernad, A., Martin, M.C., Cigudosa, J.C., Garcia-Castro, J., and de la Fuente, R. (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316, 1648-1650.

Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* 26, 3352-3363.

Gebhart, E., and Liehr, T. (2000). Patterns of genomic imbalances in human solid tumors (Review). *Int J Oncol* 16, 383-399.

Gertow, K., Cedervall, J., Unger, C., Szoke, K., Blennow, E., Imreh, M.P., and Ahrlund-Richter, L. (2007). Trisomy 12 in HESC leads to no selective in vivo growth advantage in teratomas, but induces an increased abundance of renal development. *J Cell Biochem* 100, 1518-1525.

Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., Gonzalez, M.A., Rico, L., Buscher, D., and Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58, 929-939.

Grant, M.B., May, W.S., Caballero, S., Brown, G.A., Guthrie, S.M., Mames, R.N., Byrne, B.J., Vaught, T., Spoerri, P.E., Peck, A.B., *et al.* (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8, 607-612.

Greaves, M. (2002). Childhood leukaemia. *BMJ* 324, 283-287.

Greaves, M. (2005). In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev* 81, 123-129.

Greaves, M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 193-203.

Greaves, M. (2013). Cancer stem cells as 'units of selection'. *Evol Appl* 6, 102-108.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.

Greaves, M.F., Katz, F.E., Myers, C.D., Davies, L., and Sieff, C. (1985). Selective expression of cell surface antigens on human haemopoietic progenitor cells. *Prog Clin Biol Res* 184, 301-315.

Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L., and Ford, A.M. (2003). Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 102, 2321-2333.

Greaves, M.F., and Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 3, 639-649.

Guan, X.Y., Xu, J., Anzick, S.L., Zhang, H., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1996). Hybrid selection of transcribed sequences from microdissected DNA: isolation of genes within amplified region at 20q11-q13.2 in breast cancer. *Cancer Res* 56, 3446-3450.

Gunsilius, E., Duba, H.C., Petzer, A.L., Kahler, C.M., Grunewald, K., Stockhammer, G., Gabl, C., Dirnhofer, S., Clausen, J., and Gastl, G. (2000). Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 355, 1688-1691.

Guo, J., Jauch, A., Heidi, H.G., Schoell, B., Erz, D., Schrank, M., and Janssen, J.W. (2005). Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41, 278-283.

Guthrie, R., and Susi, A. (1963). A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 32, 338-343.

Hanson, C., and Caisander, G. (2005). Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS* 113, 751-755.

Hanson, S. (2005). Perspectives on the geographic stability and mobility of people in cities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15301-15306.

Hardarson, T., Caisander, G., Sjogren, A., Hanson, C., Hamberger, L., and Lundin, K. (2003). A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 18, 399-407.

Harper, J.C., Coonen, E., Handyside, A.H., Winston, R.M., Hopman, A.H., and Delhanty, J.D. (1995). Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 15, 41-49.

Harper, J.C., and Sengupta, S.B. (2012). Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet* 131, 175-186.

Harrison, N.J., Baker, D., and Andrews, P.W. (2007). Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy. *Int J Androl* 30, 275-281; discussion 281.

Heins, N., Englund, M.C., Sjoblom, C., Dahl, U., Tonning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 367-376.

Hoffman, L.M., and Carpenter, M.K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 699-708.

Holmfeldt, W.L., Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis

ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. (2012). The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* 45(3): , 242-252.

Hovatta, O., Jaconi, M., Tohonen, V., Bena, F., Gimelli, S., Bosman, A., Holm, F., Wyder, S., Zdobnov, E.M., Irion, O., *et al.* (2010). A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes. *PLoS One* 5, e10263.

Huret, J.L., Dessen, P., and Bernheim, A. (2001). An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* 15, 987-989.

Hurst, C.D., Fiegler, H., Carr, P., Williams, S., Carter, N.P., and Knowles, M.A. (2004). High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 23, 2250-2263.

Ilic, D., Caceres, E., Lu, S., Julian, P., Foulk, R., and Krtolica, A. (2010). Effect of karyotype on successful human embryonic stem cell derivation. *Stem Cells Dev* 19, 39-46.

Imreh, M.P., Gertow, K., Cedervall, J., Unger, C., Holmberg, K., Szoke, K., Csoregh, L., Fried, G., Dilber, S., Blennow, E., *et al.* (2006). In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem* 99, 508-516.

Inaba, M., and Yamashita, Y.M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* 11, 461-469.

Inzunza, J., Sahlen, S., Holmberg, K., Stromberg, A.M., Teerijoki, H., Blennow, E., Hovatta, O., and Malmgren, H. (2004). Comparative genomic hybridization and

karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol Hum Reprod* 10, 461-466.

Islam, A., Gong, J.K., and Henderson, E.S. (1988). Direct evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies on syngeneic (inbred) Wistar Furth rats. *J Med* 19, 119-136.

Jones, J.M., and Thomson, J.A. (2000). Human embryonic stem cell technology. *Semin Reprod Med* 18, 219-223.

Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355, 1253-1261.

Josephson, R., Sykes, G., Liu, Y., Ording, C., Xu, W., Zeng, X., Shin, S., Loring, J., Maitra, A., Rao, M.S., *et al.* (2006). A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biol* 4, 28.

Kaatsch, P. (2010). Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 36, 277-285.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.

Katz, F.E., Tindle, R., Sutherland, D.R., and Greaves, M.F. (1985). Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 9, 191-198.

Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19, 1129-1155.

Kempski, H., Mensa-Bonsu, K.A., Kearney, L., Jalali, G.R., Hann, I., Khurshid, M., and Greaves, M. (2003). Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 406-411.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.

Kersey, J.H. (1997). Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 90, 4243-4251.

Kersun, L.S., Wimmer, R.S., Hoot, A.C., and Meadows, A.T. (2004). Secondary malignant neoplasms of the bladder after cyclophosphamide treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 42, 289-291.

Knuutila, S., Aalto, Y., Autio, K., Bjorkqvist, A.M., El-Rifai, W., Hemmer, S., Huhta, T., Kettunen, E., Kiuru-Kuhlefelt, S., Larramendy, M.L., *et al.* (1999). DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 155, 683-694.

Knuutila, S., Bjorkqvist, A.M., Autio, K., Tarkkanen, M., Wolf, M., Monni, O., Szymanska, J., Larramendy, M.L., Tapper, J., Pere, H., *et al.* (1998). DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152, 1107-1123.

Koynova, D.K., Jordanova, E.S., Milev, A.D., Dijkman, R., Kirov, K.S., Toncheva, D.I., and Gruis, N.A. (2007). Gene-specific fluorescence in-situ hybridization analysis on tissue microarray to refine the region of chromosome 20q amplification in melanoma. *Melanoma Res* 17, 37-41.

Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.

Krivtsov, A.V., and Armstrong, S.A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7, 823-833.

Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., *et al.* (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-368.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.

Lakshmipathy, U., Pelacho, B., Sudo, K., Linehan, J.L., Coucouvanis, E., Kaufman, D.S., and Verfaillie, C.M. (2004). Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 22, 531-543.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8, 106-118.

Le Blanc, K., and Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 383-396.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.

Lefort, N., Perrier, A.L., Laabi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* 4, 899-909.

Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2006). Scientific and clinical opportunities for modeling blood disorders with embryonic stem cells. *Blood* 107, 2605-2612.

Liang, D.C., Shih, L.Y., Fu, J.F., Li, H.Y., Wang, H.I., Hung, I.J., Yang, C.P., Jaing, T.H., Chen, S.H., and Liu, H.C. (2006). K-Ras mutations and N-Ras mutations in

childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* 106, 950-956.

Liang, Q., Conte, N., Skarnes, W.C., and Bradley, A. (2008). Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17453-17456.

Libura, J., Slater, D.J., Felix, C.A., and Richardson, C. (2005). Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood* 105, 2124-2131.

Libura, J., Ward, M., Solecka, J., and Richardson, C. (2008). Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential. *Eur J Haematol* 81, 185-195.

Lichter, P., Joos, S., Bentz, M., and Lampel, S. (2000). Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37, 348-357.

Liew, C.G., Moore, H., Ruban, L., Shah, N., Cosgrove, K., Dunne, M., and Andrews, P. (2005). Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Ann Med* 37, 521-532.

Lopez-Villar, O., Garcia, J.L., Sanchez-Guijo, F.M., Robledo, C., Villaron, E.M., Hernandez-Campo, P., Lopez-Holgado, N., Diez-Campelo, M., Barbado, M.V., Perez-Simon, J.A., *et al.* (2009). Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia* 23, 664-672.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24, 185-187.

Mackinnon, R.N., Selan, C., Wall, M., Baker, E., Nandurkar, H., and Campbell, L.J. (2010). The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 998-1013.

Maia, A.T., Ford, A.M., Jalali, G.R., Harrison, C.J., Taylor, G.M., Eden, O.B., and Greaves, M.F. (2001). Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood* 98, 478-482.

Maia, A.T., Koechling, J., Corbett, R., Metzler, M., Wiemels, J.L., and Greaves, M. (2004a). Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 335-340.

Maia, A.T., Tussiwand, R., Cazzaniga, G., Rebutta, P., Colman, S., Biondi, A., and Greaves, M. (2004b). Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 38-43.

Maitland, N.J., and Collins, A. (2005). A tumour stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer. *BJU Int* 96, 1219-1223.

Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassauei, K., Sui, G., Cutler, D.J., Liu, Y., Brimble, S.N., *et al.* (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099-1103.

Mandal, A., Tipnis, S., Pal, R., Ravindran, G., Bose, B., Patki, A., Rao, M.S., and Khanna, A. (2006). Characterization and in vitro differentiation potential of a new human embryonic stem cell line, ReliCellhES1. *Differentiation* 74, 81-90.

Mantzouratou, A., and Delhanty, J.D. (2011). Aneuploidy in the human cleavage stage embryo. *Cytogenet Genome Res* 133, 141-148.

Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M., and Munne, S. (2000). Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 1, 17-26.

Marschalek, R. (2010). Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J* 277, 1822-1831.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Martins-Taylor, K., Nisler, B.S., Taapken, S.M., Compton, T., Crandall, L., Montgomery, K.D., Lalande, M., and Xu, R.H. (2011). Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 488-491.

Meisner, L.F., and Johnson, J.A. (2008). Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. *Methods* 45, 133-141.

Menendez, P., Bueno, C., and Wang, L. (2006). Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy* 8, 530-541.

Menendez, P., Bueno, C., Wang, L., and Bhatia, M. (2005a). Human embryonic stem cells: potential tool for achieving immunotolerance? *Stem Cell Rev* 1, 151-158.

Menendez, P., Redondo, O., Rodriguez, A., Lopez-Berges, M.C., Ercilla, G., Lopez, A., Duran, A., Almeida, J., Perez-Simon, J.A., San Miguel, J.F., *et al.* (1998). Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* 34, 264-271.

Menendez, P., Wang, L., and Bhatia, M. (2005b). Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Curr Gene Ther* 5, 375-385.

Menendez, P., Wang, L., Chadwick, K., Li, L., and Bhatia, M. (2004). Retroviral transduction of hematopoietic cells differentiated from human embryonic stem cell-derived CD45(neg)PFV hemogenic precursors. *Mol Ther* 10, 1109-1120.

- Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Cespedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Munoz, P., *et al.* (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8, 511-524.
- Merok, J.R., and Sherley, J.L. (2001). Breaching the Kinetic Barrier to In Vitro Somatic Stem Cell Propagation. *J Biomed Biotechnol* 1, 25-27.
- Metzler, M., Forster, A., Pannell, R., Arends, M.J., Daser, A., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using inverter technology. *Oncogene* 25, 3093-3103.
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Groger, D., Park, T.S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villarese, P., Macintyre, E., *et al.* (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*.
- Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., *et al.* (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23, 1490-1499.
- Meyer, C., Schneider, B., Jakob, S., Strehl, S., Attarbaschi, A., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M.W., van Dongen, J.J., den Boer, M.L., *et al.* (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777-784.
- Mezey, E., Key, S., Vogelsang, G., Szalayova, I., Lange, G.D., and Crain, B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1364-1369.
- Midorikawa, Y., Yamamoto, S., Ishikawa, S., Kamimura, N., Igarashi, H., Sugimura, H., Makuuchi, M., and Aburatani, H. (2006). Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* 25, 5581-5590.

Mikkola, M., Olsson, C., Palgi, J., Ustinov, J., Palomaki, T., Horelli-Kuitunen, N., Knuutila, S., Lundin, K., Otonkoski, T., and Tuuri, T. (2006). Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Dev Biol* 6, 40.

Mitalipova, M.M., Rao, R.R., Hoyer, D.M., Johnson, J.A., Meisner, L.F., Jones, K.L., Dalton, S., and Stice, S.L. (2005). Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 19-20.

Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., *et al.* (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24, 1095-1103.

Money Penny, C.G., Shao, J., Song, Y., and Gallagher, E.P. (2006). MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis* 27, 874-881.

Montes, R., Ayllon, V., Gutierrez-Aranda, I., Prat, I., Hernandez-Lamas, M.C., Ponce, L., Bresolin, S., Te Kronnie, G., Greaves, M., Bueno, C., *et al.* (2011). Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* 117, 4746-4758.

Moon, S.H., Kim, J.S., Park, S.J., Lim, J.J., Lee, H.J., Lee, S.M., and Chung, H.M. (2011). Effect of chromosome instability on the maintenance and differentiation of human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res* 6, 50-59.

Moore, J.C., Sadowy, S., Alikani, M., Toro-Ramos, A.J., Swerdel, M.R., Hart, R.P., and Cohen, R.I. (2010). A high-resolution molecular-based panel of assays for identification and characterization of human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Res* 4, 92-106.

Moorman, A.V., Hagemeijer, A., Charrin, C., Rieder, H., and Secker-Walker, L.M. (1998). The translocations, t(11;19)(q23;p13.1) and t(11;19)(q23;p13.3): a

cytogenetic and clinical profile of 53 patients. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 12, 805-810.

Moralli, D., Yusuf, M., Mandegar, M.A., Khoja, S., Monaco, Z.L., and Volpi, E.V. (2010). An Improved Technique for Chromosomal Analysis of Human ES and iPS Cells. *Stem Cell Rev.*

Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, L.E., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C., and Greaves, M. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8242-8247.

Mosna, F., Sensebe, L., and Krampera, M. (2010). Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 19, 1449-1470.

Muller, F.J., Brandl, B., and Loring, J.F. (2008). Assessment of human pluripotent stem cells with PluriTest.

Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., *et al.* (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758-764.

Munne, S., Tang, Y.X., Grifo, J., Rosenwaks, Z., and Cohen, J. (1994). Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 61, 111-117.

Narva, E., Autio, R., Rahkonen, N., Kong, L., Harrison, N., Kitsberg, D., Borghese, L., Itskovitz-Eldor, J., Rasool, O., Dvorak, P., *et al.* (2010). High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotechnol* 28, 371-377.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem

cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.

Nikitina, V.A., Osipova, E.Y., Katosova, L.D., Rumyantsev, S.A., Skorobogatova, E.V., Shamanskaya, T.V., and Bochkov, N.P. (2011). Study of genetic stability of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med* 150, 627-631.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.

O'Brien, C.A., Kreso, A., and Dick, J.E. (2009). Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol* 19, 71-77.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.

Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.

Pickering, S.J., Braude, P.R., Patel, M., Burns, C.J., Trussler, J., Bolton, V., and Minger, S. (2003). Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reprod Biomed Online* 7, 353-364.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Polyak, K., and Hahn, W.C. (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12, 296-300.

Prelle, C., Bursen, A., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2012). Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia*.

Priller, J., Persons, D.A., Klett, F.F., Kempermann, G., Kreutzberg, G.W., and Dirnagl, U. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155, 733-738.

Prosper, F., and Verfaillie, C.M. (2003). [Adult stem cells]. *An Sist Sanit Navar* 26, 345-356.

Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S., and Arceci, R.J. (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 29, 551-565.

Pui, C.H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166-178.

Pui, C.H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., and Relling, M.V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165-1174.

Pui, C.H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535-1548.

Pyle, A.D., Lock, L.F., and Donovan, P.J. (2006). Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat Biotechnol* 24, 344-350.

Rafii, S., and Lyden, D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9, 702-712.

Ramos-Mejia, V., Montes, R., Bueno, C., Ayllon, V., Real, P.J., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2012). Residual expression of the reprogramming factors prevents

differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS One* 7, e35824.

Rao, P.H., Cigudosa, J.C., Ning, Y., Calasanz, M.J., Iida, S., Tagawa, S., Michaeli, J., Klein, B., Dalla-Favera, R., Jhanwar, S.C., *et al.* (1998). Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood* 92, 1743-1748.

Rebuzzini, P., Neri, T., Zuccotti, M., Redi, C.A., and Garagna, S. (2008). Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture. *Cytotechnology* 58, 17-23.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Ribera, J.M., Ortega, J.J., Oriol, A., Granada, I., Hernandez-Rivas, J.M., Parody, R., Bethencourt, C., Rivas, C., Bastida, P., del Potro, E., *et al.* (2002). Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 87, 154-166.

Rieger, K., Marinets, O., Fietz, T., Korper, S., Sommer, D., Mucke, C., Reufi, B., Blau, W.I., Thiel, E., and Knauf, W.U. (2005). Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 33, 605-611.

Ringden, O., Le Blanc, K., and Hovatta, O. (2003). Transplantation of embryonic stem cells: possibilities and challenges. *Transplantation* 76, 1011-1012.

Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lonnie, H., Marschall, H.U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., *et al.* (2006).

Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81, 1390-1397.

Rodriguez, R., Garcia-Castro, J., Trigueros, C., Garcia Arranz, M., and Menendez, P. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. *Adv Exp Med Biol* 741, 187-205.

Rosler, E.S., Fisk, G.J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M.S., and Carpenter, M.K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229, 259-274.

Ross, J.A., Potter, J.D., Reaman, G.H., Pendergrass, T.W., and Robison, L.L. (1996). Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. *Cancer Causes Control* 7, 581-590.

Rowley, J.D. (1999). The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol* 36, 59-72.

Sachs, L. (1996). The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4742-4749.

Salem, H.K., and Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28, 585-596.

Sanchez, L., Gutierrez-Aranda, I., Ligeró, G., Rubio, R., Muñoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J.L., Ramos, V., Real, P.J., Bueno, C., Rodriguez, R., *et al.* (2011). Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. *Stem Cells* 29, 251-262.

Satterthwaite, A.B., Borson, R., and Tenen, D.G. (1990). Regulation of the gene for CD34, a human hematopoietic stem cell antigen, in KG-1 cells. *Blood* 75, 2299-2304.

Sawyer, J.R., Lukacs, J.L., Munshi, N., Desikan, K.R., Singhal, S., Mehta, J., Siegel, D., Shaughnessy, J., and Barlogie, B. (1998). Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* 92, 4269-4278.

Scott, S.A., Cohen, N., Brandt, T., Toruner, G., Desnick, R.J., and Edelman, L. (2010). Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Genet Med* 12, 85-92.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., *et al.* (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273, 494-497.

Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972.

Sell, S. (2004). *Stem Cells Hand Book*. Humana Press, 1-18.

Shinawi, M., and Cheung, S.W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 13, 760-770.

Singer, J.W., Keating, A., Cuttner, J., Gown, A.M., Jacobson, R., Killen, P.D., Moohr, J.W., Najfeld, V., Powell, J., Sanders, J., *et al.* (1984). Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leuk Res* 8, 535-545.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

Sjogren-Jansson, E., Zetterstrom, M., Moya, K., Lindqvist, J., Strehl, R., and Eriksson, P.S. (2005). Large-scale propagation of four undifferentiated human embryonic stem cell lines in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 233, 1304-1314.

Skotheim, R.I., Monni, O., Mousses, S., Fossa, S.D., Kallioniemi, O.P., Lothe, R.A., and Kallioniemi, A. (2002). New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res* 62, 2359-2364.

Smith, M.A., Seibel, N.L., Altekruze, S.F., Ries, L.A., Melbert, D.L., O'Leary, M., Smith, F.O., and Reaman, G.H. (2010). Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol* 28, 2625-2634.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., and Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 399-407.

Spector, L.G., Xie, Y., Robison, L.L., Heerema, N.A., Hilden, J.M., Lange, B., Felix, C.A., Davies, S.M., Slavin, J., Potter, J.D., *et al.* (2005). Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 651-655.

Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.

Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzanidou, A., Staessen, C., Vandesselde, Y., Van der Elst, J., Liebaers, I., and Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 26, 1361-1363.

Stephenson, E., Ogilvie, C.M., Patel, H., Cornwell, G., Jacquet, L., Kadeva, N., Braude, P., and Ilic, D. (2010). Safety paradigm: genetic evaluation of therapeutic grade human embryonic stem cells. *J R Soc Interface* 7 *Suppl* 6, S677-688.

Stratton, M.R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331, 1553-1558.

Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., and Schwarzingler, I. (2004). Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351, 250-259.

Strick, R., Strissel, P.L., Borgers, S., Smith, S.L., and Rowley, J.D. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4790-4795.

Stumpel, D.J., Schneider, P., van Roon, E.H., Pieters, R., and Stam, R.W. (2013). Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 49, 175-184.

Tanner, M.M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Isola, J., Kuukasjarvi, T., Collins, C., Kowbel, D., Guan, X.Y., Trent, J., Gray, J.W., *et al.* (1996). Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 3441-3445.

Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., *et al.* (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549-1553.

Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Thomson, J.A., and Odorico, J.S. (2000). Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 18, 53-57.

Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khatry, D.B., Protopopov, A., You, M.J., Aguirre, A.J., *et al.* (2005). High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9625-9630.

Torsvik, A., Rosland, G.V., Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., Lonning, P.E., Primon, M., Sobala, E., Tonn, J.C., *et al.* (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res* 70, 6393-6396.

Vassilopoulos, G., Wang, P.R., and Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.

Veldman, T., Vignon, C., Schrock, E., Rowley, J.D., and Ried, T. (1997). Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 15, 406-410.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.

Voet, T., Vanneste, E., and Vermeesch, J.R. (2011). The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 133, 160-168.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.

Voullaire, L., Wilton, L., McBain, J., Callaghan, T., and Williamson, R. (2002). Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in

embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 8, 1035-1041.

Vries, R.G., Huch, M., and Clevers, H. (2010). Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* 4, 373-384.

Wang, L., Li, L., Shojaei, F., Levac, K., Cerdan, C., Menendez, P., Martin, T., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2004). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21, 31-41.

Wang, L., Menendez, P., Cerdan, C., and Bhatia, M. (2005a). Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. *Exp Hematol* 33, 987-996.

Wang, L., Menendez, P., Shojaei, F., Li, L., Mazurier, F., Dick, J.E., Cerdan, C., Levac, K., and Bhatia, M. (2005b). Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med* 201, 1603-1614.

Wang, Q.F., Wu, G., Mi, S., He, F., Wu, J., Dong, J., Luo, R.T., Mattison, R., Kaberlein, J.J., Prabhakar, S., *et al.* (2011). MLL fusion proteins preferentially regulate a subset of wild-type MLL target genes in the leukemic genome. *Blood* 117, 6895-6905.

Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.

Weinberg, R.A. (1995). The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* 758, 331-338.

Weissman, I.L. (2000a). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.

Weissman, I.L. (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.

Werbowetski-Ogilvie, T.E., Bosse, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M.J., Dingwall, S., Carter, T., *et al.* (2009). Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 27, 91-97.

Werbowetski-Ogilvie, T.E., Morrison, L.C., Fiebig-Comyn, A., and Bhatia, M. (2012). In vivo generation of neural tumors from neoplastic pluripotent stem cells models early human pediatric brain tumor formation. *Stem Cells* 30, 392-404.

Werbowetski-Ogilvie, T.E., Schnerch, A., Rampalli, S., Mills, C.E., Lee, J.B., Hong, S.H., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2011). Evidence for the transmission of neoplastic properties from transformed to normal human stem cells. *Oncogene* 30, 4632-4644.

Westermann, F., and Schwab, M. (2002). Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett* 184, 127-147.

Wiemels, J.L., Cazzaniga, G., Daniotti, M., Eden, O.B., Addison, G.M., Masera, G., Saha, V., Biondi, A., and Greaves, M.F. (1999a). Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354, 1499-1503.

Wiemels, J.L., Pagnamenta, A., Taylor, G.M., Eden, O.B., Alexander, F.E., and Greaves, M.F. (1999b). A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 59, 4095-4099.

Wiemels, J.L., Xiao, Z., Buffler, P.A., Maia, A.T., Ma, X., Dicks, B.M., Smith, M.T., Zhang, L., Feusner, J., Wiencke, J., *et al.* (2002). In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3801-3805.

Wilton, L. (2002). Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 22, 512-518.

Wu, H., Kim, K.J., Mehta, K., Paxia, S., Sundstrom, A., Anantharaman, T., Kuraishy, A.I., Doan, T., Ghosh, J., Pyle, A.D., *et al.* (2008). Copy number variant analysis of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1484-1489.

Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S.J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 1476-1486.

Yamanaka, S., and Takahashi, K. (2006). [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 51, 2346-2351.

Yanez, R., Lamana, M.L., Garcia-Castro, J., Colmenero, I., Ramirez, M., and Bueren, J.A. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24, 2582-2591.

Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.

Yoder, M.C., and Ingram, D.A. (2009). Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol* 16, 269-273.

Yunis, J.J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science* 191, 1268-1270.

Zandvliet, D.W., Hanby, A.M., Austin, C.A., Marsh, K.L., Clark, I.B., Wright, N.A., and Poulosom, R. (1996). Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Biochim Biophys Acta* 1307, 239-247.

Zhang, M., and Rosen, J.M. (2006). Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 16, 60-64.

Zitzelsberger, H., Lehmann, L., Werner, M., and Bauchinger, M. (1997). Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 108, 403-417.

Zucchelli, M., Strom, S., Holm, F., Malmgren, H., Sahlen, S., Religa, P., Hovatta, O., Kere, J., and Inzunza, J. (2012). In vivo differentiated human embryonic stem cells can acquire chromosomal aberrations more frequently than in vitro during the same period. *Stem Cells Dev* 21, 3363-3371.



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**ABC:** siglas inglesas de *ATP-binding cassette*. Casete de unión al ATP.

**aCGH:** siglas inglesas de *Arrays Comparative Genomic Hybridization*. Hibridación genómica comparada con *arrays*.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ASCs:** siglas inglesas de *Adipose Stem Cells*. Célula troncal mesenquimal derivada de grasa.

**CFU-F:** siglas inglesas de *Colony Forming Units Fibroblasts*. Unidad formadora de colonias de fibroblastos.

**CGH:** siglas inglesas de *Comparative Genomic Hybridization*. Hibridación genómica comparada.

**CLP:** siglas de Progenitor Linfoide Común.

**CN:** siglas inglesas de *Copy Number*. Número de copias.

**CNV:** siglas inglesas de *Copy Number Variation*. Variación en el número de copias.

**CPM:** siglas de Progenitor Mieloide Común.

**CSC:** siglas inglesas de *Cancer Stem Cell*. Célula troncal tumoral.

**EBs:** siglas inglesas de *Embryoid Bodies*. Cuerpos embrioides.

**FAB:** siglas inglesas de *French-American-British*. Franco-Americano-Británico.

**FISH:** siglas inglesas de *Fluorescence in situ hybridization*. Hibridación *in situ* fluorescente.

**FIV:** siglas de Fecundación *in vitro*.

**GMP:** siglas inglesas de *Granulo –monocyte Progenitors*. Progenitores Granulocito-Monocíticos.

**hESCs:** siglas inglesas de *Human Embryonic Stem Cells*. Células troncales embrionarias humanas.

**HPCs:** siglas inglesas de *Hematopoietic Progenitor Cell*. Células progenitoras hematopoyéticas.

**HSCs:** siglas inglesas de *Hematopoietic Stem Cells*. Células troncales hematopoyéticas.

**HSPCs:** siglas inglesas de *Hematopoietic Stem/Progenitor Cell*. Célula troncal progenitora hematopoyéticas.

**ICM:** siglas inglesas de *Inner Cell Mass*. Masa celular interna.

**IP:** Yoduro de Propidio.

**iPSCs:** siglas inglesas de *Induced Pluripotent Stem Cells*. Células troncales pluripotentes inducidas.

**ISCBI:** siglas inglesas de. Iniciativa internacional para bancos de células troncales.

**ISCT:** siglas inglesas de *International Society for Cellular Therapy*. Sociedad internacional de terapia celular.

**LLA:** siglas de Leucemia Linfoblástica Aguda.

**LMA:** siglas de Leucemia Mieloblástica Aguda.

**LOH:** siglas inglesas de *Loss Heterozygosity*. Pérdida de heterozigidad.

**LT-HSC:** siglas inglesas de *Long Time Hematopoietic Stem Cell*. Células troncales

hematopoyéticas con capacidad de repoblación a largo plazo.

**MDR:** siglas inglesas de *Multi Drug Resistance*. Resistencia múltiple a drogas.

**MEFs:** siglas inglesas de *Mouse Embryonic Fibroblasts*. Fibroblastos embrionarios de ratón.

**MEP:** siglas de Progenitores Eritroides Megacariocíticos.

**M-FISH:** siglas inglesas de *Multicolor Fluorescence in situ Hybridization*. Hibridación *in situ* fluorescente multicolor.

**MLL:** sigla inglesa de *Mixed Lineage Leukemia*. Leucemia de linaje mixto.

**MSCs:** siglas inglesas de *Mesenchymal Stem Cells*. Células troncales mesenquimales.

**NCBI:** siglas inglesas de *National Center for Biotechnology Information*. Centro nacional de información sobre biotecnología.

**NHEJ:** siglas inglesas de *Non Homologous End Joining*. Recombinación no homologa

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PCR:** siglas inglesas de *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

**RT-PCR:** siglas inglesas de *Reverse Transcription - Polymerase Chain*. Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa.

**SKY:** siglas inglesas de *Spectral Karyotyping*. Cariotipo Espectral.

**SNP:** siglas inglesas de *Single Nucleotide Polymorphism*. Polimorfismo de un sólo nucleótido.

**ST-HSC:** siglas inglesas de *Short Time Hematopietic Stem Cell*. Células troncales

hematopoyéticas con capacidad de repoblación a corto plazo.

