



*ugr*

Universidad  
de Granada

**Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina**

TESIS DOCTORAL

“RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria humana”

Óscar Navarro Montero

Directores de la tesis:

Dr. Pedro José Real Luna

Dr. Pablo Menéndez Buján

GRANADA, 2016



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA  
DE **GENÓMICA** E **INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Óscar Navarro Montero  
ISBN: 978-84-9125-679-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44168>

El doctorando Óscar Navarro Montero y los directores de la tesis Pedro José Real Luna y Pablo Menéndez Buján, 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, 7 de Junio de 2016

Director/es de la Tesis

Fdo.: Pedro José Real Luna

Doctorando

Fdo.: Óscar Navarro Montero

Pablo Menéndez Bujan

## Criterios de calidad para optar al grado de Doctor de la Universidad de Granada

### Publicaciones incluidas en la tesis

- ✓ O. Navarro-Montero, D. Romero-Moya, R. Montes, V. Ramos-Mejía, C. Bueno, P. J. Real, and P. Menendez, "Intrahepatic transplantation of cord blood CD34+ cells into newborn NOD/SCID-IL2R $\gamma$ (null) mice allows efficient multi-organ and multi-lineage hematopoietic engraftment without accessory cells.," *Clin. Immunol.*, vol. 145, no. 2, pp. 89–91, Nov. 2012.
- ✓ O. Navarro-Montero, P. J. Real, V. Ramos-Mejía, V. Ayllón, C. Bueno, and P. Menéndez, "The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells.," *Blood*, vol. 121, no. 26, pp. 5250–2, Jun. 2013
- ✓ O. Navarro-Montero, V. Ayllón, V. Ramos-Mejía, R. Montes, C. Bueno, E. Ng, M. Lamolda, L. Lopez-Onieva, X. Guerrero-Carreño, T. Romero, D. Romero-Moya, E. Stanley, A. Elefanty, P. Menendez and P.J. Real, "*RUNX1c* regulates hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells through activation of pro-inflammatory signaling.," *Blood*, Under consideration. May. 2016

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>8</b>
1.1. Células madre pluripotentes humanas.....	8
1.1.1. Desarrollo embrionario humano .....	8
1.1.2. Definición y propiedades .....	11
1.1.3. Tipos, derivación .....	14
1.1.4. Cultivo.....	16
1.1.5. CMEH como modelo de desarrollo embrionario .....	17
1.1.6. CMEH como terapia en medicina regenerativa .....	20
1.2. Hematopoyesis .....	23
1.2.1. Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético .....	24
1.2.2. Hematopoyesis en el adulto .....	28
1.2.3. Especificación hematopoyética a partir de CMPH.....	33
1.2.4. Control molecular del sistema hematopoyético .....	36
1.3. RUNX1 y hematopoyesis .....	41
1.3.1. Estructura y regulación .....	41
1.3.2. RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria.....	44
1.3.3. RUNX1 en la hematopoyesis adulta.....	47
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>51</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>54</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>56</b>
4.1. Cultivo de CMEH.....	56
4.2. Estrategia de clonaje, vectores lentivirales y transducción .....	56
4.3. Caracterización de las CMEH por citometría de flujo.....	59
4.4. Aislamiento de ARN, RT-PCR y análisis de qRT-PCR .....	59
4.5. Western Blot.....	61
4.6. Ensayo de formación de teratomas <i>in vivo</i> .....	61
4.7. Diferenciación hematopoyética mediante co-cultivo con células OP9 .....	62
4.8. Ensayo de unidades formadoras de colonias .....	62
4.9. Análisis del ciclo celular de los PHE .....	62
4.10. Análisis de la apoptosis de los PHE.....	63
4.11. Recogida de sangre de cordón umbilical y aislamiento de CMH y progenitores CD34+ .....	63
4.12. Trasplante en ratones inmunodeficientes y análisis de la reconstitución del sistema hematopoyético.....	63
4.13. Análisis de la expresión génica .....	64
4.14. Análisis estadístico.....	64

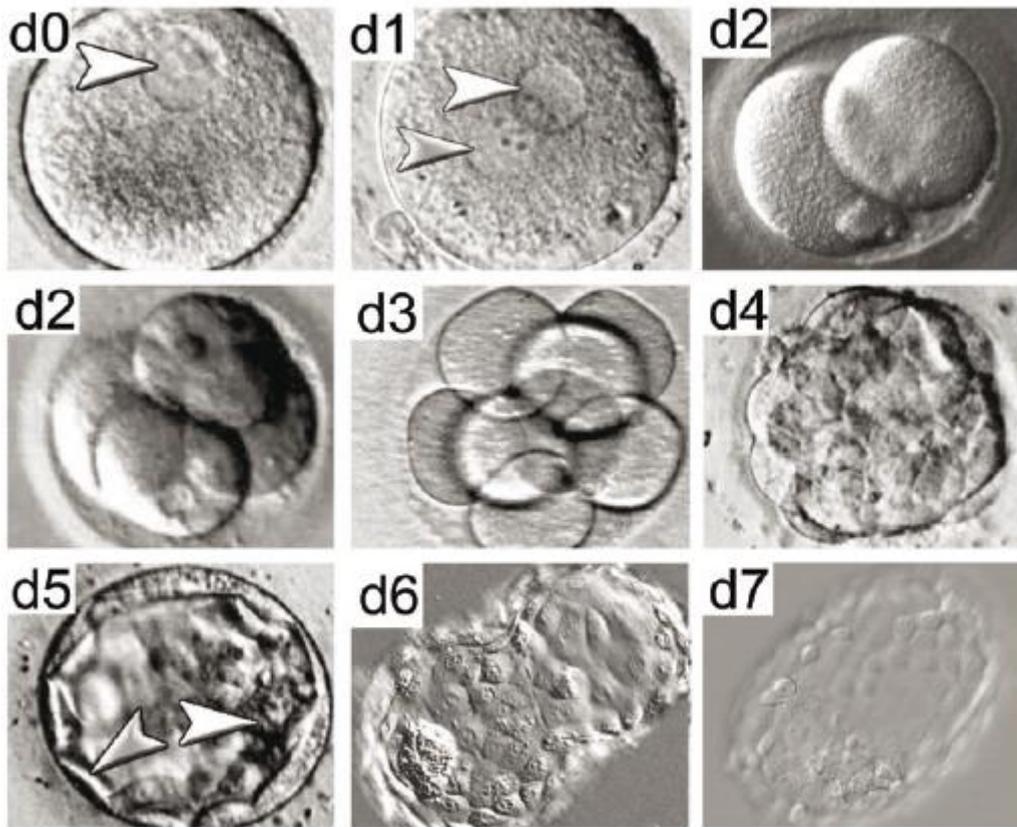
<b>5. Resultados</b> .....	66
5.1. Objetivo 1. Análisis de la dinámica de expresión de las isoformas de RUNX1 durante la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH .....	66
5.2. Objetivo 2. Dilucidar el rol de RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria humana.....	69
5.2.1. Generación de líneas de CMEH que sobre-expresan <i>RUNX1c</i> .....	69
5.2.2. La sobre-expresión de <i>RUNX1c</i> aumenta la especificación de los PHE y su posterior compromiso a células hematopoyéticas.....	72
5.2.3. La eliminación específica de <i>RUNX1c</i> prácticamente anula la TEH .....	79
5.2.4. El silenciamiento de <i>RUNX1</i> compromete el desarrollo hematopoyético humano .....	82
5.3. Objetivo 3. Ensayo de reconstitución hematopoyética en ratones inmunodeficientes NSG.....	85
5.4. Objetivo 4. La sobre-expresión de <i>RUNX1c</i> induce un perfil transcripcional inflamatorio en PHE .....	90
<b>6. Discusión</b> .....	106
<b>7. Conclusiones</b> .....	116
<b>8. Bibliografía</b> .....	119
<b>9. Anexo I: Publicaciones como primer autor</b> .....	154
<b>10. Anexo II: Otras publicaciones</b> .....	164

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Células madre pluripotentes humanas (CMPH)

### 1.1.1. Desarrollo embrionario humano

El desarrollo humano comienza con la fusión de los gametos (haploides), oocito y espermatozoide, procedentes de los progenitores para constituir una única célula llamada cigoto (diploide). El cigoto comienza a dividirse mediante un proceso llamado "escisión" dando lugar a las blastómeras, las cuales desarrollan uniones gap que les permiten desarrollarse de forma coordinada. Cuando el cigoto alcanza el estadio de unas 16-32 blastómeras, esta estructura pasa a llamarse mórula. Durante este estadio las células se unen firmemente en un proceso denominado compactación. Las células continúan dividiéndose hasta alcanzar el estadio de blastocisto, en el cual las células más externas se han diferenciado a una estructura denominada trofoblasto y las más internas forman la masa celular interna (MCI). Las células de la MCI continúan dividiéndose y diferenciándose para dar lugar al embrioblasto y, por último, al embrión junto con todas sus membranas (saco amniótico, saco vitelino y alantoides); mientras que las células del trofoblasto originarán la placenta. En estadio de blastocisto y una vez polarizada la MCI, el trofoblasto comienza a segregar fluido al blastocele, la cavidad interna hueca del blastocisto, haciendo que el blastocisto aumente de tamaño y, finalmente, provocando la "eclosión" y ruptura de la zona pelúcida que lo envolvía mucho antes de la fecundación, cuando todavía era un oocito. Una vez liberado de la zona pelúcida, el blastocisto se une a las paredes del endometrio mediante el trofoblasto en un proceso que se denomina implantación. Posteriormente comienza el proceso de gastrulación, mediante el cual el embrioblasto se reorganiza y diferencia dando lugar a la gástrula, un disco trilaminar compuesto por 3 capas (ectodermo, mesodermo y endodermo). A partir de estas 3 capas germinales se desarrollarán todas las estructuras y órganos del cuerpo mediante los procesos de somitogénesis, histogénesis y organogénesis.



**Figura 1.1.1.1. Estadios del desarrollo humano antes de la implantación.** Imágenes de contraste de fase de embriones humanos desde día 0 hasta día 7. Las flechas a día 0 indican los pronúcleos. Alrededor del día 4 el embrión se compacta formando la mórula, formado por los blastómeros rodeados por la zona pelúcida. El blastocisto se forma alrededor del día 5 y es una estructura rellena de fluido compuesta por la masa celular interna (a la derecha) y el trofoectodermo (a la izquierda). A día 6 el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y a día 7 está listo para implantarse en la pared del útero. Adaptada de Niakan *et al.*<sup>1</sup>

Debido a la creciente exposición a numerosos químicos presentes en todos los ámbitos de nuestra vida, cada vez hay más personas que sufren de infertilidad. En la última mitad del siglo pasado se desarrollaron las tecnologías necesarias para dar lugar a la reproducción asistida, permitiendo a pareja infértiles poder tener hijos. Estas tecnologías abarcan la administración de sustancias para inducir la ovulación, la inseminación artificial y los métodos de fertilización *in vitro* (FIV). Edwards y Steptoe hicieron avances fundamentales en dos frentes que establecieron las bases para la FIV en humanos. En 1969 describieron los primeros estadios de FIV con óvulos humanos<sup>2</sup>. Un año después anunciaron el cultivo de embriones humanos en estadio de división<sup>3</sup>. Posteriormente, ambos investigadores continuaron profundizando en el estudio de la reproducción humana en un marco básico y clínico y en 1978 anunciaron el nacimiento de Louise Brown, el primer ser humano concebido mediante FIV<sup>4</sup>. Gracias a los avances actuales en la reproducción asistida, como la estimulación ovárica y una mejora en el manejo, cultivo y

almacenamiento de los embriones, se ha generado un excedente de embriones humanos que han sido utilizados para reproducción y para otros fines no reproductivos, como la investigación.

Los embriones humanos pre-implantación usados en investigación se obtienen generalmente de dos fuentes: 1) embriones destinados a ser descartados durante el proceso de reproducción asistida considerados de muy baja calidad para su transferencia al útero o para criopreservación; 2) embriones excedentes de necesidades reproductivas. Una vez completado el parto con éxito las parejas poseen tres opciones para los embriones almacenados: 1) pueden seguir manteniéndolos criopreservados para futuros embarazos de la pareja; 2) pueden desecharlos; o 3) pueden donarlos, ya sea con fines reproductivos a otras parejas o para investigación (siempre y cuando un banco de embriones esté dispuesto a aceptar los embriones). Sólo aquellos embriones donados a la ciencia con el correspondiente consentimiento informado de las parejas y la aprobación del comité ético pueden ser usados en investigación.

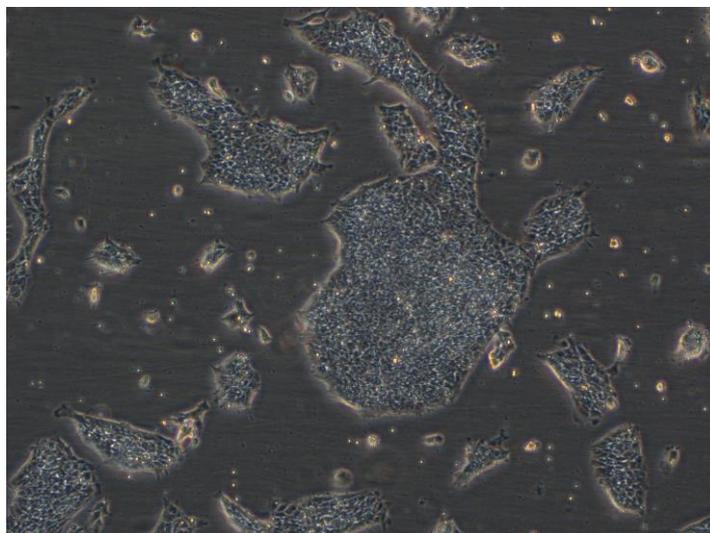
El acceso a embriones humanos para estudios de desarrollo conlleva una serie de implicaciones éticas y legales que restringen notablemente su uso. Históricamente, sólo ha sido posible acceder a embriones humanos en el caso de abortos espontáneos. Hasta hace relativamente poco tiempo los estudios se limitaban a realizar una mera descripción morfológica debido a las limitaciones tecnológicas existentes. Más recientemente, con el desarrollo de la FIV en la mayoría de los países se ha podido “cultivar” embriones legalmente hasta 14 días de desarrollo *in vitro* o la formación de la estría primitiva, lo que antes acontezca. La posibilidad de “cultivar” embriones derivados de procesos de FIV junto con la llegada de técnicas avanzadas de microscopía y el desarrollo de tecnologías de análisis de expresión génica más sensibles han permitido un estudio detallado de los mecanismos moleculares y celulares del desarrollo embrionario humano pre-implantacional. Para el estudio de procesos que tienen lugar en el periodo post-implantación *in vivo* la única manera plausible es la obtención de embriones fruto de abortos consentidos mediante la firma del consentimiento informado para su uso en investigación y la correspondiente aprobación de un comité ético. Esto solamente es posible en algunos países en los que la legislación lo permite, lo que sumado a la escasez de estos abortos y su necesario consentimiento hacen del periodo post-implantación una etapa muy difícil de estudiar. Esta situación ha generado la necesidad de buscar modelos alternativos para el estudio del desarrollo embrionario humano.

En 1981, Evans, Kaufman y Martin describieron por primera vez el aislamiento y cultivo de células derivadas de la MCI de embriones de ratón en estadio de blastocisto, a las cuales

llamaron células madre embrionarias de ratón (CMER)<sup>5,6</sup>. La derivación de las primeras CME supuso el pistoletazo de salida para la obtención de CME de distintas especies que culminó en 1998 con la obtención de las primeras células madre embrionarias humanas (CMEH) en el laboratorio del Dr. Thomson, a partir de la MCI blastocistos derivados de fertilización *in vitro*<sup>7</sup>. Estas células permiten el acceso a etapas pre y post-implantacional, posibilitando el estudio del desarrollo embrionario humano temprano y la generación y diferenciación de distintos tejidos y sistemas.

### 1.1.2. Definición y propiedades

Las células madre pluripotentes (CMP) son células con capacidad de auto-renovación y de originar tejidos representativos de las 3 capas germinales de un embrión en desarrollo (ectodermo, mesodermo y endodermo), así como a la línea germinal. Estas células no contribuyen normalmente al trofoblasto a partir del cual se generará la placenta (tejido extraembrionario). Las primeras CMP fueron derivadas de teratocarcinomas<sup>8</sup>, un tumor de origen germinal. Más tarde, la obtención de CMP a partir de blastocistos de ratón (CMPR) y también de humanos (CMPH) demostró que las CMP pueden cultivarse como líneas celulares inmortalizadas no transformadas<sup>5-7</sup>.



**Figura 1.1.2.1. Imagen de las típicas colonias de CMEH en cultivo sin células de soporte.** Línea H9, de CMEH cultivadas sobre Matrigel en medio químicamente definido E8.

En función de las condiciones de derivación y de mantenimiento, las CMPR presentan distintas propiedades. Las CMPR obtenidas de embriones pre-implantación se conocen como CMER mientras que aquellas generadas a partir de estadios ligeramente posteriores se denominan CMEpi (células madre epiblasticas)<sup>9,10</sup>. Los términos 'primitiva' y 'programada' se introdujeron

para describir las etapas temprana y tardía de ontogenia del epiblasto describiendo a las CMER y CMEpi, respectivamente. Las CMPH poseen un perfil molecular similar al de las CMEpi y, por tanto, son clasificadas como 'programadas'<sup>11</sup>. Los distintos requerimientos para su cultivo, programas de expresión génica y características epigenéticas son un reflejo del carácter dinámico de la pluripotencia en el embrión.

Las CMP se caracterizan por poseer mecanismos moleculares responsables del mantenimiento de la auto-renovación y supresión de la diferenciación a la vez que por mantener genes clave implicados en diferenciación en un estado quiescente pero 'preparado' (primed). 3 factores de transcripción controlan y, por tanto, definen el estado pluripotente: OCT4, SOX2 y NANOG<sup>12</sup>. OCT4 y NANOG conforman el núcleo transcripcional ya que su expresión es específica de CMP y de embriones tempranos. SOX2 forma un heterodímero junto con OCT4 y ambos son necesarios para la formación de células madre pluripotentes inducidas (CMPI), destacando su rol en el establecimiento de la pluripotencia<sup>13</sup>. Estos 3 factores, de forma cooperativa, se unen a sus propios promotores, formando un circuito interconectado de auto-regulación<sup>12</sup>. De ellos OCT4 es el más indispensable y, por tanto, se le considera el factor pluripotente principal por excelencia.

Las CMPH deben ser caracterizadas para determinar su potencial real para poder ser usadas tanto en investigación básica como aplicaciones clínicas. La expresión de marcadores de pluripotencia puede ser determinada usando 3 métodos complementarios: 1) la inmunotinción de CMPH revela la expresión de marcadores y permite la estimación de su homogeneidad en un cultivo monocapa. Este método es rápido y fácil pero es cualitativo y requiere un cultivo negativo para marcadores de pluripotencia para sustraer la señal de fondo; 2) el análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a transcripción reversa (en inglés qRT-PCR) permite una cuantificación fiable de los niveles de expresión. Aunque la qRT-PCR es potente e informativa, muestra el fenotipo de todo el cultivo de las CMPH mostrando valores de expresión promedio y perdiéndose la información de homogeneidad de la población celular; 3) la citometría de flujo o FACS (Fluorescence-activated cell sorting) complementa a la qRT-PCR y provee información de diferentes poblaciones celulares de CMPH. Además de marcadores de membrana específicos de las CMPH, como el SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y SSEA-3, también pueden detectarse los factores transcripcionales OCT-4 o NANOG que son característicos en las CMPH.

El cariotipado de CMPH para su uso en terapias celulares debe ser llevado a cabo cada 10 pases (2 meses) *in vitro*, aunque recientemente se ha demostrado que el cariotipo no posee la

resolución suficiente para detectar todas las aberraciones genéticas con potencial tumorigénico<sup>14</sup>. Se necesitaría un método de detección con una resolución de al menos 50kb para confirmar la seguridad de las células antes de su uso para trasplantes en pacientes. Una alternativa adecuada pueden ser los arrays de polimorfismos de nucleótido único en todo el genoma (SNPs arrays) junto con el análisis de variaciones en el número de copias (Copy Number Variation o CNVs) y la pérdida de heterocigosidad (Loss of heterozygosity o LOH). La estabilidad genética se estudia mediante arrays de hibridación genómica comparativa. Por último, la hibridación *in situ* fluorescente puede ser usada para detectar aneuploidías y proporcionar mayor información acerca de la integridad genética. La tinción de fosfatasa alcalina también puede usarse para definir el estado pluripotente de las CMPH. Finalmente, la “firma molecular” mediante el análisis de expresión de ARNm puede sugerir características pluripotentes pero solo los ensayos funcionales de pluripotencia pueden establecer el potencial real de las CMP.

Existen 6 ensayos que se pueden emplear para determinar el potencial de desarrollo de las CMP: 1) diferenciación *in vitro*; 2) formación de teratomas; 3) formación de quimeras; 4) transmisión a la línea germinal; 5) complementación tetraploide; y 6) formación de quimeras a partir de células individuales. La **diferenciación *in vitro*** a células de las 3 capas germinales representa el nivel más bajo aceptado de pluripotencia. La **formación de teratomas** evalúa la formación espontánea de tejidos diferenciados pertenecientes a las 3 capas germinales tras la inyección de CMPH en un ratón inmunodeficiente. Esta metodología tiene varias limitaciones. El ensayo de teratomas determina el potencial de desarrollo a nivel poblacional ya que los teratomas no se pueden generar a partir de células individuales. Además, no es un ensayo cuantitativo y sólo nos podemos limitar a realizar un análisis histológico de los diferentes tejidos diferenciados espontáneamente dentro de los teratomas. La **formación de blastocistos quiméricos** mide la contribución de las CMP introducidas en embriones, ya sea en estadio de mórula o blastocisto, durante el desarrollo embrionario. Las CMP de alta calidad participan en el desarrollo normal y dan lugar a quimeras de alta calidad con abundante colonización de todos los tejidos embrionarios, incluida la línea germinal, mientras que las CMP de menor calidad producen o bien bajo quimerismo o embriones con viabilidad reducida. Este tipo de ensayos se puede realizar entre CMP y embriones de la misma especie o interespecie (humano-ratón, humano-cerdo o humano-primate entre otras múltiples combinaciones). La **transmisión a la línea germinal** conlleva la cría de quimeras para producir descendencia con todas células derivadas de las CMP originalmente inyectadas, lo cual demuestra la capacidad de las CMP

estudiadas de generar gametos funcionales. La **complementación tetraploide** mide la capacidad de las CMP de dirigir el desarrollo de un organismo completo. Las CMP de estudio son introducidas en un blastocisto 4n generado por electrofusión de blastómeros en el estadio de 2 células. Ya que los blastocistos 4n son incapaces de mantener un desarrollo normal del embrión mientras que sí permiten el desarrollo normal del tejido extraembrionario cualquier embrión resultante derivara enteramente de las CMP introducidas. La pluripotencia genuina es una propiedad de células individuales y, por tanto, quimeras con amplia contribución a partir de una única célula respaldan la claridad de los ensayos clonales. Por eso, el ensayo más riguroso consiste en **inyectar CMP individuales** en estadio de mórula o blastocisto. Tanto el quimerismo a partir de células individuales como la complementación tetraploide tienen altas tasas de fracaso, pero son interpretados como los mejores ensayos para definir el estado pluripotente de las CMP. El ensayo de teratomas es el ensayo de referencia para la evaluación del potencial de desarrollo de las CMPH. Tanto los ensayos de formación de quimeras de CMPH en embriones de ratón como la formación de quimeras primarias con embriones de humano (*in vitro* no gestacional) están permitidos bajo las normas de la comunidad internacional de investigación con células madre tras una rigurosa revisión científica y ética. Sin embargo, es éticamente impermisible la evaluación de la potencialidad de formación de quimeras primarias humanas mediante complementación gestacional *in vivo*.

### 1.1.3. Tipos y derivación.

Existen 4 tipos básicos de CMPH en función de su origen y método de derivación:

1. CMEH. Las CMEH fueron las primeras CMPH cultivadas con éxito. Son obtenidas a partir de células de la MCI de embriones humanos, embriones excedentes de procesos de FIV cedidos mediante consentimiento informado de las parejas para su uso en investigación. En un principio fueron obtenidas mediante el cultivo directo de blastocistos enteros y posteriormente se ha mejorado la técnica gracias al empleo de la inmunocirujía, microdissección o separación con láser del trofoectodermo antes del cultivo de la MCI. Las CMEH están consideradas el modelo de referencia dentro de las CMPH y, junto con las CMPHI, son las mejor estudiadas y ya están siendo empleadas en ensayos clínicos (mayormente para probar la seguridad del empleo de terapias basadas en CMPH). El principal inconveniente para su empleo en terapia celular es el posible problema de la alogenicidad cuando no exista histocompatibilidad. Además, su obtención ha requerido hasta hace muy poco tiempo la destrucción de embriones humanos con los consideraciones éticas que ello conlleva. Sin embargo, recientemente se ha conseguido la

derivación de varias líneas de CMEH a partir de un blastómero de la MCI sin interferir con el potencial de desarrollo del embrión<sup>15</sup>.

2. CMPIH: Son generadas mediante la expresión ectópica o introducción directa de ciertos ADNc, ARNm o proteínas en células somáticas. Los métodos de reprogramación han avanzado enormemente desde los métodos iniciales que involucraban la integración al azar de los vectores virales de reprogramación en el genoma de la célula a reprogramar<sup>16</sup>, hasta los métodos actuales que no implican integración facilitando su potencial terapéutico<sup>17-19</sup>. Las principales ventajas del uso de CMPIH son que se pueden realizar transplantes autólogos y están libres de problemas éticos. Sin embargo, se ha demostrado que las CMPIH son propensas a desarrollar aberraciones transcripcionales y epigenéticas<sup>20-23</sup>. Como resultado en muchas ocasiones las CMPIH no se diferencian completamente, generando células somáticas que no son totalmente funcionales. Además, hay que indicar que la tecnología actual es demasiado costosa en términos de tiempo y dinero por lo que generar CMPIH para cada paciente resultaría inviable<sup>24</sup>. Debido a esto se están desarrollando diferentes iniciativas para establecer bancos de líneas celulares que caractericen y almacenen CMPIH generadas a partir de donantes sanos homocigotos para los diferentes antígenos leucocitarios humanos (del inglés HLA) que permitirían su uso terapéutico histocompatible para un amplio rango de población en el futuro<sup>25</sup>.

3. Las células madre embrionarias humanas partenogénicas (CMEHP) se obtienen a partir de embriones partenogénicos. Pueden ser heterocigotas<sup>26</sup> u homocigotas<sup>27</sup> para el HLA, en función del protocolo de activación del oocito. Las primeras serían muy útiles para tratamientos autólogos, mientras que las segundas son muy valiosas para su depósito en bancos de líneas celulares. Sin embargo, una impronta anormal y la LOH puede complicar su uso en medicina regenerativa. Las CMEHP no están exentas de controversia ética ya que los oocitos no fertilizados utilizados en su generación deben ser adquiridos mediante un programa de donación de óvulos que implica el uso de un protocolo de estimulación ovárica.

4. Las células madre embrionarias humanas por transferencia nuclear (CMEH-TN) se obtienen mediante transferencia de un núcleo de una célula somática a un oocito humano enucleado<sup>28</sup>. El proceso se denomina transferencia nuclear de células somáticas. Las CMEH-TN son células que poseen el mismo HLA que las células somáticas de las que proviene el núcleo pero tienen mitocondrias alogénicas procedentes del oocito, lo que puede desencadenar una respuesta adaptativa aloinmune<sup>29</sup>. De manera similar a las CMEHP, al implicar el uso de oocitos de donantes, su generación conlleva similares implicaciones éticas.

Tabla 1.1.3.1 Propiedades de los distintos tipos de CMPIH. Adaptada de Simonson *et al.*<sup>30</sup>

hPSC type	Patient-specific cell lines that prevent alloimmune response	Lack of epigenetic aberrations	Reported methods for derivation under xeno-free and chemically defined conditions	Ongoing clinical trials
hESCs	–	+	+	+
iPSCs	+	– <sup>a</sup>	+	+
NT-ESCs	–/+ <sup>b</sup>	+/-	–	–
phESC	+	–	–	–

#### 1.1.4. Cultivo.

El crecimiento de cualquier tipo de célula de mamífero *in vitro* requiere medio de crecimiento, matrices extracelulares y factores ambientales. El **medio de crecimiento** es uno de las componentes más críticos del cultivo de CMPH y ha experimentado una enorme evolución desde sus inicios tras la derivación de las primeras CMEH. Para poder usar las CMPH en terapia es necesario el desarrollo de un medio químicamente definido libre de suero y de agentes no humanos, adecuado para el crecimiento de todos los tipos de CMPH. La primera generación de medio para CMEH contenía suero fetal bovino además de componentes indefinidos los cuales eran secretados por fibroblastos embrionarios de ratón. Recientemente, se han establecido medios más estandarizados y definidos que reemplazan elementos de origen animal en el medio. El suero de reemplazo KO se ha usado ampliamente junto con FGF-2 para el cultivo de CMPH sobre células de soporte. Para el cultivo en condiciones libres de células de soporte se desarrolló un medio definido (denominado TeSR1)<sup>31</sup>. Más recientemente, Thomson *et al.* han desarrollado un medio químicamente definido denominado E8, derivado del TeSR1, que contiene 8 componentes. Este medio E8, junto con el uso de EDTA como agente para subcultivo, puede ser apropiado para el cultivo de una gran variedad de líneas de CMPH<sup>32</sup>.

Entre los **componentes extracelulares** se incluyen diversas matrices orgánicas de origen animal, hidrogeles, proteínas individuales de matriz, superficies sintéticas y algunos componentes libres de agentes de origen animal y comercialmente definidos. Hasta ahora, el Matrigel ha sido uno de los componentes extracelulares más usados para el cultivo de CMPH sin células de soporte. Es una matriz de la membrana basal, rica en colágenos tipo I y IV, laminina, entactina, heparán sulfato, metaloproteinasas, factores de crecimiento indefinidos y compuestos químicos<sup>33</sup>. Al ser un sustrato de origen animal no puede ser usado para la generación de CMPH para uso clínico. Muchas proteínas de la matriz extracelular están reguladas a lo largo del desarrollo y pueden ser usadas, por tanto, para reforzar la auto-renovación o el compromiso a

distintos linajes de las CMPH. La vitronectina recombinante es un sustrato definido que mantiene la auto-renovación de las CMPH mediante la adhesión con la integrina  $\alpha V\beta 5$ <sup>34</sup>. Existe además cada vez más evidencias que demuestran que algunas isoformas específicas de lamininas (expresadas en embriones post-implantación) pueden tener un papel importante en sustentar el crecimiento a largo plazo de las CMPH. En los últimos años se están desarrollando nuevos métodos que utilizan superficies sintéticas para simular los efectos de proteínas de la matriz extracelular en el crecimiento de las CMPH.

Existen una serie de **señales ambientales**, incluyendo los ambientes físicos y fisiológicos (más allá de las células, componentes del medio de crecimiento y matriz extracelular) que estimulan el crecimiento de las CMPH, como la temperatura, humedad, osmolaridad, acidez, rigidez de la superficie de crecimiento, densidad celular, intercambio de gases y los modos de asociación multicelular. De entre todos estos factores, los más destacables son el consumo de oxígeno y los modos de asociación multicelular. El ambiente fisiológico del desarrollo temprano de embriones mamíferos es hipóxico. El cultivo de CMPH debe estar diseñado para mimetizar al máximo esta condición *in vivo*. Sin embargo, de forma tradicional el cultivo de CMPH se ha hecho en normoxia (21% O<sub>2</sub>). Bajas tensiones de O<sub>2</sub> ( $\approx 2-3\%$  O<sub>2</sub>) previenen la diferenciación espontánea de las CMPH<sup>35</sup> además de favorecer el mantenimiento de la integridad genómica. Los modos de asociación multicelular son propiedades físicas de las interacciones intercelulares. Estas propiedades físicas tienen un impacto significativo en la densidad celular, interacciones ligando-receptor, procesamiento de señales, transducción intracelular de señales y en el microambiente de las CMPH. Con el descubrimiento de los mecanismos de muerte y supervivencia de células individuales<sup>36,37</sup>, actualmente las CMPH se pueden crecer de distintas formas como en colonias (método tradicional)<sup>7</sup>, células individuales<sup>38</sup>, monocapas de células individuales que no forman colonias<sup>39</sup> y en agregados en suspensión<sup>40</sup>. La elección de una forma específica de crecimiento de las CMPH dependerá de los objetivos de la investigación y de las aplicaciones clínicas o farmacéuticas.

#### 1.1.5. CMPH como modelo de desarrollo embrionario

Se ha acumulado una enorme cantidad de conocimiento del genoma, fisiología y anatomía humana pero existe poca información directa sobre cómo se regula el desarrollo embrionario humano. La mayoría de nuestro conocimiento del desarrollo humano ha sido extrapolado de estudios con organismos modelo. Estos estudios han aportado conocimientos esenciales de los fundamentos del desarrollo, así como los genes y rutas de señalización que controlan la

especificación celular y la morfogénesis tisular. Algunos de estos genes y rutas de señalización tienen un papel conservado a lo largo de la evolución y se mantienen durante el desarrollo humano. Por razones prácticas, el ratón es el principal sistema experimental para modelar el desarrollo humano. Ratonos y humanos tienen un tamaño genómico similar y comparten el 99% de sus genes, además de presentar grandes similitudes en desarrollo, anatomía y fisiología. Sin embargo, a pesar de ser un poderoso organismo modelo, tiene notables limitaciones. Alrededor del 1% de los genes humanos no tiene homólogo identificable en ratón. Aunque se espera que la mayoría de genes tengan un papel conservado en ratones y humanos, existen diferencias obvias en el periodo de gestación, morfología y en la regulación espacio-temporal de la expresión génica durante el desarrollo embrionario. Por tanto, no es raro que se pase por alto la función crítica de un gen en el desarrollo humano, incluso tras llevarse a cabo estudios en ratón. Existen cada vez más evidencias que sugieren que la diferenciación *in vitro* de las CMPH recapitula aspectos del desarrollo humano, y que pueden ser usadas como modelo de estudio del desarrollo embrionario humano temprano.

Las CMPH poseen dos características que las hacen adecuadas para el estudio del desarrollo humano: 1) poseen el potencial de generar cualquier célula adulta. Su cultivo *in vitro* además proporciona una forma rápida y rentable de analizar la función de un gen durante un proceso específico del desarrollo; 2) las CMPH tienen capacidad de auto-renovación ilimitada, proporcionando material en abundancia para análisis de alta capacidad (del inglés High-throughput Screening o HTS). Por tanto, las CMPH pueden ser usadas para probar hipótesis surgidas de estudios previos en organismos modelo. Dichos estudios dependen de plataformas de diferenciación *in vitro* robustas que mimeticen el desarrollo embrionario fidedignamente.

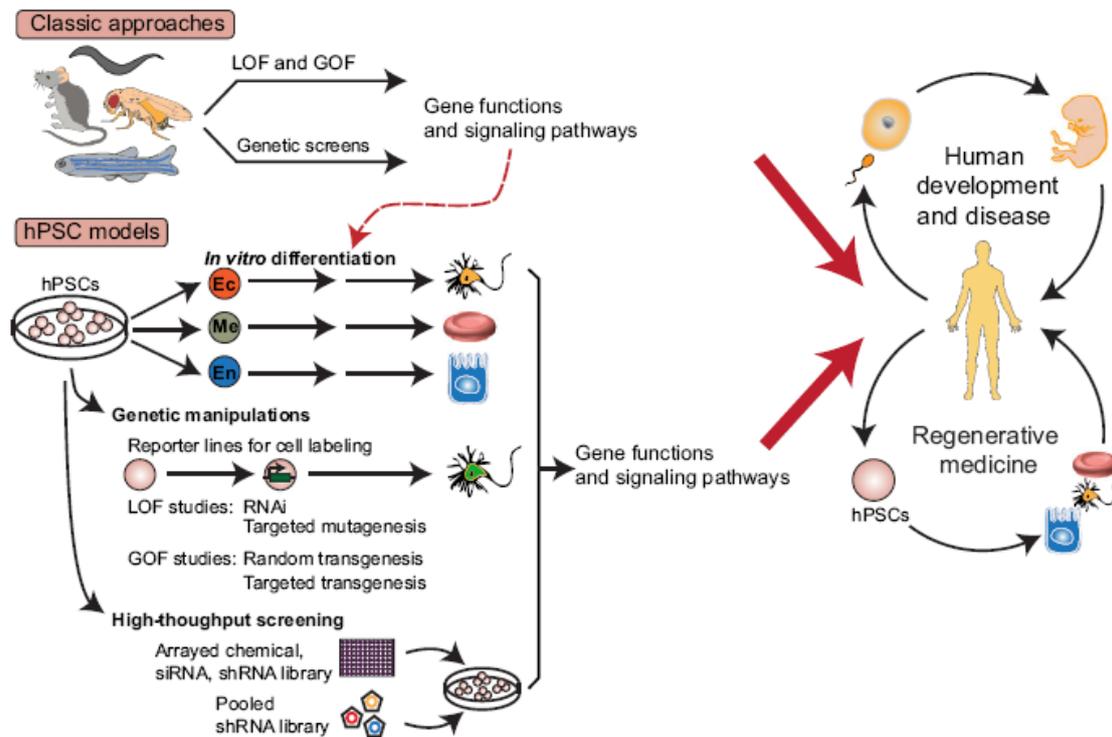
Para abordar problemas específicos respecto al compromiso hacia linajes, es necesario desarrollar condiciones de diferenciación más definidas. Se han desarrollado diversos métodos de diferenciación. La mayoría implican la adición de factores de crecimiento recombinantes o moléculas pequeñas. Algunos usan condiciones de cultivo adherentes, mientras que otras usan formación de cuerpos embrionarios (del inglés embryoid bodies o EBs) y otras usan células de soporte. La diferenciación dirigida consiste típicamente en una serie de etapas definidas que mimeticen el proceso del desarrollo embrionario. Uno de los primeros eventos del desarrollo es la formación de las 3 capas germinales a través de la gastrulación; por lo tanto, la mayoría de protocolos implican primero una dirección hacia ectodermo, mesodermo o endodermo, seguido de una serie de pasos para guiar la diferenciación hacia el tipo celular de interés<sup>41</sup>. Cada etapa de diferenciación es guiada por señales de diferenciación específicas. Se usan normalmente

factores de crecimiento recombinantes y moléculas pequeñas para mimetizar señales conocidas que instruyen en el desarrollo embrionario. Cuando no hay conocimiento previo del desarrollo, una estrategia que se usa es recapitular el ambiente *in vivo* mediante el uso de células aisladas de la localización física donde el tipo celular deseado aparece. Sin embargo, un problema en el análisis funcional de las células derivadas de CMPH es que el tipo celular de interés está presente en el cultivo junto con muchos otros tipos y no está claro el posible uso terapéutico de esta mezcla de células, debido a problemas con la formación de teratomas y los efectos impredecibles de una población mixta. Los futuros análisis funcionales se beneficiaran de mejoras en los protocolos de diferenciación así como de métodos de enriquecimiento, los cuales pueden basarse en la identificación de marcadores específicos de superficie o en el desarrollo de reporteros fluorescentes.

Gracias a la diferenciación dirigida de las CMPH se puede tener acceso a un número creciente de tipos celulares embrionarios además de procesos del desarrollo temprano. Sin embargo aún quedan muchos escollos por salvar. La existencia de heterogeneidad entre distintas líneas de CMPH resalta la importancia de validar resultados usando múltiples líneas celulares. Un desafío importante yace en la dificultad de generar células maduras funcionales. La dificultad de generar células maduras funcionales podría deberse a la incapacidad actual de recapitular la larga ventana de tiempo de desarrollo en un ambiente *in vitro*. Otro problema es el desconocimiento de las señales claves requeridas para las etapas finales de maduración. Por otro lado, un aspecto infravalorado es que las células no funcionales se pueden generar por problemas en etapas de diferenciación tempranas. Además, a diferencia del compromiso de linaje, algunos aspectos del desarrollo, como el patrón y morfogénesis tisular, no son fácilmente recapitulables con los protocolos de diferenciación actuales. Esto supone un obstáculo al estudio del compromiso de linaje de células que necesitan de interacciones entre tejidos para su adecuada especificación, maduración y supervivencia.

Además del estudio del desarrollo normal, las CMPH ofrecen una vía para recapitular el desarrollo anormal e investigar la patogénesis de enfermedades humanas. Muchas células relevantes en enfermedades, como las neuronas, no son fácilmente accesibles en pacientes. Por tanto, los modelos animales, especialmente el ratón, han sido ampliamente usados para entender la patogénesis de enfermedades humanas. Sin embargo, los modelos murinos no siempre recapitulan los fenotipos manifestados en humanos. Las CMPH que posean las modificaciones genéticas asociadas a determinadas enfermedades pueden vencer estas limitaciones, dando lugar a una fuente ilimitada de cualquier tipo celular relevante en una

enfermedad para su estudio específico y para el desarrollo de fármacos que puedan ser utilizados en su tratamiento.



**Figura 1.1.5.1. Estudios en organismos modelo y CMPH para el avance en biología del desarrollo y medicina regenerativa.** Análisis genéticos y ensayos de ganancia y pérdida de función de genes en organismos modelo han identificado genes y rutas de señalización. Esta información ha permitido el avance en los procesos de diferenciación a partir de CMPH hacia distintos linajes de las 3 capas germinales. La formación de cualquier tipo celular a partir de CMPH permite el desarrollo en campos como la medicina regenerativa, modelaje de enfermedades y descubrimiento de nuevos fármacos. Adaptada de Zhu *et al.*<sup>42</sup>

### 1.1.6. CMPH como terapia en medicina regenerativa

El principal objetivo de la medicina regenerativa es el acceso a un número ilimitado de cualquier tipo celular cuya funcionalidad permita la reconstitución de una estructura o función perdida. Gracias a las mejoras en los protocolos de diferenciación a partir de CMPH, esta posibilidad podría hacerse realidad para varios tipos celulares relevantes en diversas enfermedades. Recientes avances en el campo de las células madre señalan que el 'santo grial' de la diferenciación dirigida (la generación de un número ilimitado de tipos celulares funcionales y genéticamente compatibles para terapia celular) podría traducirse en terapias efectivas para enfermedades hasta ahora incurables, aunque seguramente aparecerán nuevos retos/obstáculos en el camino hacia dicha traslación a humanos.

Las CMPH representan una fuente de células atractiva dada su escalabilidad y versatilidad. Sin embargo, para la mayoría de los linajes derivados de ellas, el gran desafío es la generación de células funcionales adecuadas para su uso en clínica. Este problema es particularmente grave para aquellos tipos celulares que desarrollan su total funcionalidad solo en estadios tardíos del desarrollo, como las células madre hematopoyéticas. Las estrategias actuales de diferenciación producen células diferenciadas que mayormente se asemejan a los estadios embrionarios o fetales del desarrollo. Por tanto, es necesario desarrollar tecnologías que produzcan células con propiedades funcionales características de etapas adultas del desarrollo.

La identificación de tipos celulares y etapas definidas *in vitro* es un componente importante de cualquier estrategia de diferenciación. La cuantificación de expresión de marcadores por citometría de flujo es muy útil, ya que evita los problemas asociados con análisis de imágenes en placas de cultivo que son más difíciles de cuantificar. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el uso de análisis del transcriptoma completo, como las plataformas de microarray y secuenciación masiva de ARN, que se están convirtiendo en el método estándar en el campo. También se está intentando incluir ensayos globales para definir el estado de la cromatina de la progenie diferenciada de las CMPH.

Los primeros estudios de trasplante de CMPH estaban mayormente diseñados con el objetivo de medir la supervivencia celular mediante histología. Algunas estrategias que están en desarrollo incluyen reporteros genéticos que permiten el mapeo y análisis clonales *in vivo*, que han sido usados de rutina en ratón<sup>43</sup>. Los estudios de eliminación genética son importantes para determinar los mecanismos que subyacen la función del injerto, tales como distinguir los efectos tróficos a corto plazo de efectos de la implantación funcional a largo plazo.

Las CMPIH específicas de paciente son atractivas como una fuente autóloga que podría obviar la necesidad de inmunosupresión, aunque este tema no está claro como se ha visto en estudios en CMPIR<sup>44,45</sup>. Es difícil evaluar la inmunocompatibilidad completa en células humanas debido a la falta de un modelo experimental de implante autólogo. Un posible problema en el uso de CMPIH es la adquisición de alteraciones genéticas y epigenéticas durante la reprogramación, incluyendo mutaciones en regiones codificantes<sup>46</sup> y aberraciones en la metilación del ADN<sup>21</sup>. Otra preocupación es si las células reprogramadas retienen la memoria epigenética del material biológico original utilizado para la reprogramación celular<sup>47,48</sup>. Existen evidencias que las CMPI de ratón y humano retienen, al menos de forma temporal, un perfil epigenético parcialmente

relacionado con la célula de origen y que puede afectar a su potencial de diferenciación posterior a diferentes linajes celulares.

La conversión directa de células somáticas mediante introducción de factores de transcripción específicos de linaje se ha conseguido para algunos tipos celulares<sup>49</sup>. Sin embargo, el potencial traslacional de este enfoque, incluyendo la capacidad de la implantación funcional a largo plazo, no ha sido determinado todavía. La escalabilidad y el establecimiento de una plataforma de terapia celular de conformidad con buenas prácticas de producción representan otro de los grandes obstáculos hacia su posible traslación clínica.

La aparición de ensayos clínicos que involucran CMPH ilustra el progreso que se ha hecho en el desarrollo de tipos celulares terapéuticos y la mitigación de los riesgos de las CMPH. La actual oleada de ensayos clínicos basados en CMPH se centra principalmente en tratar la degeneración de la retina. Estudios preclínicos muestran la seguridad y eficacia del epitelio retinoico pigmentado (ERP) derivado de las CMEH y CMPIH en varios modelos animales<sup>50,51</sup>, allanando el camino para los ensayos clínicos recientes. Actualmente, están en marcha 9 ensayos clínicos que utilizan ERP derivado de CMPH para reparar degeneración macular y enfermedades relacionadas, 8 de ellos usan ERP de CMEH y 1 de ellos ERP procedente de CMPIH, el cual es además el primer ensayo con CMPIH en humanos<sup>52</sup>. Los resultados hasta ahora muestran que las células trasplantadas son bien toleradas sin evidencia de proliferación adversa, tumorigenicidad u otros problemas oculares o sistémicos<sup>53,54</sup>. Se han detectado parches de pigmentación subretinal persistentes en el ojo incluso después de la interrupción de la inmunosupresión.

Implantes de tejido cardíaco derivado de CMPH pueden restaurar la función de áreas debilitadas o isquémicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria. El primer ensayo clínico establecido para probar esta técnica en humanos está en estos momentos en fase de reclutamiento de pacientes. Modelos animales preclínicos (ratón y primates no humanos) muestran que estos implantes aumentan el volumen sistólico del ventrículo izquierdo, mejorando la función cardíaca general<sup>55</sup>.

En 2014 se inició el primer ensayo clínico para probar un tratamiento para la diabetes basado en CMPH. El producto, VC-01, es un dispositivo subcutáneo que consiste en células pancreáticas (PEC-01) derivadas de CMEH envueltas en un dispositivo semipermeable. El dispositivo protege a las células PEC-01 del rechazo inmune permitiendo además que el oxígeno y los nutrientes penetren dentro de la capsula así como la liberación de insulina en respuesta a niveles elevados

de glucosa en sangre. Ensayos preclínicos mostraron que las células PEC-01 pueden diferenciarse a varios tipos celulares pancreáticos<sup>56</sup> y, de forma similar a las células  $\beta$ , secretar insulina<sup>57</sup> y regular la glucosa sanguínea en ratones<sup>58</sup>.

Tabla 1.1.6.1 Ensayos clínicos con células derivadas de CMH. Adaptada de Kimbrel *et al.*<sup>59</sup>

Cell type (product name)	Company or group	Trial location	Disease	Stage of trial	Cell delivery	Status of trial
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	Ocata Therapeutics	United States	Dry AMD	Phase I/II	Cell suspension	Active, not recruiting
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	Ocata Therapeutics	United States	Stargardt	Phase I/II	Cell suspension	Active, not recruiting
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	Ocata Therapeutics	United Kingdom	Stargardt	Phase I/II	Cell suspension	Recruiting
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	CHABiotech (licensed from Ocata)	Korea	Dry AMD	Phase I/II	Cell suspension	Recruiting
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	CHABiotech (licensed from Ocata)	Korea	Stargardt	Phase I	Cell suspension	Active, not recruiting
hESC-derived RPE (MA09-hRPE)	University of California, Los Angeles (with Ocata's cells)	United States	MMD	Phase I/II	Cell suspension	Not yet recruiting
iPSC-derived RPE (autologous)	Rikagaku Kenkyūsho (RIKEN) Institute	Japan	Wet AMD	Phase I	Monolayer sheet (no membrane)	On hold
hESC-derived RPE (PF-05206388)	Pfizer	United Kingdom	Wet AMD	Phase I	Membrane-immobilized monolayer sheet	Recruiting
hESC-derived RPE (Opregen)	Cell Cure Neuroscience	Israel	Dry AMD	Phase I/II	Cell suspension	Recruiting
hESC-derived CD15 <sup>+</sup> ISL-1 <sup>+</sup> cardiac progenitors	Assistance publique, Hôpitaux de Paris	France	Severe heart failure	Phase I	Cells embedded in fibrin patch	Recruiting
hESC-derived pancreatic endoderm (VC-01)	Viacyte	United States	Type I diabetes	Phase I/II	PEC-01 cells encapsulated in a medical device	Recruiting
hESC-derived oligodendrocyte progenitors (AST-OPC1)	Asterias Biotherapeutics	United States	Spinal cord injury	Phase I	Cell suspension	Completed (took over from Geron)
hESC-derived oligodendrocyte progenitors (AST-OPC1)	Asterias Biotherapeutics	United States	Spinal cord injury	Phase I/II	Cell suspension	Recruiting

AMD, age-related macular degeneration; hESC, human embryonic stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell; MMD, myopic macular degeneration; RPE, retinal pigment epithelium.

## 1.2. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de formación de las células del sistema hematopoyético. El sistema hematopoyético consta de más de 10 tipos diferentes de tipos celulares con varias funciones. Los leucocitos representan varios tipos celulares especializados con funciones en inmunidad innata y adquirida. Los eritrocitos transportan O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, mientras los megacariocitos generan plaquetas para la coagulación y reparación de heridas. Todos los tipos celulares son generados a partir de las células madre hematopoyéticas (CMH) que residen en la médula ósea, el sitio principal de hematopoyesis en el adulto. La sangre es uno de los tejidos más plásticos y dinámicos, con millones de células “viejas” que son repuestas por células “nuevas” a cada segundo. En situaciones de emergencia, como anemia o infección, el número de células sanguíneas rápidamente crece, volviendo a la normalidad tras la recuperación. El tiempo de vida de algunos tipos celulares maduras varía desde horas hasta años. Es el primer tejido en

formarse durante el desarrollo embrionario, con una dinámica compleja, apareciendo a distintos tiempos de desarrollo, distintos tipos celulares en distintas localizaciones anatómicas. Existen 2 etapas con propiedades y características claramente definitorias en las cuales se puede dividir la hematopoyesis: la hematopoyesis embrionaria y la adulta.

### 1.2.1. Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético

La mayoría del conocimiento actual acerca del desarrollo embrionario del sistema hematopoyético proviene de modelos animales, siendo el ratón el más estudiado de todos dada la disponibilidad de los ensayos de formación de colonias y trasplante, los cuales definen funcionalmente la presencia de progenitores hematopoyéticos y CMH, respectivamente. En el ratón, la hematopoyesis se inicia entre los días embrionarios 7.0-7.5 (E7.0-7.5) en una estructura extraembrionaria denominada saco vitelino, donde las células hematopoyéticas se encuentran rodeadas de células endoteliales dentro de unas estructuras llamadas islas sanguíneas (del inglés blood islands)<sup>60,61</sup>. Las primeras células diferenciadas en emerger son los eritrocitos primitivos nucleados que expresan hemoglobina embrionaria, junto con otras células mieloides (básicamente macrófagos y megacariocitos) identificadas en torno al día E8.0<sup>62</sup>. A esta fase se le denomina hematopoyesis primitiva y/o oleada 1 y su principal propósito es producir eritrocitos que faciliten la oxigenación tisular mientras el embrión experimenta un crecimiento rápido. Sin embargo, estas células no son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de un ratón irradiado, el ensayo estrella de la actividad de CMH, indicando que durante este estadio del desarrollo aún no se han generado CMH funcionales<sup>63-65</sup>. Las células hematopoyéticas primitivas son rápidamente reemplazadas por sus homologas definitivas y tienen unas funciones específicas en el embrión que las hacen distintas de sus equivalentes en el adulto.

Poco después del inicio de la hematopoyesis primitiva los primeros progenitores eritroides definitivos (denominados BFU-E) aparecen en el saco vitelino en torno a E8.25<sup>66-68</sup>. Neutrófilos, mastocitos y progenitores granulocíticos-macrófagos muestran una cinética de aparición similar. Además, también se detectan en el saco vitelino a E8.25, justo antes del establecimiento de la circulación, unos progenitores altamente proliferativos con capacidad para formar colonias con potencialidad para dar lugar a múltiples linajes mieloides<sup>69</sup>. Ya que estos progenitores definitivos producen eritrocitos y células mieloides pero no eran capaces de colonizar el timo, se llamó a esta población progenitores eritro-mieloides (PEM). Estos PEM migran al hígado fetal antes de la aparición de las CMH y generan, entre otros tipos celulares, macrófagos que colonizan tejidos como el hígado (células de Kupffer), cerebro (microglía), epidermis (células de Langerhans) y

pulmones (macrófagos alveolares) donde permanecen hasta la edad adulta<sup>70</sup>. Además, en el saco vitelino y en la estructura precursora del aorta-gonada-mesonefros (AGM), conocida como P-Sp, también se producen progenitores linfoides B y T, entre 1 y 2 días antes de la aparición de las primeras CMH<sup>71</sup>. A la aparición del conjunto de PEM y progenitores linfoides se le denomina oleada 2 y pertenece a la hematopoyesis definitiva. A pesar del solapamiento temporal parcial en la aparición en el saco vitelino de la hematopoyesis primitiva y definitiva oleada 2, se pueden distinguir dichas poblaciones por su progenie y deben ser consideradas como oleadas hematopoyéticas distintas.

El saco vitelino es el sitio principal de hematopoyesis hasta aproximadamente E10.0, cuando las primeras CMH son detectadas en estructuras intraembrionarias. En un principio se pensó que el sistema hematopoyético se desarrollaba directamente a partir de las células hematopoyéticas del saco vitelino que migraban al embrión tras el inicio de la circulación en torno a E8.5. Sin embargo, ensayos de trasplantes demostraron que el saco vitelino no contenía CMH definitivas de tipo adulto hasta E11.5<sup>63,64,72</sup>, posterior a cuando pueden ser detectadas en el embrión. A E10.0 se identificó una región con actividad hematopoyética, denominada AGM, capaz de formar colonias en bazo con una mayor tasa que las células del saco vitelino cuando eran trasplantadas en ratones letalmente irradiados<sup>64</sup> y capaces de reconstituir el sistema hematopoyético completo<sup>65</sup>. El lugar concreto dentro del AGM donde se establece la hematopoyesis es la aorta dorsal<sup>63</sup>. A partir de las células endoteliales de la aorta ventral aparecen pequeños clústeres de células que expresan marcadores hematopoyéticos, denominados clústeres hematopoyéticos intra-aórticos (CHIA), que son liberados a la circulación<sup>73-75</sup>. Estos CHIA están formados por pre-CMH que maduran progresivamente hasta dar lugar a las CMH definitivas<sup>76</sup>. El proceso de formación de CMH definitivas a partir de una población única de células endoteliales en la pared ventral de la aorta dorsal, definidas como endotelio hemogénico, se denomina **transición endotelio-hematopoyesis (TEH)**<sup>77-79</sup>. A la formación de las CMH se le denomina oleada 3 y pertenece a la hematopoyesis definitiva.

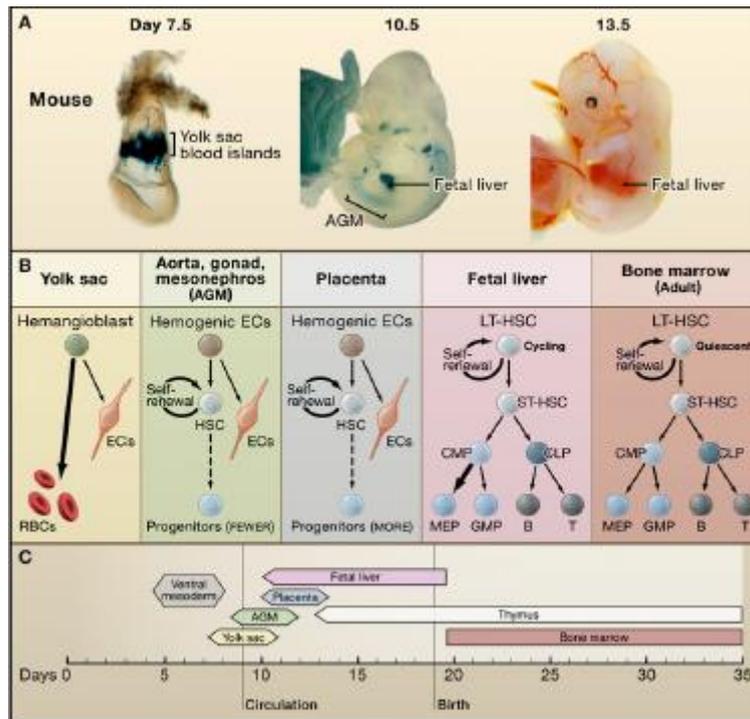
Desde estadios tempranos del desarrollo, las CMH y las células endoteliales comparten la expresión de VE-Cadherina, que es posteriormente apagada durante el desarrollo fetal<sup>80,81</sup>. Los progenitores hematopoyéticos en el embrión temprano expresan CD41 y posteriormente CD45<sup>82,83</sup>. La TEH ocurre en varias etapas secuenciales de desarrollo de forma muy rápida, atravesando varios estadios celulares caracterizados por la expresión de marcadores de superficie. Del **endotelio hemogénico** (VE-Cadh<sup>+</sup>Runx1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>) se generarán las **pro-CMH** (VE-Cadh<sup>+</sup>Runx1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>) a continuación **pre-CMH tipo I** (VE-Cadh<sup>+</sup>Runx1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD43<sup>+</sup>)

y **pre-CMH tipo II** (VE-Cadh<sup>+</sup>Runx1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD43<sup>high</sup>CD45<sup>+</sup>) que finalmente formarán las **CMH definitivas** (VE-Cadh<sup>+</sup>Runx1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>-/low</sup>CD43<sup>high</sup>CD45<sup>+</sup>). Pre-CMH tipo II y CMH definitivas tienen el mismo fenotipo pero pueden ser distinguidas desde un punto de vista funcional mediante el trasplante directo en ratones irradiados. Los 4 tipos celulares anteriores han sido identificados morfológicamente en la aorta dorsal<sup>84-87</sup>. En el caso de humanos esta sucesión de etapas no se ha estudiado con tanto detalle, aunque parece que pueden existir diferencias ya que CD41 no se expresa en estas etapas del desarrollo, al contrario que CD43 que parece que sí lo expresan las primeras CMH en humanos<sup>88</sup>. Además, se ha observado que la expresión de CD43 define a los progenitores hematopoyéticos durante la diferenciación hematopoyética de CMEH<sup>89</sup>.

Parece ser que los macrófagos de las oleadas 1 y 2 podrían participar en el establecimiento de la hematopoyesis definitiva permitiendo la movilización y colonización de las CMH a los órganos hematopoyéticos<sup>90</sup>. Técnicas de rastreo dinámico y de imagen llevados a cabo *in vivo* han demostrado que la TEH representa un proceso continuo mediante el cual las células endoteliales adquieren gradualmente morfología y fenotipo hematopoyético<sup>77,91,92</sup>. Tras la aparición de las CMH en el AGM, éstas migran al hígado fetal y sufren un proceso de expansión, colonizando finalmente la médula ósea justo antes del nacimiento. Aquí es donde permanecerán el resto de la vida del individuo adulto<sup>93</sup>. Recientemente se han encontrado progenitores hematopoyéticos en el músculo, en un estadio intermedio entre el hígado fetal y la médula ósea, sugiriendo que el músculo embrionario sirve de nicho en el desarrollo del sistema hematopoyético<sup>94</sup>. Además, se han descrito otros lugares auxiliares de hematopoyesis definitiva, como la placenta<sup>95</sup>, las arterias vitelina y umbilical<sup>96</sup>, la vasculatura de la cabeza<sup>97</sup>, el endocardio<sup>98</sup> y los capilares emergentes del saco vitelino<sup>99</sup>.

Además de las dudas respecto a los sitios anatómicos hematopoyéticos, el origen celular de las células hematopoyéticas también ha sido motivo de controversia. La observación en el saco vitelino de islas sanguíneas que contienen células hematopoyéticas rodeadas por endotelio<sup>100</sup> condujo a la hipótesis de que ambos tipos celulares emergen de un precursor común, el **hemangioblasto**<sup>60,61</sup>. Aunque el término hemangioblasto inicialmente designaba un precursor mesodérmico, la literatura moderna lo aplica ampliamente para describir cualquier tipo celular que pueda producir células endoteliales y hematopoyéticas mediante cultivo *in vitro* en condiciones específicas. Las células con actividad hemangioblástica representan un grupo muy heterogéneo de progenitores, que incluyen células mesodérmicas en el saco vitelino y células con características típicas de endotelio en el AGM<sup>101-103</sup>. La observación de clústeres

hematopoyéticos en la aorta dorsal de muchas especies llevó a la teoría opuesta en la que las CMH se desarrollan a partir de un endotelio con potencial hematopoyético, el endotelio hemogénico. Este endotelio ha sido observado tanto en la aorta dorsal<sup>75</sup> como en el saco vitelino<sup>99,104,105</sup>, desafiando la teoría del hemangioblasto. Recientemente, ambas teorías se han reconciliado demostrando que durante el desarrollo de las células hematopoyéticas se produce un proceso secuencial que parte del mesodermo, a continuación se establece el hemangioblasto, luego el endotelio hemogénico y, finalmente, los progenitores hematopoyéticos<sup>106</sup>.



**Figura 1.2.1.1. Regulación durante el desarrollo de la hematopoyesis en ratón.** (A) La hematopoyesis ocurre primero en las islas sanguíneas del saco vitelino y después en el AGM, placenta e hígado fetal. Las islas sanguíneas del saco vitelino se visualizan mediante tinción de LacZ dirigida por *Gata1*. AGM e hígado fetal por LacZ dirigida por *Runx1*. (B) Hematopoyesis en cada localización favorece la producción de linajes hematopoyéticos específicos. Abreviaturas: ECs, células endoteliales; RBCs, eritrocitos; LT-HSC, células madre hematopoyéticas de largo plazo; ST-HSC, células madre hematopoyéticas de corto plazo; CMP, progenitor mieloide común; CLP, progenitor linfocítico común; MEP, progenitor eritro-megacariocítico; GMP, progenitor granulocítico-macrófago. (C) Ventana temporal de desarrollo en la que se producen los cambios anatómicos durante la hematopoyesis. Adaptada de Orkin *et al.*<sup>107</sup>

Poco se sabe de la hematopoyesis embrionaria humana debido a las implicaciones éticas del estudio de embriones humanos. Lo poco que sabemos proviene de grupos que han tenido acceso a abortos espontáneos donados por pacientes mediante consentimiento informado. Consecuentemente, se trata de un estudio estático del embrión, no dinámico como es el caso de los modelos experimentales anteriormente mencionados. Además, las causas del aborto y el

manejo del embrión después del aborto pueden provocar su deterioro y, por tanto, dificultar su estudio. Estos estudios indican que el desarrollo hematopoyético embrionario humano se asemeja mucho al del ratón. Comienza en el saco vitelino y, a diferencia del ratón, transiciona de forma temporal por el hígado antes de la aparición de células hematopoyéticas en las arterias, seguido de una segunda colonización hepática antes de establecerse definitivamente en la médula ósea y el timo. Se ha confirmado también la existencia del hemangioblasto en humanos. Además, también se ha descrito que las CMH se encuentran próximas a células endoteliales y que células endoteliales vasculares aisladas entre los días 27-40 de desarrollo y cultivadas sobre células estromales MS-5 dan lugar a células hematopoyéticas. Estudios de trasplante de CMH de embriones humanos en ratones inmunodeficientes han confirmado que las primeras CMH definitivas humanas aparecen en el AGM<sup>108</sup>. Existe además, al igual que en el ratón, una fuerte polarización dorsoventral, localizándose exclusivamente en la aorta ventral la actividad repobladora multilínea de largo plazo, es decir las CMH humanas<sup>109</sup>.

### 1.2.2. Hematopoyesis en el adulto

Las CMH producidas durante el desarrollo embrionario que colonizan la médula ósea son las encargadas de mantener la homeostasis del sistema hematopoyético a lo largo de la vida del individuo. Este proceso está altamente regulado para mantener la producción de células hematopoyéticas a la vez que se asegura el mantenimiento de por vida del reservorio/stock de CMH. Para ello las CMH permanecen en un estado de quiescencia, del que salen solamente cuando se necesita reemplazar a las células hematopoyéticas maduras. La integridad funcional del sistema hematopoyético y el reservorio/stock de CMH puede controlarse mediante la salida de las células de la médula ósea, la entrada en apoptosis, la auto-renovación o la diferenciación.

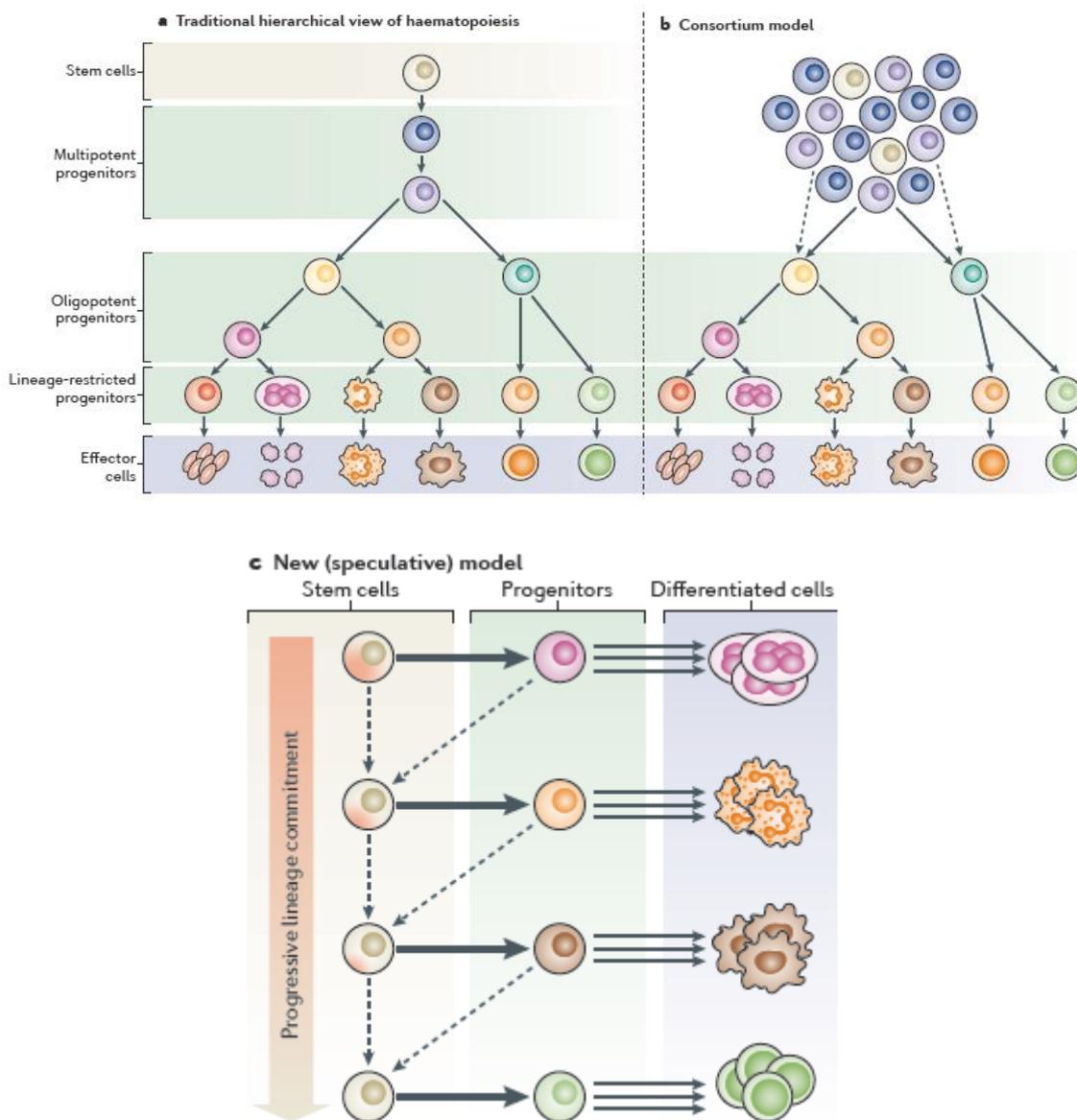
Tradicionalmente se ha considerado la diferenciación hematopoyética en mamíferos como un proceso jerárquico donde las CMH se encuentran en el ápice de dicha jerarquía (Figura 4a). A partir de ellas se generan los distintos tipos de progenitores cuya potencialidad decrece a medida que se diferencian para dar lugar a todas las células del sistema hematopoyético. Las CMH se pueden clasificar según su capacidad de colonizar la médula ósea de ratones. Así podemos encontrar CMH capaces de colonizar la médula ósea de ratones trasplantados durante largo plazo (CMH-LP<sup>110,111</sup>), medio plazo (CMH-MP<sup>112</sup>) y corto plazo (CMH-CP<sup>113</sup>) que dan lugar en un primer momento a progenitores multipotentes (PMP) que posteriormente originan progenitores mieloides comunes (PMC) y progenitores linfoides comunes (PLC). Éstos últimos producirán células del linaje linfóide (linfocitos T, B y natural killers). Los PMC producen progenitores eritro-

megacariocíticos (PEMk) y progenitores granulocito-macrófagos (PGM). Los PEMk generarán eritrocitos y megacariocitos, mientras que los PGM dan lugar a granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y macrófagos. Esta jerarquía ha sido completada con diversos progenitores intermedios a los anteriormente mencionados, reflejando el carácter dinámico del proceso de diferenciación desde una CMH hasta una célula completamente diferenciada<sup>114</sup>.

Esta visión está cambiando en los últimos años gracias a varios estudios que desafían el modelo clásico de desarrollo hematopoyético. Las CMH eran concebidas como una población uniforme de células con capacidad equivalente de generar una progenie diversa, aunque estudios recientes demuestran que no es así. El primer indicio definitivo de la existencia de patrones específicos de producción de linajes procede del seguimiento de la progenie clonal regenerada a partir de una CMH individual tras trasplantes seriados sucesivos<sup>115</sup>. Estas observaciones han sido confirmadas en varios estudios<sup>116-119</sup>. Los patrones de diferenciación específicos de cada clon de CMH con capacidad de auto-renovación duradera pueden encontrarse balanceados hacia la producción de progenie mieloide y linfoide (células  $\beta$ ) o hacia la producción exclusiva mieloide y carecer de potencial linfoide (células  $\alpha$ ). Además, se han propuesto otros tipos de CMH (células  $\gamma$  y células  $\delta$ ) deficientes en progenie mieloide incapaces de mantener una auto-renovación duradera que no permiten trasplantes secundarios. Una característica interesante que se desprende de estos estudios es que las CMH más predeterminadas hacia linaje mieloide muestran los niveles más altos de quiescencia mientras que las más predeterminadas hacia linaje linfoide se dividen más activamente. Esto explicaría por qué las células  $\gamma$  y  $\delta$  tienen esa baja capacidad de colonización y el hecho de que con la edad disminuye la capacidad de producción de linaje linfoide mientras que aumenta la de mieloide<sup>117,120,121</sup>. Parece ser, por tanto, que los tipos de CMH representan probablemente un continuo de estados caracterizados por diferencias sutiles, tales como pequeños cambios en la expresión génica. La distribución de estos tipos de CMH cambia durante el desarrollo y el envejecimiento<sup>117,122,123</sup> y, además, está sujeta a una modulación extrínseca<sup>118</sup>. Un meta-análisis de varios estudios en humanos indica que las CMH humanas también tienen propiedades regenerativas heterogéneas<sup>124</sup>, apuntando a la posibilidad de que también existan estos tipos de CMH en humanos.

Estos estudios desafían la visión jerárquica tradicional de diferenciación de las CMH y sugieren otros modelos de desarrollo, como el modelo de CMH en consorcio, donde existen diferentes grupos de CMH con pequeñas variaciones en su capacidad de diferenciación y producción de diferentes linajes celulares (Figura 4b). Alternativamente se ha propuesto otro modelo que podría aunar varias observaciones discrepantes. En este modelo las CMH se establecen pronto durante

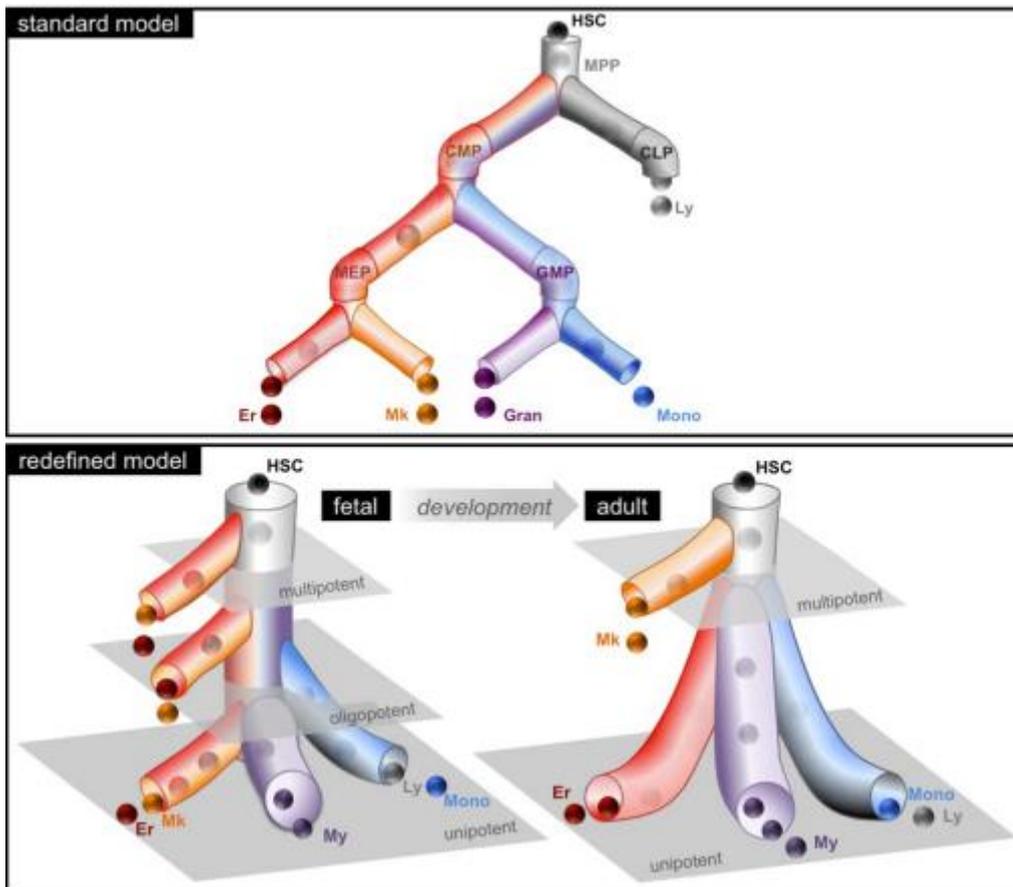
el desarrollo embrionario, generándose diversas subpoblaciones asociadas a diferentes nichos celulares (Figura 4c). Estas CMH generan principalmente progenitores de larga duración que producen exclusivamente uno o pocos linajes<sup>121,125</sup>. Algunos de estos progenitores podrían retener cierto grado de flexibilidad, pudiendo revertir su estado actual a un estado más primitivo comportándose como CMH. Los progenitores revertidos pasarían a un estado oligopotente con capacidad limitada de diferenciación. La relación de linajes producidos entre estos progenitores con características de CMH podría verse como una pérdida gradual de potencial de diferenciación, lo cual sería consistente con la existencia de células como los progenitores multipotentes con tendencia linfoide que carecen de potencial eritro-megacariocítico<sup>126</sup>.



**Figura 1.2.2.1. Modelos de células madre para el sistema hematopoyético.** (A) La visión jerárquica tradicional de la hematopoyesis consiste en que un tipo de célula madre tiene la capacidad de dar lugar a progenitores con

potencial de linaje restringido que se diferencian a todos los tipos celulares sanguíneos con la misma propensión. (B) En el modelo en consorcio, un grupo de células madre con propiedades ligeramente distintas regenera el sistema continuamente mediante progenitores con potencial cada vez más restringido. (C) En el nuevo modelo especulativo, las células madre son células escasas de reserva que ocasionalmente generan progenitores con potencial de linaje restringido. Estas células madre tienen diferentes preferencias hacia linaje y dan lugar a progenitores específicos, que son los impulsores principales de la hematopoyesis., generando un número masivo de células diferenciadas durante un largo periodo de tiempo. Durante estrés extremo (como una herida grande o trasplante), los progenitores pueden volver a un estado similar a células madre (línea discontinua hacia la izquierda) a la vez que retienen algunas de sus preferencias de linaje. Este modelo es consistente con la existencia de células madre con tendencia megacariocítica y progenitores multipotentes con tendencia linfoide, además de con el sesgo de diferenciación observado con el envejecimiento. También se pueden concebir modelos híbridos de los 3 descritos. Adaptada de Goodell *et al.*<sup>127</sup>

Muy recientemente se ha publicado un artículo que apoya esta visión compleja del sistema hematopoyético en humanos. Notta *et al.*, mediante aislamiento celular y ensayo funcional mejorado basado en el cultivo de CMH individuales purificadas a partir de hígado fetal, sangre de cordón umbilical y medula ósea de adultos, demuestran que la jerarquía hematopoyética cambia a lo largo del desarrollo<sup>128</sup>. Existe una mayoría de progenitores oligopotentes en hígado fetal mientras que la medula ósea está compuesta básicamente por progenitores unipotentes. El modelo que se desprende de este estudio se basa en 2 niveles: el superior, compuesto por células multipotentes como CMH o PMP, y el inferior, compuesto por progenitores unipotentes comprometidos, postulando la no existencia del PMC en adultos. Además, la aparición del linaje megacariocítico en hígado fetal está enriquecida (aunque no restringida) en el compartimento de CMH, mientras que en medula ósea se producen casi exclusivamente a partir del compartimento multipotente (CMH y PMP)<sup>128,129</sup>. Esto refuerza datos anteriores que sugieren que las CMH más primitivas están pre-dirigidas al linaje megacariocítico en medula ósea en ratones<sup>130</sup>.



**Figura 1.2.2.2. Modelo de los cambios en la diferenciación mieloide, eritroide y megacariocítica que ocurre a lo largo del desarrollo.** Representación gráfica de la diferenciación mieloide, eritroide y megacariocítica que incluye el potencial de linaje predominante de las subpoblaciones de progenitores; se muestra el modelo estándar en comparación. El modelo redefinido propone un cambio durante el desarrollo en la arquitectura de los progenitores desde el feto, donde algunas CMH y progenitores son multipotentes, hasta el adulto, donde el compartimento de CMH es multipotente, pero los progenitores son unipotentes. Los planos grises representan niveles teóricos de diferenciación. Adaptada de Notta *et al.* <sup>128</sup>

La diferenciación hematopoyética durante estado estacionario y su adaptación tras inflamación o daños está en gran medida controlada por citoquinas. Las citoquinas son pequeñas proteínas solubles que pueden ser secretadas o estar unidas a membrana. Están producidas por diferentes tipos celulares y pueden actuar tanto a nivel local en el microambiente de las CMH como sistémicamente a través del torrente sanguíneo o los vasos linfáticos. Las citoquinas señalizan a través de sus receptores que promueven la activación de procesos de señalización intracelulares y, en última instancia, a la expresión génica. Se sabe que las citoquinas estimulan la supervivencia y la proliferación de las CMH e influyen la producción de distintos linajes hematopoyéticos. Sin embargo no está claro si este compromiso hacia linajes específicos ocurre mediante mecanismos intracelulares seguido de una función selectiva de las citoquinas (modelo

selectivo) o si las citoquinas tienen un papel instructor, induciendo programas transcripcionales específicos de linaje (modelo instructivo)

El microambiente de la médula ósea contiene una población heterogénea de células estromales organizadas en nichos que mantienen a las CMH y a otros progenitores hematopoyéticos. El nicho de las CMH genera señales que regulan la auto-renovación, quiescencia y diferenciación de las mismas. La médula ósea es un tejido altamente vascularizado<sup>131,132</sup>. En huesos largos, las arterias centrales longitudinales dan lugar a arterias radiales que a su vez se ramifican en arteriolas cerca del endostio<sup>131</sup>. La transición de las arteriolas al endotelio venoso ocurre en las proximidades del endostio. Los sinusoides venosos se extienden hacia la cavidad central donde se fusionan en un seno central grande. A pesar de la alta densidad vascular, la médula ósea es un ambiente hipóxico, con las menores tensiones de oxígeno cerca de los sinusoides en la cavidad central<sup>133</sup>. Los estudios iniciales, usando poblaciones marcadas enriquecidas en CMH trasplantadas en recipientes, sugerían una localización mayormente endostial de las CMH<sup>134-136</sup>. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la mayoría de las CMH son perivasculares y se concentran en la región endostial altamente vascularizada<sup>131,137</sup>. Esta región contiene una red compleja de células estromales, que participan en el mantenimiento de las CMH, incluyendo células óseas, endoteliales (arteriales y venosas), pericitos, células reticulares abundantes en CXCL12 (células CAR), nervios simpáticos y células de Schwann no mielinizantes. Muchos de los factores reguladores de las CMH en la médula ósea son producidos por estas poblaciones de células estromales. Los estudios más recientes sugieren la presencia de 2 nichos en la médula ósea: el nicho arteriolar<sup>138,139</sup> y el nicho sinusoidal-megacariocítico<sup>140,141</sup>. Existe evidencia de peso que indica que las señales del microambiente de la médula ósea son dinámicas y condicionadas por factores externos, como inflamación o estrés, y juegan un papel clave en la regulación de la hematopoyesis normal y maligna.

### 1.2.3. Especificación hematopoyética a partir de CMPH

El trasplante de médula ósea es la terapia de reemplazo celular más establecida. En 1951 Lorenz *et al.* describieron por primera vez el efecto protector de inyecciones de médula ósea de los efectos letales de la irradiación con rayos X en ratones y cobayas<sup>142</sup>. Más tarde, Thomas *et al.* infundieron médula ósea de cadáveres fetales y adultos en pacientes que recibieron radiación o quimioterapia<sup>143</sup>. El trasplante de médula ósea es el único tratamiento curativo en pacientes que sufren de desórdenes hematológicos. La unidad funcional de un trasplante de médula ósea es la CMH. La médula ósea, la sangre de cordón umbilical o la sangre periférica movilizada son

las únicas fuentes de CMH disponibles en la actualidad. La expansión de las CMH representa una posible fuente de unidades adicionales para el trasplante y se ha hecho un avance considerable en la definición de los mecanismos moleculares que permiten la expansión de CMH en cultivo<sup>144-146</sup>. Sin embargo, incluso los mejores protocolos solo alcanzan una expansión modesta de las CMH con capacidad de repoblar a largo plazo y, con frecuencia, estas CMH ven reducido su potencial multilinaje y migratorio comparado con CMH frescas. La expansión de los registros de donantes, el desarrollo de fuentes alternativas de CMH y el uso de nuevos regímenes de acondicionamiento han mejorado significativamente el acceso a trasplantes. Sin embargo, el fallo del trasplante, la enfermedad del injerto contra huésped y un retraso en la reconstitución suponen causas significativas de morbilidad y mortalidad tras el trasplante de medula ósea<sup>147,148</sup>, dejando al 50% de los pacientes con una incapacidad permanente o sin cura<sup>149</sup>.

Debido a las limitaciones de las fuentes tradicionales de CMH se han explorado formas alternativas de obtener CMH. Las 2 más prometedoras son mediante diferenciación directa a partir de CMPH y la reprogramación de células somáticas (conversión directa o transdiferenciación). La transdiferenciación es el proceso de cambio directo de linaje celular sin revertir a un estado pluripotente donde participan factores encargados de regular el epigenoma y reprogramar la identidad celular. Se han descrito numerosas conversiones directas, incluyendo muchos tipos celulares relevantes en terapia, como neuronas motoras<sup>150</sup>, células de isletas pancreáticas<sup>151-154</sup>, células  $\beta$ <sup>155</sup> y cardiomiocitos<sup>156</sup>. También se han llevado a cabo conversiones directamente entre tipos celulares hematopoyéticos gracias al gran conocimiento de los factores de transcripción específicos de cada linaje hematopoyético<sup>157-161</sup>. Estos estudios demuestran que las células del sistema hematopoyético son susceptibles de reprogramación resaltando el rol instructivo de determinados factores de transcripción.

La otra fuente alternativa es la obtención de CMH mediante la diferenciación directa de CMPH. Gracias a su capacidad de auto-renovación ilimitada y la posibilidad de diferenciarse al linaje hematopoyético las CMPH son un modelo único no solo para terapia celular en medicina regenerativa<sup>162,163</sup>, sino también para estudios de biología del desarrollo, especialmente durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Las CMPIH poseen dos ventajas añadidas con respecto a las CMEH. En primer lugar suponen una fuente inagotable de células inmunocompatibles con el donante para terapia, y además, nos posibilita la generación de modelos celulares de enfermedad a partir de pacientes humanos<sup>164,165</sup>. Una posible aplicación de las CMPIH sería la producción de células hematopoyéticas antitumorales. Las CMPIH podrían

diferenciarse a linfocitos T y células dendríticas que reconozcan antígenos tumorales induciendo una respuesta antitumoral específica<sup>166,167</sup>. Además, también se podrían usar las CMPIH para producir progenitores pan-mieloides autólogos para el manejo de las citopenias en pacientes con retraso en la reconstitución<sup>168</sup>. Finalmente, las CMPIH podrían servir como modelo *in vitro* donde analizar el efecto de distintos fármacos en los tipos celulares afectados por las alteraciones genéticas causantes de enfermedades e incluso posibilitar la terapia personalizada (screening de fármacos).

Todo este potencial de las CMPH dependerá de la optimización de protocolos de diferenciación robustos que reproduzcan los procesos que suceden *in vivo* conduciendo a la obtención de tipos celulares cuya morfología, funcionalidad y fenotipo sean lo más similares posible a sus homólogos *in vivo*. En el caso de la diferenciación hematopoyética se han establecido diversos protocolos que producen progenitores de vida corta que carecen de funcionalidad auténtica de CMH, aunque sí se han obtenido numerosos tipos celulares maduros con distintos grados de funcionalidad. La mayoría de los esfuerzos en este campo están centrados en desentrañar los mecanismos moleculares y celulares de las distintas etapas del desarrollo embrionario humano *in vitro*. Además, se están desarrollando protocolos de diferenciación, que mimeticen las diversas etapas de desarrollo embrionario hematopoyético *in vitro* y que permitan la obtención no solo de CMH funcionales sino de todo el amplio espectro de células hematopoyéticas maduras<sup>169</sup>.

En general, las aproximaciones para la diferenciación de las CMPH a células hematopoyéticas son similares a las CMPR. La primera diferenciación hematopoyética a partir de CMPH la consiguió Kaufman *et al.* mediante el co-cultivo con una línea estromal murina S17<sup>170</sup>. Desde entonces, se han desarrollado numerosos protocolos basados en formación de EBs y cultivos en 2D, incluyendo algunos libres de sueros y células de soporte<sup>171-178</sup>. Muchos factores que son imprescindibles para la especificación hematopoyética en ratones también lo son en humano, como BMP4, WNT, Activin A, FGF2 y VEGF<sup>171,173,176,179-186</sup>. Además, está bastante estandarizado el uso de determinadas citoquinas hematopoyéticas que promueven la diferenciación, siendo SCF, TPO, IL3 e IL6 las más usadas. Gracias a la constante evolución de estos protocolos de diferenciación se han conseguido identificar distintos tipos celulares implicados en el desarrollo hematopoyético, tales como el hemangioblasto<sup>102,103,106,187</sup> y el endotelio hemogénico<sup>178,186,188-193</sup>. Cabe destacar la importante labor desarrollada por el laboratorio del Dr. Slukvin en los últimos 10 años<sup>89,168,174,178,191,194-197</sup>. Otra estrategia usada para mejorar los protocolos de diferenciación es la expresión de factores de transcripción relevantes durante el desarrollo hematopoyético<sup>198</sup>. Además, la expresión ectópica de estos factores de

transcripción persigue la obtención de CMH funcionales capaz de mantener el sistema hematopoyético a largo plazo. Varios grupos hemos expresado distintos factores de transcripción individualmente (HOXB4<sup>198-200</sup>, Cdx4<sup>201</sup>, SOX17<sup>193,202-204</sup>, RUNX1a<sup>205</sup>, SCL<sup>206</sup> y HOXA9<sup>207</sup>) o en combinación (HOXA9+ERG+RORA+SOX4+MYB<sup>208</sup>, ETV2+GATA2 y GATA2+SCL<sup>197</sup>). En todos los casos se ha observado una mejora en la diferenciación hematopoyética, aunque en ninguno de estos estudios se ha conseguido la producción de CMH multipotentes de largo plazo.

Estos protocolos demuestran que se pueden generar células hematopoyéticas con capacidad clonogénica a partir de CMPH, aunque estos progenitores hematopoyéticos carecen de diferenciación linfóide y capacidad de reconstitución *in vivo* sólidas. Se cree que esta deficiencia es reflejo de un programa de desarrollo inmaduro. Varios estudios han detectado células hematopoyéticas humanas en la médula ósea de ratones y ovejas inmunodeficientes muchos meses después de la inyección intravenosa o intrafemoral de poblaciones enteras de CMPH diferenciadas o de células CD34+ derivadas de CMPH<sup>198,209-216</sup>. Sin embargo, dicha reconstitución siempre ha sido baja (entre un 0.1%-2%) y principalmente restringida al linaje mielóide. Estos estudios demuestran que los protocolos de diferenciación actuales no reproducen la complejidad del desarrollo hematopoyético embrionario que conduce a la especificación y expansión de las CMH.

#### 1.2.4. Control molecular del desarrollo hematopoyético embrionario.

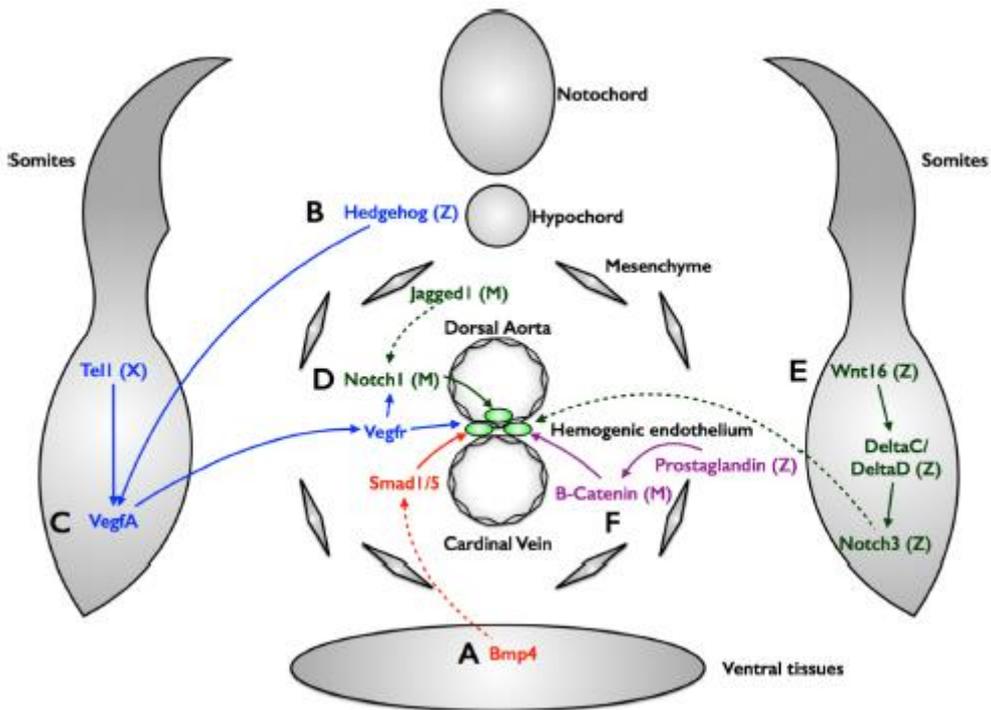
Tanto la especificación de las CMH durante el desarrollo como su posterior compromiso hematopoyético una vez formadas están firmemente controladas a nivel transcripcional. A partir de modelos experimentales deficientes se han identificado numerosos reguladores de la especificación, expansión, homeostasis y diferenciación de las CMH. Estos incluyen tanto a **factores de transcripción** como los **efectores de rutas de señalización**.

La correcta determinación de los ejes corporales, las capas germinales primarias y la compartimentalización del mesodermo en órganos y tejidos son prerequisites necesarios para la especificación hematopoyética. Conceptualmente, deben ocurrir al menos 5 pasos que posibilitarán la generación de las CMH: especificación del mesodermo, ventralización y posteriorización del mesodermo, lateralización del mesodermo, producción del endotelio del tronco arterial y especificación de las CMH a partir del endotelio hemogénico. El mesodermo aparece cuando células del epiblasto acceden a través de la estría primitiva, un proceso que requiere de la señalización de Nodal<sup>217</sup>, BMP<sup>218-220</sup>, FGF<sup>221,222</sup> y WNT<sup>223</sup>. La **especificación del mesodermo** y de las otras capas germinales se integra en el diseño dorso-ventral y antero-

posterior. La especificación de la sangre depende de este diseño ya que la aorta dorsal, y por tanto las CMH, se desarrolla a partir de la placa mesodérmica lateral ventro-posterior. En la **especificación antero-posterior** la señalización por WNT es activamente suprimida en la región anterior mediante secreción de antagonistas, mientras que ligandos de WNT y BMP cooperan para especificar el **mesodermo ventro-posterior**<sup>224–227</sup>. También se necesita la señalización por FGF para la especificación del mesodermo posterior<sup>221,222,228–230</sup>. A continuación, se produce la **lateralización del mesodermo** ventro-posterior (la aorta dorsal deriva de la placa lateral mesodérmica) mediante la acción combinada de WNT y BMP. Estudios en ratón y pez cebra muestran que la acción cooperativa de WNT3A, WNT8, BMP2B y BMP4 inducen la expresión de genes CDX (caudal-type homeobox), incluyendo Cdx1, Cdx2 y Cdx4<sup>219,231–234</sup>, los cuales regulan la expresión de genes HOX (homeobox genes). El paso inmediatamente anterior a la aparición de las CMH es el **desarrollo del endotelio hemogénico** que yace en la parte ventral de la aorta dorsal primitiva, la cual expresa el receptor de VEGF, KDR (también conocido como FLK1 o VEGFR2)<sup>91,92,235,236</sup>. En ratón y pollo, el endotelio aórtico bilateral converge en la línea media y se fusiona antes de la aparición de las CMH<sup>237</sup>. Antes de esta fusión, antagonistas de BMP impiden la migración de la aorta a la línea media<sup>238,239</sup>. Las CMH no aparecen hasta la formación del lumen de la aorta en la línea media. Las vías de Sonic hedgehog (Shh) and VegfA son requeridas para la especificación arterio-venosa y de las CMH, regulando la convergencia del hemangioblasto en la placa lateral del mesodermo.

La vía de Notch está involucrada en la formación temprana del tronco vascular de vertebrados, incluyendo la aorta dorsal que contiene el endotelio hemogénico. La señalización por Notch controla la especificación arterio-venosa<sup>240</sup>, conduciendo a la expresión de genes específicos de arteria incluyendo efrina B2 (Efnb2)<sup>241</sup>. La señalización de Notch es una parte integral conservada de la maduración del endotelio arterial del cual derivan las CMH. Además, es clave en la especificación de las CMH. Embriones de ratón o pez cebra con mutaciones o delección de Mib, que codifica una ubiquitin ligasa necesaria para la señalización de Notch, carecen de CMH<sup>242,243</sup>. Jagged1, ligando de la vía de Notch, contribuye a dicho proceso de especificación<sup>244</sup>. Notch1, receptor de Notch, es crítico para el desarrollo hematopoyético definitivo<sup>245</sup> aguas arriba de Runx1, el cual cuando es expresado de forma ectópica rescata la expresión génica hematopoyética en células deficientes en Notch1<sup>246</sup>. Se ha propuesto que la activación de Runx1 por Notch1 esta mediada por GATA2 ya que el promotor de Runx1 no contiene ningún elemento de respuesta a Notch. La recepción de la señalización por Notch es una de las pocas cosas que distinguen las CMH de las PEM<sup>245–248</sup>. La activación de las CMH mediada por Notch está

directamente regulada por el eje de señalización Shh-VegfA. La señalización por Shh regula la expresión en los somitas de Vegfa. Vegfa regula la expresión de marcadores arteriales en el supuesto endotelio arterial como efnb2a, así como el receptor de Notch, notch3<sup>249,250</sup>. Estos resultados sugieren un modelo en el cual la señalización por Shh induce la expresión de vegfa en los somitas. Vegfa activa la expresión de receptores de la vía de Notch en el endotelio arterial, potenciando la capacidad de recibir la señalización por Notch que se requiere para la especificación de las CMH. Otras vías de señalización como las vías canónicas ( $\beta$ -catenina)<sup>251-256</sup> y no canónicas (mediada por Wnt16) de WNT<sup>257</sup>, la prostaglandina E2<sup>258,259</sup>, el flujo sanguíneo (señalización por óxido nítrico)<sup>260-262</sup> y las catecolaminas-Gata3<sup>263-265</sup> juegan un papel muy relevante en la formación de las CMH.



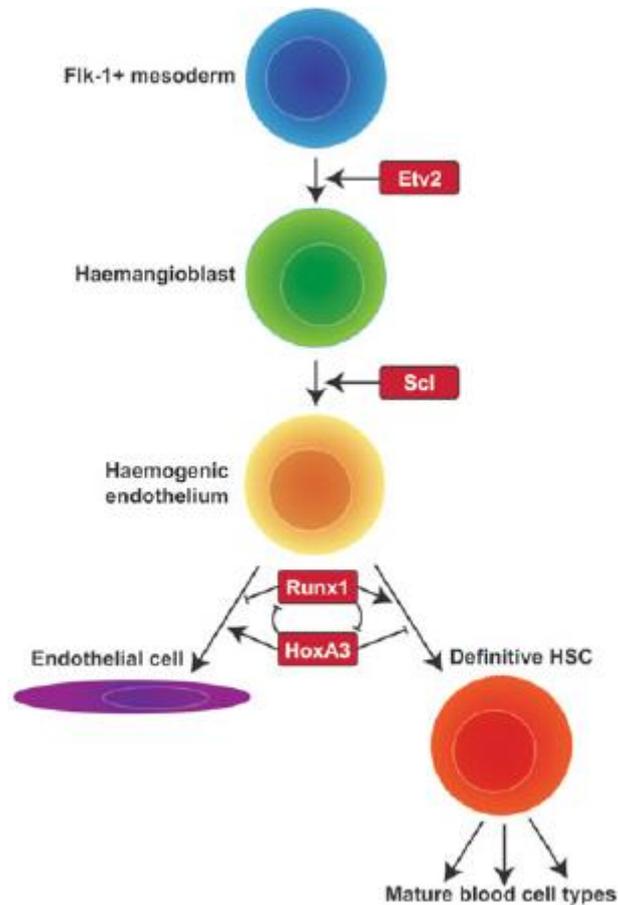
**Figura 1.2.4.1. Rutas de señalización celular implicadas en la especificación de las CMH.** Una sección transversal de un embrión vertebrado con los requerimientos de señalización de las vías Bmp (A), Hedgehog (B), Vegf (C), Notch (D), Wnt/Notch no canónica (E) y Wnt canónica (F) representadas. Los genes necesarios para la aparición de las CMH se encuentran anotados, incluyendo su sitio de expresión anatómico y su epistasis conocida dentro de cada ruta. Las especies se indican en aquellos casos que solo se ha identificado su función en ratón (M), Xenopus (X) o pez cebra (Z). Las líneas sólidas indican que existe evidencia de una relación genética entre proteínas, mientras que las líneas discontinuas indican relaciones plausibles pero no investigadas. Adaptada de Kim *et al.*<sup>266</sup>

Por otro lado, se ha identificado un gran número de factores de transcripción que juegan un rol crucial en la especificación de las CMH durante el desarrollo. En la **formación del**

**hemangioblasto** a partir del mesodermo destaca **Etv2**. Etv2 es esencial para el desarrollo de los linajes endotelial y hematopoyético en un estadio temprano<sup>267</sup>. Los precursores mesodérmicos del hemangioblasto se generan en embriones que no expresan Etv2, pero su especificación más allá se ve bloqueada. Además, Etv2 se expresa pronto en el mesodermo en desarrollo y marca una subpoblación de células mesodérmicas Flk1+ con un potencial endotelial y hematopoyético aumentado. **Scl** es clave en el compromiso del hemangioblasto hacia el endotelio hemogénico. Scl se empieza a expresar en el hemangioblasto y su expresión se mantiene durante el endotelio hemogénico y las CMH<sup>106,268</sup>. La expresión de Scl está regulada por varios enhancers específicos de tejido, incluyendo 3 importantes en la hematopoyesis.

En la **especificación del endotelio hemogénico** a las CMH participan numerosos factores siendo claves algunos como Runx1, Mll1, TFIIIS, Gata2, Notch1, Meis1, Erg, c-Myb y c-Myc. Tanto **Runx1** como su compañero CBF $\beta$  son necesarios para el establecimiento de la hematopoyesis definitiva<sup>269-271</sup>. Chen *et al.* han demostrado que la TEH depende de Runx1<sup>79</sup>. Nottingham *et al.* identificaron un importante enhancer en la región +23 que regula la expresión de Runx1 durante la aparición de las CMH mediante la unión de factores Gata, Ets y Scl<sup>272</sup>. La histona metiltransferasa (H3K4) **Mll1** es necesaria para la hematopoyesis definitiva ya que ratones que no la expresan mueren durante el desarrollo embrionario<sup>273</sup>. El factor de elongación S-II (**TFIIIS**) también es necesario para la hematopoyesis definitiva<sup>274</sup>. El factor de transcripción con dedos de zinc **Gata2** se expresa antes de que aparezcan las primeras CMH y se piensa que marca células con especificación hematopoyética<sup>275</sup>. Gata2 es esencial para la hematopoyesis definitiva. Gata2 parece tener un rol que solapa con Runx1 en la hematopoyesis definitiva ya que ratones heterocigotos Gata2+/- Runx1+/- no son viables presentando defectos en la hematopoyesis en mitad de la gestación, mientras que los heterocigotos simples son viables con un fenotipo hematopoyético menor<sup>276</sup>. El factor de transcripción **Erg** es crítico para el mantenimiento temprano pero no para la especificación de las CMH definitivas ya que su delección resulta en una pérdida rápida de CMH<sup>277</sup>. Se piensa que actúa como un regulador aguas arriba de Scl, Gata2 y Runx1<sup>272,278,279</sup>. **Meis1**, un miembro de la subfamilia TALE de proteínas Homeobox, es un cofactor de las proteínas Hox que modula su afinidad y especificidad de unión al ADN. Se han generado varios modelos de ratón deficientes en Meis1 y todos presentan fenotipos similares: los ratones mueren en torno a E14.5 con hemorragias e hiperplasia del hígado debido a una hematopoyesis deficiente<sup>280,281</sup>. La hematopoyesis definitiva está comprometida pero no es completamente eliminada, ya que los hígados fetales de ratones deficientes en Meis1 a E12.5 tienen una población reducida de CMH que carecen de capacidad

de reconstitución. **HoxA3** es un regulador positivo de la especificación endotelial del endotelio hemogénico. Actúa manteniendo la expresión de los genes endoteliales mediante la represión directa la expresión de Runx1. Éste a su vez, tiene un efecto antagónico a HoxA3 porque induce la expresión de una cascada de factores de transcripción hematopoyéticos y reprime los genes endoteliales<sup>282</sup>.



**Figura 1.2.4.2. Modelo de especificación de las CMH definitivas a partir del mesodermo durante el desarrollo embrionario.** Las CMH definitivas derivan del mesodermo Fik1+, que se diferencia a través de un progenitor bipotente hemangioblástico (dependiente de Etv2) y un estadio bipotente endotelio hemogénico (dependiente de Scl). La especificación del endotelio hemogénico a células hematopoyéticas o endoteliales es dependiente de la expresión de los factores de transcripción antagonistas Runx1 y HoxA3, respectivamente. Adaptada de Wilkinson *et al.*<sup>283</sup>.

Una vez generado el endotelio hemogénico de él se originarán las primeras CMH como comentamos con anterioridad en un proceso denominado TEH. Se estima que en torno al día E11.5 existe únicamente una CMH por AGM. La expansión de estas CMH tempranas es crítica para formar una población suficientemente grande como para mantener la hematopoyesis a lo largo de la vida de un organismo. Esta propiedad de expansión es característica de las CMH fetales a diferencia de las CMH adultas, que mantienen el tamaño de población. **Sox17** es un

factor de transcripción que se expresa exclusivamente durante la hematopoyesis fetal y neonatal, y desaparece en las CMH adultas<sup>284</sup>. Recientemente, se ha observado que Sox17 es necesario para la especificación del endotelio hemogénico pero se requiere que su expresión disminuya para la TEH<sup>285</sup>.

### 1.3. RUNX1 y hematopoyesis

De los numerosos factores de transcripción descritos en el apartado anterior hay uno que destaca por ser crítico durante la TEH, una etapa clave del desarrollo hematopoyético: el factor transcripcional RUNX1.

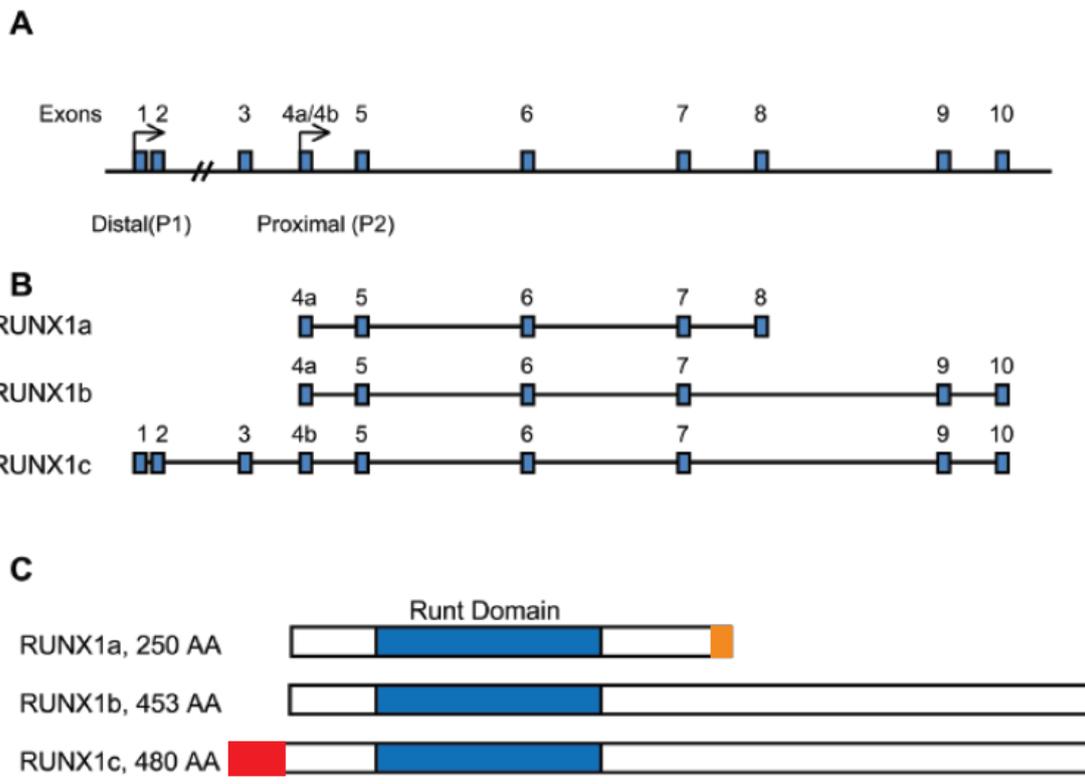
#### 1.3.1. Estructura y regulación

RUNX1, también conocido como AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1), CBF $\alpha$ 2 (Core Binding Factor  $\alpha$ 2) o PEPBP2 $\alpha$ B (Polyomavirus enhancer binding protein 2  $\alpha$ B), pertenece a la familia de factores de transcripción Runt (CBF). La proteína Runt fue inicialmente descubierta en *Drosophila*, codificada por el gen *runt*, y se requiere para la segmentación normal, determinación sexual y neurogénesis durante la embriogénesis de *Drosophila*<sup>286,287</sup>. También se le denomina AML1 debido al descubrimiento de su secuencia génica en un paciente humano con leucemia mieloide aguda (LMA) positiva para (t8;21)<sup>288</sup>. Además de RUNX1, existen otros 2 genes RUNX en ratones y humanos: RUNX2 y RUNX3. RUNX2 es necesario para la formación del hueso<sup>289</sup> y RUNX3 parece estar implicado en el desarrollo de linfocitos T citotóxicos<sup>290</sup> y los sistemas gastrointestinal<sup>291,292</sup> y neurales<sup>293</sup>.

El locus de RUNX1 en humanos se encuentra en el cromosoma 21q22.12, se expande 260 kb y está compuesto por 12 exones<sup>294</sup>. Su expresión está regulada por 2 regiones promotoras distintas, denominadas *P1* o promotor distal y *P2* o promotor proximal<sup>295</sup>, separadas por 160 kb (Figura 8A). Mediante el uso diferencial de estos 2 promotores además del splicing alternativo se producen numerosos transcritos a partir del gen, que difieren en sus regiones 5'UTR, 3'UTR y en los exones que los componen. Todas las isoformas contienen el dominio Runt localizado en el extremo N-terminal. Este dominio de 128 aminoácidos, también conocido como Runt Homology Domain (RHD), está presente en todos los miembros de la familia CBF y es necesario para la unión al ADN, en concreto a la secuencia consenso YGYGGT, y a ciertas proteínas, especialmente con su subunidad  $\beta$  denominada core binding factor  $\beta$  (CBF $\beta$ ) que incrementa 10 veces su afinidad por el ADN<sup>296,297</sup>. Las distintas regiones 5'UTR derivadas de ambos promotores actúan como reguladores de la traducción *in vivo*. La región UTR-1 conduce a una

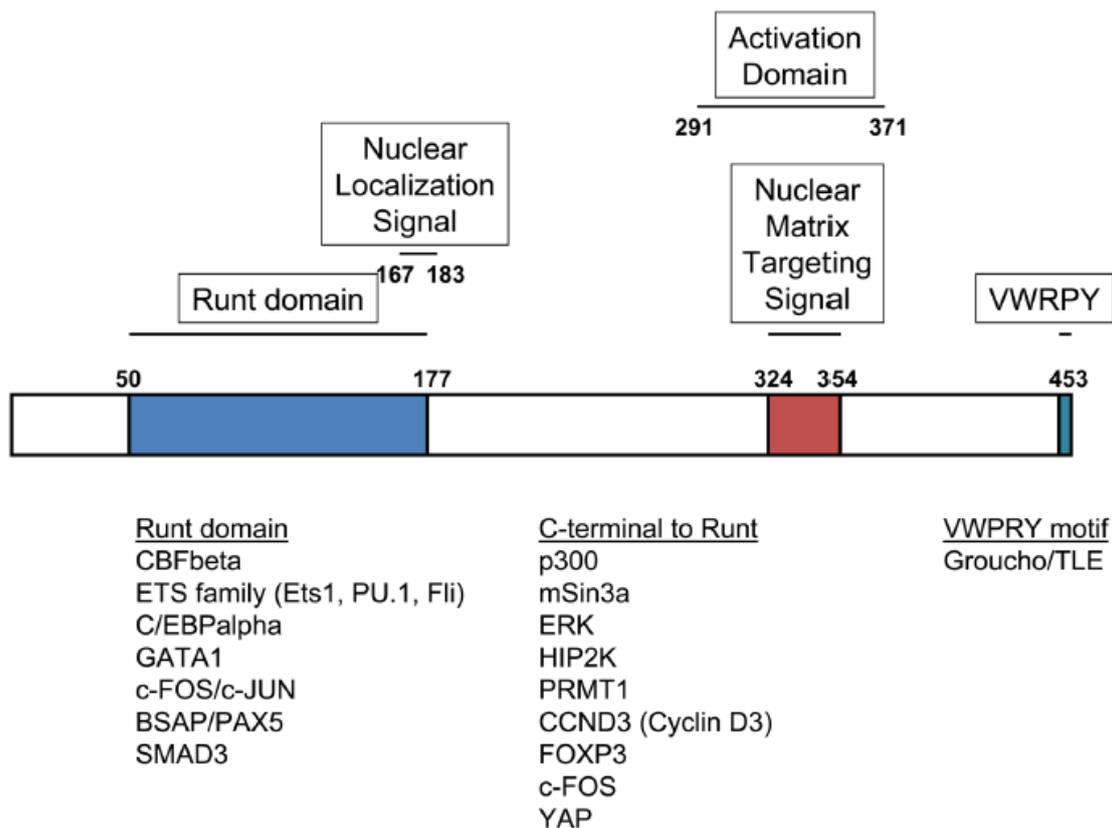
traducción dependiente de cap mientras que la UTR-2 contiene un IRES (Internal Ribosome Entry Site) y conduce a una traducción independiente de cap<sup>298</sup>. Esta regulación multinivel (uso diferencial de promotores, splicing alternativo y mecanismos de traducción) permite la generación de niveles adecuados de las isoformas relevantes en cada tipo celular y en el momento correcto. Los 2 promotores dependen de un elemento cis-regulador localizado aproximadamente 23.5 kb aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción del promotor distal<sup>272,299</sup>. Este elemento cis-regulador posee sitios de unión para varios factores de transcripción hematopoyéticos tales como Gata2, Scl y Lmo2<sup>272</sup> y es capaz de dirigir la expresión de marcadores genéticos (LacZ o GFP) a CMH y el endotelio hemogénico en ratones transgénicos<sup>299,300</sup>. Finalmente, RUNX1 también está regulado a nivel post-transcripcional por la acción de miRNAs<sup>301</sup>.

De estos múltiples transcritos o isoformas, hay 3 principales que han sido las más estudiadas hasta ahora, denominadas *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c* (Figura 8B). *RUNX1a*, con 250 aminoácidos, y *RUNX1b*, con 453 aminoácidos, comparten la misma región N-terminal y son el resultado de splicing alternativo, ya que proceden ambas del promotor proximal P2<sup>302</sup>. *RUNX1a* carece de dominios reguladores de la transcripción presentes en el extremo C-terminal común en *RUNX1b* y *RUNX1c*<sup>303</sup>, por lo que se considera que actúa como dominante negativo. *RUNX1c*, con 480 aminoácidos, es la más larga de todas las isoformas de RUNX1 y es transcrita a partir del promotor distal *P1*, poseyendo un extremo N-terminal único (Figura 8C).



**Figura 1.3.1.1. Isoformas de RUNX1 y su locus genómico.** (A) Locus genómico de RUNX1 en el cromosoma 21 con la localización de los promotores proximal y distal y los exones basados en la base de datos del NCBI Nucleotide. (B) Composición exónica de las 3 isoformas principales de RUNX1. (C) Esquema de la estructura proteica (posición del dominio de unión al ADN Runt) y su número de aminoácidos de las 3 principales isoformas de RUNX1. En rojo la porción única de la isoforma RUNX1c y en naranja la porción única de la isoforma RUNX1a. Adaptada de Lam *et al.*<sup>304</sup>

RUNX1 posee otros dominios proteicos que permite su interacción con otras proteínas nucleares para regular la transcripción de sus genes diana (Figura 9). RUNX1 contiene una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal que ayuda en la activación transcripcional<sup>305</sup>. Al final del extremo C-terminal existe un motivo VWRPY conservado entre todos los miembros de la familia Runt. Este motivo media la actividad represora de RUNX1 dependiente de Groucho/TLE<sup>306,307</sup>. RUNX1, además de interactuar con CBF $\beta$ , interacciona con numerosos factores de transcripción y co-reguladores transcripcionales. Por ejemplo, RUNX1 y Ets1 interaccionan mediante el dominio Runt de RUNX1 para coordinar la actividad transcripcional del receptor de células T<sup>308,309</sup>. Se ha demostrado que RUNX1 interacciona con PU.1<sup>310</sup>, CEBP $\alpha$ <sup>311</sup>, p300<sup>312</sup>, mSin3a<sup>313</sup>, GATA1<sup>314,315</sup> y Fli1<sup>316</sup>, entre otros<sup>276,317,318</sup>. Además de todos estos niveles de regulación e interacciones proteína-proteína, existen una serie de modificaciones post-traduccionales, como fosforilación<sup>319,320</sup>, ubiquitinación<sup>321</sup> y metilación<sup>322</sup> que también regulan la función de RUNX1.



**Figura 1.3.1.2. Dominios proteicos de RUNX1 y sus compañeros de interacción.** Se muestra la isoforma RUNX1b con los dominios principales listados en la parte superior y los compañeros de interacción listados en la parte inferior. Adaptada de Lam *et al.*<sup>304</sup>

### 1.3.2. RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria

Como hemos explicado anteriormente, la hematopoyesis embrionaria se divide básicamente en dos fases: hematopoyesis primitiva y definitiva. En ratón, la hematopoyesis primitiva comienza en el saco vitelino a E7.25 produciendo eritrocitos y megacariocitos primitivos. La hematopoyesis definitiva empieza a E8.25 con la producción transitoria de PEM<sup>62,67</sup>, seguida de progenitores linfoides en saco vitelino, P-Sp y placenta a E9.0<sup>323,324</sup> y CMH a E10.5 en el AGM y arterias vitelina y umbilical<sup>63,325</sup>. Runx1 se expresa en el mesodermo del saco vitelino y en el endotelio hemogénico desde E7.5 hasta poco después de E11.5, por lo que participa en ambas fases. Su expresión se encuentra en todos los sitios de hematopoyesis en el embrión y precede la aparición de los progenitores hematopoyéticos definitivos y las CMH.

Durante la hematopoyesis primitiva, ratones deficientes en *Runx1* no producen macrófagos y sus progenitores *in vivo*, al igual que ocurre con la diferenciación hematopoyética *in vitro* a partir de CMER<sup>101,326</sup>. Por otro lado, la pérdida de Runx1 no afecta a la aparición de eritrocitos primitivos y megacariocitos diploides primitivos<sup>269,327-329</sup>, aunque no escapan indemnes. Una proporción de

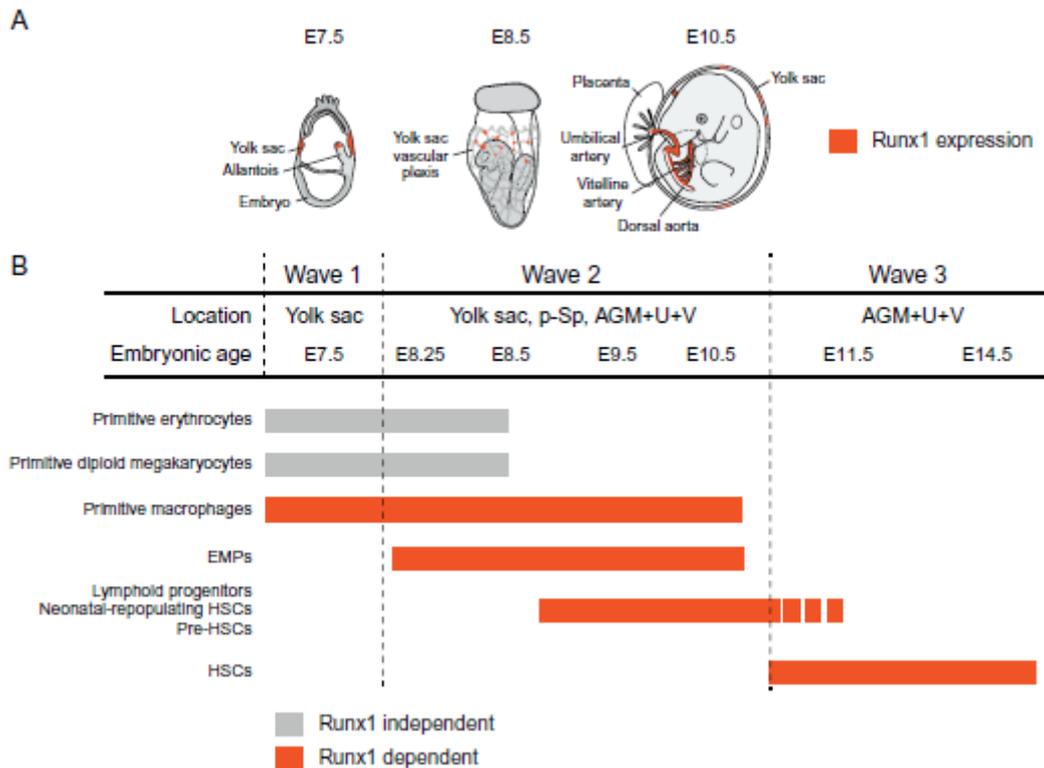
los eritrocitos primitivos presentan morfología anormal y expresión reducida del marcador eritroide Ter119 y de los factores de transcripción eritroides Klf1 y Gata1<sup>330</sup>. Los megacariocitos primitivos diploides son menos numerosos en embriones deficientes en *Runx1* y producen un menor número de plaquetas<sup>329</sup>.

Durante la hematopoyesis definitiva, tanto los PEM, los progenitores linfoides y las CMH se diferencian a partir del endotelio hemogénico<sup>77-79,91,92,323</sup> y su formación depende estrictamente de RUNX1<sup>79</sup>, así como de su heterodímero CBF $\beta$ <sup>66</sup>. La presencia de transcritos de *Runx1* en la parte ventral de la aorta dorsal esta conservada entre todas las especies de vertebrados que han sido examinados<sup>331-336</sup>. La necesidad de *Runx1* para la hematopoyesis definitiva queda reflejada en el hecho de que ratones deficientes en *Runx1* mueren en torno a E11.5-12.5 debido a la ausencia de hematopoyesis definitiva<sup>269,337</sup>. Esta ausencia de hematopoyesis definitiva se observa en todos los lugares hematopoyéticos del embrión de ratón (saco vitelino, arterias vitelina y umbilical, AGM, alantoides/placenta, hígado fetal y timo)<sup>270,271,324,336,338-340</sup>. La deficiencia en *Runx1* bloquea la formación de los CHIA *in vivo*, sin afectar a la migración/incorporación de células endoteliales al endotelio arterial ni a la especificación del endotelio hemogénico, lo que sugiere que *Runx1* es necesario para la TEH<sup>336,338</sup>.

La vasculatura de los embriones deficientes en *Runx1* es mayormente normal, con deficiencias sutiles en el número de capilares pequeños y ramificación vascular<sup>341</sup>. Modelos más refinados de delección condicional demuestran que la delección de *Runx1* en células endoteliales VEC+ (Vascular Endothelial Cadherin) bloquea por completo la formación de PEM y CMH<sup>79</sup>, confirmándose que *Runx1* es necesario para la TEH. Sin embargo, la delección de *Runx1* en células hematopoyéticas VAV1+ (VAV guanine nucleotide exchange factor 1) no elimina los PEM o las CMH, aunque si se detectan defectos en linajes específicos, como linfocitos o megacariocitos<sup>79,342</sup>. Por tanto, *Runx1* es necesario para la TEH pero no después.

Otro estudio demuestra como *Runx1* es requerido en distintos momentos del desarrollo embrionario en el endotelio hemogénico para la formación de los PEM y de las CMH. A día E10.5 la mayoría de los PEM se han diferenciado a partir del endotelio hemogénico y la delección de *Runx1* hasta ese momento, pero no después, impacta negativamente el número de PEM. En cambio, la delección de *Runx1* entre los E10.5-11.5 no tiene impacto en los PEM aunque elimina completamente las CMH en el AGM y en las arterias umbilical y vitelina<sup>343</sup>. El requerimiento temporal separado de *Runx1* para la formación de los PEM y las CMH es consistente con el hecho de que los PEM y las CMH son detectadas por primera vez en distintos momentos<sup>344</sup>. Por

otro lado, la haploinsuficiencia de *Runx1* resulta en un cambio dramático en la distribución espacio-temporal de las CMH, apareciendo un día antes de lo habitual en el saco vitelino (E10) a la vez que en el AGM<sup>327</sup>. A día E14.5 ya no es visible la expresión de *Runx1* en células endoteliales y los clústeres hematopoyéticos en las arterias principales casi han desaparecido. Las células que nacieron en las arterias se han liberado a la circulación y han colonizado el hígado fetal y el timo<sup>336,345</sup>.



**Figura 1.3.2.1. Oleadas de aparición de células hematopoyéticas, sitios de expresión de Runx1 y dependencia de progenitores/CMH de la actividad de Runx1.** (A) Diagramas esquemáticos (de izquierda a derecha) de embriones a días E7.5 (placa neural), E8.5 y E10.5. Los sitios de expresión relevantes en la aparición de progenitores/CMH se encuentran coloreados en naranja. Estos incluyen las islas sanguíneas del saco vitelino y el extremo distal del alantoides a día E7.5; el endotelio homogéneo y pequeños grupos de PEM en el plexo vascular del saco vitelino del embrión a día E8.5; y en la parte ventral de la aorta dorsal, las arterias umbilical y vitelina y en pequeños clústeres hematopoyéticos en el saco vitelino a día E10.5. (B) Las 3 oleadas de formación de la sangre, descritas por Yoder<sup>346</sup>. Los progenitores que emergen se indican a la izquierda. Los progenitores/CMH que requieren de Runx1 para su aparición se indican con barras naranjas. Los progenitores linfoides son dependientes de CBF $\beta$ <sup>347,348</sup>. Solo se muestran los tiempos y sitios de aparición de progenitores/CMH, no mostrándose la persistencia de estas células en ratones adultos. AGM+U+V, región AGM y arterias umbilical y vitelina. Adaptada de Tober *et al.*<sup>349</sup>

También se ha investigado la implicación de las isoformas principales durante el desarrollo embrionario del sistema hematopoyético. Para ello se han creado ratones transgénicos con

genes reporteros (*P1-LacZ* o *P1-GFP* y *P2-LacZ* o *P2-hCD4*) bajo el control o bien del promotor *P1* (principalmente isoforma *RUNX1c*) o *P2* (isoformas *RUNX1a* y *RUNX1b*) y se ha analizado su expresión a lo largo del desarrollo embrionario. En ambos modelos se ha encontrado que la activación del promotor *P2* comienza pronto en el desarrollo, expresándose en primer lugar eritrocitos primitivos, antes que la activación del promotor *P1*. Este promotor se activa transcripcionalmente en torno a la aparición de las primeras CMH y va ganando importancia relativa con respecto a *P2*, que a partir de entonces empieza a reprimirse, hasta que en las CMH adultas solo es detectable *P1*<sup>350,351</sup>. Sin embargo, en pez cebra los patrones de expresión son contrarios; *P1* es el primer promotor en activarse en los PEM, mientras que *P2* se activa más tarde y está localizado en CMH<sup>352</sup>. Estos resultados probablemente reflejan diferencias inherentes en la regulación de los promotores entre distintas especies. Los laboratorios del Dr. Groner y la Dra. De Bruin han establecido modelos de ratón deficientes tanto en *P1* como en *P2* de forma independiente. Ambos modelos experimentales presentan una ausencia casi total de CHIA y profundos defectos hematopoyéticos, aunque solamente la delección de *P2* es letal poco después del nacimiento<sup>353</sup>.

### 1.3.3. RUNX1 en la hematopoyesis adulta

Una vez establecidas las CMH, *Runx1* deja de ser crucial para la supervivencia de los embriones de ratón<sup>79</sup>, aunque *Runx1* se expresa ampliamente en las células hematopoyéticas maduras fetales<sup>354,355</sup>. La delección condicional de *Runx1* en ratones adultos, sin embargo, resulta en un desequilibrio hematopoyético que se manifiesta con disminución de linfocitos periféricos, expansión de monocitos y granulocitos y maduración deficiente de linfocitos T<sup>356-358</sup>, que conlleva al desarrollo de esplenomegalia y linfomas en uno de los modelos murino<sup>359</sup>. Además, *Runx1* también es crítico en la maduración megacariocítica y producción de plaquetas<sup>360,361</sup>, ya que participa en la represión de genes importantes para la diferenciación eritroide<sup>362</sup>. Sin embargo, su relevancia en el mantenimiento de las CMH adultas está un poco más en entredicho con resultados contradictorios. La mayoría de estudios reportan una expansión de las CMH en la médula ósea de ratones deficientes en *Runx1*<sup>357,360,363-365</sup> debido a una mayor auto-renovación y una menor apoptosis<sup>342,364</sup>. Uno de los estudios muestra que tras una fase inicial de expansión, el número de CMH decrece debido a que se agotan con el tiempo<sup>365</sup>. Por el contrario, Cai *et al.* no observan ni mayor auto-renovación ni agotamiento tras someter a los animales a un estrés proliferativo<sup>342</sup>. Por otro lado, Growney *et al.* describen que a pesar del mayor número de CMH encontradas en la médula ósea, éstas tienen comprometido su potencial de reconstitución de la hematopoyesis a largo plazo<sup>357</sup>. En todos los casos parece bastante claro que la deficiencia de

*Runx1* en estadio adulto predispone a las CMH a desarrollar leucemias/linfomas tras un segundo evento transformante. Esta predisposición a desarrollar enfermedades hematológicas puede ser explicada, al menos en parte, por una mayor resistencia a estreses genotóxicos y endógenos debido a una biogénesis ribosomal y apoptosis disminuidas. En consecuencia, se seleccionan CMH más resistentes que pueden perdurar en el tiempo, acumular nuevas alteraciones genéticas y expandirse propiciando una transformación leucémica<sup>366</sup>. Cabe destacar que la haploinsuficiencia de *Runx1* no desencadena leucemia, aunque se observan fenotipos leves como un número reducido de plaquetas y un mayor número de progenitores hematopoyéticos en ratones *Runx1 +/-*, manifestaciones idénticas a las descritas en pacientes con desorden plaquetario familiar (DPF)<sup>367,368</sup>.

A nivel de isoforma también se ha estudiado la activación de los promotores *P1* y *P2* a lo largo del sistema hematopoyético en ratones adultos. *P1* es el promotor dominante en la hematopoyesis adulta, encontrándose activo en todas las poblaciones que expresan *Runx1*<sup>369</sup>. La activación de *P2* es mucho más heterogénea, confinada a subpoblaciones de progenitores de los linajes granulocítico-monocitos, linfocítico y megacariocítico<sup>369</sup>. Con la excepción de los megacariocitos, parece ser que la represión de *P2* es un prerrequisito para la diferenciación terminal de estos linajes.

Además del análisis de expresión también se han llevado a cabo estudios de funcionalidad. La determinación de la función que lleva a cabo cada isoforma específicamente ha llevado a resultados contradictorios entre distintos estudios. Por un lado, se ha observado que la sobre-expresión de *Runx1a* potencia la capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético de las CMH en ratón<sup>370</sup> y, además, expande el número de CMH funcionales, promoviendo auto-renovación y proliferación<sup>371</sup>. Sin embargo, otro estudio ha observado que su sobre-expresión contribuye a dar lugar a una hematopoyesis anormal, provocando un fenotipo leucémico en ratones<sup>372</sup>, además de demostrar que *RUNX1a* está altamente expresado en algunas leucemias<sup>303,372</sup>. En cuanto a *Runx1b*, en un estudio muestran que su sobre-expresión en CMH promueve diferenciación *in vitro* inhibiendo la capacidad de reconstitución *in vivo*<sup>370</sup>. Por el contrario, Challen y Goodell observan que la expresión ectópica de *RUNX1b* induce quiescencia en CMH fetales y adultas de ratón *in vitro* e *in vivo*<sup>373</sup>. En este mismo estudio, *Runx1c*, al igual que *Runx1b*, promovió quiescencia en CMH fetales<sup>373</sup> y adultas de ratón *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, un estudio reciente ha observado que el promotor *P1* (el que dirige la expresión de *Runx1c*) se encuentra activo en todas las células hematopoyéticas adultas de ratón (excepto en eritrocitos), lo que sugiere que participa en la proliferación y/o diferenciación desde las CMH

hasta células hematopoyéticas adultas<sup>369</sup>. La deficiencia de *Runx1c* en adultos no elimina la hematopoyesis adulta pero provoca ciertas anomalías en determinados linajes, con disminución de plaquetas, aumento de colonias eritroides derivadas de células de medula ósea y ratio CD4 SP/CD8 SP mucho menor que ratones wild-type<sup>369</sup>.

## **2. HIPÓTESIS**

A lo largo de la historia se ha estudiado el desarrollo embrionario humano a partir de abortos espontáneos. Con la llegada de la FIV se empezaron a cultivar los primeros embriones humanos *in vitro*, permitiendo el estudio de procesos que ocurren antes de la implantación porque es éticamente impermisible alargar el cultivo de un embrión humano más allá de este periodo. La obtención de las CMEH ha hecho posible el estudio de los procesos embrionarios post-implantación (gastrulación, somitogénesis, histogénesis y organogénesis). Las CMEH suponen un modelo ideal para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a procesos de especificación embrionaria, con enormes implicaciones en biología del desarrollo y medicina regenerativa.

El sistema hematopoyético es el primero en generarse durante el desarrollo embrionario. Es un sistema derivado del mesodermo con una dinámica espacio-temporal compleja y muy regulada. La mayoría del conocimiento acerca de su biología proviene de modelos animales, especialmente el ratón. Los mecanismos moleculares que orquestan su regulación han sido muy estudiados en dichos modelos animales. Existen numerosas rutas de señalización y factores de transcripción identificados que juegan distintos papeles en el desarrollo hematopoyético, pero poco se sabe a día de hoy de lo que ocurre en humanos. Nosotros hemos centrado nuestro interés en el factor transcripcional RUNX1 que posee un papel crítico en la TEH. Su ausencia imposibilita la formación de las CMH y la viabilidad del ratón. En humanos, se desconoce si RUNX1 es necesario para la hematopoyesis definitiva.

Por todo lo anterior, la hipótesis de nuestro estudio es que RUNX1 debe ser imprescindible durante el desarrollo hematopoyético embrionario en humanos. Consideramos que la expresión de RUNX1 potenciará la diferenciación hematopoyética de CMEH.

El trasplante de medula ósea es la terapia de reemplazo más frecuente. La unidad funcional del trasplante de medula ósea es la CMH, procedente de cordón umbilical, medula ósea o sangre periférica. Su limitada disponibilidad, la dificultad de expansión *ex vivo* y los problemas inmunogénicos en el hospedador han propiciado la búsqueda de fuentes alternativas de CMH. Una de ellas es la generación de CMH a partir de CMEH. Se han llevado a cabo numerosos intentos para obtener CMH funcionales a partir de CMEH, consiguiendo en los mejores casos CMH con capacidad de reconstitución a corto plazo reducida y con clara deficiencia en el establecimiento del linaje linfóide. Una de las posibles estrategias para solventar estas limitaciones es la sobre-expresión de factores de transcripción con un papel relevante en la hematopoyesis para dotar de funcionalidad *in vivo* a largo plazo.

Es por ello que hipotetizamos que la sobre-expresión de RUNX1 puede dotar de funcionalidad a las células hematopoyéticas producidas a partir de CMEH, promoviendo la reconstitución a largo plazo de ratones inmunodeprimidos. Además, la determinación de los mecanismos moleculares regulados por RUNX1 durante la diferenciación nos permitirían su modulación de manera alternativa sin necesidad de introducir el gen mediante transducción lentiviral. Esto supondría un considerable avance en la mejora de los protocolos de diferenciación *in vitro* actuales y la posibilidad de realizar trasplantes hematopoyéticos a partir de CMEH en el futuro.

## **3. OBJETIVOS**

Para responder a las hipótesis anteriores proponemos 4 objetivos:

1. Estudiar la dinámica de expresión de las isoformas de RUNX1 durante la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH.
2. Dilucidar el rol de RUNX1 en la hematopoyesis humana
  - a. Ganancia de función (Sobre-expresión)
  - b. Pérdida de función (Knock-down y knock-out)
3. Evaluar la capacidad de reconstitución hematopoyética de las CMEH que sobre-expresan RUNX1 mediante ensayos de trasplante en ratones inmunodeficientes.
4. Analizar el perfil de expresión génica desencadenado por la expresión constitutiva de RUNX1.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 4.1. Cultivo de CMEH

Las líneas de CMEH AND1, H9, HS181 y HES3 fueron mantenidas en estado indiferenciado en cultivo con y sin células de soporte. Durante el mantenimiento de rutina las CMEH fueron cultivadas en frascos T25 sobre una monocapa de células madre mesenquimales humanas (CMMH) previamente irradiadas ( Gy) en medio compuesto por 80% de KO-DMEM (Knock-out Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 20% KOSR (Knock-Out Serum Replacement), 1% Non-essential aminoacids, 1mM L-glutamine, 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol y 8 ng/ml de FGF2 (todo de Invitrogen menos el FGF2 de Miltenyi Biotech). Cuando se iba a realizar un experimento de diferenciación hematopoyética las CMEH se cultivaron en T25 cubiertos con Matrigel (BD Bioscience) en medio condicionado por células madre mesenquimales humanas (MC-CMMH, básicamente el mismo medio descrito anteriormente enriquecido con moléculas secretadas por las CMMH)<sup>374</sup> suplementado con 8 ng/ml de FGF2 (Miltenyi Biotech), para evitar que células madre mesenquimales humanas fueran co-cultivadas junto con las CMEH. El medio de cultivo se reemplazó diariamente y cultivos confluentes fueron subcultivados cada 5-7 días mediante disociación con 200U/ml de Collagenase IV (Invitrogen, Edinburgh, UK) seguido de raspado con rasquetas celulares. La línea HES3 RUNX1c  $-/-$  fue generada mediante recombinación homóloga convencional<sup>193,375</sup>. El comité nacional para el manejo de células madre aprobó el trabajo con estas CMEH.

#### 4.2. Estrategia de clonaje, vectores lentivirales y transducción

El ADNc humano de *RUNX1c* (Addgene #12426) fue subclonado direccionalmente en el vector intermediario KJ-EGFP-2A (amablemente cedido por el Dr. Garcia-Perez; GENyO, Granada, España). Después, el cassette completo EGFP-2A-Flag-*RUNX1c* fue extraído y clonado en el vector pRRL-EF1 $\alpha$ -PGK-NEO (Figura 4.2.1) previamente cortado en los sitios PmeI (generosamente provisto por el Prof. Trono, Lausanne, Suiza). Basado en un backbone pRRL<sup>376</sup>, el vector carece de actividad promotora y de enhancer en su 3' LTR (Long Terminal Repeat) eliminando el riesgo de activación de oncogenes, lo que se denomina auto-inactivación o SIN (Self-inactivating). La extensión central de polipurinas (cPPT, central polypurine tract) aumenta la eficiencia de transducción drásticamente, facilitando la importación nuclear. EF1 $\alpha$  es el promotor del factor de elongación 1 $\alpha$ , promotor constitutivo de origen humano que se usa para dirigir expresión ectópica de genes tanto *in vitro* como *in vivo*. Se suele usar en aquellos sistemas en los que el promotor CMV (Cytomegalovirus) tiene baja o nula actividad, como en CMEH<sup>377</sup>. PGK es el promotor de la fosfoglicerato quinasa, promotor constitutivo humano que facilita la

expresión de transgenes en CMEH a largo plazo<sup>377</sup>. Neo (Neomycin resistance cassette), técnicamente conocido como aminoglicósido 3' fosfotransferasa, es un gen que codifica una enzima que inactiva por fosforilación a los antibióticos aminoglicósidos, como la neomicina o la geneticina (o G418 sulfato), permitiendo a las células que lo expresan ser resistentes a la exposición a estos antibióticos. Se usa para seleccionar a las líneas celulares transducidas con plásmidos de expresión, eliminando a las células no transducidas. Este vector produce resistencia a neomicina gracias al promotor PGK, pero su promotor EF1 $\alpha$  no dirige la expresión de ningún transgén, por lo que lo hemos usado como vector control (EV, empty vector). Para introducir el cDNA de RUNX1c primero lo subclonamos en un vector intermedio KJ-EGFP-2A para luego obtener el fragmento EGFP-2A-Flag-RUNX1c que fue el que subclonamos dentro de nuestro vector pRRL, obteniendo el vector pRRL-SIN-cPPT-EF1 $\alpha$ -EGFP-2A-Flag-RUNX1c-PGK-Neo (de ahora en adelante vector RUNX1c, Figura 4.2.1). EGFP, es la proteína verde fluorescente mejorada que permite un seguimiento mediante técnicas de citometría e imagen de la expresión del vector y se considera un “chivato” de la expresión de nuestro transgén. 2A es un péptido de escisión que permite a una proteína escindirse mediante su secuencia; en este caso permite la liberación del péptido EGFP del péptido RUNX1c, ya que se transcriben como un solo ARNm a partir del promotor EF1 $\alpha$ . Flag es un oligopéptido de 8 aminoácidos que sirve como “etiqueta” para la expresión de RUNX1c ya que existen anticuerpos comerciales que reconocen este péptido, permitiendo la detección específica de nuestro transgén mediante técnicas de citometría de flujo e inmunotinción.

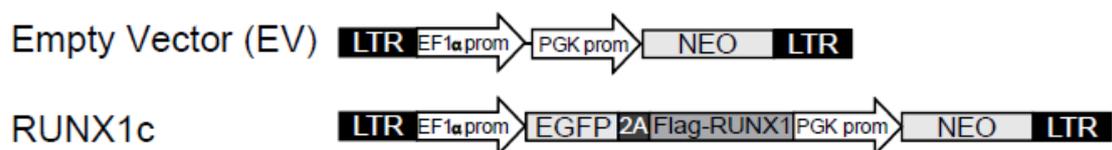


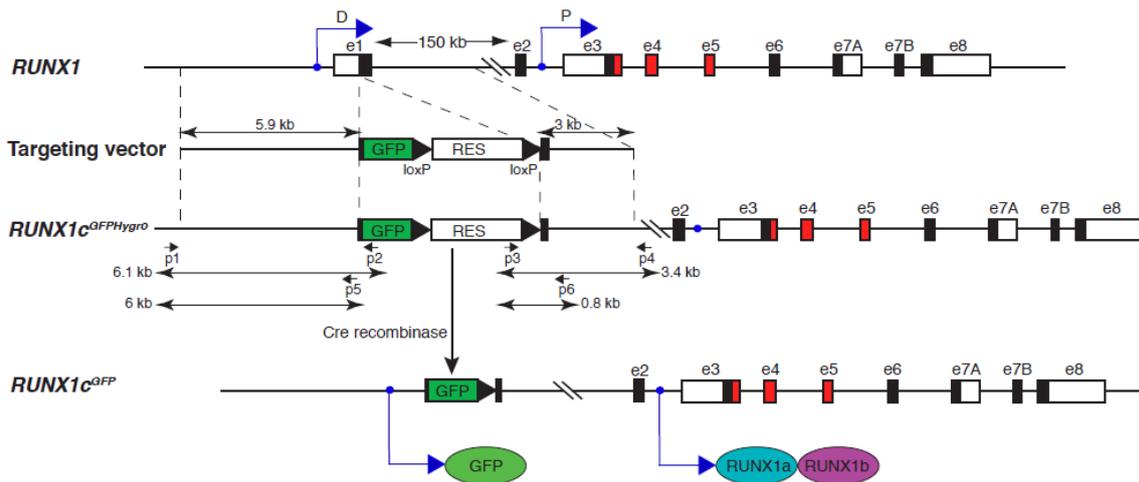
Figura 4.2.1 Esquema de los vectores de expresión usados como control (EV) y para sobre-expresar RUNX1c (RUNX1c) en CMEH.

Para los experimentos de pérdida de función por knock-down se seleccionaron cinco secuencias comerciales de ARNi, que reconocen al ARNm de RUNX1 humano, clonadas en el vector pLKO.1-Puro (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Las células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores pRRL-EF1 $\alpha$ -PGK-NEO (Empty Vector: EV), pRRL-EF1 $\alpha$ -EGFP-2A-Flag-RUNX1c-PGK-NEO (RUNX1c), pLKO.1-Puro-shNT (shNT) o pLKO.1-Puro-shRUNX1 (shRUNX1), junto con los plásmidos empaquetadores (psPAX y pMD2.G, de Addgene) mediante transfección estándar con fosfato cálcico<sup>378</sup>. Los

sobrenadantes fueron recogidos 48h tras la transfección y concentrados mediante ultracentrifugación a 26000 rpm. Las partículas virales fueron resuspendidas en medio de cultivo de CMEH y las líneas AND1 (pRRL y pLKO.1) y HS181 (solo pRRL) fueron transducidas durante 14-16h tras ser subcultivadas con los virus concentrados y suplementadas con polybrene (8 µg/ml; Sigma-Aldrich) que neutraliza la repulsión de cargas entre las partículas víricas y el ácido siálico presente en la superficie celular, aumentando la eficiencia de transducción. Al día siguiente, el sobrenadante con los virus fue eliminado y las CMEH transducidas fueron lavadas con medio fresco y mantenidas en cultivo. Las células transducidas se seleccionaron con G418 (150 µg/ml; Invitrogen), en el caso de los vectores pRRL, o puromicina dihidrocloruro (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich), en el caso de los vectores pLKO.1, desde el día 3 hasta el día 15 post-transducción.

La línea HES3 *RUNX1c*<sup>-/-</sup> fue generada mediante recombinación homóloga convencional. Para ello se diseñó un vector con brazos de homología frente al exón 1 flanqueando al gen reportero GFP mas un gen de resistencia (en este caso frente a higromicina), flanqueado a su vez por secuencias loxP. Se llevó a cabo electroporación de la línea HES3 con dicho vector seguido de selección con higromicina. Las colonias resultantes se aislaron, expandieron y se confirmó mediante PCR la recombinación. Las colonias positivas para el evento de recombinación PCR se sometieron a confirmación: i) de la recombinación mediante Southern-Blot o secuenciación; ii) fenotipo de CMEH; y iii) cariotipo normal. Tras confirmar todo lo anterior se prosiguió con la eliminación del gen de resistencia mediante transfección con un vector de expresión de la recombinasa Cre, la cual reconoce los sitios loxP recombinando sus secuencias y eliminando el fragmento que flanquean. Las colonias resultantes se expanden, se extrae su ADN y se confirma mediante PCR que han perdido el gen de resistencia. Si se han cumplido todos los requisitos anteriores se procede a la selección clonal (células individuales) y expansión de células individuales para establecer líneas clonales. Por último se vuelve a confirmar todo lo anterior antes de proceder a expandir y hacer stock de las líneas generadas. El resultado es una línea de CMEH que expresa GFP bajo el control del promotor *P1* del locus de *RUNX1* en lugar de expresar el correspondiente transcrito, en este caso *RUNX1c* (Figura 4.2.2).



**Figura 4.2.2. Estrategia de generación de la línea *RUNX1c<sup>-/-</sup>*, sustituyendo el exón 1 por el gen reportero GFP mediante recombinación homóloga convencional.** Brazos de homología del vector de recombinación flanqueando GFP+RES de 5.9kb y 3 kb, respectivamente. P1-p6: sitios de hibridación de primers para confirmar por PCR la recombinación y la pérdida del gen de resistencia. D: Promotor distal o P1. P: Promotor proximal o P2. E1-e8: exones del gen *RUNX1*. GFP: Green fluorescent protein. RES: gen de resistencia a antibiótico.

### 4.3. Caracterización de las CMEH por citometría de flujo

Las CMEH se disociaron con TryPLE Express (Invitrogen) y se resuspendieron en FACS Buffer (PBS 1X suplementado con 5-10% suero fetal bovino y 2mM EDTA). La suspensión de células fue teñida con anticuerpos anti-TRA-1-60 y SSEA3 conjugados PE, anti-TRA-1-81 y SSEA4 conjugados con alofocianina (APC) y anti-OCT4 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Bioscience) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar con FACS Buffer, las células fueron teñidas con 7-aminoactinomicina (7AAD, BD Bioscience) durante 5 min. Las células vivas fueron identificadas por ser negativas para 7AAD usando un citómetro de flujo FACS Canto II.

### 4.4. Aislamiento de ARN, RT-PCR y análisis de qRT-PCR

El ARN total fue aislado usando Trizol (Invitrogen)<sup>379</sup>. El ADNc fue generado usando SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen) a partir de entre 1 µg de ARN y analizado mediante qRT-PCR usando Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, La Jolla, CA) en el sistema Mx3005P QPCR (Agilent Technologies). Se usó *GAPDH* como normalizador y la expresión relativa fue calculada usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ <sup>380</sup>. Los primers usados en este estudio se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 4.4.1. Lista de primers**

<b>Primer name</b>	<b>Sequence</b>
GAPDH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
GAPDH Rv	GAAGATGGTGATGGGATTTG
RUNX1a Fw	AAGACACAGCACCTGGAGA
RUNX1a Rv	GCCTCCCTCATAACGTGCAT
RUNX1a/b Fw	CGTGACATACATTAGTAGCACTACCTTTG
RUNX1a/b Rv	CTCCACGAATCTTGCTTGCAGAGGTTAAG
RUNX1c Fw	GAAGTCTGAACCCAGCATAGTGGTCAGCAG
RUNX1c Rv	GTGGACGTCTCTAGAAGGATTCATTCCAAG
RUNX1 Fw	CCGAGAACCTCGAAGACATC
RUNX1 Rv	GCTGACCCTCATGGCTGT
SCL Fw	GGATGCCTTCCCTATGTTCA
SCL Rv	GGTGTGGGACCATCAGTAA
GATA1 Fw	TCACTCCCTGTCCCAATAG
GATA1 Rv	GGAGAGTTCACGAAGCTTG
PU.1 Fw	GTGCCCTATGACACGGATCT
PU.1 Rv	CCCAGTAATGGTCGCTATGG
CSF1 Fw	GCAAGAACTGCAACAACAGC
CSF1 Rv	ATCAGGCTTGGTCACCACAT
CSF1R Fw	GAACATCCACCTCGAGAAGAAA
CSF1R Rv	GACAGGCCTCATCTCCACAT
IFNA1 Fw	CCCTCTCTTTATCAACAACTTGC
IFNA1 Rv	TTGTTTTCATGTTGGACCAGA
IFNA2 Fw	TCCTGCTTGAAGGACAGACA
IFNA2 Rv	TTTCAGCCTTTTGGAACTGG
IFNB1 Fw	CGACACTGTTCTGTGTTGTCA
IFNB1 Rv	GAAGCACAACAGGAGAGCAA
IFNG Fw	GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG
IFNG Rv	TTTGGATGCTCTGGTCATCTT
IFNL1 Fw	GGGACCTGAGGCTTCTCC
IFNL1 Rv	CCAGGACCTTCAGCGTCA
IRF1 Fw	ACCAGGGCTGTCAGTTGATT
IRF1 Rv	TATGGCACATGCCTCAAAAC
IRF3 Fw	AGACACCTCTCCGGACACC
IRF3 Rv	TCCAGAATGTCTTCTGGGTA
IRF5 Fw	TCTACGAGGTCTGCTCCAATG

IRF5 Rv	CATCCTCTGCAGCTCTTCCT
IRF7 Fw	AGAAGGGCTTCCCCTGACT
IRF7 Rv	GTGACAGGTACGGCTCTGC
STAT1 Fw	TTGGCACCTAACGTGCTG
STAT1 Rv	TTCGTACCACTGAGACATCCTG
STAT2 Fw	CCTGAAGGATCTCTGGAATGA
STAT2 Rv	GGTGCCAGACATGGTCTTCT
STAT3 Fw	CCCTTGGATTGAGAGTCAAGA
STAT3 Rv	AAGCGGCTATACTGCTGGTC
TLR4 Fw	GTCTGCAGGCGTTTTCTTCT
TLR4 Rv	AAGTGAAAGCGGCAACCTTA
TNF Fw	CGCTCCCCAAGAAGACAG
TNF Rv	AGAGGCTGAGGAACAAGCAC
NFKB1 Fw	CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC
NFKB1 Rv	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA
RELA Fw	TCATGAAGAAGAGTCCTTTCAGC
RELA Rv	CTGGCTTGGGGACAGAAG

#### 4.5. Western Blot

Las CMEH fueron lavadas dos veces con PBS 1X y disociadas con TryPLE Express (Invitrogen). Las células fueron lisadas en buffer RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado con el cocktail inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostic, Basel, Suiza) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich). Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en geles de Dodecilsulfato sódico (del inglés SDS)-Poliacrilamida al 12% y transferidos a membranas de polyvinylidene fluoride (del inglés PVDF). La proteína de RUNX1c fue detectada con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-cor Bioscience, Lincoln, NE) usando un anticuerpo anti-RUNX1 (1:500) (Abcam, Cambridge, MA). Como control de carga de uso un anticuerpo anti- $\beta$ -actina (1:10000) (clone AC-15; Sigma-Aldrich).

#### 4.6. Ensayo de formación de teratomas *in vivo*

El protocolo de formación de teratomas fue aprobado por el comité de ética en experimentación animal de la Universidad de Granada. Entre  $1-2 \times 10^5$  CMEH fueron implantadas subcutáneamente en el flanco de ratones NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$  (NSG) de entre 6-8 semanas (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA). El crecimiento del teratoma fue monitorizado

semanalmente y los ratones fueron sacrificados a las 8-10 semanas post-implantación. Los teratomas fueron fijados en formaldehído, embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina o mediante inmunocitoquímica (anti-CKAE1AE3 para endodermo, anti-vimentin para mesodermo y anti-GFAP para ectodermo).

#### **4.7. Diferenciación hematopoyética mediante co-cultivo con células OP9**

Las células estromales OP9 fueron cultivadas en placas de 10cm cubiertas con gelatina en medio basal  $\alpha$ -MEM suplementado con suero fetal bovino no inactivado por calor al 20% durante 8 días. Las CMEH fueron crecidas en frascos T25 cubiertos con Matrigel y se prepararon como una suspensión de pequeños agregados usando tratamiento con Collagenase IV durante 5 min a 37°C seguido de rascado suave en medio de diferenciación (compuesto por medio basal  $\alpha$ -MEM al 10% con suero fetal bovino no inactivado por calor, 100  $\mu$ M monioglicerol y 50  $\mu$ g/ml ácido ascórbico). Se cultivó 1/5 de la suspensión sobre las células OP9 en 10 ml de medio de diferenciación y las células fueron alimentadas con medio de diferenciación fresco al día siguiente. Desde el día 4 hasta el día 15 de co-cultivo, se realizó un cambio de la mitad del medio cada 2 días. La diferenciación hematopoyética fue analizada mediante citometría de flujo (a días 6, 8 y 10 de co-cultivo) y mediante ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) a día 8 de co-cultivo. Para el análisis por citometría de flujo, las células fueron teñidas con anticuerpo anti-mouse CD29 conjugado con FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) para excluir a las células de ratón del análisis, anti-human CD31-PE, CD34 conjugado con ficoeritrinacianina7 (PE-Cy7) y CD45-APC. El porcentaje de progenitores hemato-endoteliales (PHE, CD31+CD34+CD45-), progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+) y células hematopoyéticas totales (CD45+) se analizó mediante citometría de flujo, usando el citómetro FACS Canto II.

#### **4.8. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)**

El ensayo del potencial clonogénico de los progenitores hematopoyéticos humanos se realizó mediante cultivo de  $5 \times 10^4$  células provenientes de co-cultivos CMEH-OP9 en metilcelulosa H4436 (Stem Cell Technologies) a día 8 de diferenciación. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmosfera humidificada y las colonias fueron contadas entre los días 10 y 12 usando criterios morfológicos estándar.

#### **4.9. Análisis del ciclo celular de los PHEs**

Co-cultivos de CMEH-OP9 fueron recogidos a día 8 de diferenciación, fijados en etanol frío al 70% y guardados de un día para otro a -20°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas 2

veces con PBS 1X frío e incubadas con anticuerpos anti-CD31-FITC, anti-CD34-FITC y anti-CD45 APC (Miltenyi Biotec) durante 15 min a temperatura ambiente. Tras lavar, las células fueron resuspendidas en buffer de yoduro de propidio (PI) que contenía 50 µg/ml yoduro de propidio y 100 µg/ml RNAsa en PBS. La distribución del ciclo celular se analizó usando el citómetro de flujo FACS Canto II equipado con el software Modfit (Verity Software House, Topsham, ME).

#### **4.10. Análisis de apoptosis en PHEs**

Las CMEH cultivadas sobre OP9 fueron recogidas a día 8, lavadas con buffer de unión a Anexina V e incubadas con anticuerpos anti-human CD31-FITC, anti-human CD34-FITC y anti-human CD45-APC (Miltenyi Biotec) y Anexina V-APC (Beckton Dickinson) durante 20 min. Tras lavar, las células fueron resuspendidas en buffer de unión a Anexina V con 7AAD. La muerte celular por apoptosis fue detectada usando un citómetro de flujo FACS Canto II.

#### **4.11. Recogida de sangre de cordón umbilical y aislamiento de CMH y progenitores CD34<sup>+</sup>**

Se obtuvieron unidades frescas de sangre de cordón umbilical a partir de neonatos sanos de hospitales locales con aprobación del comité local de ética en investigación. Las muestras de sangre de cordón fueron agrupadas para reducir la variabilidad entre unidades individuales. Las células mononucleares fueron aisladas usando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Stockholm, Sweden). Tras lisar los eritrocitos (Lysis Solution, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), las células CD34 fueron purificadas mediante separación magnética usando el kit human CD34 MicroBead y el separador AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de la fracción CD34 fue evaluada mediante citometría de flujo usando anticuerpo anti-CD34-ficoeritrina (PE; BD Bioscience, San Jose, CA) y solo las fracciones CD34<sup>+</sup> que mostraron una pureza mayor del 90% fueron usadas para el trasplante en ratones inmunodeficientes. La fracción CD34<sup>-</sup> fue irradiada (15 Gy) y usada como células accesorias para co-trasplantarlas junto con las CMH y progenitores CD34<sup>+</sup>.

#### **4.12. Trasplante en ratones inmunodeficientes y análisis de la reconstitución del sistema hematopoyético**

Los ratones NSG fueron mantenidos bajo condiciones estériles en el animalario del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Se realizaron trasplantes intra-hepáticos en ratones neonatos, de entre 1-2 días, irradiados entre las 4 y 12h anteriores (1 Gy)

tanto de células CD34+ aisladas de cordón umbilical ( $3 \times 10^4$  en 50  $\mu$ l) solas o junto con células accesorias CD34-Lin<sup>+</sup> ( $5 \times 10^4$  irradiadas a 15 Gy), como de células obtenidas de co-cultivos CMEH-OP9 a día 8 de diferenciación tanto EV como RUNX1c ( $1-2.5 \times 10^5$  células en 50  $\mu$ l). La salud general de los ratones fue monitorizada a lo largo de todo el experimento. Los ratones fueron sacrificados entre 6-8 semanas tras el trasplante y se extrajo la médula ósea, bazo, hígado y sangre periférica para analizar el quimerismo humano. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-human HLA-ABC-FITC, anti-human CD45 conjugado con alofococianina-cianina7 (APC-Cy7), anti-human CD19-APC, anti-human CD33-PE y anti-human CD34-PE-Cy7 (BD Bioscience) para analizar la presencia de células hematopoyéticas humanas mediante citometría de flujo usando un FACS Canto II.

#### **4.13. Análisis de expresión génica**

CMEH indiferenciadas y PHEs purificados a día 6, 8 y 10 a partir de co-cultivos de CMEH-EV y CMEH-RUNX1c fueron aislados usando un aislador celular FACS Aria (BD Bioscience) y el ARN total fue extraído usando Trizol. La elevada calidad del ARN se confirmó usando la plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Las muestras de ARN fueron marcadas (Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies) con Cy3 (cianina 3) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento de hibridación se completó usando el kit Agilent Gene Expression Hybridization (Agilent Technologies) más el Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray, 8x60K (Agilent Technologies). Se marcaron e hibridaron dos muestras independientes por línea celular y condición. Se consideraron genes diferencialmente activados aquellos que presentaban un Z-score  $> 2$  y P-value  $< 0.01$ . El análisis del perfil de expresión y de las rutas de señalización se llevó a cabo usando la herramienta web pública Panther ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) y usando el software privado Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA) ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)).

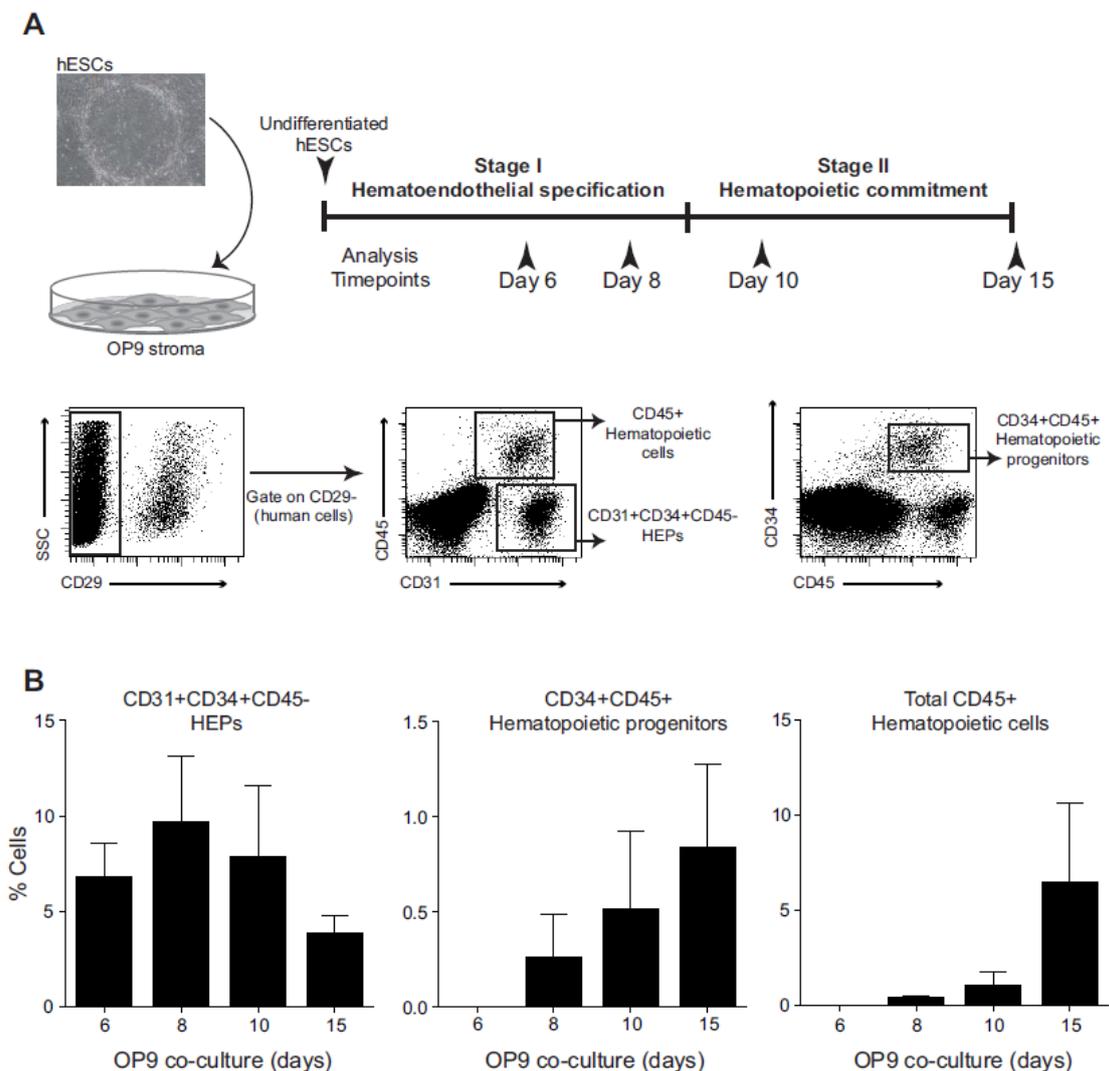
#### **4.14. Análisis estadístico**

Todos los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas han sido llevadas a cabo con un test de t-Student pareado con la excepción de los datos de distribución de las colonias en los ensayos de CFU en los cuales se ha aplicado un test de Wald. Valores de  $P < 0.05$  han sido considerados estadísticamente significativos. \* corresponde a  $P < 0.05$ , \*\* corresponde a  $P < 0.01$  y \*\*\* corresponde a  $P < 0.001$ .

## **5. RESULTADOS**

## 5.1. Objetivo 1. Análisis de la dinámica de expresión de las isoformas de RUNX1 durante la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH

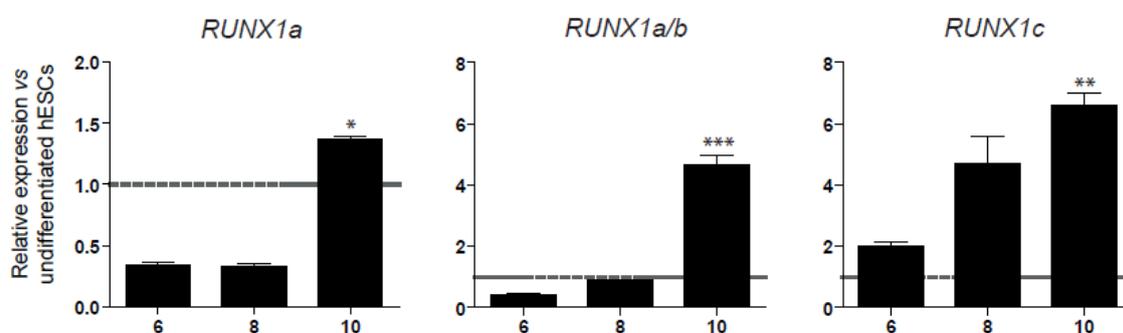
Para el estudio de la expresión de las diferentes isoformas de RUNX1 hacemos uso del sistema de diferenciación hematopoyética basado en co-cultivo de CMEH sobre células de estroma de ratones neonatos con mutación en el gen M-CSF que produce fenotipo osteopetrótico (OP9)<sup>196</sup>. Este sistema ha sido bien estudiado y ha generado resultados publicados en numerosas revistas internacionales. De forma breve, se cultivan las CMEH sobre células OP9 en medio de diferenciación y se analiza a días 6, 8 y 10 mediante citometría de flujo la aparición de PHE (CD31+CD34+CD45-), progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+) y células hematopoyéticas totales (CD45+), además de realizar a día 8 el ensayo de CFU. Los PHE dan lugar a células hematopoyéticas, mediante un estadio intermedio de progenitores hematopoyéticos (Figura 5.1.1). En este sistema, los progenitores hemato-endoteliales (PHE) aparecen a día 6 y se diferencian a células hematopoyéticas CD45+ a partir de 8<sup>381</sup>.



**Figura 5.1.1. Cinética de diferenciación hematopoyética de las CMEH en co-cultivos de OP9.** (A) Diagrama esquemático representando el sistema mediante co-cultivo con células OP9 usada para la diferenciación hematopoyética de CMEH y gráficos de puntos mostrando el análisis mediante citometría de flujo de los PHE (HEPs en el gráfico), progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas. (B) Cinética de aparición de los PHE (HEPs en el gráfico, CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>), progenitores hematopoyéticos (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) y células hematopoyéticas totales (CD45<sup>+</sup>) usando co-cultivos de OP9. Amablemente cedida por la Dr. Veronica Ayllón Cases.

La población celular que denominamos aquí como PHE sería el equivalente *in vitro* del endotelio hemogénico *in vivo*.

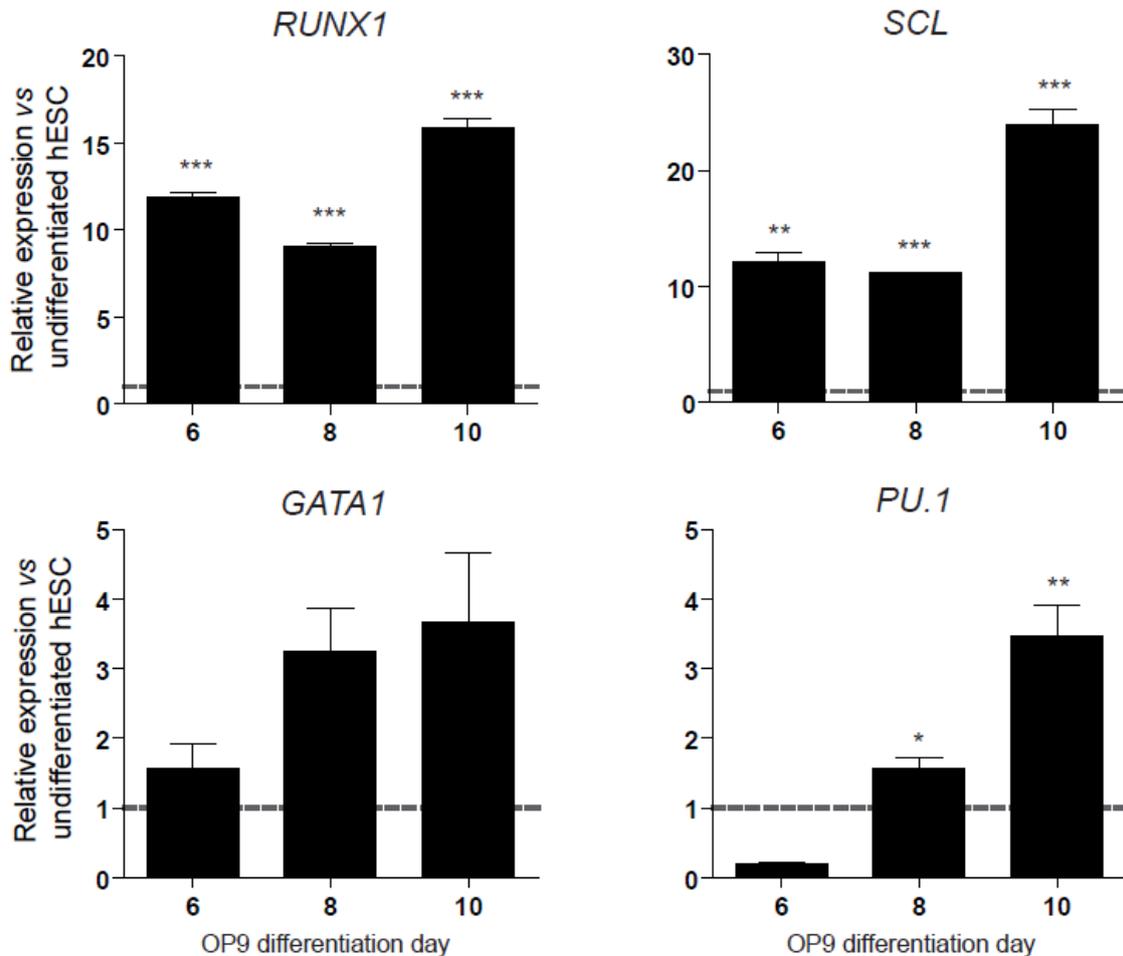
A día 6, 8 y 10 de co-cultivo se recogieron las células totales de la línea celular AND1 y se analizaron los niveles de expresión de *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c* mediante qRT-PCR. Ya que *RUNX1b* y *RUNX1a* comparten su extremo N-terminal, mientras que *RUNX1b* y *RUNX1c* tienen conservado su extremo C-terminal, es imposible generar una pareja de primers para qRT-PCR que hibride exclusivamente con la isoforma *RUNX1b* sin reconocer *RUNX1a* o *RUNX1c*. En este caso usamos una pareja de primers que reconocen las isoformas *RUNX1b* y *RUNX1a* que pasaremos a denominar *RUNX1a/b*. La expresión de *RUNX1a* y de *RUNX1a/b* no se induce hasta el día 10 de diferenciación hematopoyética, mientras que la expresión de la isoforma *RUNX1c* se induce a partir de día 6, en paralelo a la aparición de los PHE, y su expresión crece progresivamente durante la diferenciación hematopoyética (Figura 5.1.2).



**Figura 5.1.2. Expresión de las isoformas *RUNX1a*, *RUNX1a/b* y *RUNX1c* durante la diferenciación hematopoyética de CMEH.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Además de la expresión de las isoformas de *RUNX1* también analizamos la expresión de otros factores de transcripción hematopoyéticos importantes como son *SCL*, *GATA1* y *PU.1* (Figura 5.1.3). Como se ha descrito previamente, *SCL* es el primero de estos factores de transcripción en inducirse<sup>194</sup>, antes de la formación de los PHE, lo que concuerda con su conocido papel en la formación del endotelio hemogénico en ratón<sup>106</sup>. Se sabe que *SCL* activa la expresión de

RUNX1<sup>272,382</sup>, por lo que es probable que dicha activación haya ocurrido antes de día 6 de cultivo. *GATA1* se empieza a inducir levemente a partir de día 6 y *PU.1* a partir de día 8, aumentando sus niveles de expresión progresivamente. Ambos son dianas de RUNX1 y se expresan después que este<sup>330,383</sup>, validando la regulación espacio-temporal de estos factores en el sistema de diferenciación basado en OP9.



**Figura 5.1.3. Expresión de los factores de transcripción SCL, GATA1 y PU.1 a lo largo de la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Para una mejor caracterización de la expresión de las isoformas purificamos los PHE y las células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> a día 8 y 10 de diferenciación hematopoyética, respectivamente. También se aislaron células no hematopoyéticas (CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>) como control. El análisis mediante qRT-PCR en dos líneas celulares independientes (AND1 y H9), reveló que las tres isoformas de RUNX1 se expresan en células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup>, siendo *RUNX1c* la que presenta mayores niveles de expresión. Por otro lado, *RUNX1c* es la única isoforma que se

expresa en los PHE, sugiriendo que esta isoforma puede ser relevante en la funcionalidad de los PHE y/o en la formación de células hematopoyéticas mediante la TEH (Figura 5.1.4).

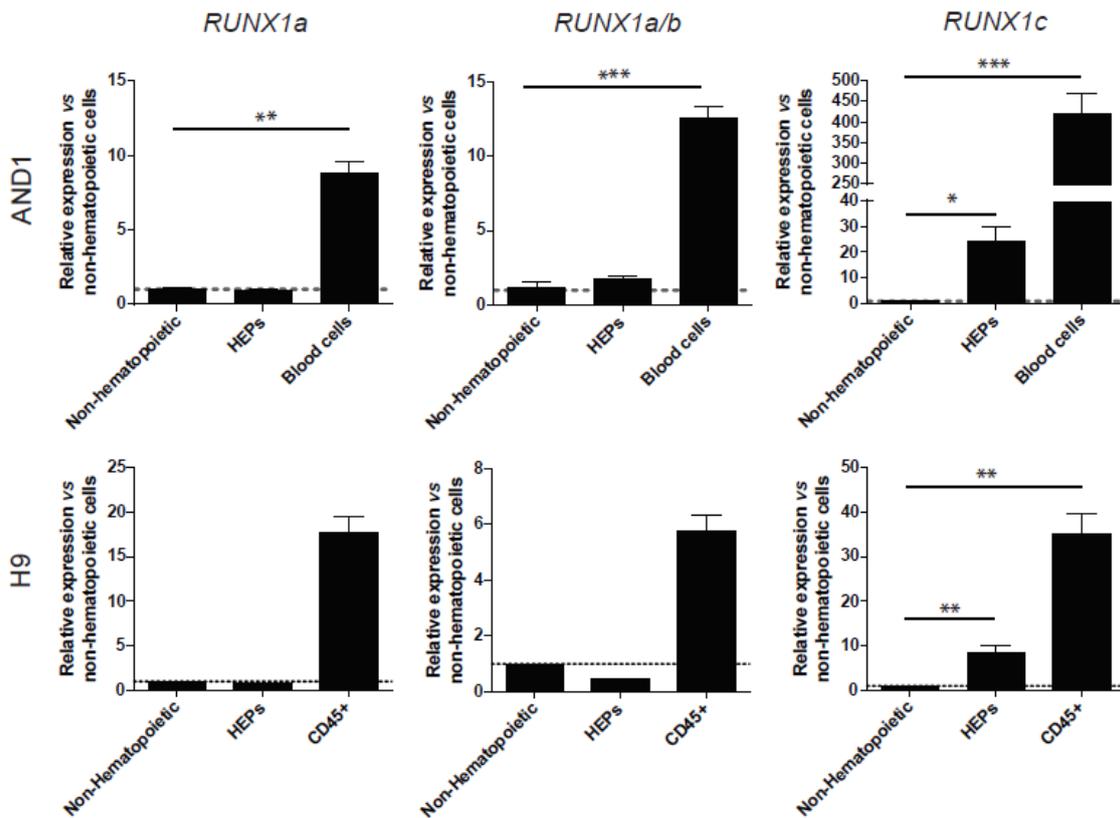


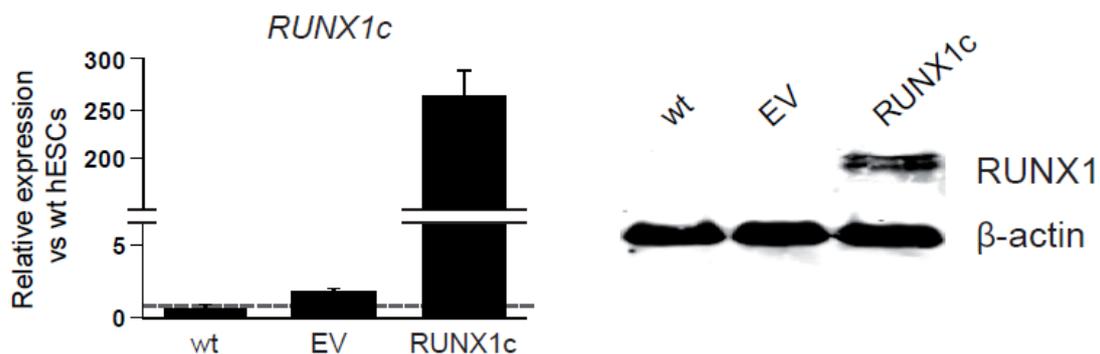
Figura 5.1.4. Expresión de las isoformas RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c en células no hematopoyéticas, progenitores hemato-endoteliales (PHE) y células hematopoyéticas. La expresión relativa se muestra normalizada frente a células no hematopoyéticas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

## 5.2. Objetivo 2. Dilucidar el rol de RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria humana

### 5.2.1. Generación de líneas de CMEH que sobre-expresan RUNX1c

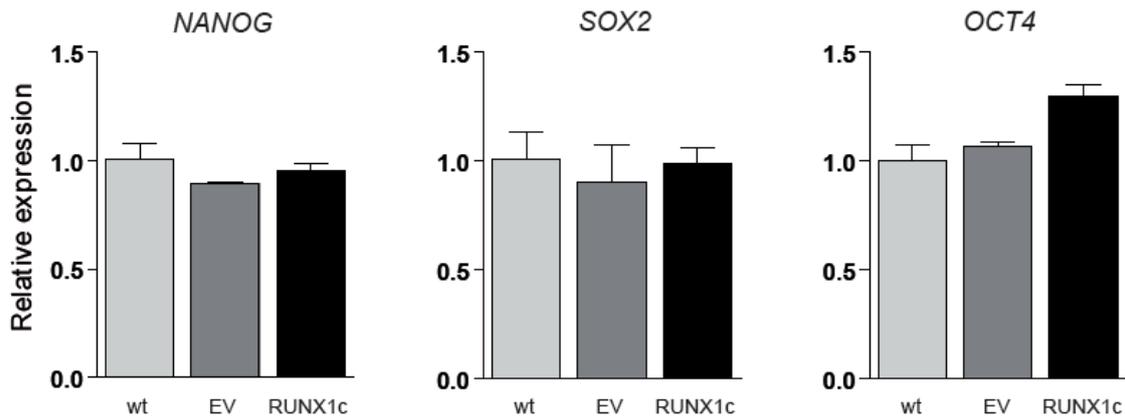
Una vez observado el patrón de expresión de las diferentes isoformas de RUNX1 durante la diferenciación hematopoyética decidimos centrarnos en estudiar la función de la más interesante de las tres, RUNX1c. Para ello generamos un plásmido que permitiera la sobre-expresión de RUNX1c en CMEH, usando un plásmido amablemente cedido por el Prof Didier Trono, el vector pRRL-SIN-cPPT-EF1 $\alpha$ -PGK-Neo. Una vez obtenidos ambos vectores se transfectaron en células HEK 293T mediante cloruro de calcio junto con los plásmidos empaquetadores (psPAX y pMD2.G) para obtener partículas virales con nuestro plásmido en su interior. Estas partículas virales se encuentran en el sobrenadante, por lo que lo recogimos y lo ultracentrifugamos para concentrar las partículas lentivirales y las resuspendimos en el medio de cultivo de las CMEH.

A continuación, incubamos las CMEH con dicho medio conteniendo las partículas lentivirales infectivas durante 14-16 horas. Este subcultivo partiendo de CMEH en suspensión facilita el proceso de transducción viral y aumenta la eficiencia. Una vez transcurridas las 14-16h se cambió el medio por un medio fresco libre de partículas lentivirales y a partir del tercer día se comenzó la selección con neomicina hasta el día 15. Tras este tiempo las células seleccionadas se expandieron y se comenzó la caracterización de las líneas generadas. En este caso transdujimos tres líneas de CMEH para corroborar resultados y evitar resultados sesgados, fruto de efectos específicos de línea, AND1, HS181 y H9. En primer lugar comprobamos que las líneas expresan constitutivamente el transgén a nivel de ARNm y de proteína. Para lo primero se realizó una qRT-PCR tanto de las líneas wild-type como de las EV y RUNX1c, demostrándose que la única que expresa el transgén es la línea RUNX1c. Para lo segundo se realizó un Western-Blot, demostrándose lo mismo a nivel de proteína (Figura 5.2.1.1). Estos ensayos los realizamos en las 3 líneas celulares generadas, aunque por simplificación sólo hemos representado los resultados obtenidos en una línea celular representativa (AND1).



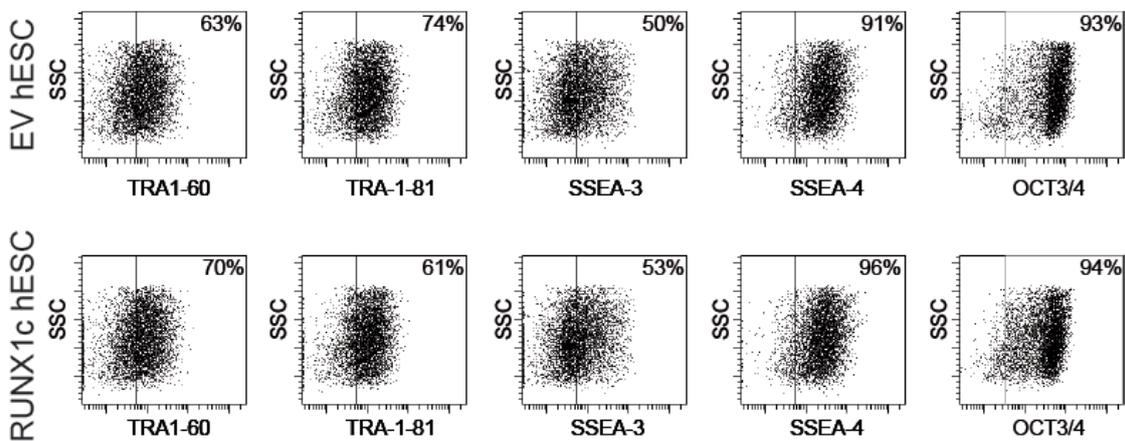
**Figura 5.2.1.1. Validación a nivel de ARNm y proteína de la sobre-expresión de RUNX1c en CMEH.** (A) La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH wild-type. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (B) Detección mediante Western-Blot de la proteína RUNX1c en CMEH. Se usó la proteína  $\beta$ -actina como control de carga.

Lo siguiente es comprobar que dichas líneas conservan la pluripotencia, característica básica para evaluar su potencial de diferenciación hematopoyético. La pluripotencia en CMEH se evalúa normalmente por métodos *in vitro* e *in vivo*. Los métodos *in vitro* abarcan la expresión de factores importantes de pluripotencia a nivel de ARNm y de proteína. Para el primer caso se evaluó la expresión mediante qRT-PCR de los marcadores NANOG, SOX2 y OCT3/4, conservándose dicha expresión a niveles comparables a los de la línea wild-type (Figura 5.2.1.2).



**Figura 5.2.1.2. Expresión de factores de pluripotencia a nivel ARNm en CMEH wild-type, EV y RUNX1c.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH wild-type. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

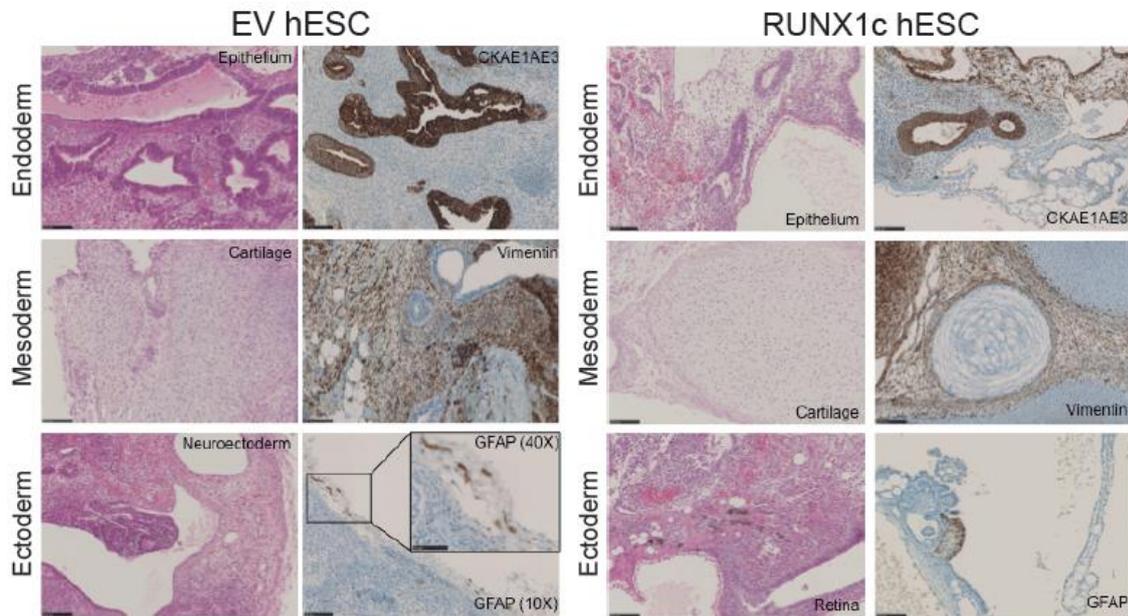
La pluripotencia a nivel de proteína se evalúa mediante tinción con anticuerpos frente a marcadores de superficie específicos de CMEH y su determinación/cuantificación por citometría de flujo. Dichos marcadores son TRA-1-60, TRA-181, SSEA3 y SSEA4. También analizamos la expresión intracelular del factor de transcripción de pluripotencia OCT3/4. En este caso también se puede observar cómo tanto las líneas EV como las RUNX1c expresan estos marcadores a niveles similares (Figura 5.2.1.3).



**Figura 5.2.1.3. Expresión de factores de pluripotencia a nivel de proteína en CMEH EV y RUNX1c, detectados mediante citometría de flujo.**

Los métodos *in vivo* conllevan la infiltración/inoculación de las CMEH en ratones inmunodeficientes para la formación de teratomas, tumores, generalmente benignos, desarrollados a partir de CME que contienen estructuras celulares y tisulares características de las tres capas germinales. Las líneas transgénicas formaron teratomas con idéntica eficiencia, latencia y composición histológica con estructuras de las tres capas germinales que las células

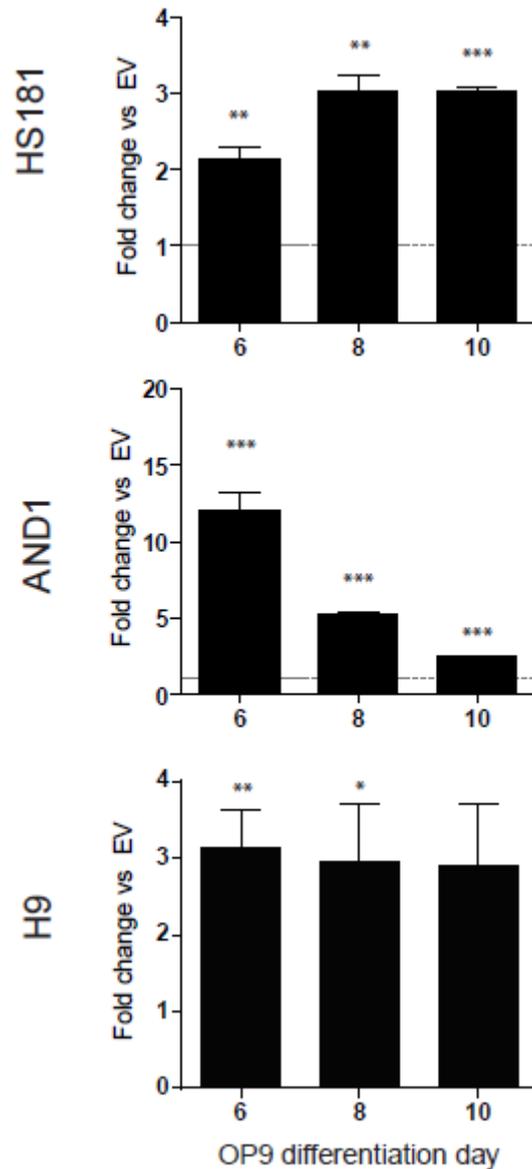
parentales de las que derivaban (Figura 5.2.1.4). Por lo tanto, conseguimos generar tres líneas de CMEH (AND1, H9 y HS181) que sobre-expresan de forma constitutiva y estable RUNX1c sin que pierdan sus propiedades pluripotentes.



**Figura 5.2.1.4. Secciones histológicas de teratomas formados en ratones inmunodeficientes a partir de CMEH EV y RUNX1c.** Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina (H-E) y con anticuerpos específicos frente a CKAE1AE3 (endodermo), vimentina (mesodermo) y GFAP (ectodermo).

## 5.2.2. La sobre-expresión de RUNX1c aumenta la especificación de los PHE y su posterior compromiso a células hematopoyéticas

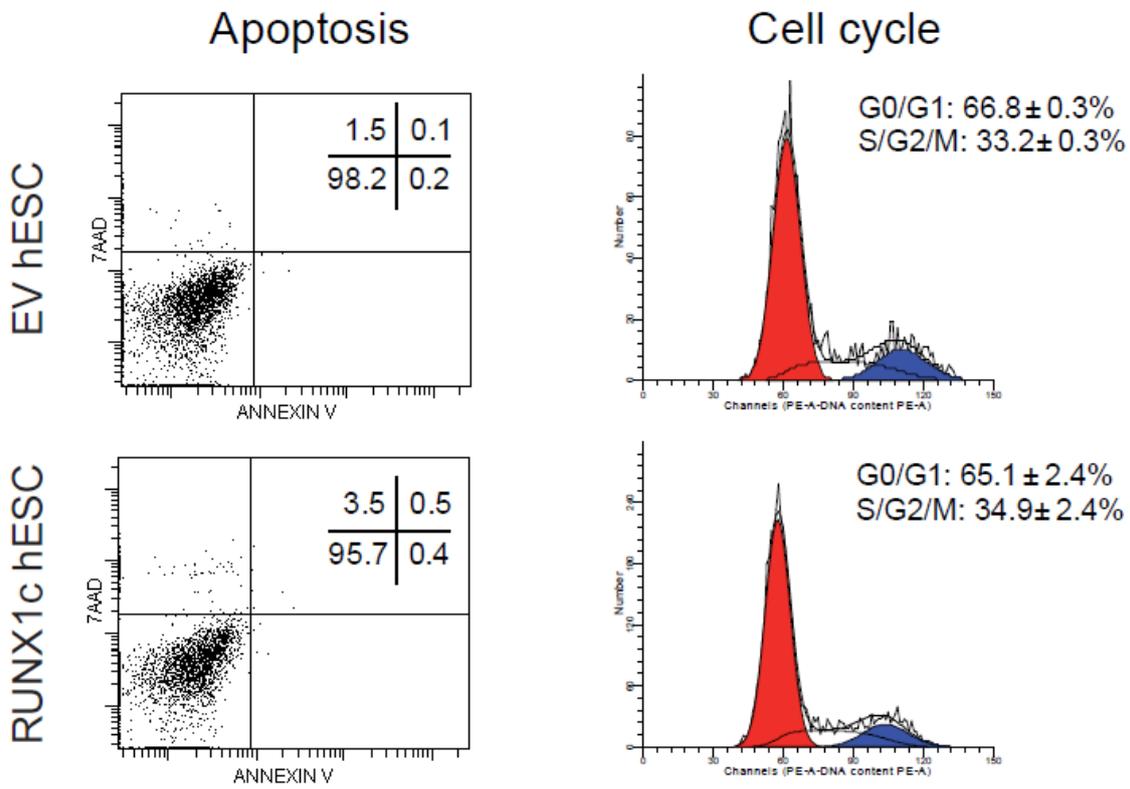
Una vez obtenidas las líneas de CMEH que sobre-expresan RUNX1c y demostrada la conservación de la pluripotencia, evaluamos el papel de RUNX1c en la diferenciación hematopoyética. En las tres líneas de CMEH la sobre-expresión de RUNX1c aumentó significativamente la generación de los PHE, entre 2-12 veces más a lo largo de toda la diferenciación hematopoyética (Figura 5.2.2.1).



**Figura 5.2.2.1.** La expresión ectópica de *RUNX1c* aumenta la formación de PHE a partir de CMEH. El incremento relativo se muestra normalizado frente a las líneas CMEH EV. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Este aumento en el número de PHE puede ser debido a: (i) un aumento en la especificación hemato-endotelial a partir de las CMEH o (ii) un aumento en la proliferación o reducción de la apoptosis de los PHE generados. Para abordar estas dos posibilidades, analizamos la distribución del ciclo celular (% de células en las distintas fases del ciclo celular) y los niveles de apoptosis en la población de PHE mediante citometría de flujo. A nivel de apoptosis encontramos un 0.3% de células en apoptosis en EV vs 0.9% en *RUNX1c*. Asimismo no encontramos diferencias significativas en la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular, encontrándose en fase S/G2/M un  $33 \pm 0.3\%$  en EV vs  $34 \pm 2.4\%$  en *RUNX1c* (Figura 5.2.2.2).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la expresión ectópica de RUNX1c promueve la especificación de los PHE a partir de las CMEH sin modificar su proliferación o apoptosis.



**Figura 5.2.2.2. La sobre-expresión de *RUNX1c* no favorece la proliferación ni la apoptosis.** (A) Análisis representativo por citometría de flujo de la apoptosis y (B) de la distribución ciclo celular mediante software Modfit en PHE EV y RUNX1c a día 8 de diferenciación. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

A continuación, analizamos la generación de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> y en la de células hematopoyéticas totales CD45<sup>+</sup> en las tres líneas de CMEH mediante citometría de flujo. Independientemente de la línea celular, la sobre-expresión de RUNX1 promueve un aumento significativo en el la producción de los progenitores hematopoyéticos (entre 7-15 veces) y las células hematopoyéticas totales (entre 8-10 veces) (Figura 5.2.2.3).

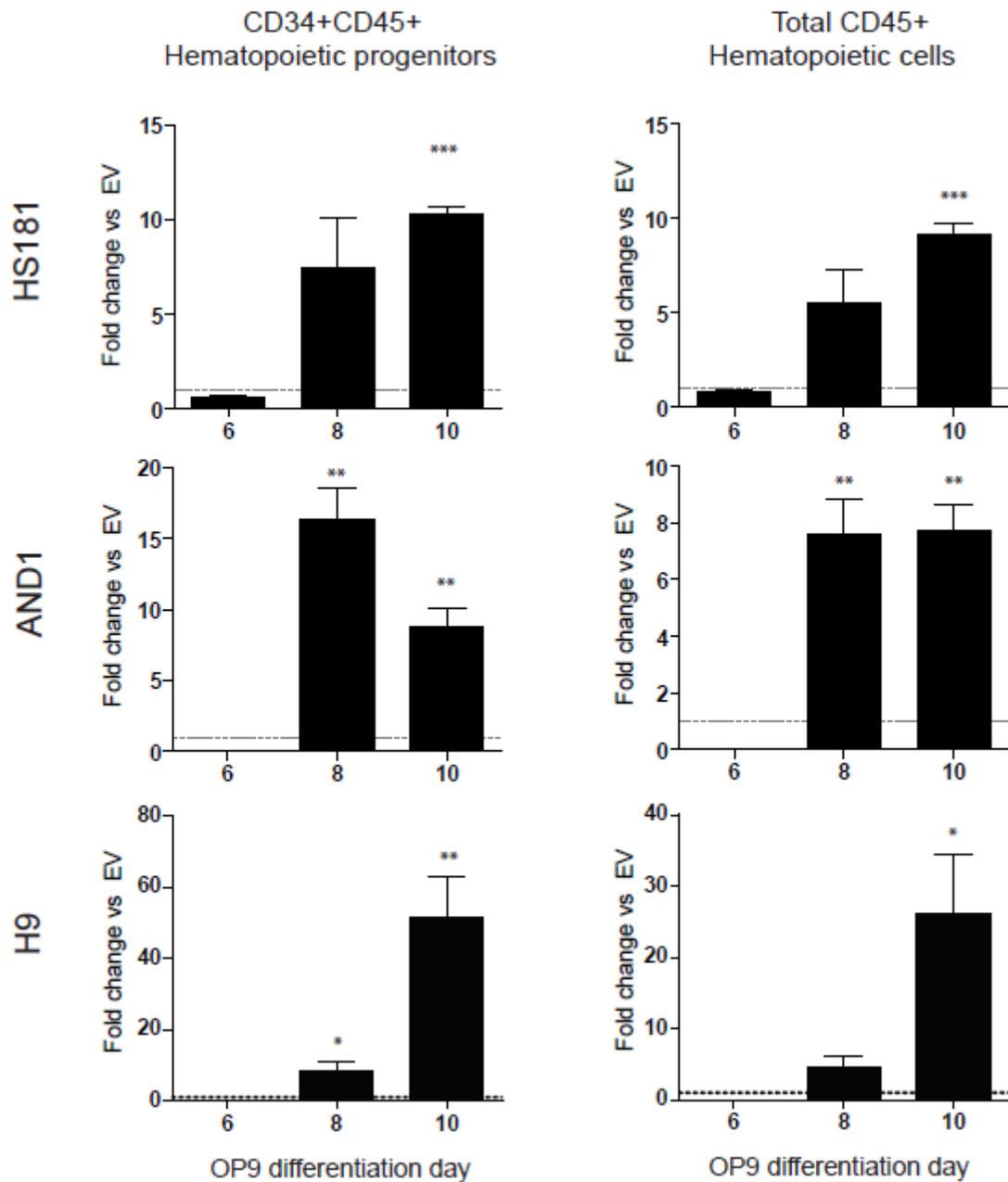


Figura 5.2.2.3. La sobre-expresión de *RUNX1c* promueve la formación de progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+) y células hematopoyéticas totales (CD45+) a partir de CMEH. El incremento relativo se muestra normalizado frente a las líneas CMEH EV. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

El aumento en la producción de progenitores y células hematopoyéticas totales en las líneas que sobre-expresan *RUNX1c* puede ser debido a que *RUNX1c* solo afecte a la especificación de los PHE o que también favorezca el compromiso de los PHE hacia células hematopoyéticas. Para evaluar estas dos posibilidades, calculamos el ratio de número de células CD45+ producidas por cada PHE para las líneas EV y *RUNX1c*. Este ratio es significativamente mayor en las líneas *RUNX1c* con respecto a las EV a día 10 (entre unas 3-4 veces superior) (Figura 5.2.2.4).

Nuestros resultados sugirieren que la sobre-expresión de RUNX1c no sólo promueve la generación y producción de más PHE sino que también aumenta su posterior compromiso hematopoyético, manifestado por el incremento en este ratio.

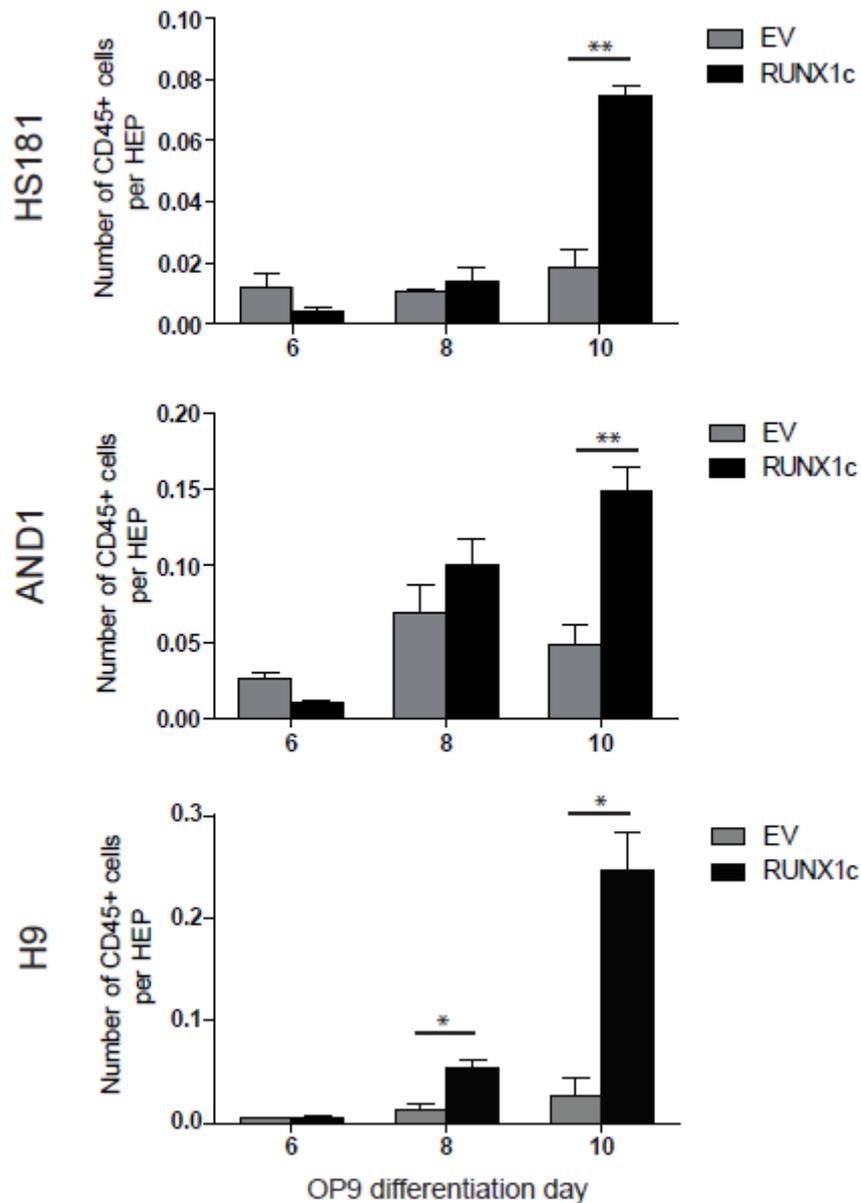
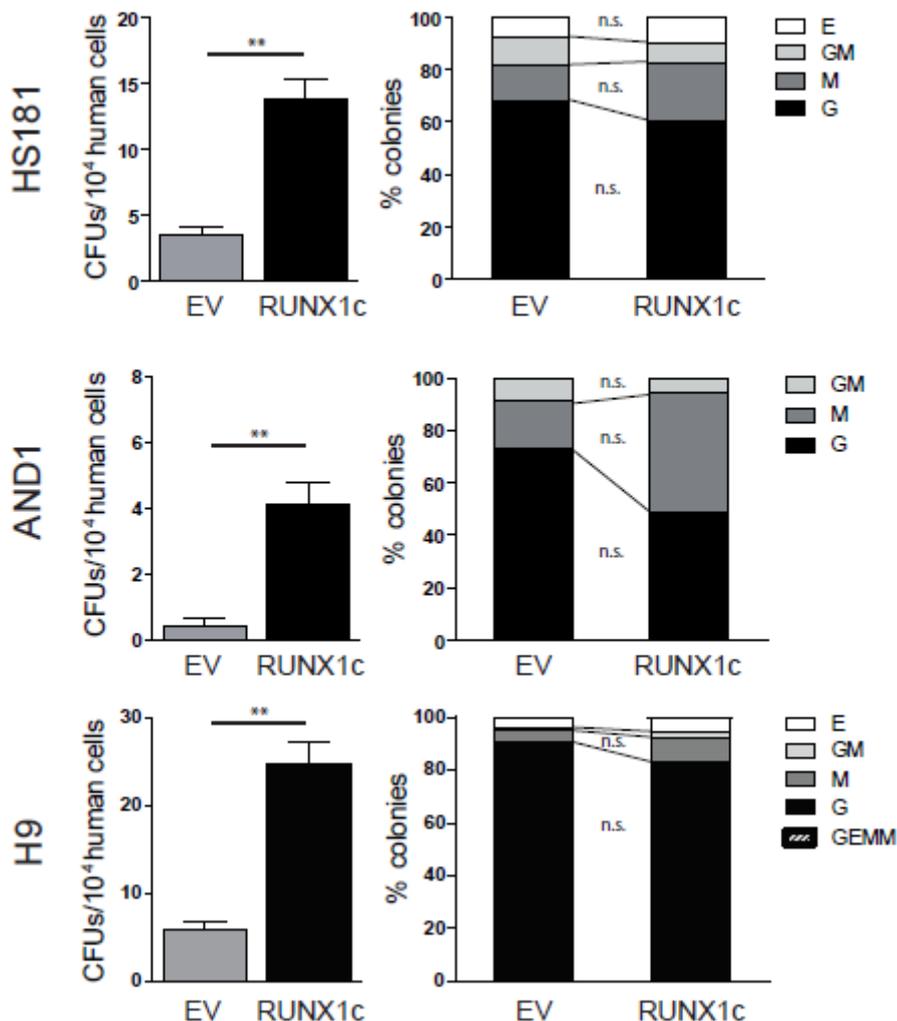


Figura 5.2.2.4. Ratio de número de células CD45<sup>+</sup> por cada PHE en CMEH EV y RUNX1c. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

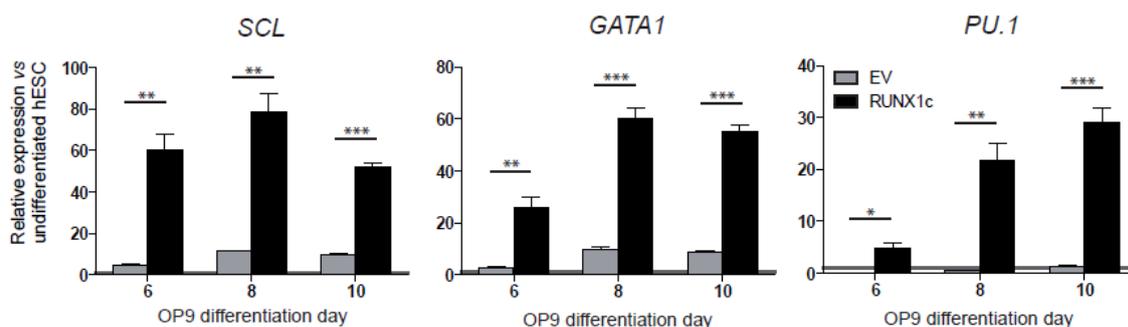
A continuación, nos exploramos la funcionalidad de las células hematopoyéticas generadas a partir de CMEH realizando ensayos de unidades formadoras de colonias (colony forming unit o CFU) en medio semisólido. Para ello se levantan las células de las placas de co-cultivo a día 8 de diferenciación, se cuantifican y se cultivan en metilcelulosa con citoquinas hematopoyéticas que promueven la diferenciación terminal de los progenitores hematopoyéticos humanos

presentes en el co-cultivo. El potencial de formar colonias, conocido como potencial clonogénico, fue significativamente mayor en las células hematopoyéticas que sobre-expresan RUNX1c que en las EV, entre 3-8 veces mayor (Figura 5.2.2.5). Además del conteo del número total de colonias también usamos criterios morfológicos para distinguir los distintos tipos de colonias que se forman en este tipo de ensayos: granulocitos (CFU-G), monocitos (CFU-M), granulocitos-monocitos (CFU-GM), eritroides (CFU-E) y mixtas (CFU-GEMM). Las colonias mixtas son las más primitivas ya que el progenitor que la forma retienen el potencial de formar células de todos los linajes mieloides (progenitor multipotente). Las colonias GM son relativamente primitivas también al estar originadas por progenitores bipotentes, mientras que las colonias G, M y E revelan la presencia de progenitores más comprometidos, con potencialidad unilínea exclusivamente (progenitor unipotente). La sobre-expresión de RUNX1c provoca un ligero aumento en el número de colonias CFU-M a expensas de una disminución en colonias CFU-G y CFU-GM (Figura 5.2.2.5). Sin embargo, esta tendencia no superó la significancia estadística ( $p < 0.05$ ) al realizar el test de Wald.



**Figura 5.2.2.5. *RUNX1c* aumenta la funcionalidad de los progenitores hematopoyéticos derivados de CMEH.** Los datos representan la media  $\pm$  SEM y la distribución porcentual de los tipos de colonias de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ . n.s.: no significativo.

A nivel molecular analizamos la expresión de los mismos tres factores de transcripción hematopoyéticos (*SCL*, *GATA1* y *PU.1*) a lo largo de la diferenciación. Los tres se encontraron significativamente mucho más inducidos en los co-cultivos de CMEH que sobre-expresan *RUNX1c* con respecto a las EV (Figura 5.2.2.6). En el caso de *SCL* y *GATA1* los niveles de expresión son mucho más elevados en todos los tiempos, pero en el caso de *PU.1* la sobre-expresión de *RUNX1c* no sólo aumenta enormemente los niveles sino que también acelera su expresión haciendo que aparezca a día 6 dos días antes de lo que aparece en condiciones normales en células EV (Figura 5.2.2.6). Estos resultados indican que la sobre-expresión de *RUNX1c* está promoviendo un programa transcripcional hematopoyético complejo que implica la inducción de otros elementos transcripcionales reguladores de la hematopoyesis.



**Figura 5.2.2.6. La sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de los factores de transcripción hematopoyéticos *SCL*, *GATA1* y *PU.1* durante la diferenciación hematopoyética.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

A modo de confirmación de que el fenotipo que observamos se debe a la sobre-expresión de *RUNX1c*, analizamos mediante qRT-PCR la expresión del transgén a lo largo de la diferenciación y efectivamente confirmamos que sus niveles se mantienen elevados y prácticamente constantes durante toda la diferenciación (Figura 5.2.2.7).

En conjunto nuestros resultados demuestran que la sobre-expresión de *RUNX1c* promueve la formación de PHE y favorece su posterior compromiso a células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> a partir de CMEH.

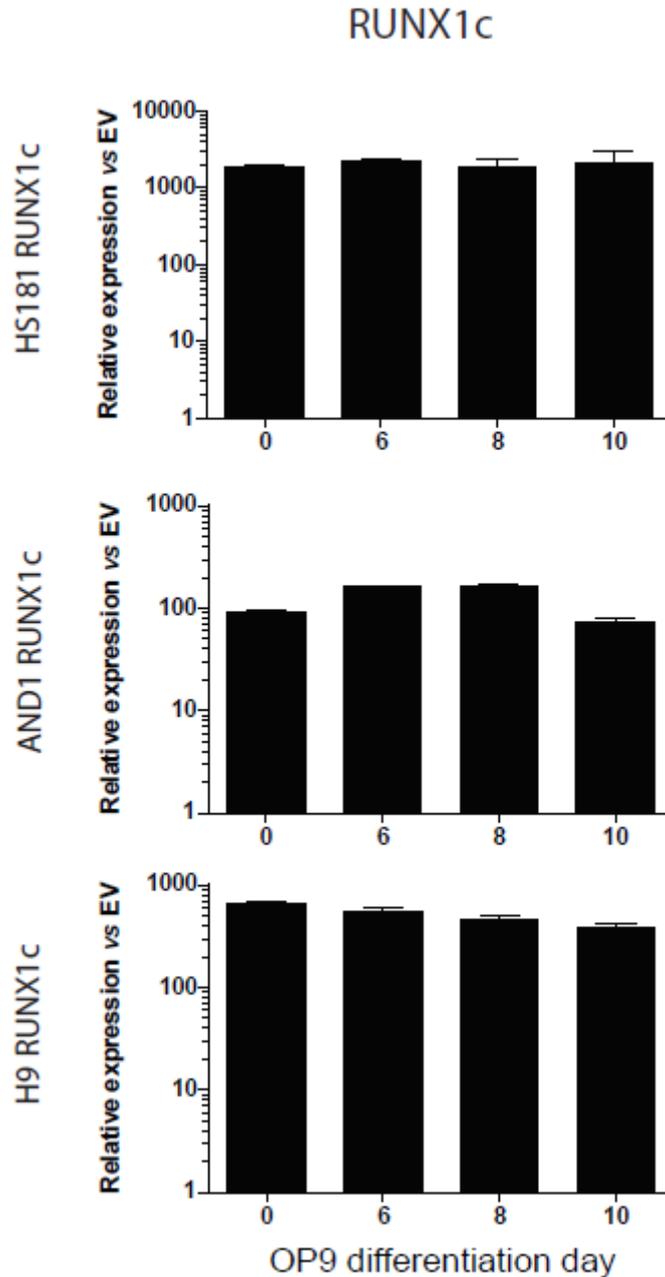


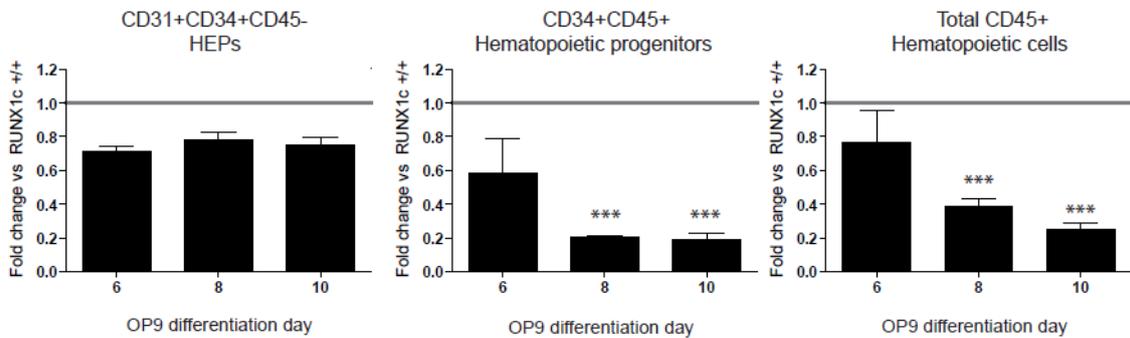
Figura 5.2.2.7. Expresión de *RUNX1c* durante la diferenciación hematopoyética en CMEH que sobre-expresan *RUNX1c* con respecto a CMEH EV. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

### 5.2.3. La eliminación específica de *RUNX1c* prácticamente bloquea la TEH

Visto el aumento en la producción de todos los tipos celulares estudiados durante el proceso de la diferenciación hematopoyética promovido por la sobre-expresión de *RUNX1c* quisimos profundizar más en el rol específico de esta isoforma en el desarrollo hematopoyético humano. El grupo del Dr. Elefanty (Murdoch Childrens Research Institute, Melbourne, Australia) nos cedió

amablemente una línea de CMEH donde el exón 1 del locus de *RUNX1* ha sido sustituido por el gen reportero GFP, obteniéndose una línea que expresa GFP bajo el control del promotor P1, pero que es deficiente en la expresión de *RUNX1c* (Figura 4.2.2). La sustitución se realizó mediante recombinación homóloga convencional y los dos alelos fueron modificados genéticamente.

Como control de dicha línea *RUNX1c*  $-/-$  usamos la misma línea de CMEH wild-type (*RUNX1*  $+/+$ ). La delección de *RUNX1c* no produjo diferencias significativas en la producción de PHE respecto de la línea wild-type (Figura 5.2.3.1). Sin embargo, la deficiencia en *RUNX1c* produjo una eliminación prácticamente total de la producción de progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+) y células hematopoyéticas totales CD45+ a días 8 y 10 de diferenciación (Figura 5.2.3.1).



**Figura 5.2.3.1. La delección de *RUNX1c* no afecta a la especificación de los PHE pero si al compromiso de los PHE hacia células hematopoyéticas.** El descenso relativo se muestra normalizado frente a la línea wild-type. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Cuando analizamos el ratio de número de células hematopoyéticas CD45+ por PHE se pudo comprobar que era significativamente menor en la línea *RUNX1c*  $-/-$  a partir de día 8, reforzando los resultados anteriores (Figura 5.2.3.2).

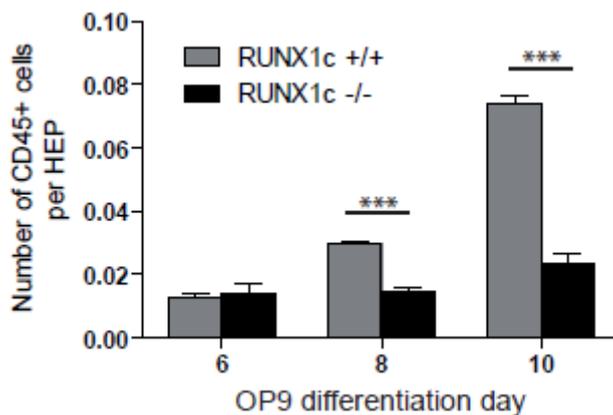


Figura 5.2.3.2. El número de células CD45<sup>+</sup> producidas por cada PHE es significativamente menor en la línea *RUNX1c* <sup>-/-</sup>. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 and \*\*\* *P* < 0.001.

El análisis de la expresión de *RUNX1c* a nivel de ARNm mediante qRT-PCR, demostró que la línea *RUNX1c* <sup>-/-</sup> carece de su expresión a lo largo de la diferenciación hematopoyética (Figura 5.2.3.3).

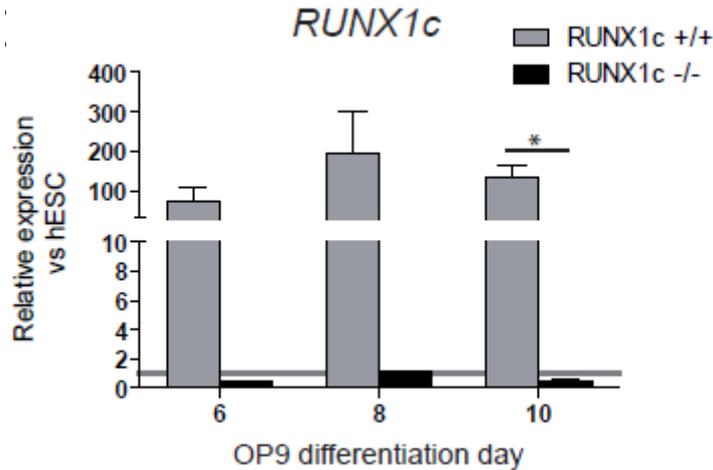
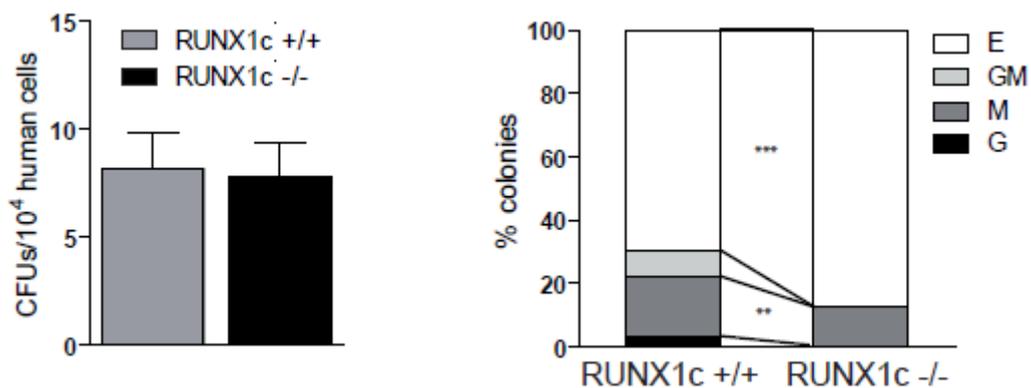


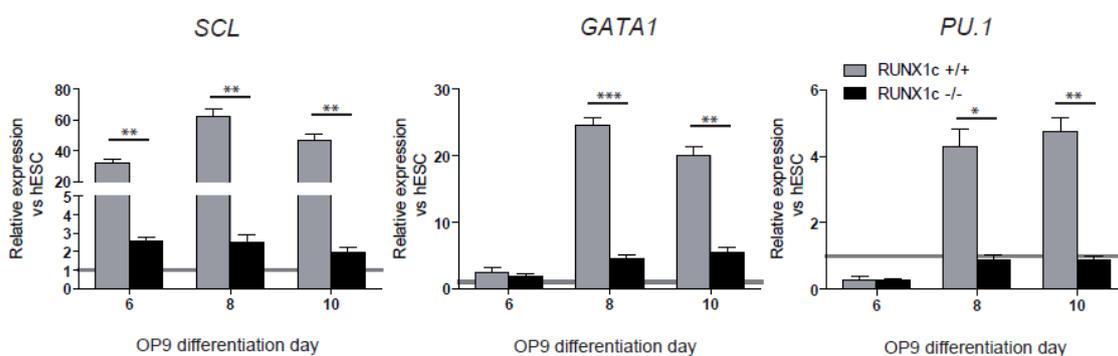
Figura 5.2.3.3. La eliminación del exón 1 mediante recombinación homóloga efectivamente conlleva la ausencia de expresión de *RUNX1c* durante la diferenciación hematopoyética. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 and \*\*\* *P* < 0.001.

A nivel funcional la delección de *RUNX1c* no afecta al número de colonias producidas a partir de los progenitores hematopoyéticos, determinado mediante el ensayo de formación de colonias (Figura 5.2.3.4). Sin embargo, sí que afecta significativamente a la distribución de los tipos de colonias producidos, desapareciendo casi por completo las CFU-G y CFU-GM y produciéndose un aumento significativo de CFU-E y disminución de las CFU-M (Figura 5.2.3.4).



**Figura 5.2.3.4. El noqueo de RUNX1c no afecta al número de colonias producidas en el ensayo de CFU pero si a la distribución de los tipos de colonias.** Los datos representan la media  $\pm$  SEM y la distribución porcentual de los tipos de colonias de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

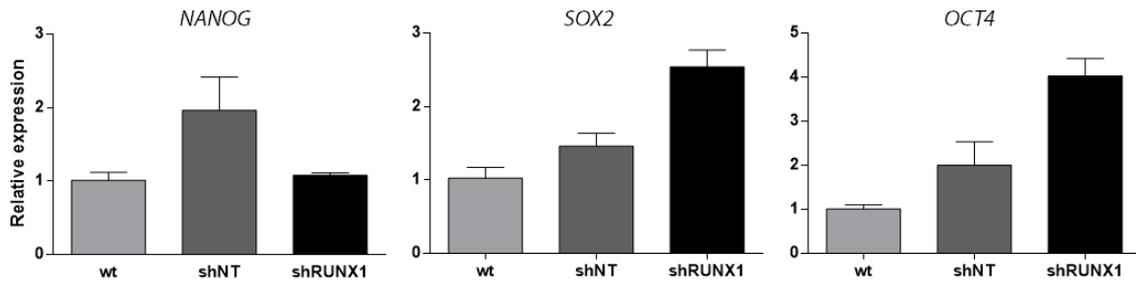
Para caracterizar aún más el fenotipo producido por la pérdida de expresión de *RUNX1c* analizamos la expresión de *SCL*, *GATA1* y *PU.1*. Los tres factores de transcripción presentan niveles de expresión muy inferiores en la línea *RUNX1c*  $-/-$  con respecto a la wild-type (Figura 5.2.3.5), apoyando los resultados obtenidos en los experimentos de sobre-expresión e indicando que *RUNX1c* regula la TEH y directa o indirectamente la expresión de estos tres factores necesarios para la hematopoyesis.



**Figura 5.2.3.5. La pérdida de expresión de RUNX1c impacta negativamente en la expresión de los factores de transcripción SCL, GATA1 y PU.1.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

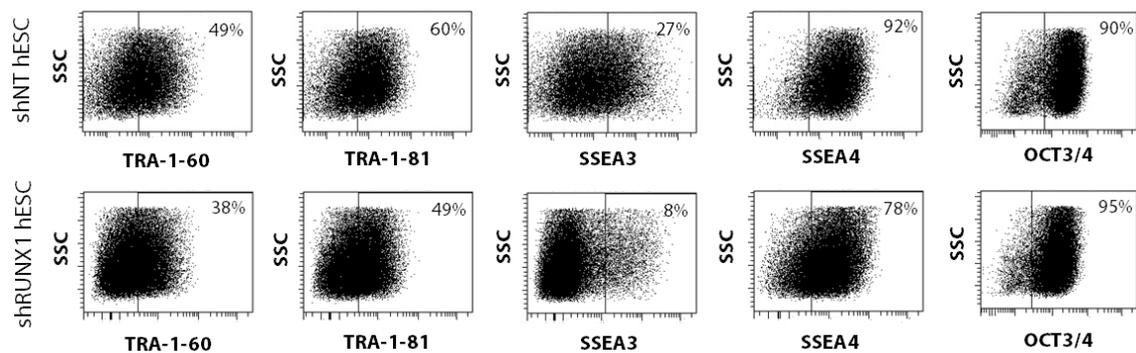
#### 5.2.4. El silenciamiento de *RUNX1* compromete el desarrollo hematopoyético humano

Para ahondar un poco más en el papel que juega *RUNX1* en la hematopoyesis humana y para arrojar un poco más de luz en el papel específico que juega la isoforma *RUNX1c*, procedimos a la generación de una línea celular de CMEH con expresión silenciamiento de todas las isoformas de *RUNX1* completo. Para ello adquirimos 5 secuencias de ARNi que reconocen a la mayoría de los ARNm de *RUNX1* (sh*RUNX1*), clonados en un vector lentiviral. Como control negativo adquirimos una secuencia irrelevante que no reconoce ningún ARNm de mamíferos (shNT). Transfectamos células HEK293T con los 5 plásmidos que contenían las secuencias de ARNi además de los plásmidos empaquetadores (psPAX y pMD2.G) para producir partículas lentivirales. Transdujimos una línea celular de CMEH con la combinación de todas las partículas virales y seleccionamos las células transducidas con puomicina. Tras 2 semanas de selección se llevó a cabo la caracterización de las líneas producidas. La pluripotencia evaluada mediante qRT-PCR demostró la expresión de los genes *NANOG*, *SOX2* y *OCT3/4* (Figura 5.2.4.1).



**Figura 5.2.4.1.** La transducción con shNT y shRUNX1 no afecta de forma significativa a la expresión de factores de pluripotencia a nivel de ARNm. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH wild-type. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

Igualmente, el análisis de expresión de marcadores de superficie de pluripotencia tampoco encontró diferencias significativas entre las nuevas líneas celulares shNT y shRUNX1 generadas (Figura 5.2.4.2).



**Figura 5.2.4.2.** Expresión de marcadores de superficie asociados a pluripotencia en CMEH shNT y shRUNX1, analizados mediante citometría de flujo.

Como *RUNX1* prácticamente no se expresa en CMEH indiferenciadas no podemos verificar la capacidad de silenciamiento de *RUNX1* hasta que no sometamos a las líneas de CMEH a diferenciación hematopoyética. El análisis mediante qRT-PCR muestra una reducción significativa en los niveles de expresión tanto de *RUNX1* total como de *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*, con niveles de silenciamiento comprendidos entre un 60-90% en comparación con las CMEH control (shNT) (Figura 5.2.4.3).

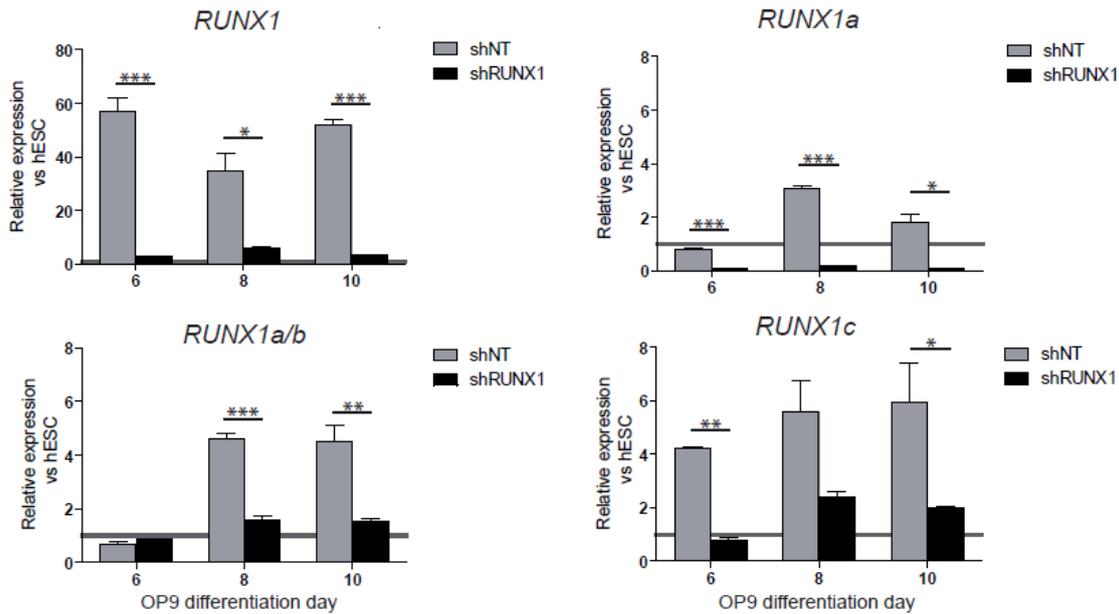


Figura 5.2.4.3. La línea shRUNX1 presenta unos niveles de expresión tanto de *RUNX1* como de sus isoformas significativamente inferior a su control shNT. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH indiferenciadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Una vez confirmada la pluripotencia y el silenciamiento de la expresión de *RUNX1* procedimos al estudio en profundidad durante el desarrollo embrionario hematopoyético humano. La formación de los PHE se vio significativamente reducida en las células shRUNX1 con respecto a las células control (shNT), aproximadamente unas 3 veces a lo largo de la diferenciación (Figura 5.2.4.4). Además, las células shRUNX1 también mostraron una menor producción de progenitores hematopoyéticos (CD34+CD45+) y células hematopoyéticas totales CD45+, aunque en ambos casos las diferencias no eran significativas (Figura 5.2.4.4).

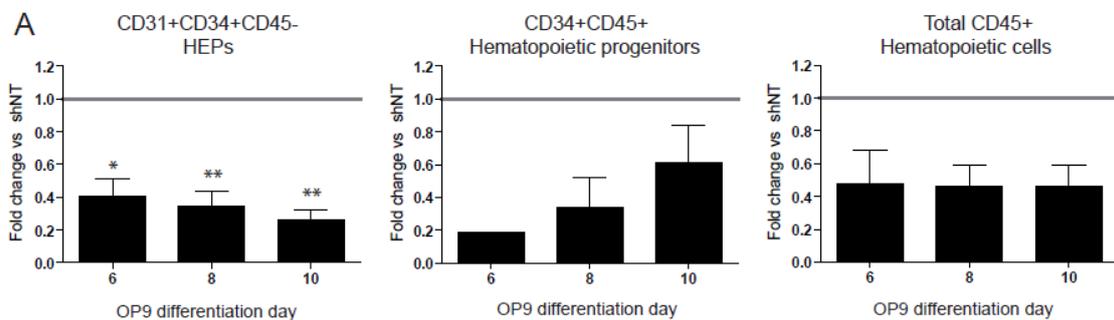


Figura 5.2.4.4. La reducción en la expresión de *RUNX1* provoca una disminución significativa del número de PHE y no significativa de células hematopoyéticas. El descenso relativo se muestra normalizado frente a la línea shNT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

También evaluamos el compromiso hematopoyético de los PHE mediante el ratio de número de CD45+ por cada PHE. En línea con los resultados anteriores no vemos diferencias significativas en este valor (Figura 5.2.4.5).

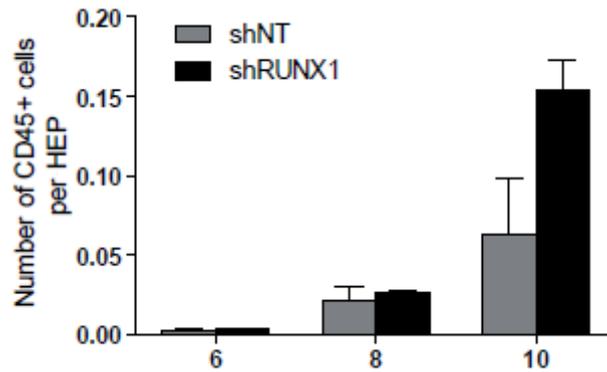


Figura 5.2.4.5. La reducción en la expresión de *RUNX1* no disminuye significativamente el ratio de células CD45+ por PHE. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

Una vez estudiado el efecto del silenciamiento parcial de *RUNX1* en el inmunofenotipo procedimos a evaluar el efecto a nivel funcional mediante el ensayo de formación de colonias. Este ensayo reveló que la disminución en la expresión de *RUNX1* disminuye el potencial clonogénico de los progenitores derivados de CMEH shRUNX1, en torno a unas 2.4 veces inferior con respecto a las células control (shNT) (Figura 5.2.4.6). Además, la pérdida de *RUNX1* anula la formación de CFU-M, que se ve compensado con un mayor porcentaje de colonias CFU-G (Figura 5.2.4.6), en claro paralelismo con los resultados obtenidos en los modelos anteriores de sobre-expresión y delección de *RUNX1c*.

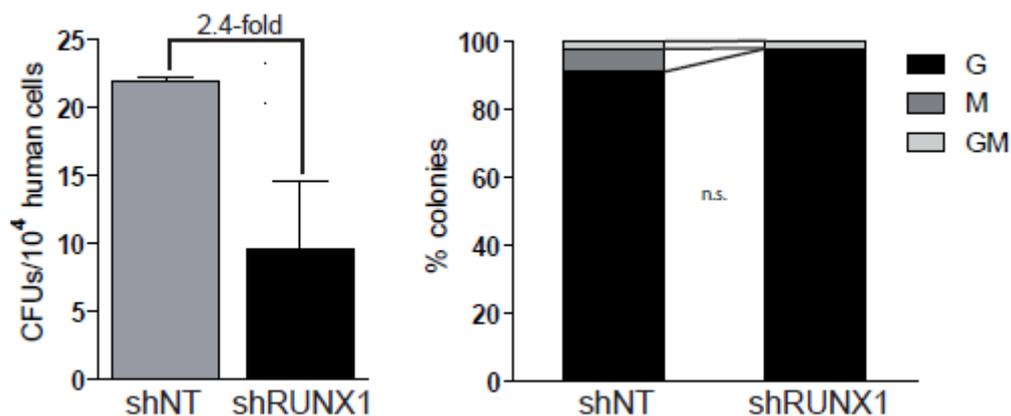


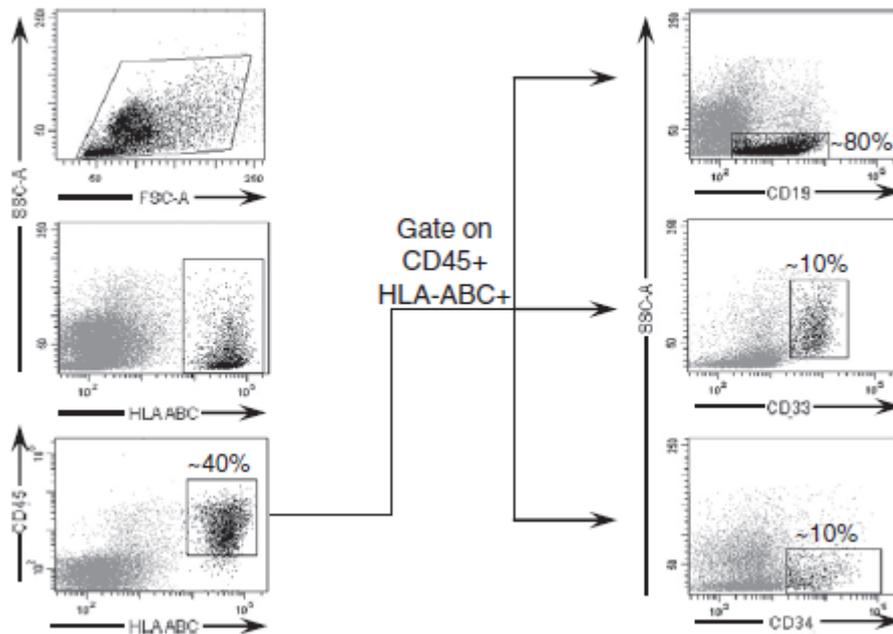
Figura 5.2.4.6. Niveles muy bajos de expresión de *RUNX1* afectan al potencial clonogénico de progenitores hematopoyéticos derivados de CMEH. Los datos representan la media  $\pm$  SEM y la distribución porcentual de los tipos de colonias de 3 experimentos independientes. N.s: no significativo.

### 5.3. Ensayo de reconstitución hematopoyética en ratones inmunodeficientes NSG

Históricamente, los métodos más usados en el modelo preclínico de xenotrasplante humano-ratón han sido la inyección intravenosa e intra-medula ósea<sup>384,385</sup>. Sin embargo, en los últimos años varios laboratorios han optimizado este modelo experimental mediante el empleo de inyección intra-hepática en recién nacidos, mejorando significativamente los niveles de reconstitución, el desarrollo multilinaje, la linfopoyesis tímica y la generación de inmunidad funcional adaptativa<sup>386,387</sup>. Además, el hígado de ratones neonatos puede ser un órgano más adecuado para el trasplante de CMH y progenitores hematopoyéticos ontogénicamente tempranos, como las derivadas de cordón umbilical o de CMEH mediante diferenciación directa. Esta técnica nunca había sido realizada en nuestro grupo y requería una puesta a punto previa a la realización de los trasplantes definitivos con células hematopoyéticas derivadas a partir de CMEH.

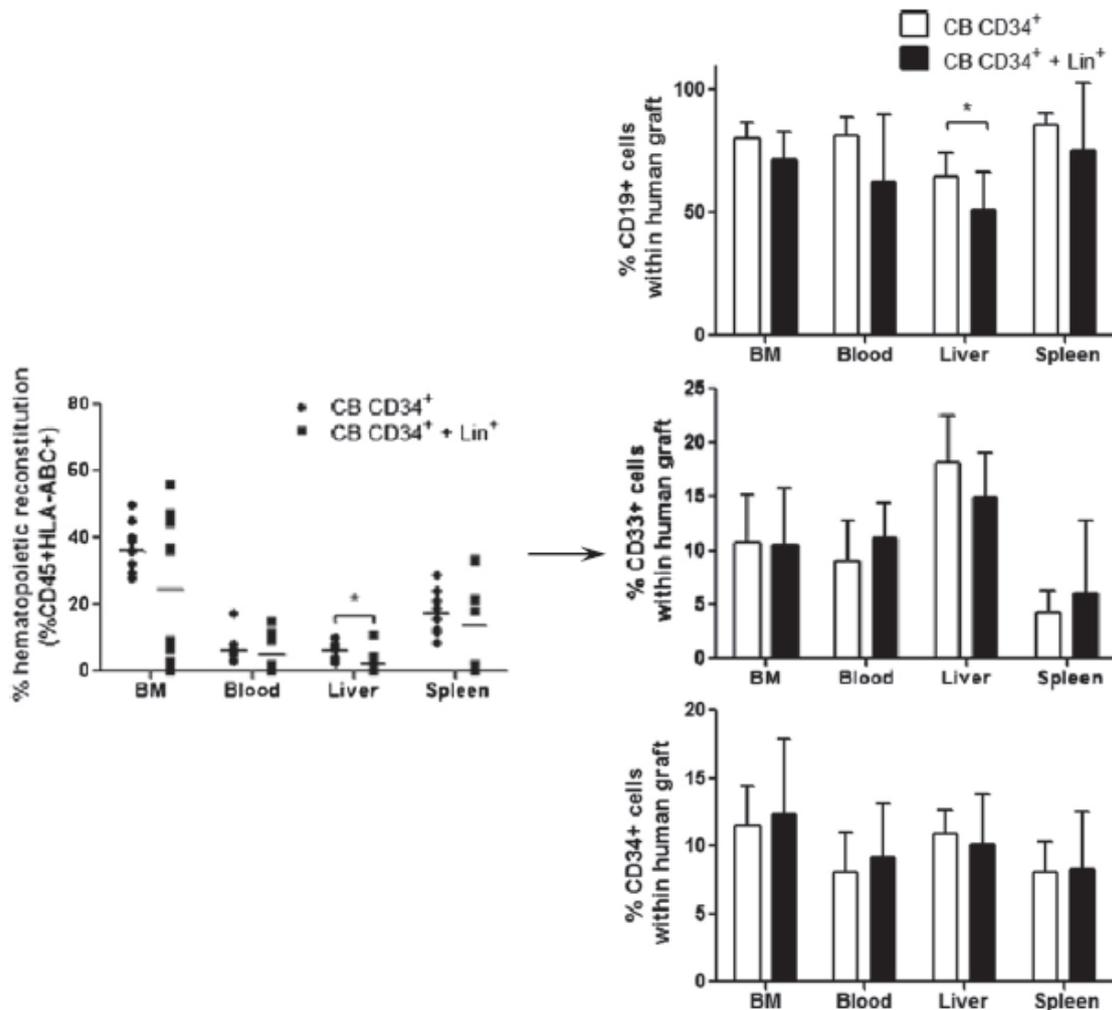
El material de partida que utilizamos fue células CD34<sup>+</sup> obtenidas de sangre de cordón umbilical, que se sabe que son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de ratones inmunodeficientes<sup>388</sup>. También se ha descrito con anterioridad que tanto en los trasplantes en vena como en médula ósea la inoculación de células humanas accesorias junto con las CMH y progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> aumentaba la reconstitución hematopoyética<sup>389,390</sup>. Sin embargo, nunca se había llevado a cabo xenotrasplantes hematopoyéticos intra-hepáticos de CMH junto con células accesorias. Por eso quisimos evaluar el impacto del co-trasplante de células accesorias CD34-Lin<sup>+</sup> en trasplante de células CD34<sup>+</sup> intra-hepático en neonatos de ratón NSG y que nos sirviera de proceso de optimización para ser aplicado en el futuro para el trasplante de CMH y progenitores hematopoyéticos derivados de CMEH. Esta práctica no se puede aplicar a la clínica para reducir el fallo del injerto aunque en clínica normalmente se seleccionan solamente las células CD34<sup>+</sup> para disminuir el riesgo de enfermedad injerto contra huésped (EICH)<sup>391</sup>. Para disminuir el riesgo de EICH irradiamos las células accesorias humanas para que no proliferen.

Evaluamos en paralelo dos grupos experimentales de ratones neonatos (1-2 días de edad), uno de ellos sólo recibió  $3 \times 10^4$  CMH de cordón umbilical y el otro recibió el mismo número de CMH junto con  $5 \times 10^4$  de células accesorias CD34-Lin<sup>+</sup> que habían sido previamente irradiadas (15 Gy). Tras 6 semanas se sacrificaron los ratones y se analizaron médula ósea, hígado, bazo y sangre periférica en busca de células hematopoyéticas humanas mediante citometría de flujo utilizando marcadores anti-CD45 y anti-HLA-ABC humanos, junto con marcadores específicos de linaje: inmaduro (CD34), linfocito B (CD19) o mielocito (CD33)(Figura 5.3.1).



**Figura 5.3.1. Reconstitución hematopoyética multilineaje y multiorganica en ratones NSG neonatos trasplantados con CMH y progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> solos o en presencia de células accesorias.** Análisis representativo por citometría de flujo mostrando reconstitución multilineaje. Todas las células humanas coexpresan HLA-ABC y CD45. La fracción humana CD45<sup>+</sup> abarca linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), células mieloides (CD33<sup>+</sup>) y células inmaduras (CD34<sup>+</sup>).

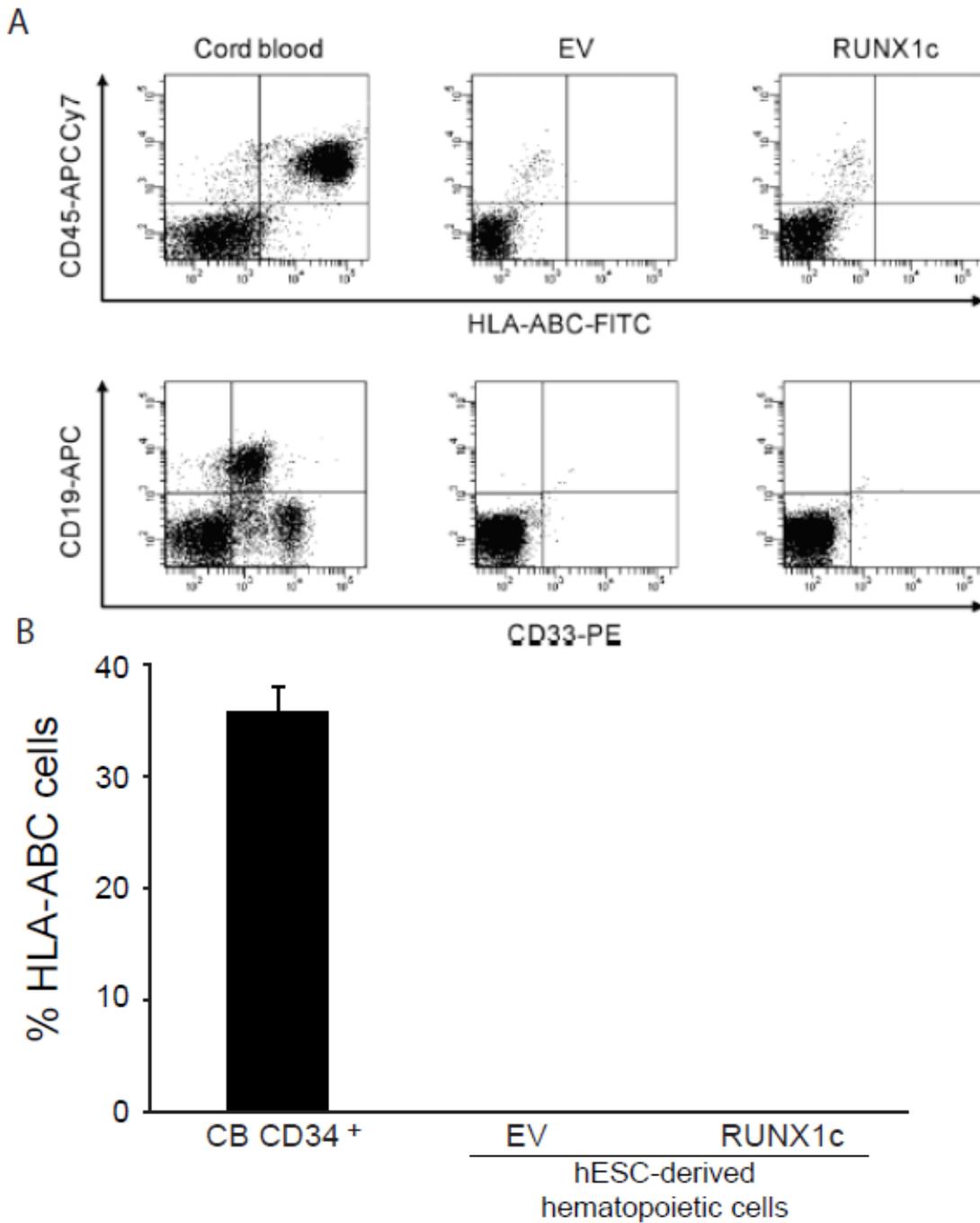
Todos los ratones trasplantados únicamente con CMH de cordón CD34<sup>+</sup> tuvieron reconstitución en todos los órganos analizados, mientras que el 20% de los que recibieron el co-trasplante de células accesorias no fueron capaces de reconstituir la hematopoyesis humana. La mayoría de las células hematopoyéticas humanas detectadas expresaban CD19<sup>+</sup> (linaje linfoide B, 80%) seguidas de células CD33<sup>+</sup> (linaje mieloides, 10%) y CD34<sup>+</sup> (progenitores hematopoyéticos, 10%) (Figura 5.3.1). La capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético no fue significativamente distinta entre los trasplantes con y sin células accesorias en tres de los cuatro órganos analizados, siendo ligeramente inferior en hígado de animales trasplantados con células accesorias (Figura 5.3.2). Es interesante que en ambos casos las células CD34<sup>+</sup> fueron capaces de migrar desde el hígado del neonato hasta la medula ósea, el órgano hematopoyético mayoritario en el adulto. En conclusión podemos decir que las células accesorias no son necesarias ni suponen un perjuicio para la capacidad de reconstitución multilineaje y multiorgánica de las células CD34<sup>+</sup> derivadas de cordón umbilical.



**Figura 5.3.2. Reconstitución hematopoyética multilineal y multiorgánica en ratones NSG neonatos trasplantados con CMH y progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> solos o en presencia de células accesorias.** Quimerismo humano multilineal en medula ósea (BM), sangre periférica (PB), bazo e hígado indicando migración exitosa de las células CD34<sup>+</sup> humanas desde el hígado fetal. Cada punto/cuadrado representa un único ratón y la línea horizontal indica la media de cada condición experimental. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 10 ratones en cada condición experimental. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Una vez puesta a punta la técnica de trasplante intra-hepático evaluamos la capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético de las células hematopoyéticas derivadas de CMEH. Los resultados obtenidos en las diferenciaciones hematopoyéticas *in vitro* con las CMEH que sobre-expresan *RUNX1c* nos animaron a investigar si este factor es suficiente para dotar de capacidad de reconstitución hematopoyética *in vivo* a las células hematopoyéticas derivadas de CMEH. Para ello trasplantamos células hematopoyéticas obtenidas de co-cultivos de CMEH EV y *RUNX1c* a día 8, trasplantando células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical como control positivo de la técnica. Tras 6-8 semanas, en ninguno de los ratones trasplantados con células hematopoyéticas derivadas de CMEH EV ni *RUNX1c* se observaron células humanas

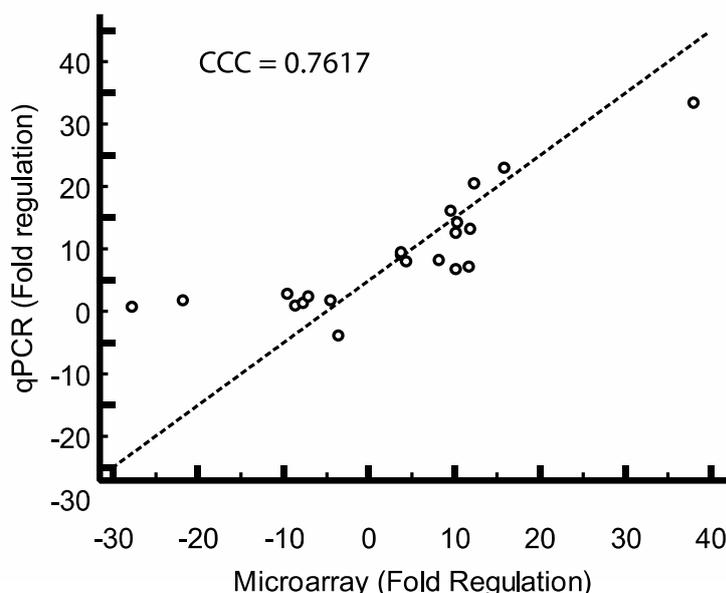
hematopoyéticas (HLA-ABC<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), mientras que si se identificaron dichas células en los ratones trasplantados con células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical (Figura 5.3.3). Por lo tanto RUNX1c por sí solo no es capaz de conferir potencial reconstitutivo *in vivo* a las células hematopoyéticas derivadas de CMEH, resultado que no sorprende a la luz de numerosos estudios en los cuales observan que las células hematopoyéticas derivadas de CMEH son incapaces de reconstituir el sistema hematopoyético *in vivo*<sup>165,169,207,392,393</sup>.



**Figura 5.3.3. La sobre-expresión de *RUNX1c* no confiere potencial de reconstitución hematopoyética a las células hematopoyéticas derivadas de CMEH.** (A) Análisis representativo por citometría de flujo mostrando reconstitución multilinaje a partir de células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical pero no de células hematopoyéticas derivadas de co-cultivos O9-CMEH EV o *RUNX1c*. Los ratones trasplantados con células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical poseen células que coexpresan HLA-ABC y CD45. La fracción humana CD45<sup>+</sup> abarca linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), células mieloides (CD33<sup>+</sup>) y células inmaduras (CD34<sup>+</sup>), a diferencia de los ratones trasplantados con células hematopoyéticas derivadas de co-cultivos OP9-CMEH EV o *RUNX1c*. (B) Porcentaje de reconstitución hematopoyética medido por porcentaje de células HLA-ABC<sup>+</sup>. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 ratones en cada condición experimental.

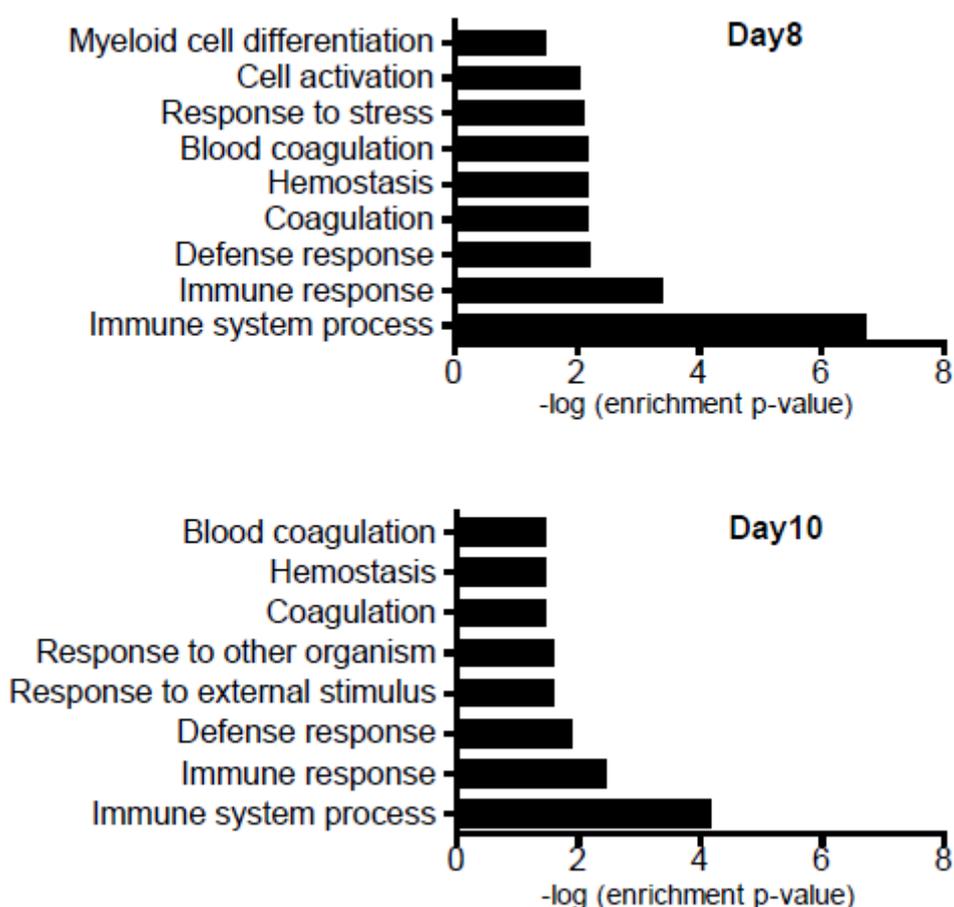
#### 5.4. La sobre-expresión de *RUNX1c* induce un perfil transcripcional inflamatorio en PHE

Para explorar los mecanismos moleculares por los cuales *RUNX1c* regula la TEH llevamos a cabo un análisis del perfil de expresión génica usando la tecnología de microarrays de ARN en PHE derivados de CMEH EV y *RUNX1c* a días 6, 8 y 10 de diferenciación hematopoyética. En primer lugar, a modo de confirmación de los resultados de los microarrays, seleccionamos 20 genes y realizamos análisis de expresión mediante qRT-PCR. A continuación, determinamos el grado de concordancia entre las dos medidas (valor de expresión de microarrays vs valor de expresión de qRT-PCR) usando un parámetro conocido como coeficiente de correlación de concordancia (CCC) (Figura 5.4.1). El valor de CCC (0.76) nos confirmó que el grado de correlación entre los resultados de expresión génica de las dos metodologías utilizadas era muy elevado y por tanto los resultados obtenidos en el microarray eran veraces.



**Figura 5.4.1. Análisis de correlación existente entre los datos de expresión obtenidos mediante microarrays de expresión y qRT-PCR.** Coeficiente de correlación de concordancia de un subconjunto de 20 genes diferencialmente expresados en PHE RUNX1c con respecto a PHE EV. Cada punto representa la intersección de los valores de expresión relativos en PHE RUNX1c frente a PHE EV analizados por qRT-PCR y por microarrays.

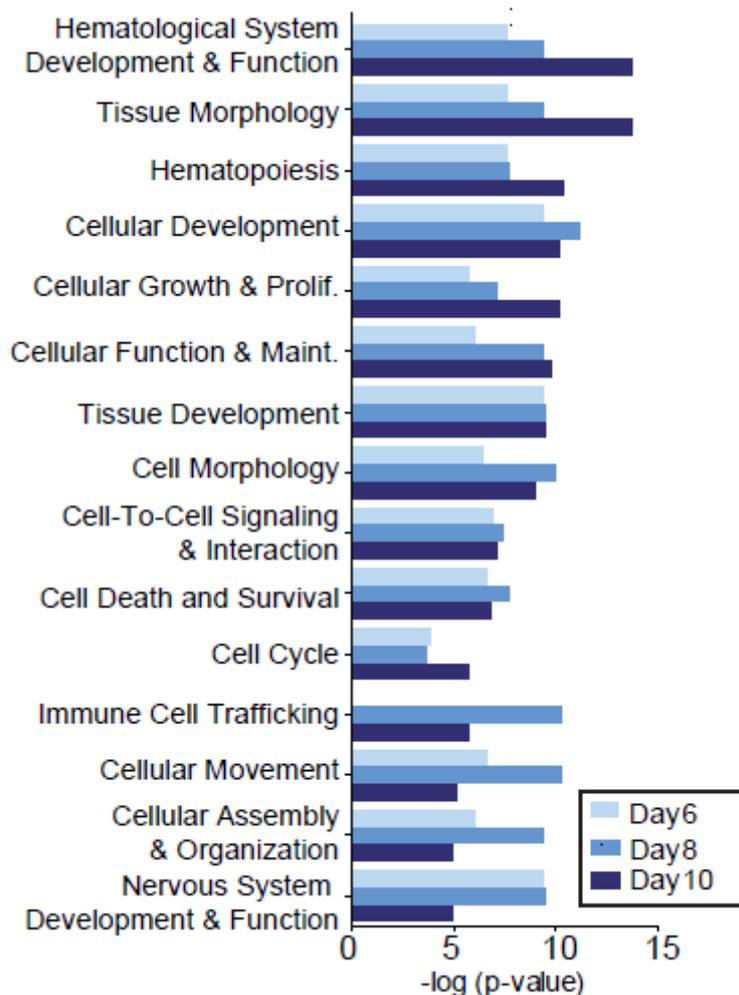
Seguidamente pasamos a analizar el perfil de expresión mediante una herramienta web llamada Panther ([www.panther.org](http://www.panther.org)) que aplica un test de enriquecimiento estadístico para encontrar los procesos biológicos en los que participan los genes diferencialmente expresados entre los PHE EV y RUNX1c a los diferentes días de diferenciación hematopoyética. A días 8 y 10 los procesos biológicos más relevantes, clasificados mediante P-value, estaban asociados con Procesos del Sistema Inmune y Respuestas de defensa/inmune (Figura 5.4.2).



**Figura 5.4.2. RUNX1c activa la expresión de genes relacionados con procesos del sistema inmune.** Principales procesos biológicos (categorizados en Gene Ontology y obtenidos mediante Panther) enriquecidos en genes diferencialmente expresados en PHE RUNX1c vs PHE EV a días 8 y 10 de diferenciación hematopoyética.

Para confirmar esta predicción, analizamos los datos de microarray con otro software llamado IPA (Ingenuity Pathway Analysis, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). La categoría “Desarrollo y función del

sistema hematopoyético” fue, de forma consistente, el proceso biológico más significativamente alterado en PHE RUNX1c con respecto a EV (Figura 5.4.3).



**Figura 5.4.3. Los procesos biológicos más significativamente alterados en PHE que sobre-expresan RUNX1c con respecto a EV tienen que ver hematopoyesis.** Principales funciones biológicas de los genes diferencialmente expresados en PHE RUNX1c comparados con PHE EV a días 6, 8 y 10 usando IPA.

El software IPA nos permite realizar un análisis más en profundidad de aquellas funciones biológicas alteradas dentro de esta categoría. Entre ellas encontramos muchas funciones que están predichas de estar activadas ( $Z\text{-score} > 2$ ) en PHE que sobre-expresan *RUNX1c* relacionadas con migración, adhesión y diferenciación tanto de células mieloides como linfoides (Figura 5.4.4). Estos resultados indican que *RUNX1c* está regulando un programa transcripcional que controla numerosas funciones biológicas durante el desarrollo de las células hematopoyéticas. Debemos destacar que este programa comienza a activarse durante el compromiso hematopoyético de los PHE, antes incluso de la aparición de los primeros progenitores hematopoyéticos.

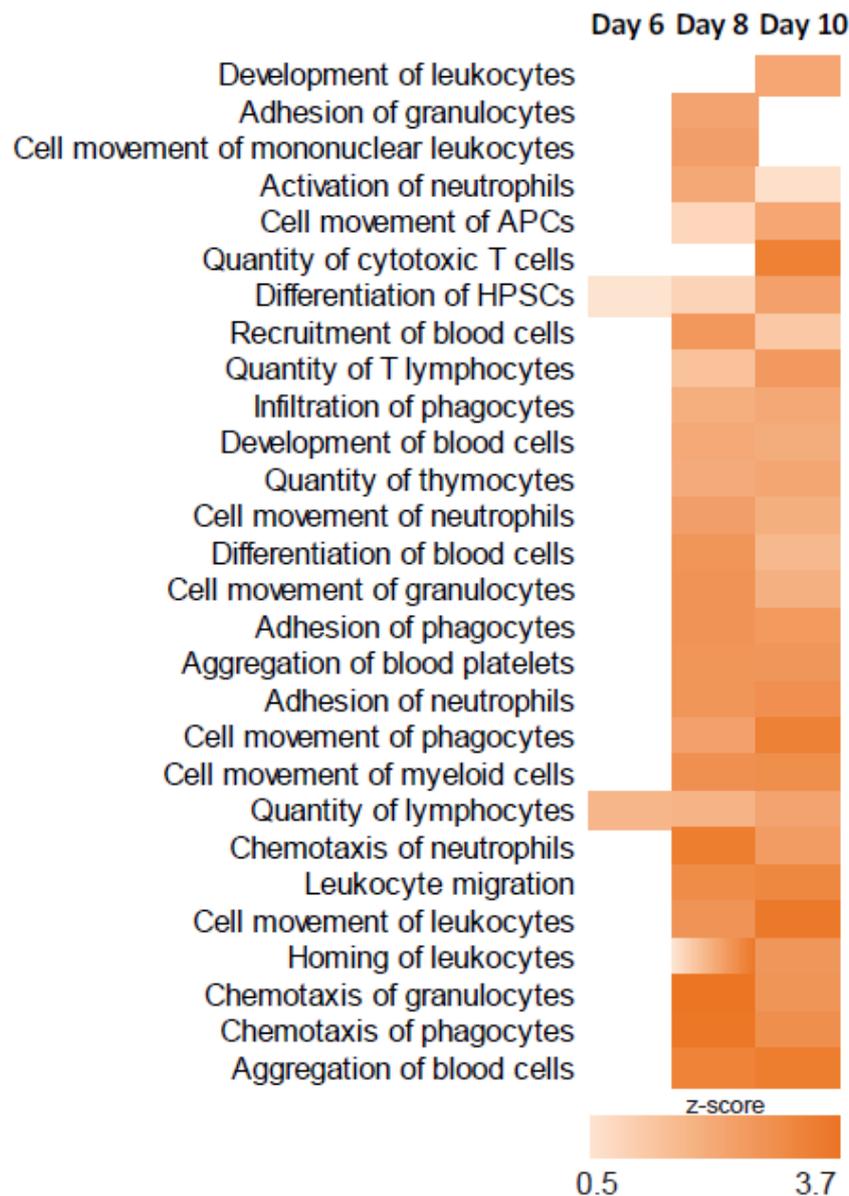
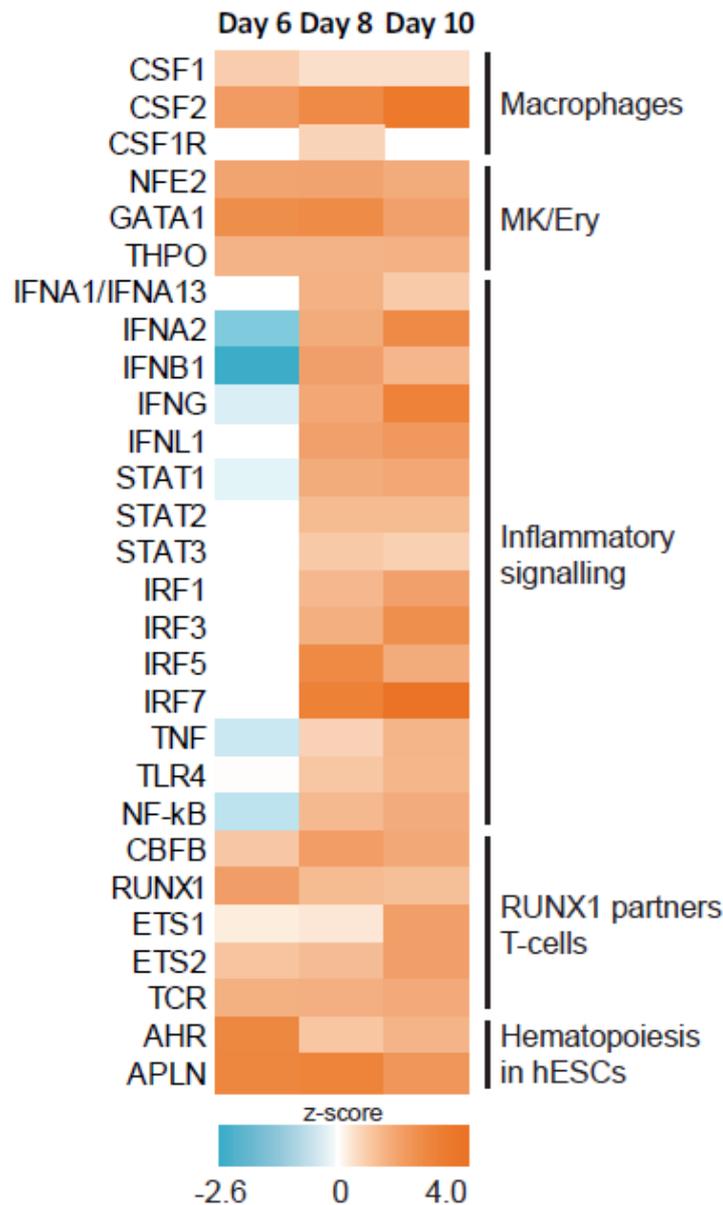


Figura 5.4.4. Funciones biológicas dentro de la categoría de “Desarrollo y función del sistema hematopoyético” predichas de estar activadas en PHE que sobre-expresan *RUNX1c* respecto a EV. Funciones biológicas predichas dentro de la categoría “Desarrollo y función del sistema hematopoyético” activas en PHE *RUNX1c* a días 6, 8 y 10.

IPA nos permite predecir que moléculas son responsables de los cambios en la expresión génica asociados con la sobre-expresión de *RUNX1c* en PHE (Figura 5.4.5). El análisis exhaustivo de estas moléculas (up-stream regulators) nos permitió distinguir cinco grupos diferentes de moléculas predichas de estar activadas por la sobre-expresión de *RUNX1c* en los PHE: i) reguladores de la diferenciación a macrófagos; ii) reguladores megacariocítico/eritroides; iii) compañeros de *RUNX1* y reguladores del desarrollo de células T; iv) reguladores de la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH<sup>394,395</sup>; y v) componentes de la vía de

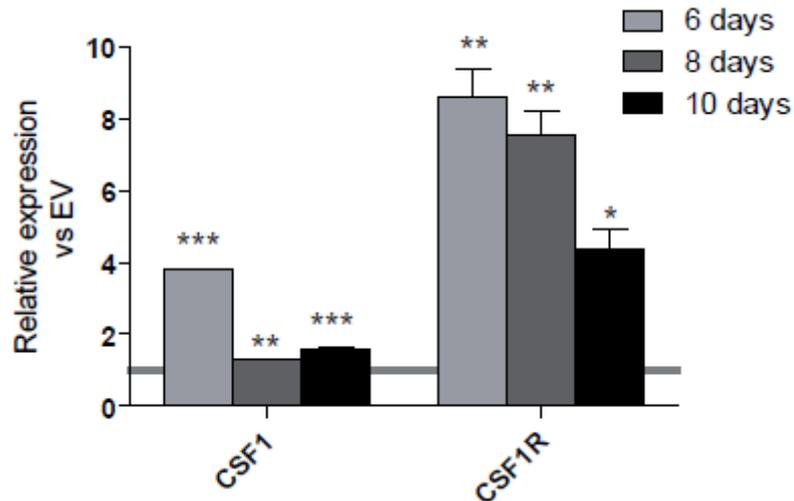
señalización inflamatoria, que representa el grupo más numeroso y que confirma los resultados obtenidos con el software Panther (Figura 5.4.2).



**Figura 5.4.5. Genes predichos de estar activos (Z-score > 2) por la sobre-expresión de *RUNX1c* agrupados en distintas categorías.** Selección de lo más destacado de los upstream regulators predicho de estar activados (naranja) o reprimidos (azul) en PHE *RUNX1c* a días 6, 8 y 10 de diferenciación.

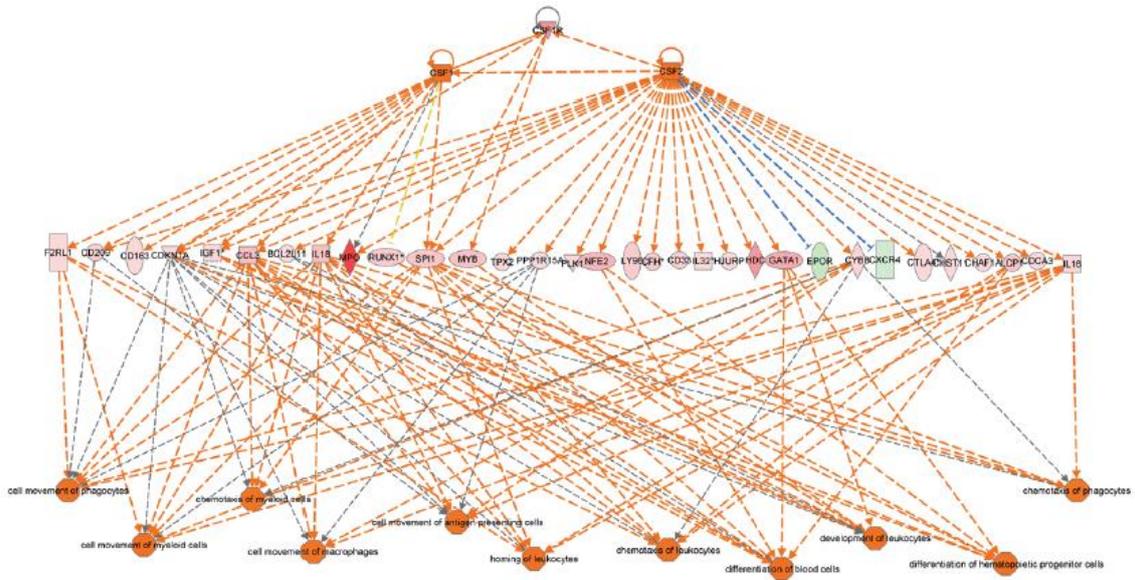
A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos funcionales de formación de colonias hematopoyéticas que sugieren que *RUNX1c* juega un papel en la generación de CFU-M (Figuras 5.2.2.5 y 5.2.3.4) nos concentramos en analizar los reguladores de la activación de macrófagos. CSF1 (también conocido como M-CSF), CSF2 (también conocido como GM-CSF) y su receptor CSF1R son necesarios para la producción, diferenciación, expansión y función de macrófagos, granulocitos y sus progenitores<sup>396</sup>. IPA predice que la sobre-expresión de *RUNX1c* en PHE

activa a CSF1 y CSF2 desde día 6 en adelante y a CSF1R a día 8. El análisis de expresión de CSF1 y CSF1R mediante qRT-PCR confirmó su aumento a lo largo de la diferenciación (Figura 5.4.6)



**Figura 5.4.6.** La sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de CSF1 y CSF1R desde día 6 a día 10 de diferenciación hematopoyética. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Este aumento en la expresión de ambos genes puede ser responsable de la activación de numerosos genes aguas abajo, que a su vez desencadenen los fenotipos obtenidos en los ensayos de formación de colonias. Usando IPA pudimos generar una red de reguladores predichos de estar activados o inhibidos aguas abajo de estos tres elementos y que participan activamente en la biología de los macrófagos (Figura 5.4.7). En conjunto nuestros resultados sugieren que la activación de vía de señalización por CSF1R mediada por *RUNX1c* puede ser responsable de las diferencias en el balance de CFU-G/CFU-M observadas en la sobre-expresión (Figura 5.2.2.5) y delección de *RUNX1c* (Figura 5.2.3.4).



**Figura 5.4.7. Red de genes predichos de estar activados o inhibidos por CSF1, CSF2 y CSF1R cuyo perfil de expresión explica una activación de funciones biológicas relacionadas con macrófagos.**

A continuación, nos centramos en el grupo de genes que regulan la vía de señalización inflamatoria y que era el más numeroso en nuestro análisis (Figura 5.4.5). Recientemente, se ha propuesto que las señales pro-inflamatorias, incluyendo a  $TNF\alpha$ ,  $IFN\alpha$  e  $IFN\gamma$ , son clave en el establecimiento de la hematopoyesis definitiva en modelos experimentales (ratón y pez cebra)<sup>397–399</sup>. Usamos IPA para visualizar la red transcripcional formada por los reguladores inflamatorios y sus dianas conocidas en PHE que sobre-expresan RUNX1c durante la diferenciación hematopoyética. A día 6, dichos reguladores inflamatorios están predichos de estar inactivos y aparecen resaltados en color azul, símbolo de predicción de inhibición (Figura 5.4.8).

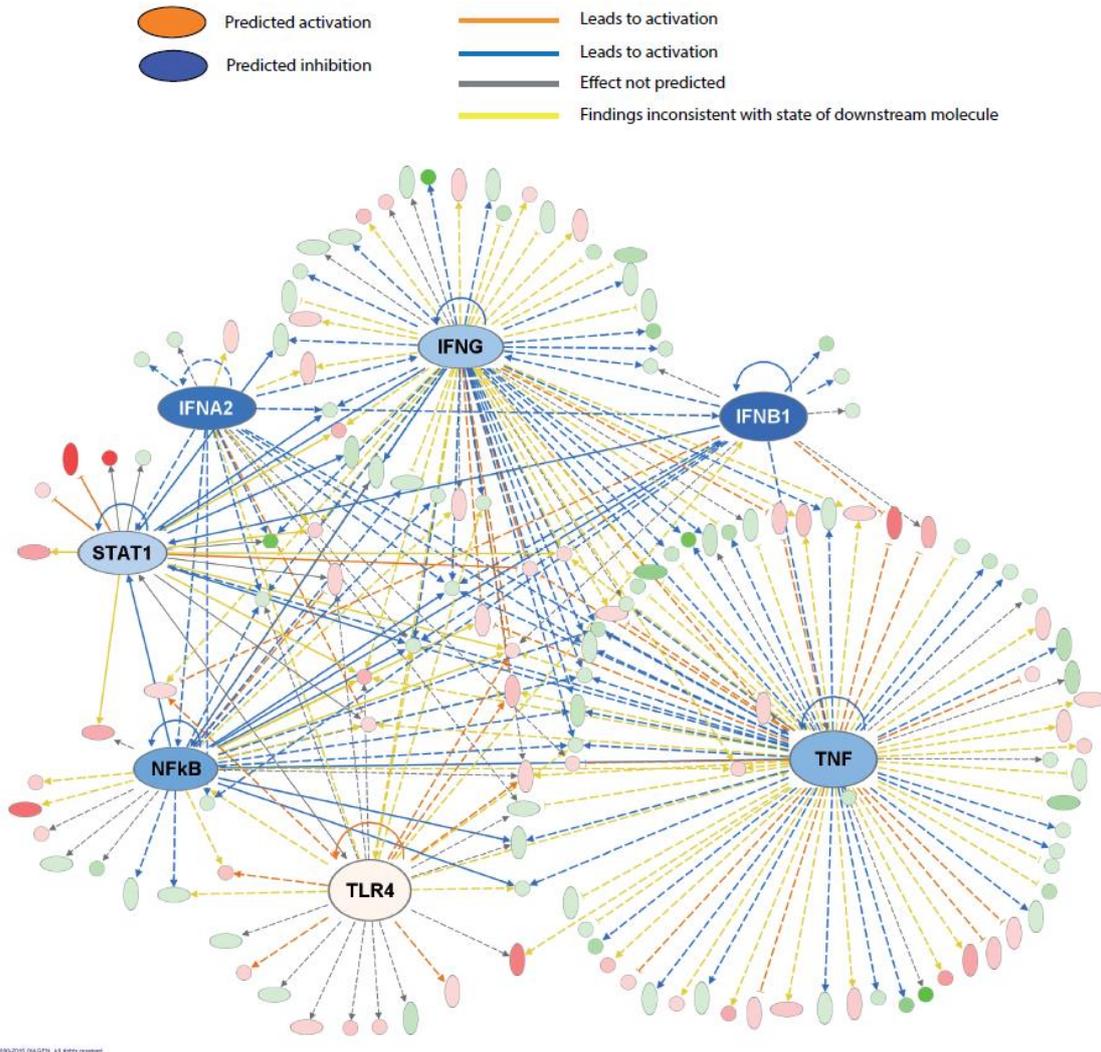


Figura 5.4.8. Predicción de un estado transcripcional reprimido de los reguladores inflamatorios y sus dianas en PHE RUNX1c a día 6 de diferenciación hematopoyética.

En cambio, conforme avanzan los días se produce un cambio sustancial en el nivel de activación de estos reguladores de la inflamación. A día 8 la red de genes directamente regulados por estas moléculas se ha expandido y está predominantemente activa, existiendo multitud de dianas co-reguladas por diferentes factores de forma simultánea (Figura 5.4.9). De todos estos reguladores IFNG parece ser el factor más importante de todos, ya que regula directamente una elevada cantidad de genes diana y comparte otro importante número (co-regulaciones) con otros reguladores de la inflamación.

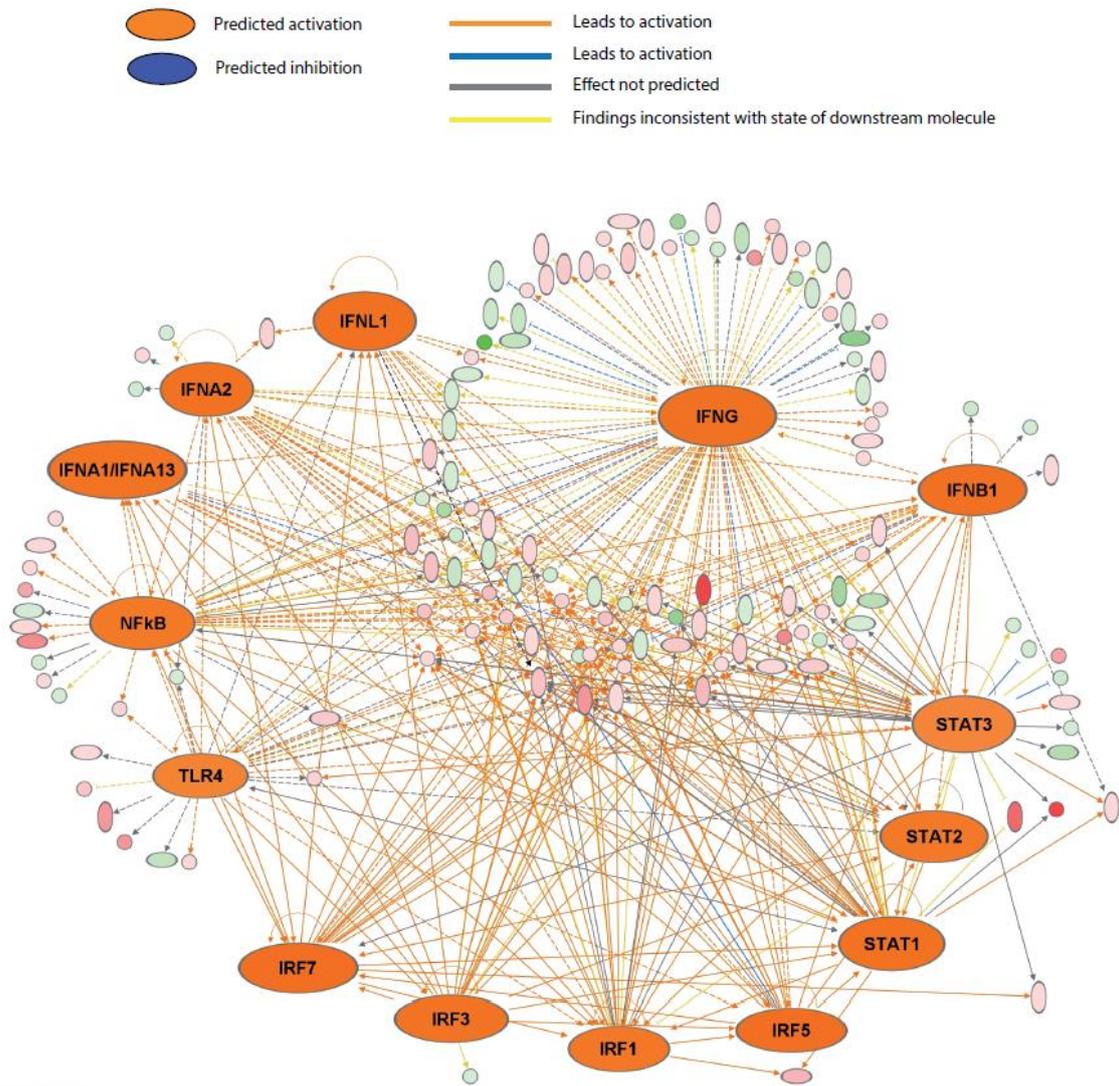


Figura 5.4.9. Predicción de un estado transcripcional activado de los reguladores inflamatorios y sus dianas en PHE *RUNX1c* a día 8 de diferenciación hematopoyética.

A día 10 los reguladores inflamatorios permanecen activados, pero la importancia relativa del IFNG ha disminuido en favor de TNF, el cual aparece ahora y presenta un gran número de genes diana y co-regulaciones (Figura 5.4.10). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *RUNX1c* activa una red compleja de señales inflamatorias, incluyendo TNFs e IFNs, en el momento en el que los PHE llevan a cabo la TEH. El papel de *RUNX1c* puede ser promover dicha transición mediante la regulación de la expresión de estos factores pro-inflamatorios.

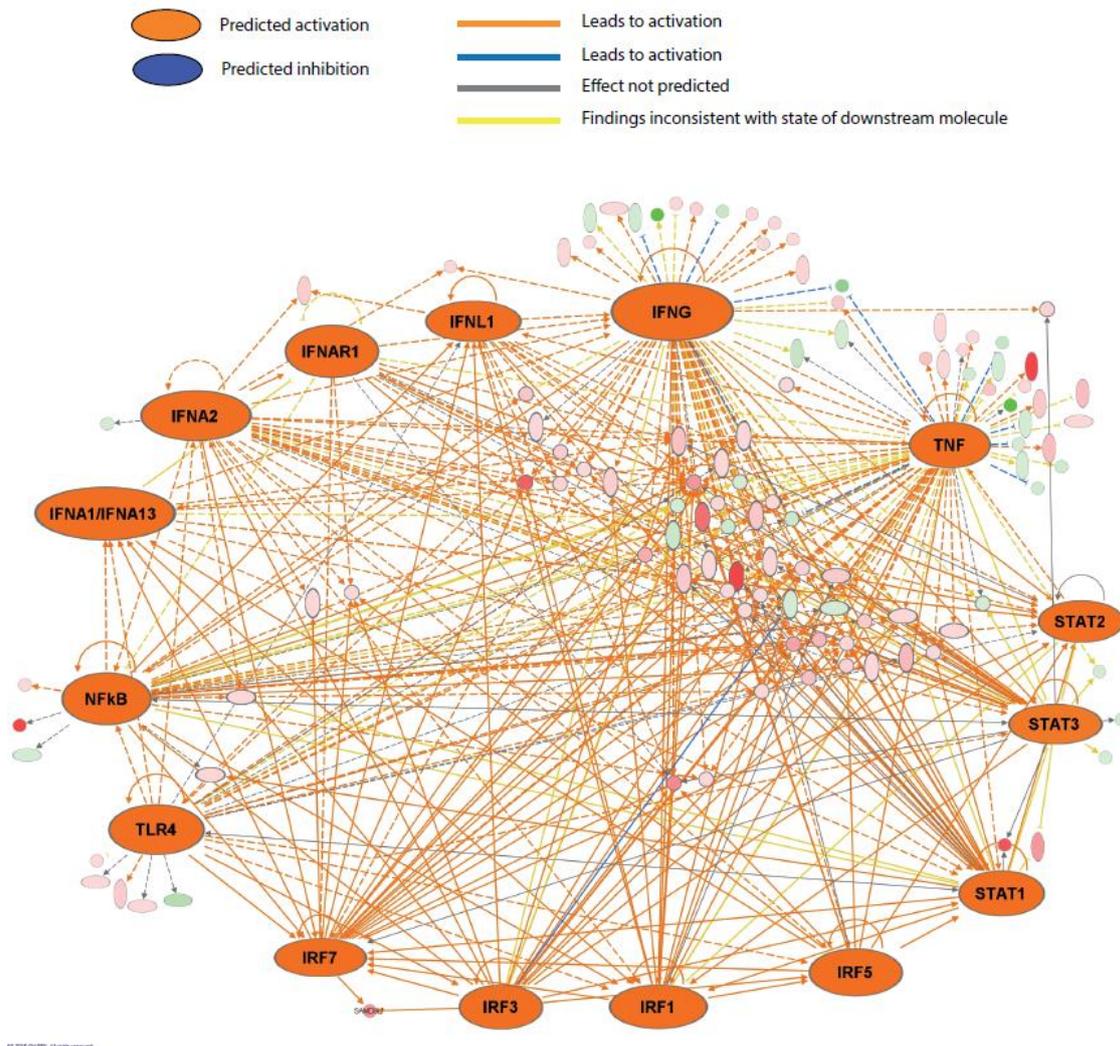


Figura 5.4.10. Predicción de un estado transcripcional activado de los reguladores inflamatorios y sus dianas en PHE RUNX1c a día 10 de diferenciación hematopoyética.

Tras estos análisis *in silico* quisimos comprobar que las activaciones predichas por IPA se correspondían con un aumento real en la expresión de estos genes reguladores de la inflamación. Para ello llevamos a cabo análisis de expresión de dichos reguladores mediante qRT-PCR en PHE generados a partir de CMEH-EV y CMEH-RUNX1c que fueron purificados a días 6, 8 y 10 de la diferenciación hematopoyética. Los genes *IFNA2*, *IFNB1*, *IRF1* e *IRF7* se encontraron más inducidos en PHE-RUNX1c con respecto al control (PHE-EV) (Figura 5.4.11).

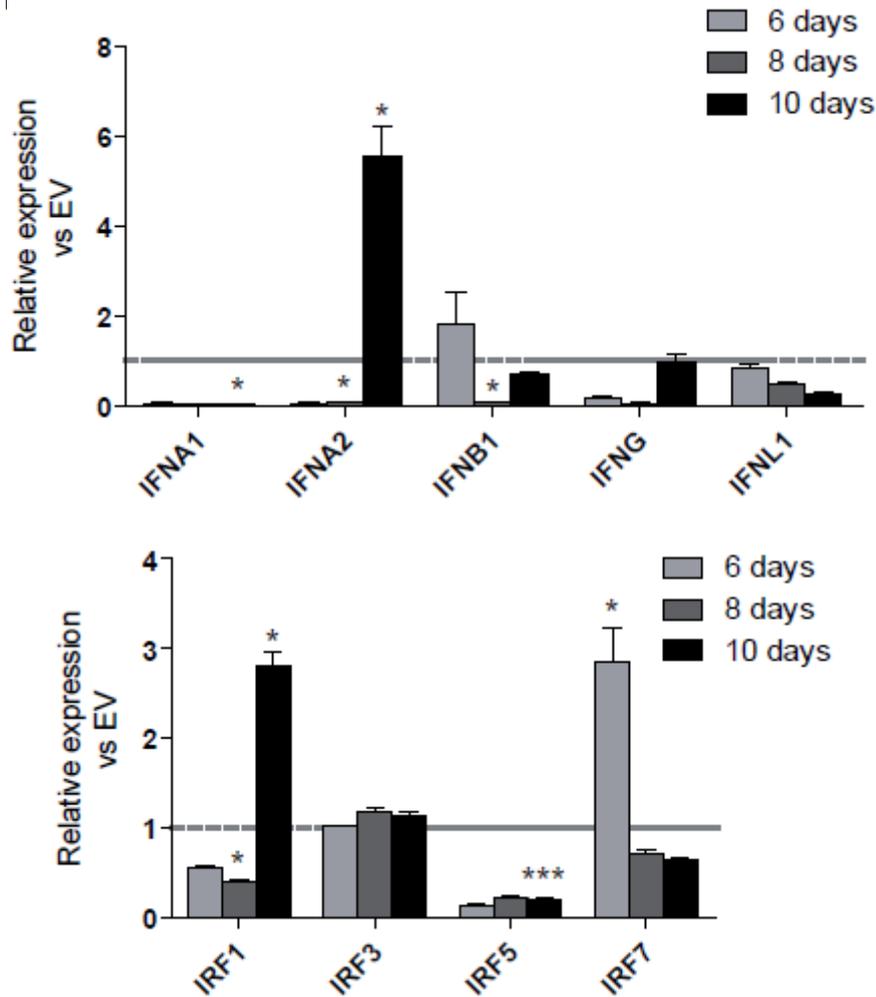
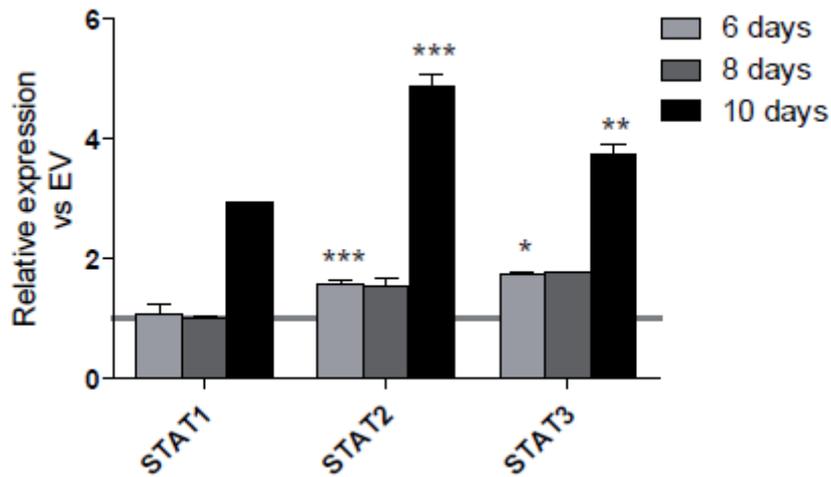


Figura 5.4.11. La sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de IFNA2, IFNB1, IRF1 e IRF7 a lo largo de la diferenciación hematopoyética. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

La señalización de los interferones de tipo I está mediada por las proteínas quinasa de la familia Janus (JAK de Janus Kinase) que reclutan y activan los factores transcripcionales STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription)<sup>400</sup>. Interesantemente, STAT2 y STAT3 presentaban un aumento significativo de su expresión a día 10 en PHE que sobre-expresan *RUNX1c* (Figura 5.4.12).



**Figura 5.4.12. La sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de los genes STATs a lo largo de la diferenciación hematopoyética.** La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Además, la sobre-expresión de *RUNX1c* también promueve un aumento de la expresión de los miembros de la familia de NF-KB, *NFKB1* y *RELA*, y de *TLR4* a día 10, mientras que no indujo la expresión de TNF a ninguno de los días (Figura 5.4.13).

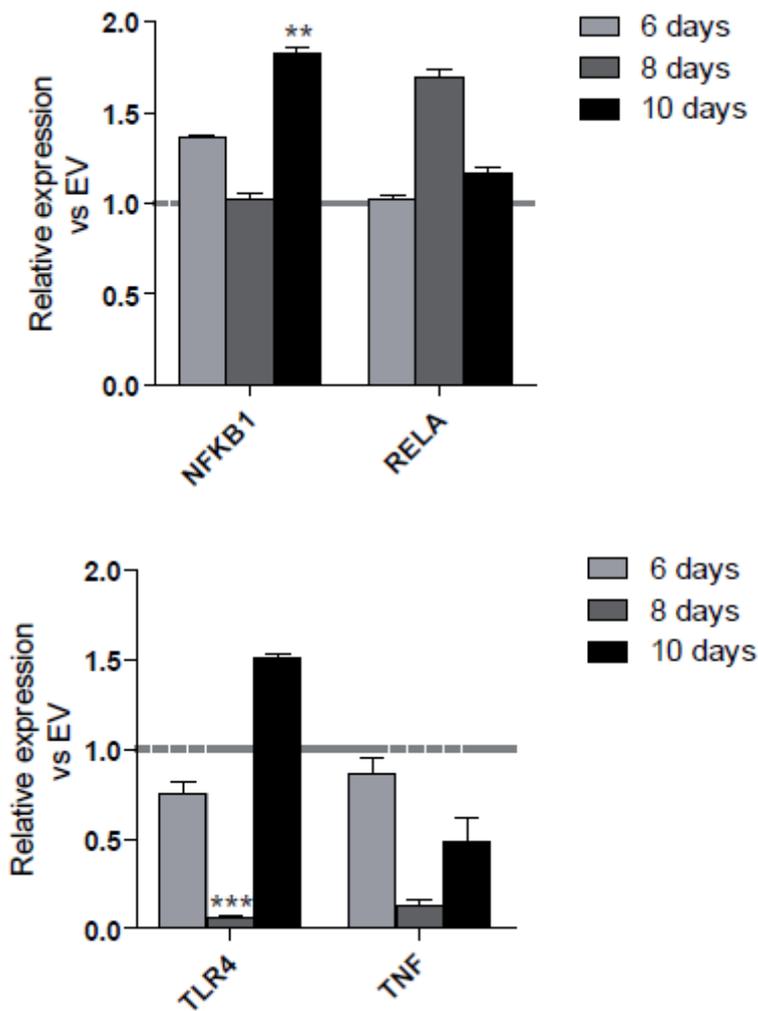


Figura 5.4.13. La sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de *NFKB1* a día 10 e inhibe a *TLR4* a día 8. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Para verificar estos resultados, aislamos los PHE diferenciados a partir de CMEH *RUNX1c*  $-/-$  y su correspondiente control (*RUNX1c*  $+/+$ ) y analizamos el mismo panel de genes de señalización pro-inflamatoria mediante qRT-PCR (Figura 5.4.14). Debemos destacar que todos los genes analizados presentaban menor expresión en PHE-*RUNX1c*  $-/-$ , reforzando la hipótesis de que *RUNX1c* regula la activación de señales pro-inflamatorias necesarias para la diferenciación hematopoyética de los PHE.

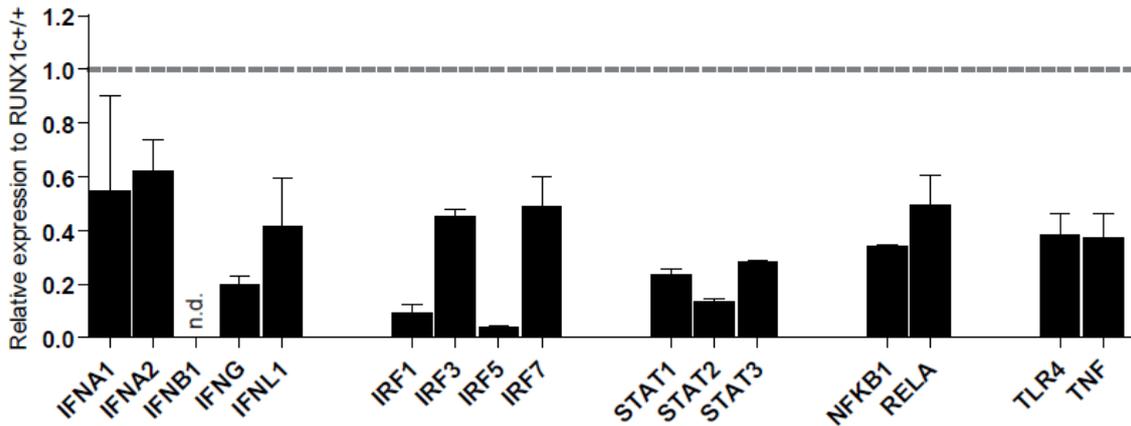


Figura 5.4.14. La ausencia de expresión de *RUNX1c* disminuye la expresión de factores clave de la señalización pro-inflamatoria. La expresión relativa se muestra normalizada frente a CMEH EV. Se ha usado *GAPDH* como control interno. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

Finalmente, quisimos evaluar la posibilidad de que la regulación de dichos genes sea directamente por *RUNX1c*. Para ello realizamos un análisis *in silico* empleando la base de datos pública BloodChIP (<http://149.171.101.136/python/BloodChIP/index.html>) que contiene los lugares de unión de diferentes factores transcripcionales hematopoyéticos en distintos modelos celulares humanos, incluidas CMH humanas. Su análisis reveló que la mayoría de estos genes son dianas directas de *RUNX1* en CMH humanas, encontrando además una buena correlación entre los genes modulados por la sobre-expresión de *RUNX1c* en PHE y la unión de *RUNX1* en sus promotores en CMH humanas (Tabla 5.4.1). Estos resultados sugieren que *RUNX1c* está mediando la expresión de los reguladores de la inflamación de manera directa, uniéndose a secuencias de reconocimiento de *RUNX1* en sus respectivos promotores.

<b>Gene</b>	<b>RUNX1 binding</b>	<b>Genome annotations (Start-End)</b>
<i>CSF1</i>	YES	chr1 110429058-110430140
<i>CSF2</i>	YES	chr5 131438435-131440094 chr5 131449874-131451544
<i>CSF1R</i>	YES	chr5 149460968-149463306
<i>IFNA1</i>	YES	chr9 21444011-21444704
<i>IFNA2</i>	YES	chr9 21385097-21385695
<i>IFNB1</i>	YES	chr9 21118646-21119729
<i>IFNG</i>	NO	
<i>IFNL1</i>	n.d.	
<i>IRF1</i>	YES	chr5 131761701-131764037 chr5 131790160-131790401 chr5 131791305-131793947 chr5 1318000177-131800415 chr5 131801591-131803945 chr5 131836212-131837675 chr5 131864594-131865665
<i>IRF3</i>	NO	
<i>IRF5</i>	YES	chr7 128572076-128582050 chr128577207-128582050
<i>IRF7</i>	YES	chr11 614580-617849
<i>NFKB1</i>	YES	chr4 103341931-103353311 chr4 103421372-103424074
<i>RELA</i>	YES	chr11 65405108-6509792 chr11 65419358-65421239 chr11 65478174-65480486
<i>STAT1</i>	YES	chr2 191812015-191813367 chr2 191835660-191835905 chr2 191878160-191879663 chr2 19184610-191886256
<i>STAT2</i>	YES	chr12 56752523-56754809
<i>STAT3</i>	YES	chr17 40467348-40468309 chr17 40471004-40472795 chr17 40539107-40541478 chr17 40557628-40558722
<i>TLR4</i>	YES	chr9 120406627-120407645
<i>TNF</i>	NO	

Tabla 5.4.1. Genes pro-inflamatorios y las coordenadas genómicas de la ocupación de RUNX1 en CMH humanas.

## **6. DISCUSIÓN**

Los procesos biológicos y moléculas responsables del desarrollo del sistema hematopoyético humano han sido bastante menos estudiados que en organismos modelo, como ratón o pez cebra, de los que hemos obtenido la mayoría del conocimiento. Las CMEH suponen el único modelo celular que nos permite acceder al estudio de los mecanismos que gobiernan la embriogénesis humana. El estudio de los factores y procesos que dirigen el desarrollo hematopoyético en CMEH permitirá el avance en la comprensión de la biología del desarrollo hematopoyético humano. Este conocimiento puede ser crucial para mejorar las terapias celulares actuales, tales como el trasplante de médula ósea, y futuras basadas en CMPH promoviendo la generación de CMH funcionales capaces de reconstituir el sistema hematopoyético humano en pacientes.

Nuestro estudio demuestra que **RUNX1c es un factor muy relevante para que se lleve a cabo la diferenciación hematopoyética de CMEH, probablemente mediante la activación de la vía de señalización pro-inflamatoria.**

En primer lugar mostramos que *RUNX1c* es la primera isoforma inducida durante la diferenciación hematopoyética de CMEH, mientras que las isoformas *RUNX1a/b* son inducidas más tarde. En nuestro estudio hemos analizado la expresión relativa frente a CMEH en estado pluripotente, por ello hablamos de inducción de la expresión. Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo en el cual se observa que la expresión de *RUNX1b* permanece más o menos constante mientras que la de *RUNX1c* es inducida en un patrón similar al de los marcadores hematopoyéticos que analizan (CD34, CD43, TAL1), en diferenciación hematopoyética a partir de CMEH utilizando un sistema de diferenciación basado en la generación de EBs<sup>373</sup>. Igualmente, en pez cebra se detecta la expresión de *RUNX1c* desde el estadio de oocito no fertilizado y también en el cigoto (tiempo 0), a diferencia de las isoformas *RUNX1a/b* que comienzan a expresarse 14 horas post-fertilización (14hpf). Así, el patrón de expresión en pez cebra es diferente al que hemos observado en CMEH<sup>352</sup>. También la forma de análisis es diferente porque ellos realizan una expresión absoluta medida por PCR, mientras que nosotros hacemos una expresión relativa. Existe otro estudio independiente que ha analizado la expresión de las isoformas de *RUNX1*, usando unos juegos de primers que reconocen las isoformas *RUNX1b/c* por un lado y *RUNX1a* por otro, por lo que no se puede discernir la expresión de *RUNX1b* de la de *RUNX1c* y por tanto tampoco lo podemos comparar con el nuestro<sup>205</sup>.

Por el contrario, durante la hematopoyesis embrionaria en ratones *in vitro* e *in vivo* las isoformas que emergen a partir del promotor P2 (*RUNX1a* y *RUNX1b*) se expresan antes que las del promotor P1 (*RUNX1c*)<sup>350,351</sup>. Es probable que la regulación del uso de los distintos promotores esté sujeto a diferencias específicas de especie. Parece que en ratón las isoformas *RUNX1a/b* se expresan pronto en el desarrollo y su expresión se mantiene constante o aumenta levemente mientras que *RUNX1c* comienza a expresarse después de *RUNX1a/b* con un aumento repentino para luego mantenerse y erigirse como la isoforma que domina en la hematopoyesis fetal y adulta. Sin embargo, en pez cebra el patrón es el contrario. Por lo tanto, no se observa un patrón claro de expresión de las distintas isoformas a lo largo del desarrollo hematopoyético conservado a lo largo de la evolución. El consenso en la forma de analizar la expresión de las diferentes isoformas (primers que distingan las 3 isoformas, expresión relativa vs absoluta, cuantitativa vs cualitativa,...) ayudaría notablemente en el estudio del patrón de expresión en las distintas especies.

A día de 6 de diferenciación *RUNX1* y *SCL* ya se expresan, *SCL* a niveles ligeramente superiores que *RUNX1*, por lo que es probable que se comience a inducir antes. En ratón se ha reportado que la expresión tanto de *SCL* como de *RUNX1* comienza en células mesodérmicas del saco vitelino que están destinadas a formar las islas sanguíneas<sup>101,268,336,401</sup> siendo *RUNX1* activado directamente por *SCL* en el saco vitelino<sup>382</sup>. En nuestro sistema de diferenciación hematopoyética basado en el co-cultivo con las células OP9, *GATA1* y *PU.1* comienzan a inducirse tras *RUNX1*, lo que concuerda con la conocida regulación de ambos factores de transcripción por *RUNX1*<sup>330,402-404</sup>, y valida este sistema de diferenciación a nivel molecular.

Analizando más en detalle la expresión de las isoformas de *RUNX1* en distintas poblaciones celulares que aparecen durante la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH, observamos que las 3 isoformas presentan un aumento en su expresión en células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> con respecto a células no hematopoyéticas, mientras que sólo la isoforma *RUNX1c* es inducida en PHE. Se ha demostrado que *Runx1* es necesario para que las pre-HSC tipo I (CD41+CD45-) progresen a pre-HSC tipo II (CD41+CD45+)<sup>405</sup>. La expresión de CD41 en este estadio del desarrollo es transitoria siendo máxima en las pro-HSC y disminuyendo progresivamente hasta que no se detecta prácticamente en HSC definitivas<sup>87</sup>. También se ha observado que la activación del promotor distal *P1* se comienza a detectar en células CD41+<sup>351</sup>. Uniendo todas estas observaciones parece probable que *RUNX1c* sea un importante regulador de la transición desde endotelio hemogénico hasta CMH definitivas, quizá en la adquisición del/los marcador/es CD43 y/o CD45. La población que denominamos PHE es heterogénea y posiblemente abarca

diferentes subpoblaciones que puedan contener desde células endoteliales con y sin potencial homogéneo hasta probablemente células de los primeros estadios de la TEH (pro-HSC, pre-HSC tipo I y tipo II), ya que todas ellas se caracterizan por la expresión de los marcadores usados para delimitar a esta población celular (CD31+CD34+CD45-). La disección de estos PHE en las distintas subpoblaciones nos permitiría establecer con más precisión en qué momento concreto se produce la activación de la expresión de *RUNX1c*. En resumen, nuestra observación de que *RUNX1c* es la única isoforma que aumenta considerablemente su expresión en los PHE concuerda con resultados de estos grupos<sup>87,351,405</sup>.

Debido al interesante patrón de expresión de *RUNX1c* durante la diferenciación hematopoyética decidimos profundizar en el estudio del papel concreto de esta isoforma durante el desarrollo hematopoyético humano. Para ello generamos tres líneas de CMEH que sobre-expresan constitutivamente *RUNX1c*. Tras diferenciarlas hacia linaje hematopoyético observamos que la sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta tanto el número de PHE como de células hematopoyéticas. Los ensayos de ciclo celular y apoptosis así como el cálculo del ratio de células CD45+ por cada PHE nos indican que *RUNX1c* promueve la diferenciación hematopoyética y no la proliferación o supervivencia de los PHE. Este aumento en la formación de PHE apoya nuestra hipótesis de que *RUNX1c* juega un papel en la biología de alguna subpoblación dentro de los PHE, probablemente en la progresión de células CD34+CD43-CD45- (pro-HSC) hasta CD34+CD43+CD45- (pre-HSC tipo I). El aumento en el número de células CD45+ por cada PHE nos indica que es muy probable que también este favoreciendo la progresión de células CD34+CD43+CD45- (pre-HSC tipo I) a CD34+CD43+CD45+ (pre-HSC tipo II). De nuevo, la disección de los PHE en distintas subpoblaciones mediante inmunofenotipo permitirá discernir la/s población/es dentro de los PHE en la/s cual/es *RUNX1c* ejerce su función. Por el contrario, la sobre-expresión de *RUNX1c* en CMH y progenitores hematopoyéticos de ratón promovieron quiescencia<sup>373</sup>. Esto se puede deberse a que *RUNX1c* tenga funciones distintas en la formación de las CMH y en la fisiología de las CMH una vez establecidas.

Ran *et al* sobre-expresaron *RUNX1a* en CMEH y llevaron a cabo diferenciación hematopoyética, observando que aumentaba la producción de distintas poblaciones mesodérmicas y hematopoyéticas<sup>205</sup>. Si se observa el estudio con más detalle se puede deducir que se produce un aumento del número de células CD34+CD43+CD45+, fenotipo de un estadio primitivo de desarrollo hematopoyético en CMEH, y que no son capaces de perder la expresión de CD34 requisito indispensable para progresar hacia la formación de células hematopoyéticas más maduras. Las células que sobre-expresan *RUNX1a* adquieren una capacidad de expansión y

proliferación inusualmente elevada, 25 veces mayor que el control e incluso mayor que las células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical. Además, reportan que el 33% de los ratones analizados muestran reconstitución, una tasa de mortalidad muy elevada para este tipo de trasplante, desconociéndose la causa de muerte del 66% restante por lo que podría estar relacionada con la sobre-expresión de *RUNX1a*. Cuando se analiza con más detalle se observa que la proporción de células mieloides (CD33<sup>+</sup>), linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y eritrocitos (CD36<sup>+</sup>) suman un 23% del total, siendo incierto el fenotipo del 77% restante. Es probable que sean células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> que presenten un bloqueo en la diferenciación fruto de la sobre-expresión de *RUNX1a*. Otro problema que presenta el estudio es que al conseguir niveles tan elevados de proliferación/expansión son capaces de trasplantar 150000 células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, algo que no es posible normalmente en el resto de laboratorios. Como no muestran resultados de reconstitución de las líneas wild-type o EV no se puede concluir que la capacidad de reconstitución es debido a la sobre-expresión de *RUNX1a* en lugar de al elevado número de células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> trasplantadas. Los autores alegan que no observan signos de transformación o una expansión anormal a lo largo de los ensayos de reconstitución, probablemente porque han ocurrido en los ratones muertos. Proponen el uso de sobre-expresión transitoria en lugar de constitutiva para conseguir este aumento en progenitores hematopoyéticos, aunque teniendo en cuenta su potencial leucemogénico no es seguro su uso ni de forma transitoria para expansión de células que van a ser usadas en trasplantes hematopoyéticos en pacientes. Estos resultados sugieren que *RUNX1a* está promoviendo una diferenciación aberrante con un bloqueo en progenitores hematopoyéticos primitivos los cuales proliferan anormalmente y que podrían tratarse de células en estadio pre-leucémicos. De hecho se ha observado que la sobre-expresión de esta isoforma en células mononucleares de medula ósea y su posterior trasplante en ratones inmunodeficientes provoca el desarrollo de leucemias, así como que *RUNX1a* se encuentra sobre-expresada en células de la medula ósea de pacientes con LLA y LMA-M2 con respecto a controles sanos<sup>406</sup>. Por lo tanto, *RUNX1a* parece estar más implicada en expansión y proliferación de CMH y progenitores hematopoyéticos y *RUNX1c* en la TEH durante el desarrollo embrionario temprano.

En ensayos funcionales de CFU, la sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta el número de colonias obtenidas por cada 10000 células humanas cultivadas. En cuanto al tipo de colonias se observa que la sobre-expresión de *RUNX1c* disminuye el número relativo de colonias G y GM y aumenta el de M. Es bien conocido el papel de *RUNX1* en la diferenciación a macrófagos<sup>311,407</sup>, aunque nunca se había profundizado en cual/es isoforma/s son la/s responsable/s de dicho efecto. De

nuestro estudio se desprende que *RUNX1c* parece estar favoreciendo la diferenciación hacia linaje monocítico. Por otro lado, la sobre-expresión de *RUNX1a* en CMEH provoca un incremento en el número de colonias GEMM y eritroides a expensas del resto<sup>205</sup>, que junto con el aumento en el número de progenitores hematopoyéticos sugiere un rol de *RUNX1a* en la proliferación de las CMH/PMP más que en diferenciación.

A nivel molecular la sobre-expresión de *RUNX1c* aumenta la expresión de *SCL*, *GATA1* y *PU.1*. De nuevo, se ha reportado la regulación de *GATA1*<sup>1330,402</sup> y *PU.1*<sup>1383,404</sup> por *RUNX1*, pero la activación de la expresión de estos dos factores por *RUNX1c* era desconocidas hasta ahora. Más sorprendente es la inducción de *SCL* por *RUNX1c*, en contraste con publicaciones previas<sup>382,408,409</sup>. Una posibilidad es que *RUNX1c* active la expresión de una de las isoformas de *SCL* que no está implicada en el establecimiento del endotelio hemogénico, como se ha sugerido en pez cebra<sup>410</sup>. Otra posibilidad es que exista un mecanismo de retroalimentación positivo de manera que la expresión de *SCL* active a *RUNX1* y *RUNX1c* a su vez active a *SCL*.

A la luz del aumento en la diferenciación hematopoyética producido por la sobre-expresión de *RUNX1c* en CMEH quisimos evaluar el potencial de reconstitución hematopoyética *in vivo* de los progenitores hematopoyéticos derivados de CMEH *RUNX1c*. Decidimos optar por el trasplante intrahepático en ratones neonatos ya que la reconstitución hematopoyética puede ser más eficiente si los progenitores hematopoyéticos derivados de CMEH son trasplantados en un órgano ontogénicamente relacionado. Además el hígado fetal es un medio más permisivo inmunológicamente, disminuyendo la posibilidad de rechazo. Por otro lado, el co-trasplante de células accesorias junto con progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> se ha asociado durante mucho tiempo con una reconstitución mayor y más estable. Parece ser que las células T accesorias disminuyen el riesgo de infecciones oportunistas y fallo del injerto, aunque por otro lado aumentan el riesgo de EICH. Como el trasplante intrahepático no estaba puesto a punto en nuestro laboratorio y como no se ha evaluado el impacto del co-trasplante de células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical junto con células accesorias en ratones inmunodeficientes, en primer lugar llevamos a cabo esta optimización. De los veinte ratones trasplantados (diez por condición experimental) solo dos no presentaron reconstitución, arrojando un porcentaje de éxito del 90%, por lo tanto establecimos el protocolo para llevar a cabo esta técnica en nuestro laboratorio. Con respecto al empleo de células accesorias no hubo diferencias con respecto a los trasplantes sin células accesorias, excepto en hígado, por lo que se puede concluir que el co-trasplante de células accesorias junto con progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> no supone una mejora en la reconstitución hematopoyética multilínea y multiorgánica en ratones NSG.

Una vez puesta a punto la técnica y concluido la dispensabilidad de las células accesorias para el trasplante, procedimos a llevar a cabo el trasplante de células hematopoyéticas derivadas de CMEH. A pesar del aumento en el número de PHE y células hematopoyéticas la sobre-expresión de *RUNX1c* no fue capaz de dotar de capacidad de reconstitución hematopoyética en ratones inmunodeficientes NSG, tal como se ha reportado en numerosos estudios previos probando distintas estrategias con células hematopoyéticas derivadas de CMEH<sup>169,393</sup>. Los pocos estudios que han conseguido detectar células hematopoyéticas humanas en la medula ósea de ratones y ovejas inmunodeficientes varios meses tras el trasplante intravenoso o intrafemoral observaron bajos niveles de reconstitución (0.1-2%) y restringido al linaje mieloide<sup>198,209-213,215,216</sup>. En uno de ellos sobre-expresaron *RUNX1a* en CMEH y obtuvieron reconstitución a corto plazo (menos de 12 semanas) restringida al linaje mieloide en el 33% de los ratones trasplantados con células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, aunque como se ha comentado antes habría que dilucidar si esta reconstitución es fruto del elevado número de células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> trasplantadas o de la sobre-expresión de *RUNX1a* y el fenotipo del 77% que no presentan marcadores de superficie de células maduras (células mieloides CD33<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup> y eritrocitos CD36<sup>+</sup>)<sup>205</sup>. Por lo tanto, la sobre-expresión de *RUNX1c* no es capaz de dotar de capacidad de reconstitución en ensayos de trasplante en ratones inmunodeficientes.

Dado el efecto de la sobre-expresión de *RUNX1c* en la potenciación de la diferenciación hematopoyética decidimos profundizar más en su rol. Para ello realizamos la diferenciación hematopoyética de CMEH deficientes en *RUNX1c*. La eliminación específica de esta isoforma no afectó significativamente a la formación de PHE, aunque se observa un ligero descenso. Sin embargo, el compromiso de los PHE hacia células hematopoyéticas sí que se encuentra profundamente afectado. La ausencia de efecto en los PHE podría ser explicada si: 1) no se requiere a *RUNX1c* para su formación o 2) existe una deficiencia en una subpoblación específica que no somos capaces de detectar debido a la resolución limitada del panel de anticuerpos usados, siendo esta deficiencia compensada con el enriquecimiento en otra subpoblación por lo que la frecuencia total de PHE no se ve alterada. En relación con lo expuesto anteriormente es posible que la eliminación de *RUNX1c* este bloqueando el paso de células pro-HSC (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>) a pre-HSC tipo I (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) o de pre-HSC tipo I (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) a pre-HSC tipo II (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) ya que la expresión de CD45 se ve afectada drásticamente. Nuevamente, un estudio detallado de las subpoblaciones dentro de los PHE podría ayudarnos a dilucidar la etapa en la cual *RUNX1c* es clave.

El potencial clonogénico, sin embargo, no se ve afectado por la pérdida de expresión de *RUNX1c*. La distribución de colonias sí que se ve afectada por la delección de *RUNX1c*, mostrándose una ausencia de colonias G/GM, menor número relativo de M y mayor número relativo de E. Estos resultados sugieren que la ausencia de *RUNX1c* podría bloquear la progresión de la hematopoyesis primitiva (caracterizada por eritrocitos, macrófagos y megacariocitos primitivos) a la definitiva. En línea con esta hipótesis, ratones deficientes en *Runx1c* presentan una ausencia virtual de CHIA en el AGM, aunque las pocas CMH que se forman consiguen colonizar el hígado fetal, expandirse y dar lugar a un individuo viable<sup>353</sup>. Estos ratones además tienen menor número de colonias G y M, en línea con lo que hemos observado en nuestro estudio. Por otro lado, en dichos ratones no se analiza el estado de la hematopoyesis primitiva, por lo que no sabemos si se encuentra afectada o no, aunque teniendo en cuenta el patrón de activación de los promotores *P1* y *P2*, es poco probable que la eliminación de *RUNX1c* afecte a la hematopoyesis primitiva<sup>351,353</sup>.

Por otro lado, la eliminación de *RUNX1c* disminuye la expresión de *SCL*, *GATA1* y *PU.1*. Estos resultados confirman el papel de *RUNX1c* como regulador transcripcional de estos tres factores de transcripción a lo largo de la diferenciación hematopoyética de CMEH. Quedaría por determinar si esta regulación es directa o indirecta.

Una vez analizado el rol específico de la isoforma *RUNX1c* quisimos diseccionar cual es la contribución específica de la pérdida de *RUNX1c* con respecto a la pérdida de *RUNX1* en la diferenciación hematopoyética. Además, hasta ahora no se había evaluado el efecto de la pérdida de expresión de *RUNX1* en el desarrollo hematopoyético humano. Para ello desarrollamos una línea con expresión reducida de *RUNX1* mediante tecnología de ARNi. La reducción de expresión de *RUNX1* produjo una disminución significativa en la formación de PHE, además de una reducción no significativa en el compromiso hematopoyético de los PHE, corroborado por la no diferencia significativa en el número de células CD45<sup>+</sup> por PHE. Se sabe que *RUNX1* se expresa en células del endotelio hemogénico y células hematopoyéticas<sup>101,336</sup> y que tiene funciones en ambos tipos celulares<sup>79,411</sup>. Ya que sabemos que dentro de los PHE existen células del endotelio hemogénico y células hematopoyéticas habría que estudiar cual/es tipo/s celular/es se ve/n afectado/s por la pérdida de expresión de *RUNX1*. En ratón y pez cebra la ausencia de *Runx1* conduce a una completa deficiencia de la hematopoyesis definitiva<sup>269,335,337</sup>. En nuestro caso no hemos sido capaces de recapitular este fenotipo, posiblemente debido a que no hemos eliminado la expresión del gen por completo quedando algo de expresión residual que podría ser suficiente para que se produzca el desarrollo

hematopoyético<sup>271,327,337</sup>. Bien es cierto que existe una disminución en el número de células hematopoyéticas que no es significativa, y que hay que tener en cuenta la elevada variabilidad que ha existido entre los 3 experimentos realizados. Por lo tanto, quizá sí que existe una reducción real del número de células hematopoyéticas que sea significativa que se podría evaluar aumentando el número de experimentos realizados. También hay que tener en cuenta que estamos disminuyendo de manera desigual las 3 isoformas (ya que hemos introducido 5 secuencias de ARNi y algunas de ellas reconocen a las 3 isoformas y otras solo a RUNX1a y RUNX1b), sabiendo que las isoformas tienen papeles específicos es probable que unos tipos celulares se vean más afectados que otros. Una aproximación más similar a la llevada a cabo en modelos animales sería la delección de exones comunes a todas las isoformas para crear una línea de CMEH deficiente completamente en RUNX1. Con el boom actual en la ingeniería genómica gracias al avance exponencial de la tecnología CRISPR/Cas9 la generación de esta línea podría convertirse en realidad dentro de muy poco tiempo, permitiendo el estudio del efecto de la pérdida de RUNX1 en el desarrollo hematopoyético embrionario humano.

La disminución en la expresión de la mayoría de las isoformas de *RUNX1* produce una reducción no significativa en el número de colonias en el ensayo de CFU, además de un aumento relativo en las colonias G a expensas de una disminución en las colonias M, efecto contrario al observado en la sobre-expresión de *RUNX1c*, en línea con el conocido papel de RUNX1 en el desarrollo de macrófagos<sup>311,407</sup>.

Por último para descifrar los mecanismos moleculares desencadenados por *RUNX1c* que aumentan la diferenciación hematopoyética a partir de CMEH, llevamos a cabo análisis del perfil de expresión génica en PHE EV y *RUNX1c* a días 6, 8 y 10 de diferenciación. Como era de esperar, *RUNX1c* activa un firma molecular relacionada con “Desarrollo y Función del Sistema Hematopoyético” y “Hematopoyesis” analizado mediante IPA. Por otro lado, el análisis de GO arrojó un resultado inesperado, posicionando a procesos relacionados con el sistema inmune como los más estadísticamente enriquecidos en los PHE que sobre-expresan *RUNX1c*.

Un análisis más profundo nos presenta la predicción de la activación de varios conjuntos de genes con diferentes funciones. El primer clúster incluye genes que controlan funciones en macrófagos, específicamente CSF1, CSF2 y CSF1R. Confirmamos mediante qRT-PCR la inducción de CSF1 y CSF1R. Esta activación podría explicar el aumento en el número de CFU-M en las células que sobre-expresan *RUNX1c*, una función desconocida hasta ahora de *RUNX1c* en el desarrollo de monocitos/macrófagos. El clúster más grande e importante comprende

numerosos genes relacionados con la vía de señalización pro-inflamatoria, confirmando los resultados obtenidos mediante GO. Recientemente se han publicado varios estudios que posicionan a la señalización pro-inflamatoria como una vía reguladora positiva del desarrollo hematopoyético<sup>397-399,412</sup>. Confirmamos mediante qRT-PCR la inducción de algunos de estos factores en PHE RUNX1c y la disminución de la expresión de todos en PHE deficientes en RUNX1c. La consulta de una base de datos de ChIP (BloodChIP) nos reveló que la mayoría de estos genes son dianas directas de RUNX1 en CMH humanas. Estos resultados desvelan el posible mecanismo molecular mediante el cual RUNX1c promueve el desarrollo hematopoyético humano, integrando a la vía de señalización pro-inflamatoria en una cascada de señalización aguas abajo de RUNX1c, algo que hasta ahora era completamente desconocido. Además, sugiere que en humanos también es importante la vía de señalización pro-inflamatoria para la formación de CMH. Por supuesto, habría que llevar a cabo más trabajo bioquímico y funcional para confirmar que RUNX1c juega su papel en hematopoyesis mediante la acción de moléculas pro-inflamatorias. Resultados preliminares que no han sido incluidos en esta tesis doctoral sugieren que la adición exógena de IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  a distintas concentraciones durante la diferenciación hematopoyética de CMEH en condiciones libres de suero, de células de soporte (para evitar el posible efecto secundario sobre las células OP9) y de agentes de origen animal, no consiguen recapitular el aumento de la diferenciación hematopoyética promovido por la sobreexpresión de RUNX1c, aunque habría que profundizar más en estos estudios para poder obtener resultados concluyentes.

Habría que determinar el tipo celular específico dentro de los PHE (endotelio hemogénico o no hemogénico, pro-HSC, pre-HSC tipo I,...) en el cual RUNX1c ejerce su función a través de las señales inflamatorias además de dilucidar las moléculas de esta ruta responsables de sus efectos positivos en la hematopoyesis. Esta información podría servir para integrar estos factores inflamatorios junto con otros reguladores hematopoyéticos para inducir de forma eficiente la formación de un programa hematopoyético definitivo con potencial de reconstituir ratones inmunodeficientes a partir de CMEH.

En conjunto, nuestro estudio demuestra que RUNX1c es un regulador positivo de la hematopoyesis embrionaria humana y que probablemente ejerza su función mediante moléculas de la vía de señalización inflamatoria. Además, RUNX1c regula el balance de diferenciación mielóide favoreciendo la diferenciación hacia monocitos/macrófagos frente a los granulocitos.

## **7. CONCLUSIONES**

1. La expresión de RUNX1c aumenta antes que la de las isoformas RUNX1a y RUNX1b durante la diferenciación hematopoyética de CMEH utilizando el co-cultivo con OP9.
2. RUNX1c es la única isoforma de RUNX1 que se expresa en los PHE.
3. RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c se expresan en células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> derivadas de CMEH, siendo RUNX1c la que presenta unos niveles de expresión más elevados.
4. La sobre-expresión de RUNX1c en CMEH promueve:
  - a) Un aumento en la generación de PHE, progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup>.
  - b) La diferenciación hematopoyética (especificación hematopoyética) frente a la proliferación o la supervivencia de los PHE.
  - c) Un aumento en el potencial clonogénico y una ligera tendencia hacia la especificación hacia monocitos/macrófagos en ensayos de CFU.
  - d) Un incremento en la expresión endógena de los factores de transcripción hematopoyéticos SCL, GATA1 y PU.1.
5. La delección específica de *RUNX1c* en CMEH:
  - a) No afecta significativamente la producción de PHE pero sí su posterior compromiso hematopoyético reduciendo la producción de progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup>.
  - b) No modifica la capacidad de formación de colonias en ensayos CFU.
  - c) Elimina la formación de colonia CFU-G y CFU-GM, disminuye las CFU-M e incrementa las CFU-E en ensayos de CFU.
  - d) Disminuye la expresión de los factores de transcripción SCL, GATA1 y PU.1.
6. El silenciamiento parcial de RUNX1 en CMEH:
  - a) Disminuye significativamente la producción de PHE y no significativamente la formación de progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup>.
  - b) Disminuye la capacidad de formación de colonias en ensayos CFU.
  - c) Reduce la formación de colonias M-CFU e incrementa las colonias G-CFU en ensayos CFU.
7. El co-trasplante de células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical junto con células accesorias Lin<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> no afecta a la eficiencia de reconstitución.
8. La sobre-expresión de RUNX1c no es capaz de conferir capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético a células hematopoyéticas producidas a partir de CMEH, analizado mediante trasplante intrahepático en ratones inmunodeficientes.

9. La sobre-expresión de RUNX1c promueve la activación de un perfil de transcripción génica relacionado con desarrollo y función del sistema hematopoyético en PHE, en concreto relacionados con: i) la biología de macrófagos; ii) megacariocitos y eritrocitos; iii) vía de señalización inflamatoria; iv) células T; y v) hematopoyesis a partir de CMEH.
10. La sobre-expresión de RUNX1c induce la expresión de factores de señalización de la vía pro-inflamatoria en PHE.
11. La delección de RUNX1c inhibe la expresión de factores de señalización de la vía pro-inflamatoria en PHE.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C. & Pera, R. A. R. Human pre-implantation embryo development. *Development* **139**, 829–841 (2012).
2. Edwards, R. G., Bavister, B. D. & Steptoe, P. C. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* **224**, 488–490 (1969).
3. Edwards, R. G., Steptoe, P. C. & Purdy, J. M. Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. *Nature* **227**, 1307–1309 (1970).
4. Steptoe, P. C. & Edwards, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* **116**, 321 (1978).
5. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
6. Martin, G. R. 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 (1981).
7. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-. ). **282**, 1145–1147 (1998).
8. Stevens, L. C. Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **20**, 1257–75 (1958).
9. Brons, I. G. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191–195 (2007).
10. Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196–199 (2007).
11. Hanna, J. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9222–9227 (2010).
12. Boyer, L. a *et al.* Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**, 947–56 (2005).
13. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126–140 (2003).
14. Amps, K. *et al.* Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* **29**,

- 1132–44 (2011).
15. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J. & Lanza, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444**, 481–5 (2006).
  16. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
  17. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **85**, 348–362 (2009).
  18. Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618–30 (2010).
  19. Okita, K. *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–412 (2011).
  20. Ohi, Y. *et al.* Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* **13**, 541–549 (2011).
  21. Lister, R. *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68–73 (2011).
  22. Nazor, K. L. *et al.* Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell* **10**, 620–634 (2012).
  23. Ma, H. *et al.* Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* **511**, 177–183 (2014).
  24. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* **140**, 2457–61 (2013).
  25. Taylor, C. J., Peacock, S., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A. & Bolton, E. M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient hla types. *Cell Stem Cell* **11**, 147–152 (2012).
  26. Revazova, E. S. *et al.* Patient-Specific Stem Cell Lines Derived from Human Parthenogenetic Blastocysts. *Cloning Stem Cells* **9**, 432–449 (2007).
  27. Revazova, E. S. *et al.* HLA Homozygous Stem Cell Lines Derived from Human

- Parthenogenetic Blastocysts. *Cloning Stem Cells* **10**, 1–14 (2008).
28. Tachibana, M. *et al.* Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* **153**, 1228–38 (2013).
  29. Deuse, T. *et al.* SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell* **16**, 33–38 (2015).
  30. Simonson, O. E., Domogatskaya, A., Volchkov, P. & Rodin, S. The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Ann. Med.* 1–11 (2015).  
doi:10.3109/07853890.2015.1051579
  31. Ludwig, T. E. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**, 185–187 (2006).
  32. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**, 424–429 (2011).
  33. Kleinman, H. K. *et al.* Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193 (1982).
  34. Braam, S. R. *et al.* Improved genetic manipulation of human embryonic stem cells. *Nat Methods* **5**, 389–392 (2008).
  35. Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4783–8 (2005).
  36. Watanabe, K. *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 681–686 (2007).
  37. Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D. R. & Thomson, J. A. Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 240–248 (2010).
  38. Tsutsui, H. *et al.* An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat. Commun.* **2**, 167 (2011).
  39. Chen, K. G. *et al.* Non-colony type monolayer culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **9**, 237–248 (2012).
  40. Steiner, D. *et al.* Derivation, propagation and controlled differentiation of human

- embryonic stem cells in suspension. *Nat. Biotechnol.* **28**, 361–364 (2010).
41. Williams, L. a, Davis-Dusenbery, B. N. & Eggan, K. C. SnapShot: directed differentiation of pluripotent stem cells. *Cell* **149**, 1174–1174.e1 (2012).
  42. Zhu, Z. & Huangfu, D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development* **140**, 705–17 (2013).
  43. Kretzschmar, K. & Watt, F. M. Lineage tracing. *Cell* **148**, 33–45 (2012).
  44. Araki, R. *et al.* Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* **494**, 100–4 (2013).
  45. Zhao, T., Zhang, Z.-N. & Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212–215 (2011).
  46. Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63–7 (2011).
  47. Polo, J. M. *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **28**, 848–55 (2010).
  48. Kim, K. *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1117–1119 (2011).
  49. Xu, J., Du, Y. & Deng, H. Direct lineage reprogramming: Strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* **16**, 119–134 (2015).
  50. Lu, B. *et al.* Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* **27**, 2126–2135 (2009).
  51. Kamao, H. *et al.* Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* **2**, 205–218 (2014).
  52. Reardon, S. & Cyranoski, D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* **495**, 13–14 (2013).
  53. Schwartz, S. D. *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* **385**, 509–516 (2015).
  54. Song, W. K. *et al.* Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell*

- Reports* **4**, 860–872 (2015).
55. Bellamy, V. *et al.* Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J. Hear. Lung Transplant.* 1–10 (2014). doi:10.1016/j.healun.2014.10.008
  56. Kelly, O. G. *et al.* Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 750–6 (2011).
  57. Amour, K. A. D. *et al.* Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1392–401 (2006).
  58. Kroon, E. *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo TL - 26. *Nat. Biotechnol.* **26 VN - r**, 443–452 (2008).
  59. Kimbrel, E. a. & Lanza, R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 681–692 (2015).
  60. Sabin, F. R. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib. to Embryol.* **9**, 215–262 (1920).
  61. Maximow, A. A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol. Rev.* **4**, 533–563 (1924).
  62. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. & Keller, G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* **126**, 5073–5084 (1999).
  63. Medvinsky, A. & Dzierzak, E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897–906 (1996).
  64. Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Müller, A. M. & Dzierzak, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**, 64–67 (1993).
  65. Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. & Dzierzak, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**, 291–301 (1994).
  66. Chen, M. J. *et al.* Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* **9**, 541–52 (2011).

67. Tober, J. *et al.* The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* **109**, 1433–1441 (2007).
68. Wong, P., Chung, S., Reicheld, S. & Chui, D. Hemoglobin Switching During Murine Embryonic Development: Evidence for Two Populations of Embryonic Erythropoietic Progenitor Cells. *Blood* **67**, 716–721 (1986).
69. Palis, J. *et al.* Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4528–4533 (2001).
70. Perdiguero, E. G. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551 (2014).
71. Lin, Y., Yoder, M. C. & Yoshimoto, M. Lymphoid progenitor emergence in the murine embryo and yolk sac precedes stem cell detection. *Stem Cells Dev.* **23**, 1168–77 (2014).
72. Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P. & Godin, I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* **15**, 477–485 (2001).
73. Jordan, H. E. Aortic Cell Clusters in Vertebrate Embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **3**, 149–56 (1917).
74. Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. & Dieterlen-Lièvre, F. Intraaortic Hemopoietic Cells are Derived from Endothelial Cells During Ontogeny. *Development* **125**, 4575–4583 (1998).
75. Garcia-Porrero, J. a, Godin, I. E. & Dieterlen-Lièvre, F. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat. Embryol. (Berl)*. **192**, 425–35 (1995).
76. Boisset, J.-C. *et al.* Progressive maturation toward hematopoietic stem cells in the mouse embryo aorta. *Blood* **125**, 465–9 (2015).
77. Boisset, J.-C. *et al.* In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* **464**, 116–20 (2010).
78. Zovein, A. C. *et al.* Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **3**, 625–636 (2008).

79. Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E. & Speck, N. A. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* **457**, 887–891 (2009).
80. Kim, I., Yilmaz, Ö. H. & Morrison, S. J. CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* **106**, 903–905 (2005).
81. Taoudi, S. *et al.* Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver. *Development* **132**, 4179–4191 (2005).
82. Mikkola, H. K. A., Fujiwara, Y., Schlaeger, T. M., Traver, D. & Orkin, S. H. Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* **101**, 508–516 (2003).
83. Ferkowicz, M. J. CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* **130**, 4393–4403 (2003).
84. Taoudi, S. *et al.* Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-Cadherin +CD45 + pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell* **3**, 99–108 (2008).
85. Rybtsov, S. *et al.* Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *J. Exp. Med.* **208**, 1305–15 (2011).
86. Yokomizo, T., Ng, C. E. L., Osato, M. & Dzierzak, E. Three-dimensional imaging of whole midgestation murine embryos shows an intravascular localization for all hematopoietic clusters. *Blood* **117**, 6132–6134 (2011).
87. Rybtsov, S. *et al.* Tracing the origin of the HSC hierarchy reveals an SCF-dependent, IL-3-independent CD43- embryonic precursor. *Stem Cell Reports* **3**, 489–501 (2014).
88. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Anderson, R. a & Medvinsky, A. CD43 but Not CD41 Marks the First Hematopoietic Stem Cells in the Human Embryo. *Blood* **124**, 4330–4330 (2014).
89. Vodyanik, M. a, Thomson, J. a & Slukvin, I. I. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* **108**, 2095–105 (2006).
90. Travnickova, J. *et al.* Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nat. Commun.* **6**, 6227 (2015).

91. Kissa, K. & Herbomel, P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* **464**, 112–115 (2010).
92. Bertrand, J. Y. *et al.* Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* **464**, 108–111 (2010).
93. Cumano, A. & Godin, I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* **25**, 745–785 (2007).
94. Tanaka, Y. *et al.* Embryonic hematopoietic progenitor cells reside in muscle before bone marrow hematopoiesis. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
95. Gekas, C., Dieterlen-lièvre, F., Orkin, S. H. & Mikkola, H. K. A. The Placenta is a Niche for Hematopoietic Stem Cells. *Dev. Cell* **8**, 365–375 (2005).
96. Yokomizo, T. & Dzierzak, E. Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Development* **137**, 3651–3661 (2010).
97. Li, Z. *et al.* Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell* **11**, 663–675 (2012).
98. Nakano, H. *et al.* Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nat. Commun.* **4**, 1564 (2013).
99. Li, W., Ferkowicz, M. J., Johnson, S. A., Shelley, W. C. & Yoder, M. C. Endothelial Cells in the Early Murine Yolk Sac Give Rise to CD41-expressing Hematopoietic Cells. *Stem Cells Dev.* **14**, 44–54 (2005).
100. Haar, J. L. & Ackerman, G. A. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat. Rec.* **170**, 199–223 (1971).
101. Lacaud, G. *et al.* Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* **100**, 458–66 (2002).
102. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, a, Papadimitriou, J. C. & Keller, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725–732 (1998).
103. Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J. & Keller, G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* **432**, 625–630 (2004).
104. Ema, M. *et al.* Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-

- cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* **108**, 4018–4024 (2006).
105. Nishikawa, S. I. *et al.* In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* **8**, 761–769 (1998).
  106. Lancrin, C. *et al.* The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**, 892–895 (2009).
  107. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631–44 (2008).
  108. Ivanovs, A. *et al.* Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J. Exp. Med.* **208**, 2417–27 (2011).
  109. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Anderson, R. a, Turner, M. L. & Medvinsky, A. Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells. *Stem cell reports* **2**, 449–56 (2014).
  110. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science (80-. )*. **273**, 242–245 (1996).
  111. Morrison, S. J., Wandycz, a M., Hemmati, H. D., Wright, D. E. & Weissman, I. L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929–1939 (1997).
  112. Benveniste, P. *et al.* Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. *Cell Stem Cell* **6**, 48–58 (2010).
  113. Yang, L. *et al.* Identification of Lin-Sca1+kit+CD34+Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105**, 2717–2723 (2005).
  114. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–18 (2012).
  115. Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Karlsson, L., Huang, J. F. & Sieburg, H. B. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* **103**, 4111–4118 (2004).

116. Dykstra, B. *et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* **1**, 218–29 (2007).
117. Benz, C. *et al.* Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* **10**, 273–283 (2012).
118. Challen, G. a, Boles, N. C., Chambers, S. M. & Goodell, M. a. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* **6**, 265–78 (2010).
119. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
120. Pang, W. W. *et al.* Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20012–20017 (2011).
121. Busch, K. *et al.* Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature* **518**, 542–546 (2015).
122. Dykstra, B., Olthof, S., Schreuder, J., Ritsema, M. & de Haan, G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **208**, 2691–2703 (2011).
123. Sudo, K., Ema, H., Morita, Y. & Nakauchi, H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1273–1280 (2000).
124. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells? *Blood* **117**, 4420–4424 (2011).
125. Sun, J. *et al.* Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* **514**, 322–327 (2014).
126. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295–306 (2005).
127. Goodell, M. a, Nguyen, H. & Shroyer, N. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 299–309 (2015).
128. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, 1–16 (2015).
129. Paul, F. *et al.* Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid

- Progenitors. *Cell* **163**, 1663–1677 (2015).
130. Sanjuan-Pla, A. *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232–6 (2013).
  131. Nombela-Arrieta, C. *et al.* Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **15**, 533–43 (2013).
  132. Sipkins, D. A. *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* **435**, 969–73 (2005).
  133. Spencer, J. A. *et al.* Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* **508**, 269–73 (2014).
  134. Nilsson, S. K., Johnston, H. M. & Coverdale, J. a. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches. **97**, 2293–2299 (2014).
  135. Wilson, A. *et al.* c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2747–2763 (2004).
  136. Xie, Y. *et al.* Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97–101 (2009).
  137. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
  138. Greenbaum, A. *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–30 (2013).
  139. Kunisaki, Y. *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**, 637–643 (2013).
  140. Bruns, I. *et al.* Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* **20**, 1315–20 (2014).
  141. Zhao, M. *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1321–1326 (2014).
  142. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice

- and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 197–201 (1951).
143. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
  144. Walasek, M. A., van Os, R. & de Haan, G. Hematopoietic stem cell expansion: Challenges and opportunities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1266**, 138–150 (2012).
  145. Fares, I. *et al.* Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science (80-. )*. **345**, 1509 (2014).
  146. Boitano, A. E. A. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science (80-. )*. **329**, 1345–1348 (2010).
  147. Spitzer, T. R., Dey, B. R., Chen, Y. Bin, Attar, E. & Ballen, K. K. The expanding frontier of hematopoietic cell transplantation. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **82 B**, 271–279 (2012).
  148. Copelan, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1813–1826 (2006).
  149. Daley, G. Q. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* **10**, 740–749 (2012).
  150. Son, E. Y. *et al.* Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* **9**, 205–218 (2011).
  151. Ferber, S. *et al.* Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat. Med.* **6**, 568–72 (2000).
  152. Miyatsuka, T. *et al.* Ectopically expressed PDX-1 in liver initiates endocrine and exocrine pancreas differentiation but causes dysmorphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1017–1025 (2003).
  153. Yechoor, V. *et al.* Neurogenin3 Is Sufficient for Transdetermination of Hepatic Progenitor Cells into Neo-Islets In Vivo but Not Transdifferentiation of Hepatocytes. *Dev. Cell* **16**, 358–373 (2009).
  154. Kojima, H. *et al.* NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat. Med.* **9**, 596–603 (2003).

155. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature* **455**, 627–632 (2008).
156. Ieda, M. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375–386 (2010).
157. Szabo, E. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* **468**, 521–6 (2010).
158. Pereira, C. F. *et al.* Induction of a hemogenic program in mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **13**, 205–218 (2013).
159. Batta, K., Florkowska, M., Kouskoff, V. & Lacaud, G. Direct Reprogramming of Murine Fibroblasts to Hematopoietic Progenitor Cells. *Cell Rep.* **9**, 1871–1884 (2014).
160. Sandler, V. M. *et al.* Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction. *Nature* **511**, 312–8 (2014).
161. Riddell, J. *et al.* Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell* **157**, 549–64 (2014).
162. Sancho-Martinez, I., Li, M. & Izpisua Belmonte, J. C. Disease correction the iPSC way: advances in iPSC-based therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 746–749 (2011).
163. Kyba, M., Perlingeiro, R. C. R. & Daley, G. Q. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* **109**, 29–37 (2002).
164. Daley, G. Q. Towards the generation of patient-specific pluripotent stem cells for combined gene and cell therapy of hematologic disorders. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 17–22 (2007). doi:10.1182/asheducation-2007.1.17
165. Kaufman, D. S. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood* **114**, 3513–3523 (2009).
166. Themeli, M. *et al.* Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* **31**, 928–33 (2013).
167. Iwamoto, H. *et al.* Antitumor immune response of dendritic cells (DCs) expressing tumor-associated antigens derived from induced pluripotent stem cells: in comparison to bone marrow-derived DCs. *Int. J. Cancer* **134**, 332–41 (2014).

168. Choi, K. D., Vodyanik, M. A. & Slukvin, I. I. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J. Clin. Invest.* **119**, 2818–2829 (2009).
169. Vo, L. T. & Daley, G. Q. De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. **125**, 2641–2648 (2015).
170. Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R. & Thomson, J. a. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10716–10721 (2001).
171. Chadwick, K. *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**, 906–915 (2003).
172. Zambidis, E. T., Peault, B., Park, T. S., Bunz, F. & Civin, C. I. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* **106**, 860–870 (2005).
173. Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S. & Keller, G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* **109**, 2679–2687 (2007).
174. Salvagiotto, G. *et al.* A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS One* **6**, e17829 (2011).
175. Niwa, A. *et al.* A novel Serum-Free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).
176. Pick, M., Azzola, L., Mossman, A., Stanley, E. G. & Elefanty, A. G. Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* **25**, 2206–2214 (2007).
177. Kennedy, M. *et al.* T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep.* **2**, 1722–35 (2012).

178. Uenishi, G. *et al.* Tenascin C Promotes Hematoendothelial Development and T Lymphoid Commitment from Human Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined Conditions. *Stem cell reports* **3**, 1073–1084 (2014).
179. Zhang, P. *et al.* Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. **111**, 1933–1941 (2009).
180. Wang, Y. & Nakayama, N. WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells. *Stem Cell Res.* **3**, 113–125 (2009).
181. Woll, P. S. *et al.* Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Differentiation* **111**, 122–131 (2008).
182. Cerdan, C., Rouleau, A. & Bhatia, M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **103**, 2504–2512 (2004).
183. Wang, C. *et al.* TGF $\beta$  inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res.* **22**, 194–207 (2012).
184. Pearson, S., Sroczynska, P., Lacaud, G. & Kouskoff, V. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* **135**, 1525–1535 (2008).
185. Kennedy, M. *et al.* T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep.* **2**, 1722–35 (2012).
186. Sturgeon, C. M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M. & Keller, G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 554–61 (2014).
187. Xiong, J.-W. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev. Dyn.* **237**, 1218–31 (2008).
188. Kyba, M. Hemogenic endothelium in a dish. *Blood* **121**, 417–8 (2013).
189. Rafii, S. *et al.* Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* **121**, 770–80 (2013).
190. Ayllon, V. *et al.* The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematoendothelial

- progenitors and regulates their hematopoietic fate. *Leukemia* **29**, 1741–1753 (2015).
191. Choi, K.-D. *et al.* Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep.* **2**, 553–67 (2012).
  192. Sturgeon, C. M., Ditadi, A., Clarke, R. L. & Keller, G. Defining the path to hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 416–418 (2013).
  193. Ditadi, A. *et al.* Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat. Cell Biol.* **17**, (2015).
  194. Vodyanik, M. a, Bork, J. a, Thomson, J. a & Slukvin, I. I. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105**, 617–26 (2005).
  195. Vodyanik, M. A. & Slukvin II. Hematoendothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 23**, Unit 23 6 (2007).
  196. Choi, K. D., Vodyanik, M. & Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **6**, 296–313 (2011).
  197. Elcheva, I. *et al.* Direct induction of haematoendothelial programs in human pluripotent stem cells by transcriptional regulators. *Nat. Commun.* **5**, 4372 (2014).
  198. Wang, L. *et al.* Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med* **201**, 1603–1614 (2005).
  199. Tashiro, K. *et al.* Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.* **8**, 300–311 (2012).
  200. Bowles, K. M., Vallier, L., Smith, J. R., Alexander, M. R. J. & Pedersen, R. a. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 1359–1369 (2006).
  201. Wang, Y., Yates, F., Naveiras, O., Ernst, P. & Daley, G. Q. Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19081–19086 (2005).
  202. Clarke, R. L. *et al.* The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. *Nat. Cell Biol.* **15**, 502–10 (2013).
  203. Corada, M. *et al.* Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial

- identity. *Nat. Commun.* **4**, 2609 (2013).
204. Nakajima-Takagi, Y. *et al.* Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **121**, 447–58 (2013).
  205. Ran, D. *et al.* *RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells.* *Blood* **121**, (2013).
  206. Real, P. J. *et al.* SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. *Mol Ther* **20**, 1443–1453
  207. Ramos-Mejia, V. *et al.* HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood* **124**, 3065–3075 (2014).
  208. Doulatov, S. *et al.* Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell* **13**, 459–470 (2013).
  209. Lu, M., Kardel, M. D., O'Connor, M. D. & Eaves, C. J. Enhanced generation of hematopoietic cells from human hepatocarcinoma cell-stimulated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* **37**, 924–936 (2009).
  210. Ledran, M. H. *et al.* Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* **3**, 85–98 (2008).
  211. Narayan, a D. *et al.* Human embryonic stem cell – derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood* **107**, 2180–2184 (2006).
  212. Tian, X., Woll, P. S., Morris, J. K., Linehan, J. L. & Kaufman, D. S. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells* **24**, 1370–1380 (2006).
  213. Risueño, R. M. *et al.* Inability of human induced pluripotent stem cell-hematopoietic derivatives to downregulate microRNAs in vivo reveals a block in xenograft hematopoietic regeneration. *Stem Cells* **30**, 131–139 (2012).
  214. Tian, X. *et al.* Bioluminescent imaging demonstrates that transplanted human embryonic stem cell-derived CD34+ cells preferentially develop into endothelial cells. *Stem Cells* **27**, 2675–2685 (2009).
  215. Amabile, G. *et al.* In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from

- induced pluripotent stem cells. *Blood* **121**, 1255–64 (2013).
216. Suzuki, N. *et al.* Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol. Ther.* **21**, 1424–31 (2013).
  217. Conlon, F. L. *et al.* A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* **120**, 1919–1928 (1994).
  218. Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N. & Behringer, R. R. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* **9**, 3027–3037 (1995).
  219. Winnier G, Blessing M, Labosky P, H. B. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 2105–2116 (1995).  
doi:10.1101/gad.9.17.2105
  220. Johansson, B. M. & Wiles, M. V. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* **15**, 141–151 (1995).
  221. Ciruna, B. G., Schwartz, L., Harpal, K., Yamaguchi, T. P. & Rossant, J. Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* **124**, 2829–2841 (1997).
  222. Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. & Rossant, J. Fgfr-1 Is Required for Embryonic Growth and Mesodermal Patterning During Mouse Gastrulation. *Genes Dev.* **8**, 3032–3044 (1994).
  223. Liu, P. *et al.* Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* **22**, 361–365 (1999).
  224. Beddington, R. S. P. & Robertson, E. J. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* **96**, 195–209 (1999).
  225. Arnold, S. J. & Robertson, E. J. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 91–103 (2009).
  226. Langdon, Y. G. & Mullins, M. C. Maternal and Zygotic Control of Zebrafish Dorsoventral Axial Patterning. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 357–377 (2011).
  227. Schier, A. F. & Talbot, W. S. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 561–613 (2005).

228. Amaya, E., Musci, T. J. & Kirschner, M. W. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66**, 257–270 (1991).
229. Draper, B. W., Stock, D. W. & Kimmel, C. B. Zebrafish *fgf24* functions with *fgf8* to promote posterior mesodermal development. *Development* **130**, 4639–4654 (2003).
230. Griffin, K., Patient, R. & Holder, N. Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* **121**, 2983–2994 (1995).
231. Shimizu, T., Bae, Y. K., Muraoka, O. & Hibi, M. Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Dev. Biol.* **279**, 125–141 (2005).
232. Ikeya, M. & Takada, S. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech. Dev.* **103**, 27–33 (2001).
233. Pilon, N. *et al.* *Cdx4* is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Dev. Biol.* **289**, 55–63 (2006).
234. Prinos, P. *et al.* Multiple pathways governing *Cdx1* expression during murine development. *Dev. Biol.* **239**, 257–69 (2001).
235. Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N. & Kodama, H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* **125**, 1747–1757 (1998).
236. Shalaby, F. *et al.* A requirement for *Flk1* in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* **89**, 981–90 (1997).
237. Hogan, K. A. & Bautch, V. L. Blood Vessel Patterning at the Embryonic Midline. *Curr. Top. Dev. Biol.* **62**, 55–85 (2004).
238. Reese, D. E., Hall, C. E. & Mikawa, T. Negative regulation of midline vascular development by the notochord. *Dev. Cell* **6**, 699–708 (2004).
239. Garriock, R. J. & Mikawa, T. Early arterial differentiation and patterning in the avian embryo model. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 985–992 (2011).
240. Lawson, N. D. *et al.* Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during

- embryonic vascular development. *Development* **128**, 3675–3683 (2001).
241. Grego-Bessa, J. *et al.* Notch Signaling Is Essential for Ventricular Chamber Development. *Dev. Cell* **12**, 415–429 (2007).
  242. Burns, C. E., Traver, D., Mayhall, E., Shepard, J. L. & Zon, L. I. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev.* **19**, 2331–42 (2005).
  243. Yoon, M.-J. *et al.* Mind bomb-1 is essential for intraembryonic hematopoiesis in the aortic endothelium and the subaortic patches. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4794–804 (2008).
  244. Robert-Moreno, A. *et al.* Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *EMBO J.* **27**, 1886–95 (2008).
  245. Kumano, K. *et al.* Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* **18**, 699–711 (2003).
  246. Nakagawa, M. *et al.* AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* **108**, 3329–34 (2006).
  247. Hadland, B. K. *et al.* A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* **104**, 3097–3105 (2004).
  248. Bertrand, J. Y., Cisson, J. L., Stachura, D. L. & Traver, D. Notch signaling distinguishes 2 waves of definitive hematopoiesis in the zebrafish embryo. *Blood* **115**, 2777–2783 (2010).
  249. Lengerke, C. *et al.* BMP and Wnt Specify Hematopoietic Fate by Activation of the Cdx-Hox Pathway. *Cell Stem Cell* **2**, 72–82 (2008).
  250. Lawson, N. D., Vogel, A. M. & Weinstein, B. M. Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev. Cell* **3**, 127–136 (2002).
  251. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409–414 (2003).
  252. Cobas, M. *et al.* B-Catenin Is Dispensable for Hematopoiesis and Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* **199**, 221–229 (2004).
  253. Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E. W. & Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* **7**, 1048–1056 (2006).

254. Scheller, M. *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat. Immunol.* **7**, 1037–1047 (2006).
255. Luis, T. C., Ichii, M., Brugman, M. H., Kincade, P. & Staal, F. J. T. Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* **26**, 414–421 (2012).
256. Luis, T. C. *et al.* Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* **113**, 546–554 (2009).
257. Clements, W. K. *et al.* A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature* **474**, 220–4 (2011).
258. Goessling, W. *et al.* Genetic Interaction of PGE2 and Wnt Signaling Regulates Developmental Specification of Stem Cells and Regeneration. *Cell* **136**, 1136–1147 (2009).
259. Goessling, W. *et al.* Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. *Cell Stem Cell* **8**, 445–458 (2011).
260. Adamo, L. *et al.* Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* **459**, 1131–5 (2009).
261. North, T. E. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Development Is Dependent on Blood Flow. *Cell* **137**, 736–748 (2009).
262. Moncada, S. & Higgs, A. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* **176**, 213–254 (2006).
263. Mascarenhas, M. I., Parker, A., Dzierzak, E. & Ottersbach, K. Identification of novel regulators of hematopoietic stem cell development through refinement of stem cell localization and expression profiling. *Blood* **114**, 4645 (2009).
264. Fitch, S. R. *et al.* Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell* **11**, 554–566 (2012).
265. Bertrand, J. Y. *et al.* Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 134–9 (2005).
266. Kim, A. D., Stachura, D. L. & Traver, D. Cell signaling pathways involved in hematopoietic stem cell specification. *Exp. Cell Res.* **329**, 227–233 (2014).

267. Kataoka, H. *et al.* Etv2 / ER71 induces vascular mesoderm from Flk1 + PDGFR  $\alpha$  + primitive mesoderm Short title ; Etv2 / ER71 induces vascular mesoderm. *Blood* **118**, 6975–6987 (2011).
268. Kallianpur, A. R., Jordan, J. E. & Brandt, S. J. The SCL/TAL-1 Gene Is Expressed in Progenitors of Both the Hematopoietic and Vascular Systems During Embryogenesis. *Blood* **83**, 1200–1208 (1994).
269. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. & Downing, J. R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321–330 (1996).
270. Sasaki, K. *et al.* Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12359–63 (1996).
271. Wang, Q. *et al.* The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* **87**, 697–708 (1996).
272. Nottingham, W. T. *et al.* Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood* **110**, 4188–4197 (2007).
273. Ernst, P. *et al.* Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev. Cell* **6**, 437–443 (2004).
274. Ito, T. *et al.* Transcription Elongation Factor S-II Is Required for Definitive Hematopoiesis Transcription Elongation Factor S-II Is Required for Definitive Hematopoiesis. **26**, 3194–3203 (2006).
275. Minegishi, N. *et al.* The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* **93**, 4196–4207 (1999).
276. Wilson, N. K. *et al.* Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **7**, 532–44 (2010).
277. Taoudi, S. *et al.* ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev.* **25**, 251–262 (2011).
278. Göttgens, B. *et al.* Establishing the transcriptional programme for blood: The SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors.

- EMBO J.* **21**, 3039–3050 (2002).
279. Pimanda, J. E. *et al.* Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17692–7 (2007).
  280. Azcoitia, V., Aracil, M., Martínez-A, C. & Torres, M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **280**, 307–320 (2005).
  281. Hisa, T. *et al.* Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J.* **23**, 450–9 (2004).
  282. Iacovino, M. *et al.* HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat. Cell Biol.* **13**, 72–8 (2011).
  283. Wilkinson, A. C. & Göttgens, B. Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells. **786**, (2013).
  284. Kim, I., Saunders, T. L. & Morrison, S. J. Sox17 Dependence Distinguishes the Transcriptional Regulation of Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **130**, 470–483 (2007).
  285. Lizama, C. O. *et al.* Repression of arterial genes in hemogenic endothelium is sufficient for haematopoietic fate acquisition. *Nat. Commun.* **6**, 7739 (2015).
  286. Gergen, J. P. & Butler, B. A. Isolation of the Drosophila segmentation gene runt and analysis of its expression during embryogenesis. *Genes Dev.* **2**, 1179–1193 (1988).
  287. Kania, M. A. *et al.* The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. (1990). doi:10.1101/gad.4.10.1701
  288. Miyoshi, H. *et al.* t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10431–4 (1991).
  289. Komori, T. *et al.* Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
  290. Taniuchi, I. *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**, 621–633 (2002).

291. Li, Q. L. *et al.* Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**, 113–124 (2002).
292. Ito, K. *et al.* RUNX3 Attenuates  $\beta$ -Catenin/T Cell Factors in Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Cell* **14**, 226–237 (2008).
293. Inoue, K. *et al.* Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat. Neurosci.* **5**, 946–54 (2002).
294. Levanon, D. *et al.* Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* **262**, 23–33 (2001).
295. Ghozi, M. C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D. & Groner, Y. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1935–40 (1996).
296. Ogawa, E. *et al.* PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6859–6863 (1993).
297. Wang, S. *et al.* Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3324–39 (1993).
298. Pozner, A. *et al.* Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap- and internal ribosome entry site-dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2297–2307 (2000).
299. Ng, C. E. L. *et al.* A Runx1 intronic enhancer marks hemogenic endothelial cells and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **28**, 1869–1881 (2010).
300. Bee, T. *et al.* The mouse Runx1 +23 hematopoietic stem cell enhancer confers hematopoietic specificity to both Runx1 promoters. *Blood* **113**, 5121–4 (2009).
301. Rossetti, S. & Sacchi, N. RUNX1: A MicroRNA hub in normal and malignant hematopoiesis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1566–1588 (2013).
302. Miyoshi, H. *et al.* Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2762–9 (1995).
303. Tanaka, T. *et al.* An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hematopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J.* **14**, 341–350 (1995).

304. Lam, K. & Zhang, D. E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Biosci.* **17**, 1120–1139 (2012).
305. Zeng, C. *et al.* Intranuclear targeting of AML/CBFalpha regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1585–9 (1998).
306. Aronson, B. D., Fisher, a L., Blechman, K., Caudy, M. & Gergen, J. P. Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5581–5587 (1997).
307. Levanon, D. *et al.* Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11590–11595 (1998).
308. Gunther, C. V & Graves, B. J. Identification of ETS domain proteins in murine T lymphocytes that interact with the Moloney murine leukemia virus enhancer. *Mol Cell Biol* **14**, 7569–7580 (1994).
309. Kim, W. Y. *et al.* Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J.* **18**, 1609–20 (1999).
310. Petrovick, M. S. *et al.* Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3915–3925 (1998).
311. Zhang, D. E. *et al.* CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1231–1240 (1996).
312. Kitabayashi, I., Yokoyama, A., Shimizu, K. & Ohki, M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.* **17**, 2994–3004 (1998).
313. Kurokawa, M. *et al.* The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1033 (2004).
314. Xu, G. *et al.* Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **20**, 1002–1008 (2006).
315. Elagib, K. E. *et al.* RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333–41 (2003).

316. Huang, H. *et al.* Differentiation-Dependent Interactions between RUNX-1 and FLI-1 during Megakaryocyte Development. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4103–4115 (2009).
317. Wilson, N. K. *et al.* Integrated genome-scale analysis of the transcriptional regulatory landscape in a blood stem/progenitor cell model. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-10-677393
318. Beck, D. *et al.* Genome-wide analysis of transcriptional regulators in human HSPCs reveals a densely interconnected network of coding and noncoding genes. *Blood* **122**, e12–22 (2013).
319. KUROKAWA, Mine. *et al.* The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3967–3979 (1996).
320. Biggs, J. R., Peterson, L. F., Zhang, Y., Kraft, A. S. & Zhang, D.-E. AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7420–7429 (2006).
321. Huang, G. Dimerization with PEBP2 b protects RUNX1 / AML1 from ubiquitin ± proteasome-mediated degradation. **20**, 723–733 (2001).
322. Zhao, X. *et al.* Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* **22**, 640–653 (2008).
323. Yoshimoto, M. *et al.* Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence. *Blood* **119**, 5706–5714 (2012).
324. Rhodes, K. E. *et al.* The Emergence of Hematopoietic Stem Cells Is Initiated in the Placental Vasculature in the Absence of Circulation. *Cell Stem Cell* **2**, 252–263 (2008).
325. de Bruijn, M. F., Speck, N. A., Peeters, M. C. & Dzierzak, E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J.* **19**, 2465–74 (2000).
326. Li Z, Chen M.J, Stacy T & N.A., S. Runx1 function in hematopoiesis is required in cells that express Tek. *Blood* **107**, 106–110 (2006).
327. Cai, Z. *et al.* Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* **13**, 423–31 (2000).
328. Wang, Q. *et al.* Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the

- central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3444–3449 (1996).
329. Potts, K. S. *et al.* A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* **124**, 2725–2729 (2014).
330. Yokomizo, T. *et al.* Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* **111**, 4075–4080 (2008).
331. Bollerot, K., Romero, S., Dunon, D. & Jaffredo, T. Core binding factor in the early avian embryo: cloning of Cbfbeta and combinatorial expression patterns with Runx1. *Gene Expr. Patterns* **6**, 29–39 (2005).
332. Burns, C. E. *et al.* Isolation and characterization of runxa and runxb, zebrafish members of the runt family of transcriptional regulators. *Exp. Hematol.* **30**, 1381–1389 (2002).
333. Ciau-Uitz, a, Walmsley, M. & Patient, R. Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell* **102**, 787–796 (2000).
334. Gering, M. & Patient, R. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev. Cell* **8**, 389–400 (2005).
335. Kalev-Zylinska, M. L. *et al.* Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development* **129**, 2015–30 (2002).
336. North, T. *et al.* Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* **126**, 2563–75 (1999).
337. Wang, Q. *et al.* Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3444–3449 (1996).
338. Yokomizo, T. *et al.* Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* **6**, 13–23 (2001).
339. Mukoyama, Y. *et al.* The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev. Biol.* **220**, 27–36 (2000).
340. Zeigler, B. M. *et al.* The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential. *Development* **133**, 4183–4192 (2006).

341. Takakura, N. *et al.* A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* **102**, 199–209 (2000).
342. Cai, X. *et al.* Runx1 loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells. *PLoS One* **6**, 1–14 (2011).
343. Tober, J., Yzaguirre, A. D., Piwarzyk, E. & Speck, N. a. Distinct temporal requirements for Runx1 in hematopoietic progenitors and stem cells. *Development* **140**, 3765–76 (2013).
344. Dzierzak, E. & Speck, N. A. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **9**, 129–136 (2008).
345. Yokomizo, T. *et al.* Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. *Nat. Protoc.* **7**, 421–431 (2012).
346. Yoder, M. C. Inducing definitive hematopoiesis in a dish. *Nat. Biotechnol.* **32**, 539–41 (2014).
347. Chen, M. J. *et al.* Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* **9**, 541–52 (2011).
348. Kobayashi, M. *et al.* Functional B-1 progenitor cells are present in the hematopoietic stem cell-deficient embryo and depend on Cbf $\beta$  for their development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12151–6 (2014).
349. Tober, J., Maijenburg, M. W. & Speck, N. A. *Taking the Leap: Runx1 in the Formation of Blood from Endothelium. Hematopoiesis* **118**, (Elsevier Inc., 2016).
350. Bee, T. *et al.* Alternative Runx1 promoter usage in mouse developmental hematopoiesis. *Blood Cells. Mol. Dis.* **43**, 35–42 (2009).
351. Sroczynska, P., Lancrin, C., Kouskoff, V. & Lacaud, G. The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood* **114**, 5279–5289 (2009).
352. Lam, E. Y. N. *et al.* Zebrafish runx1 promoter-EGFP transgenics mark discrete sites of definitive blood progenitors. *Blood* **113**, 1241–1249 (2009).
353. Bee, T. *et al.* Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis. *Blood* **115**, 3042–3051 (2010).
354. Lorsbach, R. B. *et al.* Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-

- GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* **103**, 2522–9 (2004).
355. North, T. E. & de Bruijn, M. F. T. R. Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells* **22**, 158–68 (2004).
356. Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I. & Littman, D. R. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1945–1957 (2007).
357. Gowney, J. D. *et al.* Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* **106**, 494–504 (2005).
358. Ichikawa, M., Asai, T., Chiba, S., Kurokawa, M. & Ogawa, S. Runx1/AML-1 Ranks as a Master Regulator of Adult Hematopoiesis. *Cell Cycle* **3**, 722–724 (2004).
359. Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N & Buchholz, F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* **25**, 929–939 (2006).
360. Ichikawa, M. *et al.* AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 299–304 (2004).
361. Pencovich, N. *et al.* Cell-autonomous function of Runx1 transcriptionally regulates mouse megakaryocytic maturation. *PLoS One* **8**, e64248 (2013).
362. Kuvardina, O. N. *et al.* RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. **125**, 3570–3580 (2015).
363. Ichikawa, M. *et al.* AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J. Immunol.* **180**, 4402–8 (2008).
364. Motoda, L. *et al.* Runx1 Protects Hematopoietic Stem/Progenitor Cells from Oncogenic Insult. *Stem Cells* **25**, 2976–2986 (2007).
365. Jacob, B. *et al.* Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood* **115**, 1610–1620 (2010).
366. Cai, X. *et al.* Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 165–177 (2015).

367. Sun, W. & Downing, J. R. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* **104**, 3565–3572 (2004).
368. Yamashita, N. *et al.* Haploinsufficiency of Runx1/AML1 promotes myeloid features and leukaemogenesis in BXH2 mice. *Br. J. Haematol.* **131**, 495–507 (2005).
369. Draper, J. E. *et al.* RUNX1B Expression Is Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis. *PLoS Genet.* **12**, 1–30 (2016).
370. Tsuzuki, S. *et al.* Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med.* **4**, e172 (2007).
371. Tsuzuki, S. & Seto, M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood* **119**, 727–735 (2012).
372. Liu, X. *et al.* Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia* **23**, 739–745 (2009).
373. Challen, G. A. & Goodell, M. A. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **38**, 403–416 (2010).
374. Ramos-Mejía, V. *et al.* Maintenance of human embryonic stem cells in mesenchymal stem cell-conditioned media augments hematopoietic specification. *Stem Cells Dev.* **21**, 1549–58 (2012).
375. Davis, R. P. *et al.* Generation of human embryonic stem cell reporter knock-in lines by homologous recombination. *Current protocols in stem cell biology* **Chapter 5**, (2009).
376. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463–71 (1998).
377. Norrman, K. *et al.* Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. *PLoS One* **5**, (2010).
378. Real, P. J. *et al.* SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification From Human Embryonic Stem Cells. *Mol. Ther.* **20**, 1443–1453 (2012).
379. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J. & Nilsen, T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **5**, 2010–2013 (2010).

380. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
381. Ayllón, V. *et al.* The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematoendothelial progenitors and regulates their hematopoietic fate. *Leukemia* **29**, 1741–53 (2015).
382. Landry, J.-R. *et al.* Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. *Blood* **111**, 3005–14 (2008).
383. Huang, G. *et al.* PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat. Genet.* **40**, 51–60 (2008).
384. Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O. I. & Dick, J. E. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* **9**, 959–963 (2003).
385. Rijn, R. S. Van *et al.* A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma c^{-/-}$  double-mutant mice. *Immunobiology* **102**, 2522–2531 (2003).
386. Traggiai, E. *et al.* Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* (80-. ). **304**, 104–107 (2004).
387. Ishikawa, F. *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor chain null mice. *Blood* **106**, 1565 – 1573 (2005).
388. Rongvaux, A. *et al.* *Human Hemato-Lymphoid System Mice: Current Use and Future Potential for Medicine. Annual Review of Immunology* **31**, (2013).
389. Shultz, L. D. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* **174**, 6477–6489 (2005).
390. Bueno, C., Montes, R., de la Cueva, T., Gutierrez-Aranda, I. & Menendez, P. Intra-bone marrow transplantation of human CD34(+) cells into NOD/LtSz-scid IL-2rgamma(null) mice permits multilineage engraftment without previous irradiation. *Cytotherapy* **12**, 45–49
391. Urbano-Ispizua, A. *et al.* Allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from human leukocyte antigen-identical siblings: detrimental effect of a high number of donor CD34(+) cells? *Blood* **98**, 2352–2357 (2001).
392. Ledran, M. H. *et al.* Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells

- on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* **3**, 85–98 (2008).
393. Slukvin, I. I. Review Article Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells : current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. *Blood* **122**, 4035–4046 (2013).
394. Yu, Q. C. *et al.* APELIN promotes hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Blood* **119**, 6243–54 (2012).
395. Smith, B. W. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood* **122**, 376–85 (2013).
396. Stachura, D. L. *et al.* The zebrafish granulocyte colony-stimulating factors (Gcsfs): 2 paralogous cytokines and their roles in hematopoietic development and maintenance. *Blood* **122**, 3918–28 (2013).
397. Li, Y. *et al.* Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production. *Genes Dev.* **28**, 2597–612 (2014).
398. Sawamiphak, S., Kontarakis, Z. & Stainier, D. Y. R. Interferon Gamma Signaling Positively Regulates Hematopoietic Stem Cell Emergence. *Dev. Cell* **31**, 640–653 (2014).
399. He, Q. *et al.* Inflammatory signaling regulates hematopoietic stem and progenitor cell emergence in vertebrates. **125**, 1098–1107 (2015).
400. Capobianchi, M. R., Uleri, E., Caglioti, C. & Dolei, A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 103–11 (2015).
401. Elefanty, a G., Begley, C. G., Hartley, L., Papaevangeliou, B. & Robb, L. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* **94**, 3754–3763 (1999).
402. Lancrin, C. *et al.* GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood* **120**, 314–22 (2012).
403. Swiers, G. *et al.* Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nat. Commun.* **4**, 2924 (2013).
404. Okada, H. *et al.* AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene* **17**, 2287–2293 (1998).
405. Liakhovitskaia, A. *et al.* Runx1 is required for progression of CD41+ embryonic precursors

- into HSCs but not prior to this. *Development* **141**, 3319–23 (2014).
406. Liu, X. *et al.* Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia* **23**, 739–45 (2009).
  407. Himes, S. R., Cronau, S., Mulford, C. & Hume, D. a. The Runx1 transcription factor controls CSF-1-dependent and -independent growth and survival of macrophages. *Oncogene* **24**, 5278–86 (2005).
  408. Pimanda, J. E. *et al.* The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 840–5 (2007).
  409. Nottingham, W. T. *et al.* Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata / Ets / SCL-regulated enhancer. 4188–4197 (2007).
  410. Zhen, F., Lan, Y., Yan, B., Zhang, W. & Wen, Z. Hemogenic endothelium specification and hematopoietic stem cell maintenance employ distinct Scl isoforms. *Development* **140**, 3977–85 (2013).
  411. Lie-a-ling, M. *et al.* RUNX1 positively regulates a cell adhesion and migration program in murine hemogenic endothelium prior to blood emergence. *Blood* **124**, 11–20 (2014).
  412. Espín-Palazón, R. *et al.* Proinflammatory Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Emergence. *Cell* 1–16 (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.10.031



## **9. ANEXO I: PUBLICACIONES COMO PRIMER AUTOR**



## LETTER TO THE EDITOR

**Intrahepatic transplantation of cord blood CD34<sup>+</sup> cells into newborn NOD/SCID-IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice allows efficient multi-organ and multi-lineage hematopoietic engraftment without accessory cells<sup>\*</sup>**

To the Editor:

Advancing the current understanding in experimental and developmental hematopoiesis, hematopoietic transplantation, graft-versus-host-disease (GvHD) and graft-versus-leukemia, immune system, leukemogenic processes as well as testing in pre-clinical models novel cell- and drug-based therapeutic approaches demand the use of xenotransplant systems [1]. Upon discovery of the *scid* mutation, the immune-deficient non-obese diabetic NOD/SCID mouse was developed, and rapidly became the standard model for hematopoietic xenotransplantation. Several NOD/SCID generations have evolved over the last decade [2,3]. Recently, the NOD/SCID-IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> strain (NSG) has been developed which allows higher engraftment levels and does not develop thymic lymphoma therefore displaying a longer lifespan [4,5].

Co-transplantation of inactivated accessory cells together with CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) has long been associated with enhanced and more stable hematopoietic reconstitution upon xeno-transplantation [4,5]. In a clinical setting, despite that CD34<sup>+</sup> cell-selected HSPCs have been used worldwide in allogeneic transplantation in an attempt to deplete immune cells thus reducing the risk of GvHD [6], it is now considered that accessory-depleted transplants are associated to an increased risk of opportunistic infections, secondary malignancies related to long-term immunosuppression and, more importantly, graft failure [7–9]. In such a context, it has been reported that increasing numbers of T-cells in the graft associates to decreasing graft failure rates [10].

Several experimental scenarios may require HSC or leukemic cell transplantation into newborn mice. For instance,

hematopoietic reconstitution with ontogenically early HSCs such as hematopoietic cells derived from human embryonic stem cells (hESCs), human fetal liver or cord blood (CB) may be more efficient if cells are transplanted into an ontogenically-matched organ such as newborn liver which may provide a more permissive immune-hematopoietic milieu. In addition, successful *de novo* development of functional components of the human adaptive immune system as a pre-clinical model to evaluate *in vivo* immune responses, for example, to vaccines or live infectious pathogens may benefit from cell transplantation into a newborn hematopoietic microenvironment [11].

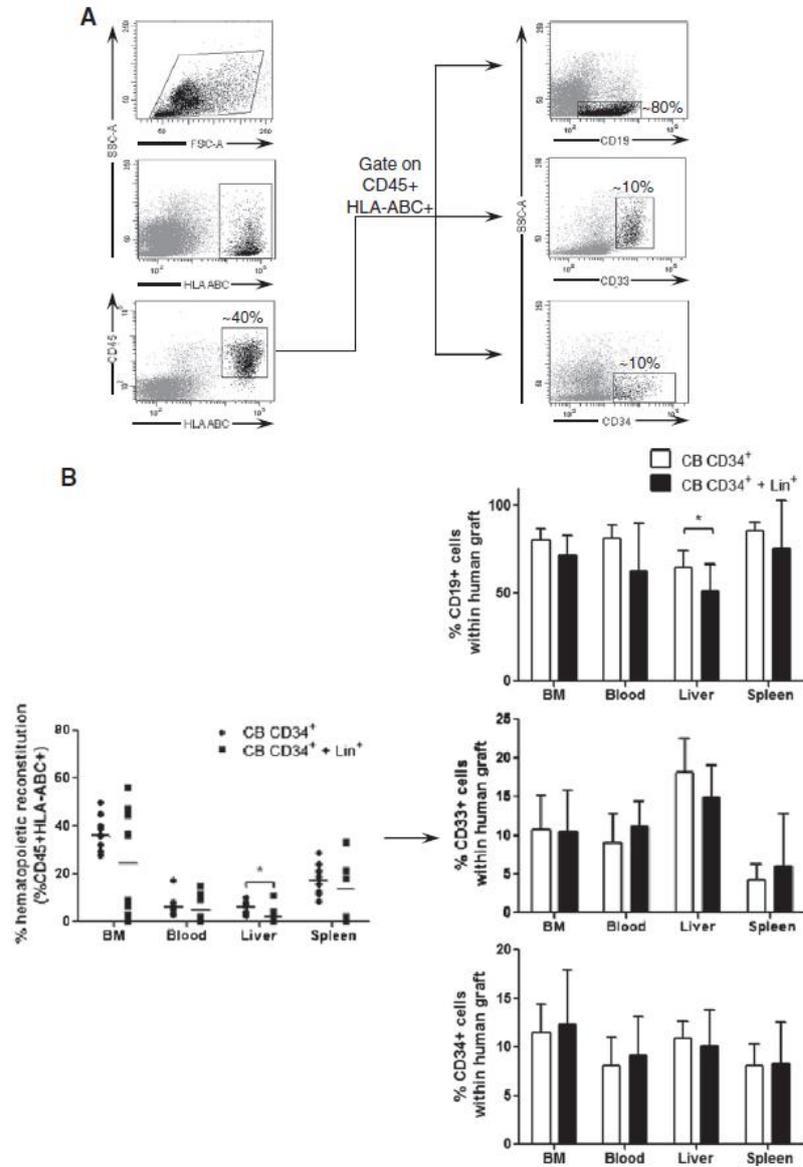
Here, we analyzed for the first time the ability of CB-derived CD34<sup>+</sup> HSCs to reconstitute the hematopoiesis of a newborn NSG mice strain upon intrahepatic transplantation. We compared side-by-side the engraftment efficiency of CB-derived CD34<sup>+</sup> cells transplanted alone or in combination with irradiated accessory cells. CB samples from healthy newborns were obtained from local hospitals upon approval by our local ethics and biohazard board committee. CB samples were pooled to reduce variability between individual CB units. Mononuclear cells were isolated using Ficoll-Hypaque density gradient. After red blood lysis, CD34<sup>+</sup> cells were purified by magnetic bead separation using a human CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) and an AutoMACS Pro-separator following the manufacturer's instructions. Purity was consistently higher than 95% (data not shown).  $3 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup> cells alone or together with  $5 \times 10^4$  irradiated (15 Gy) CD34-Lineage<sup>+</sup> accessory cells were transplanted intrahepatically in 1–2 day old newborn mice (n=20) within 12 h of irradiation (1 Gy). Mice were sacrificed 6 weeks after transplantation and BM was flushed. Peripheral blood, spleen and liver were also collected and analyzed for human chimerism. Human chimerism was determined by flow cytometry using anti-CD45 and anti-HLA-ABC (Fig. 1A). All engrafted mice were assessed for multilineage reconstitution using anti-CD19 (B-cell), anti-CD33 (myeloid) and anti-CD34 (immature cells) (Fig. 1A).

All (100%) mice transplanted with  $3 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup> cells without accessory cells showed human engraftment in all organs analyzed (Fig. 1B, left panel). However, 2 out of 10 (20%) mice transplanted with CD34<sup>+</sup> cells together with accessory cells failed to engraft (Fig. 1B, left panel). Furthermore, the levels of engraftment were significantly higher in those mice transplanted without accessory cells: BM ( $36\% \pm 2.3\%$  vs  $24\% \pm 7.3\%$ ), PB ( $6.1\% \pm 1.3\%$  vs  $5\% \pm 1.8\%$ ), liver ( $6\% \pm 1\%$  vs  $2\% \pm 1\%$ ) and spleen ( $17\% \pm 2\%$  vs  $13\% \pm 4.6\%$ ). We next characterized the engraftment composition and found

<sup>\*</sup> Authorship contributions:

O.N.-M., D.R.-M., R.M.: conception and experimental design, collection and/or assembly data, data analysis, interpretation. P.J.R., C.B.: data analysis and interpretation. P.M.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation and manuscript writing.

The manuscript has been seen and approved by all authors.



**Figure 1** Multi-lineage hematopoietic reconstitution of newborn NOD/SCID-IL2R $\gamma^{\text{null}}$  mice intrahepatically transplanted with CB-CD34+ cells alone or in combination with accessory cells. (A) Representative flow cytometry analysis showing multilineage engraftment. All human cells co-express HLA-ABC and CD45. The CD45+ human hematopoietic fraction comprises B-lymphoid cells (CD19+), myeloid cells (CD33+) and immature cells (CD34+). (B) Human multi-lineage chimerism in BM, PB, spleen and liver indicating successful migration of the human CD34+ cells from the fetal liver. Each dot/square represents an individual mouse and the horizontal line indicates the mean of each experimental condition.

very similar multilineage reconstitution in all tissues analyzed regardless whether accessory cells were co-transplanted (Fig. 1B, right panel), indicating that co-transplantation of accessory cells may have a detrimental effect on global engraftment levels but does not influence *in vivo* lineage commitment of the CD34+ grafted cells. The graft was composed predominantly by B-lymphoid cells (CD45+CD19+), followed by myeloid cells (CD45+CD33+) and immature cells (CD45+CD34+) (Fig. 1B, right panel).

Our results demonstrate that co-transplantation of accessory cells is dispensable to achieve efficient multi-organ and multi-lineage long-term hematopoietic engraftment of CB CD34+ HSPCs into NSG upon intrahepatic inoculation. Newborn liver transplantation in the permissive NSG mouse strain may offer an adequate immune-hematopoietic milieu which may facilitate the study of developmentally early hematopoiesis and the human adaptive immune system.

### Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to disclose.

### Acknowledgments

This work was funded by the CICE/FEDER (P08-CTS-3678) de la Junta de Andalucía to P.M., the FIS/FEDER (P110/00449 to P.M., P111/00119 to C.B.), the MICINN (Fondo Especial del Estado para Dinamización de la Economía y Empleo-PLE-2009-0111 to P.M.), and the Foundation "Spanish Association Against Cancer"/Junta Provincial de Albacete (CI110023 to P.M.). C.B. and P.J.R. were supported by the ISCIII/FEDER "Miguel Servet Program" (CP07/00059 to C.B. and CP09/0063 to P.J.R.). R.M. was supported by the ISCIII (CA10/01332). D.R.-M. was supported by a PFIS scholarship from the ISCIII (FI11/00511). O.N.-M. was supported by the Health Department of The Junta de Andalucía.

### References

- [1] J.E. Dick, M. Bhatia, O. Gan, U. Kapp, J.C. Wang, Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice, *Stem Cells* 15 (1997) 199–203.
- [2] L.D. Shultz, F. Ishikawa, D.L. Greiner, Humanized mice in translational biomedical research, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 118–130.
- [3] K. Levac, P. Menendez, M. Bhatia, Intra-bone marrow transplantation facilitates pauci-clonal human hematopoietic repopulation of NOD/SCID/beta2m(-/-) mice, *Exp. Hematol.* 33 (2005) 1417–1426.
- [4] C. Bueno, R. Montes, T. de la Cueva, I. Gutierrez-Aranda, P. Menendez, Intra-bone marrow transplantation of human CD34(+) cells into NOD/LtSz-scid IL-2gamma(null) mice permits multilineage engraftment without previous irradiation, *Cytherapy* 12 (2010) 45–49.
- [5] L.D. Shultz, B.L. Lyons, L.M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, et al., Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 6477–6489.
- [6] A. Urbano-Ispizua, E. Carreras, P. Marin, M. Rovira, C. Martinez, F. Fernandez-Aviles, et al., Allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from human leukocyte antigen-identical siblings: detrimental effect of a high number of donor CD34(+) cells? *Blood* 98 (2001) 2352–2357.
- [7] Y. Kawabata, M. Hirokawa, A. Komatsuda, K. Sawada, Clinical applications of CD34+ cell-selected peripheral blood stem cells, *Ther. Apher. Dial.* 7 (2003) 298–304.
- [8] J. Mattsson, O. Ringden, R. Storb, Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14 (2008) 165–170.
- [9] U. Platzbecker, G. Ehninger, M. Bornhauser, Allogeneic transplantation of CD34+ selected hematopoietic cells—clinical problems and current challenges, *Leuk. Lymphoma* 45 (2004) 447–453.
- [10] A. Urbano-Ispizua, C. Rozman, P. Pimentel, C. Solano, J. de la Rubia, S. Brunet, et al., The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings, *Blood* 97 (2001) 383–387.
- [11] E. Traggiai, L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J.C. Piffaretti, A. Lanzavecchia, et al., Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice, *Science* 304 (2004) 104–107.

Oscar Navarro-Montero<sup>1</sup>  
Damià Romero-Moya<sup>1</sup>  
Rosa Montes<sup>1</sup>  
Verónica Ramos-Mejía  
Clara Bueno  
Pedro J. Real  
Pablo Menendez\*

Center Pfizer-University of Granada-Andalusian Government for Genomics and Oncological Research (GENyO), Spain

\*Corresponding author at: Center Pfizer-University of Granada-Andalusian Government for Genomics and Oncological Research (GENyO), Avda de la Ilustración 114, 18007 Granada, Spain. Fax: +34 958 637 071.

E-mail address: pablo.menendez@genyo.es (P. Menendez).

1 August 2012

<sup>1</sup> These three authors contributed equally to this work and should be considered joint first authors.

## Correspondence

To the editor:

## The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells

In a recent issue of *Blood*, Ran et al<sup>1</sup> reported that ectopic expression of *RUNX1a* isoform facilitates the emergence of definitive hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) from human embryonic stem cells (hESCs), as well as an impressive expansion potential of the *RUNX1a*-hESC-derived HSPCs, eventually conferring multilineage in vivo engraftment ability.

The function of RUNX1 isoforms in human blood specification remains elusive and controversial.<sup>2</sup> Ran et al<sup>1</sup> showed in bulk hESC-differentiating cultures that *RUNX1b/c* isoforms are higher expressed than *RUNX1a* very early in specification (before blood emergence), whereas *RUNX1b/c* expression is lower than *RUNX1a* at the time of or after blood emergence. However, our data using different hESC lines (H9, AND1, HSI81) and both embryoid bodies-based and OP9 coculture-based differentiation systems<sup>3</sup> reveal that the expression of *RUNX1c* emerges significantly before *RUNX1a* and *RUNX1b* (Figure 1A). *RUNX1c* is almost the only *RUNX1* isoform expressed in hESC-derived fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified hemato-endothelial progenitors (CD31+CD45-) and the highest expressed in FACS-purified hESCs-derived CD45+ blood cells (Figure 1A). Furthermore, lentiviral-mediated expression of *RUNX1c* robustly accelerates and enhances the appearance of hemato-endothelial progenitors, hematopoietic cells, and colony-forming unit potential (Figure 1B). However, despite robust hematopoietic enhancement in vitro, *RUNX1c* does not confer engraftment potential in newborn immunodeficient SCID-IL2R $\gamma$ (null) mice, in keeping with previous work in mouse HSPCs<sup>4</sup> (Figure 1C).

RUNX1 is a master hematopoietic transcription factor that acts as an oncogene in several childhood leukemias,<sup>5,6</sup> mixed-lineage-rearranged leukemias,<sup>7</sup> and T-cell lymphoma.<sup>8</sup> In addition, this laboratory has previously shown that overexpression of *RUNX1a* strongly contributes to leukemogenesis.<sup>9</sup> This occurs because *RUNX1a* is missing the transactivation domain essential for its normal function in hematopoiesis,<sup>9,10</sup> and consequently it functions as a dominant inhibitor of other RUNX1 isoforms.<sup>9,10</sup>

This "double-edged sword" of RUNX1<sup>11</sup> argues whether the data reported by Ran et al<sup>1</sup> are a consequence of *RUNX1a*-mediated transformation of hESC-derived blood cells.<sup>12</sup> Our concern is based on the following data reported by Ran et al: (i) *RUNX1a* is massively (>700-fold) and nonphysiologically overexpressed; (ii) *RUNX1a*-hESC-derived CD45+CD34+ HSPCs surprisingly expand 25-fold more than the control within a short (7-day) window; (iii) *RUNX1a*-hESC-derived CD45+CD34+ HSPCs expand even more than their somatic CB-CD34+ counterparts in stroma cocultures; (iv) ~80% of the CD45+ hematopoietic stem cells (HSCs) remain as CD45+CD34+, suggestive of a lack of terminal differentiation into CD45+CD34- cells; and (v) 100% of the mice analyzed displayed engraftment (CD45+), which, to date, represents a major stumbling block in the field. However, when the multilineage engraftment was analyzed, the proportion of myeloid cells (CD33+), B-lymphoid cells (CD19+), and erythroid cells (CD36+) add up to as little as 23% of the graft. The question then is: What is the phenotype of the remaining 77% of the cells within the graft?

Because these data are not shown, we propose that they may be CD45+CD34+ cells displaying a differentiation blockage.

Finally, the large expansion of the *RUNX1a*-hESC-derived CD45+CD34+ HSPCs allowed the authors to transplant as many as 150 000 CD45+CD34+ cells, which is typically not possible for laboratories worldwide. Because in vivo data on wild-type or empty vector-expressing hESCs is not shown, it is difficult to conclude whether the engraftment is directly attributed to *RUNX1a*-mediated self-renewal/specification effects or whether it may be an indirect consequence of the large number of CD45+CD34+ cells that were transplanted. To resolve this issue, *RUNX1a* knockdown experiments would be helpful to show that the phenotype is causatively related to *RUNX1a* expression.

We conclude that the *RUNX1c* isoform appears to parallel hematopoietic emergence better than *RUNX1a*, and that overexpression of either *RUNX1a* or *RUNX1c* enhances the hemato-endothelial and hematopoietic potential of hESCs in vitro. However, the hematopoietic derivatives from *RUNX1a*-hESCs and *RUNX1c*-hESCs seem to display differential in vivo engraftment ability, as previously described in transplantation experiments using mouse HSCs.<sup>4,13</sup> In addition, the surrogate assays conducted to assess in vitro and in vivo the hematopoietic potential of hESC hematopoietic derivatives should be interpreted with caution to thoroughly address the direct versus indirect consequences of ectopically overexpressed transcription factors involved in leukemogenesis. Nevertheless, regardless of the fact that the data from Ran et al<sup>1</sup> could be the result of either normal hematopoietic specification or a leukemogenic effect, the data are equally relevant for the field. This is because many efforts are being undertaken in both directions: (i) generation of in vivo functional HSCs from hESCs and (ii) understanding of the molecular/developmental mechanisms underlying newborn/childhood leukemias with a very well-established embryonic/fetal origin.

**Pedro J. Real**

Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO),  
Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain

**Oscar Navarro-Montero**

GENYO, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain

**Verónica Ramos-Mejía**

GENYO, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain

**Verónica Ayllón**

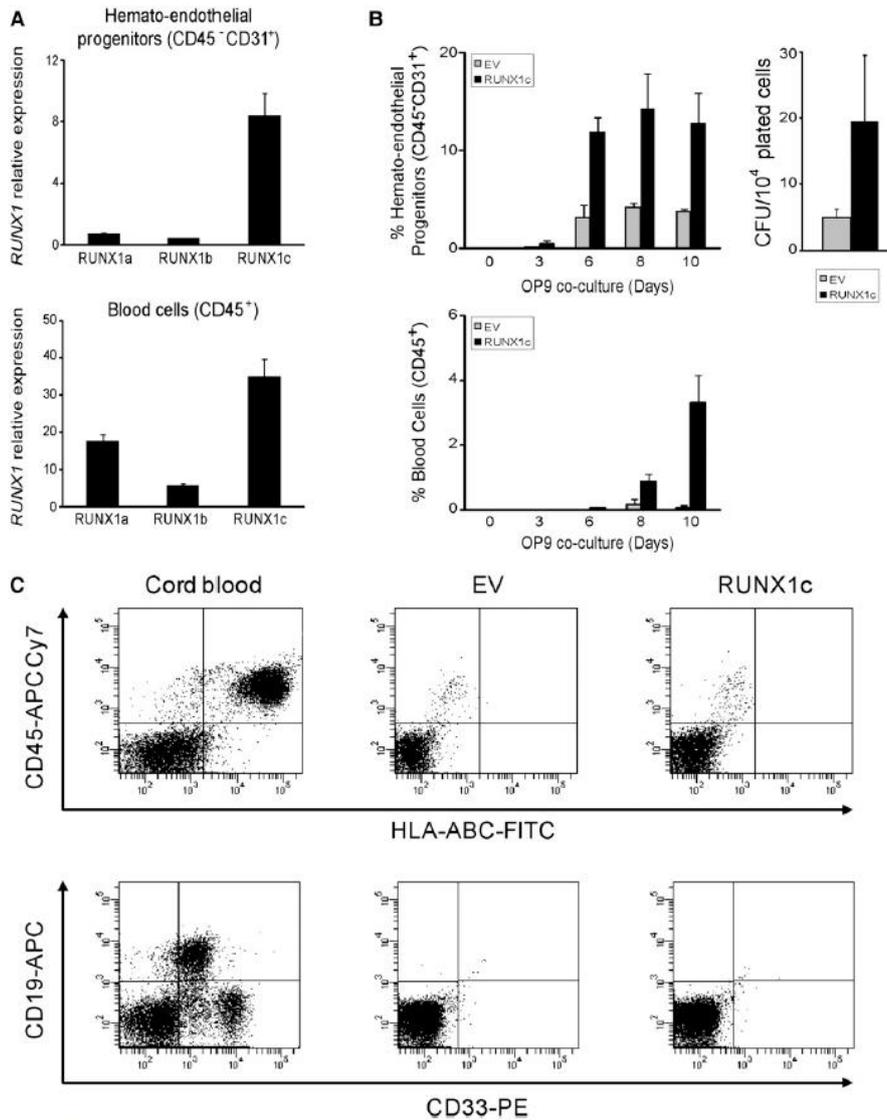
GENYO, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain

**Ciara Bueno**

GENYO, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain

**Pablo Menéndez**

GENYO, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government,  
Granada, Spain  
Josep Carreras Leukemia Research Institute,  
Cell Therapy Program of the University of Barcelona and  
Institut Catalana de Recerca i Estudis Avançats,  
Barcelona, Spain



**Figure 1. *RUNX1c* isoform accelerates and enhances hematopoietic commitment of hESC.** (A) Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis of the 3 main *RUNX1* isoforms in the H9 hESC cell line shows that *RUNX1c* is the isoform almost exclusively expressed in CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> hemato-endothelial progenitors, and is expressed at higher levels in CD45<sup>+</sup> hematopoietic cells. Relative expression is shown normalized to undifferentiated hESCs. (B) Kinetics of hematopoietic specification from H9 hESCs transduced with the empty vector (EV) or *RUNX1c*-expressing vector (*RUNX1c*). *RUNX1c* accelerates and enhances hematopoietic development of hESCs. (C) Between  $1 \times 10^6$  and  $2.5 \times 10^6$  hESC-derived EV or *RUNX1c* hematopoietic derivatives were transplanted intrahepatically into newborn immunodeficient SCID-IL2Rgamma(nu) mice. <sup>††</sup>*RUNX1c*-hESC hematopoietic derivatives fail to engraft in vivo. FACS analysis was performed 7 to 8 weeks after transplantation (n = 12). Cord blood-CD34<sup>+</sup> cells were transplanted as a positive control. APC, allophycocyanin; CFU, colony-forming units; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

P.J.R. and O.N.-M. contributed equally to this work.

**Acknowledgments:** This work is supported by grants from The Instituto de Salud Carlos III-FEDER (P110/0449 [P.M.], CP09/0063 and P12/01598 [P.J.R.], CP07/0059 and P11/00119 [C.B.], and CP12/03175 [V.R.M.]); The Spanish Association Against Cancer (P.M.); Health Canada (H4084-11281 [P.M.]); and the CSJA (0029/2006 and 0030/2006 [P.M.]; SAS-111244 [P.J.R.]) and CICE (P08-CTS-3678 [P.M.] and P10-CTS-6406 [P.J.R.]) de la Junta de Andalucía.

**Conflict-of-interest disclosure:** The authors declare no competing financial interests.

**Correspondence:** Pedro J. Real and Pablo Menendez, Avda de la Ilustración 114-PTS, Granada 18016, Spain; e-mail: pedro.real@genyo.es, pmenendez@carreresresearch.org.

## References

- Ran D, Shia WJ, Lo MC, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(15):2882-2890.
- Lam K, Zhang DE. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci*. 2012;17:1120-1139.
- Real PJ, Ligeró G, Ayllón V, et al. SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2012;20(7):1443-1453.
- Challen GA, Goodell MA. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2010;38(5):403-416.

- Mikhail FM, Sery KA, Hatem N, et al. AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2002;16(4):658-668.
- Niini T, Vetterranta K, Holmén J, et al. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia*. 2002;16(11):2213-2221.
- Wilkinson AC, Ballabio E, Geng H, et al. RUNX1 is a key target in t(4:11) leukemias that contributes to gene activation through an AF4-MLL complex interaction. *Cell Rep*. 2013;3(1):116-127.
- Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):376-387.
- Liu X, Zhang Q, Zhang DE, et al. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia*. 2009;23(4):739-745.
- Okuda T, Takeida K, Fujita Y, et al. Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):319-328.
- Mangan JK, Speck NA. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):77-91.
- Werbowetski-Ogilvie TE, Bossé M, Stewart M, et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):91-97.
- Tazuki S, Hong D, Gupta R, Matsuo K, Selo M, Erver T. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med*. 2007;4(5):e172.
- Navarro-Montero O, Romero-Moya D, Montes R, et al. Intrahepatic transplantation of cord blood CD34+ cells into newborn NOD/SCID-IL2Rγ(null) mice allows efficient multi-organ and multi-lineage hematopoietic engraftment without accessory cells. *Clin Immunol*. 2012;145(2):89-91.

## Response

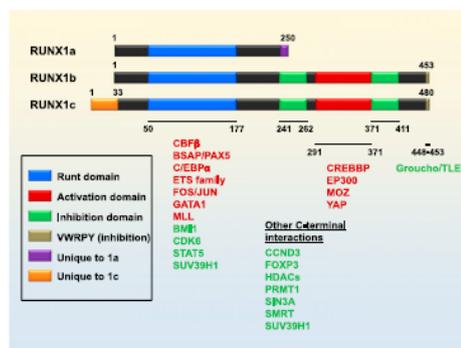
### The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells

We reported in Ran et al that ectopic expression of RUNX1a, a naturally occurring isoform of RUNX1 that contains a DNA binding domain but lacks both transactivation and inhibitory domains of RUNX1b/c (Figure 1), enhanced the production of CD34+CD45+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (ES/iPS).<sup>1</sup> HSPCs produced from ES/iPS cells transduced with lentiviruses overexpressing RUNX1a engrafted NSG mice and produced both myeloid and lymphoid cells. In the "Letter to the Editor" by

Real et al,<sup>2</sup> a valid point was raised that the transformation potential of RUNX1a could partially contribute to the enhancement of HSPC formation by RUNX1a, although no overexpansion or any other clear signs of transformation were observed throughout the 9 weeks post-transplantation in our studies. It should be noted that in addition to the dominant negative effect mentioned by Real et al, RUNX1a can be an activator or repressor in gene expression, but loses certain regulatory functions due to its lack of interaction with some positive and negative cofactors (Figure 1).<sup>3,4</sup> In mouse models, overexpression of RUNX1a results in expansion of hematopoietic cells,<sup>5</sup> lymphoid leukemia,<sup>6</sup> and enhanced engraftment upon transplantation.<sup>5,7</sup> In contrast, overexpression of RUNX1b/c promotes p53-dependent senescence,<sup>8,9</sup> hematopoietic cell differentiation,<sup>10</sup> and the loss of transplanted blood cells.<sup>5,11</sup> Using RUNX1a, but not RUNX1c, in our studies is based on these previous discoveries.

We agree that the potential for hematopoietic cell transformation due to long-term overexpression of RUNX1a is a concern. However, regulated transient expression of RUNX1a during hematopoietic development of ES/iPS cells could be very useful for expanding a rare population of HSPCs. This same principle is illustrated by the use of the very potent proto-oncogene c-Myc to generate iPS cells. In the "Discussion" section, we suggested the use of cell-permeable transcription factors as an alternative to lentiviral transduction and expression of RUNX1a.<sup>1</sup> Although we suggested this strategy to avoid the inappropriate expression of endogenous genes via lentiviral integration, transient expression strategies would also eliminate the potentially negative impact of long-term overexpression of RUNX1a on HSPCs. We thank Real et al for raising this important issue, and giving us the opportunity to clarify our argument.

Regarding the expression of 3 isoforms of RUNX1, our data agree with the finding of Real et al that the expression of RUNX1a



**Figure 1. Three isoforms of RUNX1 and interacting proteins.** Selected domains and isoform-specific regions indicated in key. Coactivator interaction partners are in red. Co-repressor interaction partners are in green. Numbering of domains refers to the RUNX1b isoform.

and RUNX1b/c is increased during the hematopoietic differentiation of human ES/PS cells, and that RUNX1b/c expression is always higher than RUNX1a expression. This was illustrated in Ran et al,<sup>1</sup> Figure 1A-B, and supplemental Figure 1.

Finally, Real et al<sup>2</sup> questioned whether the engraftment we observed by CD45+ CD34+ HSPCs derived from RUNX1a-expressing human ES cells was due to an intrinsic feature of the HSPCs, or simply because we transplanted an unusually large number of HSPCs. At present, we cannot distinguish between those 2 possibilities. However, regardless of the mechanism, overexpression of RUNX1a permitted engraftment, either by promoting expansion of HSPCs in vitro, or by altering the properties of HSPCs in vivo; determining which is the case will be a focus of future studies.

In short, we demonstrate a positive effect of RUNX1a on promoting hematopoiesis from human pluripotent stem cells, which provides a potential novel avenue for generating therapeutic HSCs. Additional studies are necessary to examine its possible transforming ability and to create inducible expression systems for using RUNX1a in regenerative medicine.

#### Dan Ran

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### Kentson Lam

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### Wei-Jong Shia

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### Miao-Chia Lo

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### Jun-Bao Fan

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### David A. Knorr

Department of Medicine and Stem Cell Institute,  
University of Minnesota Medical School,  
Minneapolis, MN

#### Patrick I. Ferrell

Department of Medicine and Stem Cell Institute,  
University of Minnesota Medical School,  
Minneapolis, MN

#### Zhaohui Ye

Division of Hematology, Department of Medicine,  
Johns Hopkins University,  
Baltimore, MD

#### Ming Yan

Moore's UCSD Cancer Center,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

#### Linzao Cheng

Division of Hematology, Department of Medicine,  
Johns Hopkins University,  
Baltimore, MD

#### Dan S. Kaufman

Department of Medicine and Stem Cell Institute,  
University of Minnesota Medical School,  
Minneapolis, MN

#### Dong-Er Zhang

Moore's UCSD Cancer Center and  
Department of Pathology and Division of Biological Sciences,  
University of California San Diego,  
La Jolla, CA

**Acknowledgments:** The authors thank Dr Nancy Speck for valuable discussion and critical suggestions.

**Conflict-of-interest disclosure:** The authors declare no competing financial interests.

**Correspondence:** Dong-Er Zhang, Moore's UCSD Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093; e-mail: dzhang@ucsd.edu.

## References

- Ran D, Shia WJ, Lo MC, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(15):2882-2890.
- Real PJ, Navarro-Montero O, Ramos-Mejia V, Ayllón V, Bueno C, Menendez P. The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(26):5250-5252.
- Lam K, Zhang DE. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci*. 2012;17:1120-1139.
- Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):3915-3925.
- Tsuzuki S, Hong D, Gupta R, Matsuo K, Seto M, Enver T. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med*. 2007;4(5):e172.
- Liu X, Zhang Q, Zhang DE, et al. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia*. 2009;23(4):739-745.
- Tsuzuki S, Seto M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*. 2012;119(3):727-735.
- Wolyniec K, Wotton S, Kilbey A, et al. RUNX1 and its fusion oncoprotein derivative, RUNX1-ETO, induce senescence-like growth arrest independently of replicative stress. *Oncogene*. 2009;28(27):2502-2512.
- Wotton SF, Blyth K, Kilbey A, et al. RUNX1 transformation of primary embryonic fibroblasts is revealed in the absence of p53. *Oncogene*. 2004;23(32):5476-5486.
- Guo H, Ma O, Speck NA, Friedman AD. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces C/ebpα transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis. *Blood*. 2012;119(19):4408-4418.
- Challen GA, Goodell MA. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2010;38(5):403-416.

Manuscript Id	Current Corr. Author	Date of Original Submission	Current Version Status	Current Editor
BLOOD/2016/717710	Pedro J Real	19 May 2016	<b>Status:</b> Under Review	Margaret Goodell
<a href="#">PDF</a> <a href="#">HTML References</a> <a href="#">Download Supplemental Files</a> <a href="#">Source Files</a>	<p><b>Version:</b> 1</p> <p><b>Title:</b> RUNX1c regulates hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells through activation of pro-inflammatory signaling</p> <p><b>Authors:</b> Oscar Navarro-Montero, Veronica Ayllon, Veronica Ramos-Mejia, Rosa Montes, Clara Bueno, Elizabeth Ng, Mar Lamolda, Lourdes Lopez-Onieva, Xiomara Guerrero-Carreño, Tamara Romero, Damia Romero-Moya, Ed Stanley, Andrew Elefanty, Pablo Menendez, and Pedro J Real</p> <p><b>Article Type:</b> Regular Article</p> <p><b>Primary Scientific Category:</b> Hematopoiesis and Stem Cells</p> <p><b>Secondary Scientific Category:</b> None</p> <p><b>Keywords:</b> HEMATOPOIESIS, Stem and Primitive Progenitor Cells; HEMATOPOIESIS, Stem and Primitive Progenitor Cells, Transcription factors; HEMATOPOIESIS, Stem and Primitive Progenitor Cells, Normal cell development; RUNX1c; hemato-endothelial precursors; hematopoiesis; human ESC</p>			

***RUNX1c* regulates hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells  
through activation of pro-inflammatory signaling**

Oscar Navarro-Montero<sup>1</sup>, Veronica Ayllon<sup>1</sup>, Veronica Ramos-Mejia<sup>1</sup>, Rosa Montes<sup>1</sup>, Clara Bueno<sup>2</sup>, Elizabeth Ng<sup>3</sup>, Mar Lamolda<sup>1</sup>, Lourdes López-Onieva<sup>1</sup>, Xiomara Guerrero-Carreno<sup>1</sup>, Tamara Romero<sup>1</sup>, Damià Romero-Moya<sup>2</sup>, Ed Stanley<sup>4</sup>, Andrew Elefanty<sup>3</sup>, Pablo Menendez<sup>2,5\*</sup>, Pedro J. Real<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>. Gene Regulation, Stem Cells and Development Group, Department of Genomic Oncology, GENYO: Centre for Genomics and Oncological Research Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía, PTS Granada, Granada 18016, Spain.

<sup>2</sup>. Josep Carreras Leukemia Research Institute and Biomedicine Department, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>. Blood Cell Development & Disease Laboratory. Murdoch Childrens Research Institute. The Royal Children's Hospital. Parkville, Australia.

<sup>4</sup>. Stem Cell Technology Laboratory. Murdoch Childrens Research Institute. The Royal Children's Hospital. Parkville, Australia.

<sup>5</sup>. Institució Catalana de Reserca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

**Running Title:** *RUNX1c* promotes human embryonic hematopoiesis.

**Key words:** *RUNX1c*, human ESC, hematopoiesis, hemato-endothelial precursors.

**\* Correspondence should be addressed to:**

Pedro J. Real Ph.D.

GENYO: Centre for Genomics and Oncological Research Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía . Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud (PTS) Granada

Avda. de la Ilustración 114, Granada 18016, Spain

Phone: 00 34 958 715 500

Email: [pedro.real@genyo.es](mailto:pedro.real@genyo.es);

Pablo Menedez Ph.D, MBA

Josep Carreras Leukaemia Research Institute

School of Medicine. Barcelona University

Carrer Casanova 143. Barcelona 08036. Spain

Tel. 00 34 935 572 809

E-mail: [pmenendez@carrerasresearch.org](mailto:pmenendez@carrerasresearch.org)

**Word counts:**

Abstract: 148 words

Text: 4000 words

Figures: 6

References: 58

**10. ANEXO II:  
OTRAS PUBLICACIONES**

- [1] P. J. Real, G. Ligeró, V. Ayllón, V. Ramos-Mejía, C. Bueno, I. Gutiérrez-Aranda, O. Navarro-Montero, M. Lako, and P. Menéndez, "SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification From Human Embryonic Stem Cells," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 7, pp. 1443–1453, Apr. 2012.
- [2] D. Romero-Moya, C. Bueno, R. Montes, O. Navarro-Montero, F. J. Iborra, L. C. López, M. Martín, and P. Menéndez, "Cord blood-derived CD34+ hematopoietic cells with low mitochondrial mass are enriched in hematopoietic repopulating stem cell function.," *Haematologica*, vol. 98, no. 7, pp. 1022–9, Jul. 2013.
- [3] C. Bueno, V. Ayllón, R. Montes, O. Navarro-Montero, V. Ramos-Mejía, P. J. Real, D. Romero-Moya, M. J. Araúzo-Bravo, and P. Menéndez, "FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs.," *Blood*, vol. 121, no. 19, pp. 3867–3878, 2013.
- [4] R. Montes, V. Ayllón, C. Prieto, a Bursen, C. Prella, D. Romero-Moya, P. J. Real, O. Navarro-Montero, C. Chillón, R. Marschalek, C. Bueno, and P. Menéndez, "Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells.," *Leukemia*, vol. 28, no. 3, pp. 666–74, 2014.
- [5] V. Ramos-Mejía, O. Navarro-Montero, V. Ayllón, C. Bueno, T. Romero, P. J. Real, and P. Menéndez, "HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells," *Blood*, vol. 124, no. 20, pp. 3065–3075, 2014.
- [6] M. G. Toscano, O. Navarro-Montero, V. Ayllón, V. Ramos-Mejía, X. Guerrero-Carreno, C. Bueno, T. Romero, M. Lamolda, M. Cobo, F. Martín, P. Menéndez, and P. J. Real, "SCL/TAL1-mediated transcriptional network enhances megakaryocytic specification of human embryonic stem cells.," *Mol. Ther.*, vol. 23, no. 1, pp. 158–70, Jan. 2015.
- [7] V. Ayllón, C. Bueno, V. Ramos-Mejía, O. Navarro-Montero, C. Prieto, P. J. Real, T. Romero, M. J. García-León, M. L. Toribio, A. Bigas, and P. Menéndez, "The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematoendothelial progenitors and regulates their hematopoietic fate," *Leukemia*, vol. 29, no. 8, pp. 1741–1753, 2015.