



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
(B11/56/1)

Tesis doctoral

Generación de modelos de leucemia pediátrica con expresión de NUP98-KDM5A en células pluripotentes humanas

Candidato doctoral
Joan Domingo Reinés

Directores de tesis
Dra. Verónica Ramos Mejía
Dr. David Landeira Frías

Granada, 22 de junio de 2022



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

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Joan Domingo Reinés
ISBN: 978-84-1117-509-8
URI <https://hdl.handle.net/10481/77140>

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

Publicación de un artículo científico en una revista relevante en el campo de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis.

Domingo-Reinés J., Martínez-Navajas G., Montes R., Lamolda M., Simón I., Ríos-Pelegrina RM., López-Hidalgo JL., García del Moral R., Marchal JA., Real PJ. & Ramos-Mejía V. (2022) **Generation of a H9 clonal cell line with inducible expression of NUP98-KDM5A fusion gene in the AAVS1 safe harbor locus.** *Front. Cell Dev. Biol.*, 01 June 2022. doi: 10.3389/fcell.2022.846092

Este artículo ha sido publicado en la revista *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (ISSN: 2296-634X), con un factor de impacto en el año 2020 de 6.684 ocupando la posición 6 de 41 en la categoría *Developmental Biology* en la edición *Science Citation Index Expanded* (SCIE) del JCR. Esta publicación pertenece al cuartil Q1.

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Granada

Estancia doctoral en un centro de investigación extranjero

- 1 de abril – 30 de septiembre de 2019. Estancia en *Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California*. En el laboratorio de la Dra. Kara Davis del *Department of Pediatrics*. Proyecto: “*Multiparametric analysis in single cell by mass cytometry for the study of pediatric acute megakaryoblastic leukemia using human pluripotent stem cells*”, bajo la supervisión de la Dra. Kara Davis. Subvenciones para la financiación de la investigación, desarrollo e innovación biomédica y en ciencias de la salud en Andalucía. Modalidad estancias formativas de investigación e innovación 2018. Expediente: EF-0256-2018

Idioma de la tesis doctoral

La tesis doctoral ha sido escrita en español y será defendida en español. Adicionalmente y siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, parte de la tesis doctoral ha sido escrita en inglés (Resumen, objetivos y conclusiones), como idioma vehicular de la ciencia, así como las conclusiones serán leídas en inglés durante la defensa.

Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral

(1). González-Pozas F., Montes R., López-Onieva L., Romero T., **Domingo-Reinés J.**, Real PJ., Ramos-Mejía V. & Ayllón V. **Generation of human pluripotent stem cell lines with suppressed expression of the Notch ligand DLL4 using short hairpin RNAs.** Stem Cell Res. 2016 May;16(3):735-9. doi: 10.1016/j.scr.2016.04.005.

(2) Ayllón V., Vogel-González M., González-Pozas F., **Domingo-Reinés J.**, Montes R., Morales-Cacho L. & Ramos-Mejía V. **New hPSC-based human models to study pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia harboring the fusion oncogene RBM15-MKL1.** Stem Cell Res. 2017 Mar;19:1-5. doi: 10.1016/j.scr.2016.12.019.

(3) González-Pozas F., Montes R., **Domingo-Reinés J.**, Ayllón V. & Ramos-Mejía V. **Establishment of 2 control and 2 hPSC cell lines constitutively expressing the Notch ligand DLL4.** Stem Cell Res. 2017 Dec;25:274-277. doi: 10.1016/j.scr.2017.07.008.

(4) **Domingo-Reinés J.**, López-Ornelas A., Montes R., Romero T., Rodríguez-Llamas JL., Lara-Rodarte R., González-Pozas F., Ayllón V., Menendez P., Velasco I. & Ramos-Mejía V. **Hoxa9 and EGFP reporter expression in human Embryonic Stem Cells (hESC) as useful tools for studying human development.** Stem Cell Res. 2017 Dec;25:286-290. doi: 10.1016/j.scr.2017.08.004.

Becas y financiación

El doctorando Joan Domingo Reinés agradece las fuentes de financiación que han hecho posible esta tesis doctoral:

- Las ayudas proporcionadas por la Fundación Inocente, Fundación AUPA y El Mundo de Namu han servido para financiar el contrato predoctoral.
- Subvenciones para la financiación de la investigación, desarrollo e innovación biomédica y en ciencias de la salud en Andalucía. Modalidad estancias formativas de investigación e innovación 2018.

Tabla de contenido

Compromiso de respeto de los derechos de autor	3
Criterios de calidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada	4
Criterios de calidad para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Granada.....	5
Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral.....	6
Becas y financiación	7
Abreviaciones y acrónimos	13
Resumen.....	18
Abstract.....	21
1. Introducción.....	24
1.1 Cáncer	24
1.1.1 Definición y características	24
1.1.2 El alcance mundial del cáncer	26
1.1.3 Origen y causas	26
1.1.4 Cáncer pediátrico	29
1.2 Leucemia	30
1.2.1 Leucemia mieloide aguda	33
1.2.2 Tratamientos y genética	35
1.2.3 Origen de la leucemia pediátrica	38
1.2.4 Modelos de leucemia mieloide aguda pediátrica	41
1.3 Células madre	44
1.3.1 Definición y características	44
1.3.2 Células pluripotentes como modelo del desarrollo y enfermedad... ..	46
1.3.3 Hematopoyesis embrionaria.....	47
1.4 NUP98-KDM5A	51
1.4.1 Estructura y función	51
1.5 NUP98	52
1.5.1 Complejo del poro nuclear y las nucleoporinas	52
1.5.2 Estructura y regulación de NUP98	54
1.5.3 Funciones de NUP98	56
1.5.4 NUP98 y cáncer	59
1.6 KDM5A	62
1.6.1 Familia de las lisina desmetilasas KDM5 y estructura.....	62

1.6.2 Funciones de KDM5A.....	64
1.6.3 KDM5A y cáncer.....	65
1.7 LMA CON EXPRESION DE NUP98-KDM5A	66
1.7.1 Modelos de NUP98-KDM5A.....	68
2. Hipótesis.....	73
3. Objetivos	76
3. Objectives.....	78
4. Materiales y métodos	81
4.1 Cultivos celulares.....	81
4.2 Construcciones plasmídicas y generación de líneas celulares	82
4.2.1. Generación de la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)	82
4.2.2 Generación de la translocación t(11;12)(p15;p13)(p15;p13) utilizando ribonucleopartículas	83
4.2.3. Expresión constitutiva del gen de fusión <i>NUP98-KDM5A</i>	84
4.2.4. Generación del sistema de expresión de NUP98-KDM5A inducible por doxiciclina.....	87
4.3 Técnicas genómicas	88
4.3.1 Extracción de ADN genómico.....	88
4.3.2 PCR.....	89
4.3.3 PCR digital (dPCR)	89
4.3.4 Extracción de ARN, síntesis de cADN y PCR en tiempo real.....	90
4.3.5 Cuantificación del número de insertos en ADN genómico	92
4.3.6 RNA-seq	92
4.4 Técnicas de detección de proteínas.....	94
4.4.1 Extracción de proteínas y western blot	94
4.4.2 Inmunofluorescencia	95
4.4.3 Citometría de flujo	97
4.4.4 Arresto mitótico y co-inmunoprecipitación	98
4.4.5 CyTOF.....	100
4.5 Caracterización celular.....	102
4.5.1 Ensayo de fosfatasa alcalina	102
4.5.2 Curva de crecimiento y ensayos de formación de colonias (CFU) ..	103
4.5.3 Cariotipos.....	103
4.6 Diferenciaciones celulares	104
4.6.1 Ensayo de diferenciación por cuerpos embrioides	104
4.6.2 Diferenciaciones dirigidas a las tres capas germinales	105
4.6.3 Diferenciaciones hematopoyéticas.....	105

4.7 Análisis estadísticos	105
5. Resultados	116
5.1 Objetivo 1. Generación de la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13)(p15;p13) usando el sistema CRISPR-Cas9 en células pluripotentes humanas.	116
5.1.1. Diseño, Síntesis y clonaje de los ARN guías	116
5.1.2. Determinación de la eficiencia de los sgRNA para generar la translocación t(11;12)(p15;p13) en células HEK-293 y seleccionar los más eficientes.....	118
5.1.3. Optimización de herramientas de biología molecular para la detección del gen de fusión NUP98-KDM5A	119
5.1.3.1 Detección por PCR.....	120
5.1.3.2 Detección por PCR digital (dPCR)	123
5.1.4 Generación de la translocación t(11;12)(p15;p13)(p15;p13) en células pluripotentes humanas.....	127
5.1.4.1. Transfección del plásmido pCAG1 en la línea celular H9	127
5.1.4.2. Nucleofección con ribonucleopartículas (RNP)	129
5.2 Objetivo 2. Desarrollo de un modelo de células pluripotentes humanas con expresión constitutiva del gen de fusión NUP98-KDM5A.....	133
5.2.1. Generación de líneas hPSC-NK5A	133
5.2.2. Caracterización de las líneas hPSC-NK5A.....	135
5.2.3. Generación de línea clonales hPSC-NK5A.....	140
5.2.4. Caracterización fenotípica de las líneas clonales hPSC-NK5A.....	145
5.2.5. Caracterización molecular de las líneas clonales iPSC4F8-NK5A	149
5.2.6. Las células que expresan NUP98-KDM5A muestran un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y daño en el ADN.....	155
5.2.7. La proteína de fusión NUP98-KDM5A provoca alteraciones en la mitosis y la aparición de cariotipos aberrantes	160
5.2.8. NUP98-KDM5A interacciona con RAE1 durante la mitosis	165
5.2.9. Otros efectos nucleares producidos por la proteína de fusión NUP98-KDM5A en hPSC	169
5.2.9.1 NUP98 en la envoltura nuclear	169
5.2.9.2. Efecto de la expresión de NK5A en la estructura y función del nucléolo.....	172
5.2.10. Análisis de la diferenciación de las hPSC con expresión de NUP98-KDM5A.....	176
5.2.10.1. Análisis de la diferenciación temprana a las tres capas germinales mediante citometría de masas (CyTOF)	176
5.2.10.3. Análisis de la diferenciación hematopoyética.....	184
5.3. Objetivo 3 Desarrollo de un modelo de expresión inducible de NUP98-KDM5A en células pluripotentes humanas utilizando el sistema CRISPR/Cas9	189

5.3.1. Generación de las líneas H9-iNK5A.....	189
5.3.2. Caracterización de las líneas H9 iNK5A.....	192
5.3.3. Validación del modelo de expresión inducible de NK5A durante la diferenciación estocástica de cuerpos embrionarios.	194
5.3.4. Inducción de la proteína de fusión NUP98-KDM5A durante la diferenciación hematopoyética	197
6. Discusión	204
7. Conclusiones	222
7. Conclusions	225
8. Referencias	228

Abreviaciones y acrónimos

3D	Tres dimensiones
7AAD	7-aminoacinaomicina D
AAVS1	Adeno-Associated Virus Integration Site 1; Sitio de integración 1 de los virus adeno-asociados
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
APC	Anaphase-promoting complex; Complejo promotor de la anafase
APLNR	Apelin Receptor; Receptor de apelina
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Bovine serum albumine; albumina de suero bovino
cADN	ADN complementario
Cas9	CRISPR associated protein 9; Proteína asociada a CRISPR 9
CD29	Integrin Subunit Beta 1; Subunidad de integrina Beta 1
CD31	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1; Molécula de adhesión de las células plaquetarias y endoteliales 1
CD34	Hematopoietic Progenitor Cell Antigen CD34; Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34
CD41	Integrin Subunit Alpha 2b; Subunidad de Integrina Alfa 2b
CD43	Sialophorin; Sialoforina
CD45	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C; Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C
CFU	Colony-forming unit; Unidad formadora de colonia
ChIP-seq	Secuenciación de inmunoprecipitados de cromatina
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas
crRNA	CRISPR RNA

CyTOF	Cytometry by timeof-flight; citometría por tiempo de vuelo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFDA	Dichlorofluorescin Diacetate; Diclorofluoresceína diacetato
DTT	Dithiothreitol; Ditiotreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EB	Embryo bodies; Cuerpos embrioides
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; Ácido etilendiaminotetracético
EF1 α	Elongator factor 1-alpha; Factor de elongación 1 alfa
FACS	Fluorescence-activated cell sorting; Clasificación de células activadas por fluorescencia
FAM	Carboxifluoresceína
FBS	Fetal bovine serum; suero bovino fetal
FC	Fold change; Número de veces de cambio
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2; Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; Ligando de la tirosina quinasa 3 tipo FMS
FWER	familywise error rate; Error producido por familia
G-SCF	Granulocyte colony-stimulating factor; Factor estimulante de colonias de granulocitos
GFP	Green fluorescence protein; Proteína verde fluorescente
H9	WA09
HCl	Ácido clorhídrico
hESC	Human embryonic stem cell; Célula madre embrionaria humana
hPSC	Human pluripotent stem cell; Célula madre pluripotente humana
HSC	Hematopoietic stem cell; célula madre hematopoiética
iCMN.1	PBMC1-iPS4F1
IdU	5-Iodo-2'-deoxiuridina

IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IP	Inmunoprecipitación
iPS4F8	PBMC2-iPS4F8
iPSC	Induced pluripotent stem cell; Célula madre pluripotente inducida
KCl	Cloruro de potasio
KDM5A	Lysine Demethylase 5A; Desmetilasa de lisinas 5A
KDR	Kinase Insert Domain Receptor; Receptor de dominio de inserción de quinasa
LB	Lysogeny broth; Caldo de lisogenia
LMA	Leucemia mieloide/mieloblástica aguda
mARN	ARN mensajero
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NaN ₃	Azida sódica
NHEJ	Non-homologous end joining; Unión de extremos no homólogos
NK5A	NUP98-KDM5A
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol; Nonilfenoxipolietoxietanol
NPC	Nuclear pore complex; complejo del poro nuclear
NUP98	Nucleoporin 98; Nucleoporina 98
Nups	Nucleoporinas
PBS	Phosphate-buffered saline; Solución salina tamponada con fosfato
PDGFR α	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha; Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PE	Phycoerythrin; Ficoeritrina
PFA	Para-formaldehído

PHD	Plant homeodomain; Hoemodominio de planta
PIC	Protease inhibitor cocktail; Cóctel de inhibidores de proteasas
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride; fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RAE1	Ribonucleic Acid Export 1; Exportador de ácido ribonucleico 1
RNA-seq	Secuenciación de ARN
RNP	Ribonucleopartícula
ROS	Reactive oxygen species; Especies reactivas de oxígeno
rRNA	ARN ribosómico
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
SCF	Stem Cell Factor; Factor de células madre
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida
sgRNA	Small guide RNA; ARN guía pequeño
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen 4; Antígeno embrionario específico de la etapa 4
tARN	ARN de transferencia
TGF β	Transforming growth factor beta; Factor de crecimiento transformador beta
tracrRNA	trans-activating crisper RNA; ARN crisper transactivador
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane; tris(hidroximetil)aminometano
VE-Cad	Cadherin 5; Cadherina 5
VIC	Victoria
WB	Western blot
WSC	Wdr82-Set1A/COMPASS
WT	Wild type; silvestre

Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) pediátrica es un desorden hematológico caracterizado por la proliferación descontrolada de células progenitoras mieloides en médula ósea. Está causada por alteraciones genómicas, muy frecuentemente translocaciones cromosómicas, que se producen durante el desarrollo fetal. Los tratamientos actuales no son efectivos en todos los pacientes y suelen ocasionar efectos secundarios a largo plazo, por lo que es de suma importancia conseguir nuevos tratamientos más específicos y eficaces.

Falta mucho conocimiento sobre los mecanismos y el desarrollo de la LMA pediátrica debido en parte a baja disponibilidad de muestras de paciente y la limitada fidelidad de los modelos de la enfermedad. Una de las mayores incógnitas es la célula en la que se origina la mutación durante el desarrollo fetal.

Por estos motivos, en esta tesis hemos planteado el uso de células pluripotentes humanas (hPSC) como base para la generación de un modelo de estudio de la LMA pediátrica. Las hPSC son células capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular y pueden servir para el estudio de la hematopoyesis embrionaria.

La translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13) que produce el gen de fusión *NUP98-KDM5A* (NK5A) se encuentra exclusivamente en pacientes pediátricos con LMA.

En esta tesis, se han desarrollado varios modelos de expresión de NK5A en hPSC. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9 generamos hPSC con la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13), sin embargo, en el cultivo hubo una selección negativa de las células editadas y no fue posible su expansión y caracterización. A través de la expresión constitutiva de NK5A con vectores lentivirales se generaron líneas clonales de hPSC con distintos niveles de expresión de NK5A, que permitió el estudio del fenotipo de acumulación de aberraciones cromosómicas por errores en el proceso de mitosis. Sugerimos que estas mitosis aberrantes se producen por la interferencia de NK5A con las funciones del NUP98 endógeno, al interactuar NK5A con la proteína RAE1, además de un aumento del daño en el ADN durante la mitosis. En este además observamos un bloqueo de la diferenciación en el mesodermo en las hPSC que expresan NK5A, sin llegar a producir células hematopoyéticas.

Por último, se generó un modelo de expresión inducible por doxiciclina de NK5A en hPSC. Éste último modelo permitió expresar NK5A en distintos momentos de la diferenciación hematopoyética mostrando que dependiendo de la población en la que se expresa la proteína de fusión se produce un bloqueo en la diferenciación en distintas poblaciones, quedando clara su utilidad para identificar la

célula de origen y los mecanismos de transformación de la LMA pediátrica causada por la expresión de NK5A.

Abstract

Pediatric acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic disorder characterized by uncontrolled proliferation of myeloid progenitor cells in bone marrow. It is caused by genomic alterations, most frequently chromosomal translocations, which occur during fetal development. Current treatments are not effective in all patients and often cause long-term side effects, so it is of utmost importance to develop new, more specific, and effective treatments.

Much knowledge about the mechanisms and development of pediatric AML is lacking due in part to low availability of patient samples and limited fidelity of disease models. One of the major unknowns is the cell in which the mutation originates during fetal development.

For these reasons, in this thesis we have proposed the use of human pluripotent stem cells (hPSC) as the basis for the generation of a model for the study of pediatric AML. hPSC are cells capable of differentiating into any cell type and can be used to study embryonic hematopoiesis.

The chromosomal translocation $t(11;12)(p15;p13)$ producing the NUP98-KDM5A (NK5A) fusion gene is found exclusively in pediatric AML patients.

In this thesis, several models with NK5A expression in hPSC have been developed. Using the CRISPR/Cas9 system we generated hPSC with the chromosomal translocation t(11;12)(p15;p13), however in culture there was a negative selection of the edited cells and expansion, and characterization was not possible. Through constitutive expression of NK5A with lentiviral vectors, clonal hPSC lines with different levels of NK5A expression were generated, which allowed the study of the phenotype of chromosomal aberration accumulation due to errors in the mitosis process. We suggest that these aberrant mitoses are caused by NK5A interference with endogenous NUP98 functions, by NK5A interacting with the RAE1 protein, in addition to increased DNA damage during mitosis. In this model we further observed a block of mesodermal differentiation in hPSC expressing NK5A, without producing hematopoietic cells.

Finally, a model of doxycycline-inducible expression of NK5A in hPSC was generated. This last model allowed the expression of NK5A at different time points of hematopoietic differentiation. Depending on the population in which the fusion protein is expressed, a blockage in different populations. This model could be useful to identify the cell of origin and the mechanisms of transformation of pediatric AML caused by the expression of NK5A.

1. Introducción

1.1 Cáncer

1.1.1 Definición y características

Cáncer es una palabra dada a un extenso número de enfermedades relacionadas por una proliferación descontrolada de células que son capaces de invadir otros tejidos del organismo.¹ La inestabilidad genómica es un factor común en todos los cánceres que promueve la adquisición de cambios en el genoma. Algunos de estos cambios provocan una ventaja en el crecimiento del tumor y suelen estar asociados a un aumento de la proliferación, a evadir inhibidores del crecimiento, a resistir la muerte celular, permitir la replicación infinita, inducir la angiogénesis y activar la invasión y metástasis.² Todas estas modificaciones en el comportamiento y las capacidades de las células confieren al cáncer su facultad para crecer descontroladamente causando problemas en el funcionamiento del organismo y en una última instancia, causar su muerte.

El cáncer evoluciona de forma reiterativa por expansión clonal, diversificación genética y selección clonal dentro de un tejido u organismo generando heterogeneidad dentro del tumor. Es por este sistema de selección natural donde van apareciendo clones con alteraciones genéticas adquiridas al azar que compiten por los recursos. Esta competencia hace que se vayan seleccionando clones más adaptados y se favorezca a los clones que hayan adquirido

mutaciones que promueven ventajas en la supervivencia y expansión. Los tratamientos también someten al cáncer a una presión donde el número de clones se reduce drásticamente pero da la oportunidad a clones resistentes al tratamiento a surgir y convertirse en la población dominante del tumor (Fig. 1).³

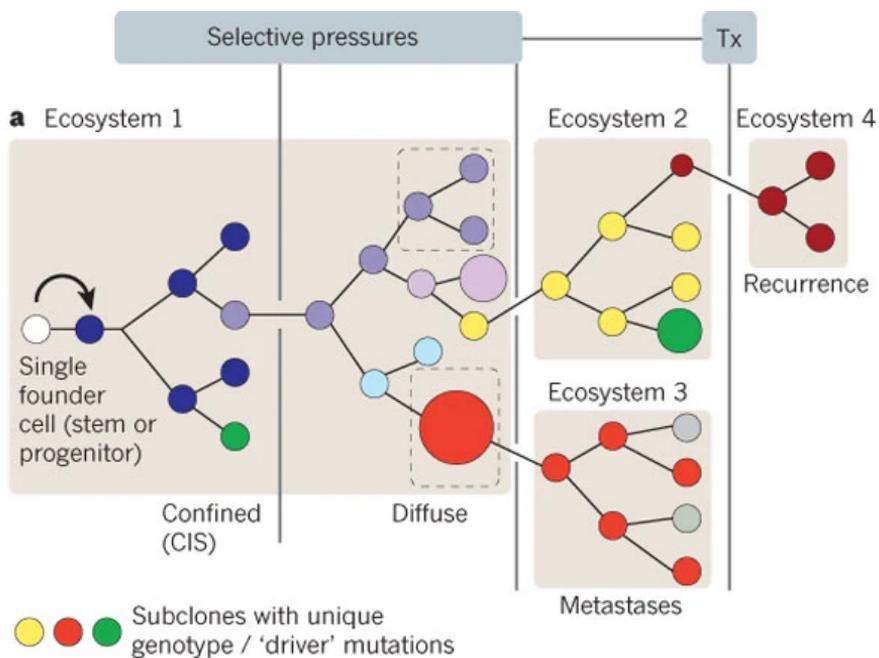


Figura 1. Evolución del cáncer donde la presión selectiva y nuevas mutaciones generan distintos clones que prosperan o se extinguen. Imagen extraída de Greaves, et al. 2012. Tx: Tratamiento.

1.1.2 El alcance mundial del cáncer

Existen evidencias que el cáncer ha afectado a los humanos desde la antigüedad,⁴ pero su incidencia se ha visto oscurecida por las muertes tempranas que causaban las infecciones en los siglos anteriores. Además, hasta hace relativamente poco, su alcance solo se conocía en países desarrollados y actualmente por fin se puede hacer una estimación del efecto que tiene el cáncer a nivel global.⁵

Es la segunda causa de muerte más común a nivel mundial con una estimación de 9.6 millones de muertes en 2018 y una previsión de 27 millones de nuevos casos anuales para 2040. El nivel de desarrollo del país afecta a la incidencia y al tipo de cánceres detectados. Mientras que en países más desarrollados se reduce la incidencia de cánceres relacionados con infecciones y las muertes por cáncer están decayendo, en los países en vías de desarrollo no muestran tal progreso.⁵ El incremento de número de casos de cáncer crecerá en todos los países, llegando a aumentar los costes sanitarios en 2030 un 34% respecto a 2015 en los EEUU. sólo por incremento de la población.⁶

1.1.3 Origen y causas

La adquisición de mutaciones en el genoma de células de todo el organismo se incrementa con el tiempo y su sucesiva acumulación promueve la aparición de células con la capacidad de dar inicio a un tumor.⁷ Por este motivo la edad es uno de los principales factores

de riesgos del cáncer.⁸ Además, la exposición a tóxicos como el tabaco o vivir en ambientes con altos niveles de contaminación, una dieta poco sana, la falta de ejercicio físico y las infecciones crónicas también pueden promover su aparición.⁵

La aparición de la enfermedad va asociada a la aparición de mutaciones normalmente adquiridas por errores en los procesos de reparación y a la exposición a agentes genotóxicos. Las alteraciones se acumulan en algunas células hasta que la combinación de varias o la adquisición de una mutación en un gen crucial desencadena el proceso de carcinogénesis.

La carcinogénesis se divide en tres etapas. La iniciación se basa en la adquisición de alteraciones genéticas irreversibles, como las mutaciones puntuales o las deleciones. Este proceso continúa con la promoción, donde se altera el funcionamiento del genoma a raíz de las alteraciones iniciales. Por último, la progresión, donde la inestabilidad genómica y el crecimiento descontrolado son las características principales.⁹

Las mutaciones que favorecen la aparición del tumor se conocen como mutaciones conductoras y pueden ser de dos tipos:¹⁰

1. Protooncogén: Son genes con funciones generalmente relacionadas con la proliferación celular y su activación descontrolada o aumento en el número de copias puede provocar el inicio del proceso de carcinogénesis.

Introducción

2. Supresor tumoral: Las funciones de estos genes suelen ser el control del ciclo celular, evitar una proliferación excesiva y promover una localización específica. La mutación en ambos alelos puede provocar la pérdida de función e inducir tumorigénesis.

Las mutaciones que afectan a proto-oncogenes y pueden dar lugar a oncoproteínas que generalmente promueven el crecimiento o la invasividad. Una mutación en un alelo del gen suele ser suficiente para su aparición y funcionamiento y por sí mismas pueden desencadenar el proceso de carcinogénesis. Las que afectan a supresores tumorales, donde generalmente son necesarias mutaciones en ambos alelos, y se produce una pérdida de función y promueve una alteración del ciclo celular, un crecimiento descontrolado o una localización celular inadecuada.¹¹ Además, existen multitud de mutaciones adicionales que pueden promover el desarrollo del tumor como las proteínas de fusión, donde se generan nuevas secuencias con funciones alteradas.¹² Mutaciones que interfieran en el buen funcionamiento en genes de reparación del ADN también pueden provocar una mayor aparición de mutaciones en proto-oncogenes o supresores tumorales.¹³

Durante el proceso de carcinogénesis se genera una selección clonal dentro del propio tumor donde las ventajas proliferativas o de resistencia a tratamientos favorecen a unos clones frente a otros.³

1.1.4 Cáncer pediátrico

Así como en adultos el cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia, en la población pediátrica se considera una enfermedad rara, sólo el 1% de los cánceres diagnosticados anualmente son en pacientes pediátricos.¹⁴ Hasta donde se sabe, los orígenes y causas del cáncer pediátrico son diferentes de las de adulto. Ya que no es la acumulación de mutaciones en el tiempo la principal causa, hace que el cáncer en este grupo de edad se considere una entidad diferente.¹⁵ La falta de conocimiento sobre la etiología de la enfermedad y de cómo esta se desarrolla causa que las terapias que se utilizan actualmente no son del todo precisas y así como en adultos, los riesgos a largo plazo no son considerados una limitación en ciertos tratamientos, en pacientes pediátricos sí generan muchos problemas.^{15,16}

Entre los tipos de cáncer más frecuentes en niños, tenemos las leucemias, seguidos de los tumores del sistema nervioso y los linfomas¹⁷ (Fig. 2).

Introducción

Número de nuevos casos estimados en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, edad 0-14

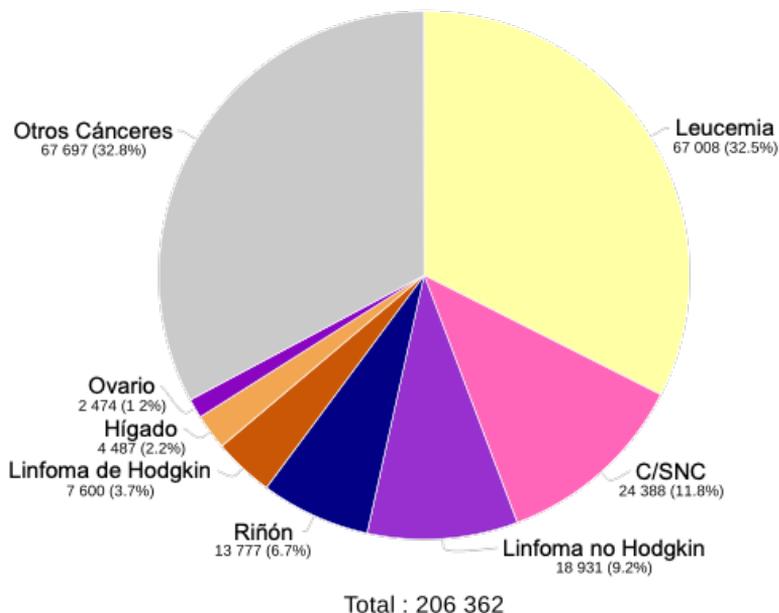


Figura 2. Incidencia de los casos de cáncer en 2020 en la población menor a 14 años proporcionado por la base de datos GLOBOCAN. Imagen modificada. C/SNC: Cerebro/sistema nervioso central.

1.2 Leucemia

La leucemia es un grupo heterogéneo de desórdenes sanguíneos caracterizados por una proliferación y diferenciación anormal de las células del sistema hematopoyético. Estas generalmente se clasifican en función del grado de diferenciación de las células afectadas pudiendo ser aguda, células en etapas tempranas de diferenciación con un crecimiento rápido, o crónica, con células más diferenciadas y funcionales con una evolución más lenta de la

enfermedad. Al mismo tiempo se clasifican en función del linaje hematopoyético afectado siendo mieloblásticas si afectan al linaje mieloide o linfoblásticas si afectan al linaje linfoide.^{18,19}

Las leucemias no se consideraron una entidad propia hasta los años 50 del siglo XIX, anteriormente solo se consideraban como una acumulación de pus e inflamación, y gracias al uso del microscopio de John Bennett se identificaron células sanguíneas como causantes de la enfermedad.²⁰ Desde entonces se ha modificado en repetidas ocasiones la forma de clasificar y describir la leucemia consiguiendo distinguir los diferentes cánceres sanguíneos en leucemias, linfomas y mielomas, dependiendo del tipo celular que afectan o su localización. En el caso de la leucemia, se ven afectadas células sanguíneas en médula ósea o sangre, en los linfomas, células linfoides en los ganglios linfáticos y en los mielomas, las células plasmáticas productoras de anticuerpos.⁵ Por este motivo la Organización Mundial de la Salud (OMS) implementó en 2001 una clasificación para neoplasias sanguíneas basado en datos genéticos junto a información inmunológica, morfológica y parámetros clínicos.²¹ Por desgracia, la falta de equipamiento especializado y la falta de formación en algunos casos dificulta la implementación de estas nuevas clasificaciones, mucho más precisas.⁵

La leucemia es el 15avo tipo de cáncer más común del mundo con 437000 casos diagnosticados en 2018, siendo un 2.4% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados anualmente, aunque en muchos

Introducción

países de bajo desarrollo su diagnóstico es difícil y se confunden mucho sus síntomas con enfermedades infecciosas o malnutrición. Las leucemias son el 40% de todos los cánceres hematológicos siendo la leucemia linfocítica crónica de célula B la más frecuente, seguida de neoplasias mieloproliferativa y la LMA.⁵

Las principales causas de la leucemia como todos los tipos de enfermedades tienen condicionantes genéticos y ambientales, aunque en cada sub-tipo de leucemia tienen pesos diferentes en su etiología. El factor de riesgo más reconocido es la edad, siendo más probable padecer la enfermedad a medida que envejece el individuo. Existe un incremento del riesgo en individuos menores a 15 años siendo igual de probable que en individuos entre los 40 a 49 años. También existe una correlación con el sexo masculino, siendo mayor en todo el espectro de edades, habiendo una ratio de sexos del 1.58 a favor de los hombres. Aparte se conocen otros factores de riesgo como la exposición a radiación ionizante o algunas infecciones víricas que tienen una asociación clara como el virus HTLV-1 que puede provocar leucemia de célula T adulta. También se conocen ciertos desordenes congénitos asociados con el desarrollo de leucemia, normalmente en pacientes pediátricos, como el síndrome de Down con la LMA y la anemia de Fanconi con síndromes mielodisplásicos.⁵

Los síntomas de la leucemia suelen ser los típicos de otros tipos de citopenias como, la anemia, la fatiga, fiebre, sangrados y

hepatoesplenomegalia entre otros. La presencia de fiebre puede ser una consecuencia de la enfermedad ya que estos pacientes son susceptibles a padecer más infecciones por lo que inicialmente se suele tratar con antibióticos.

El diagnóstico de la leucemia se inicia con la identificación de blastos leucémicos en sangre periférica o médula ósea. Se empieza por una caracterización morfológica basada en el fenotipo del linaje seguido de una citoquímica para confirmar esa primera aproximación morfológica. Se suele continuar con un inmunofenotipo para acabar de clasificar la leucemia en el subtipo al que pertenece. Por último se realiza una caracterización genética con cariotipo, FISH y secuenciación para intentar determinar las mutaciones y alteraciones genéticas que alberga el paciente y estratificarlo correctamente.²²

1.2.1 Leucemia mieloide aguda

La LMA es un tipo de neoplasia hematológica que afecta a las células del linaje mieloide y sufre una evolución rápida, caracterizada por la proliferación de células poco diferenciadas. En adultos, la LMA representa aproximadamente el 80% de los casos de leucemias agudas²³, mientras que representa el 13% de los casos de leucemias agudas en niños menores de 10 años y aumenta a un 39% en el caso de leucemias agudas entre las edades de 15 a 19 años.²⁴

Introducción

Para poder realizar un buen diagnóstico se siguen una serie de pautas para poder identificar el subtipo de LMA que padece el paciente.

Se inicia el diagnóstico con una clasificación morfológica, la más usada, se basa en el sistema Franco-americano-británico (FAB). Esta reconoce 8 subtipos que van desde la M0 a la M7 solo basándose en morfología e histología y yendo de la más indiferenciada a la más diferenciada (Tabla 1).²⁵

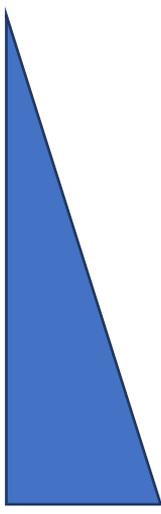
Subtipo FAB	Nombre	Grado de diferenciación
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada	
M1	Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima	
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración	
M3	Leucemia promielocítica aguda	
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	
M4eos	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia	
M5	Leucemia monocítica aguda	
M6	Leucemia eritroide aguda	
M7	Leucemia megacarioblástica aguda	

Tabla 1. Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas

El inmunofenotipo es un método rápido para determinar el linaje de los blastos leucémicos con más especificidad. De acuerdo a la OMS,

como mínimo hay que utilizar los marcadores CD34, CD117, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, iMPO, i-lisozima, CD41, CD61 para la LMA y CD19, iCD79a, iCD22, iCD3 para la leucemia aguda de linaje mixto.²²

Una vez identificado el linaje de la leucemia hay que proceder con los estudios a nivel genético. La citogenética convencional permite detectar anomalías estructurales y numéricas en los cariotipos de los pacientes en el 70-80% de los casos de LMA. Algunas translocaciones cripticas no se pueden detectar con citogenética convencional y es necesario el uso del FISH o PCR para su identificación.²² En la última revisión de la clasificación de la OMS de 2016 se muestran muchas (aunque no todas) las aberraciones cromosómicas asociadas a la LMA, ayudando a la clasificación de la enfermedad y a la estratificación del riesgo.²⁶

Por último, si es necesario se hace un diagnóstico molecular buscando los genes de fusión o mutaciones concretas presentes en el paciente. Se intenta buscar mutaciones que sean tratables con fármacos específicos como en *FLT3-IDT*, *WT1*, *C-KIT*, *CEBPA*, *NPM1* y anomalías en *MLL*.²²

1.2.2 Tratamientos y genética

Las terapias basadas en quimioterapia intensiva desarrolladas hace casi 50 años siguen siendo las utilizadas tanto en adultos como en

Introducción

pacientes pediátricos.²⁷ La terapia de inducción de primera línea se basa en una combinación 7+3 de quimioterapia mielosupresora con 7 días con infusión de citarabina y 3 días de administración de una antraciclina como la daunorubicina.^{23,28} Estos tratamientos pueden seguir con un trasplante de médula ósea en pacientes estratificados con riesgo moderado o alto. En las últimas décadas se ha mejorado la administración y dosis de la quimioterapia y en la estratificación de los pacientes y a pesar de ello la supervivencia global en pacientes pediátricos se mantiene alrededor de un 70%²⁹ mientras que en pacientes mayores de 65 años la mortalidad asciende al 70% después de un año del diagnóstico.²³

En cuanto al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC; por sus siglas en inglés) hay que decir que su eficacia está ligada a la aceptación de las células del donante por parte del receptor por lo que su uso está reducido a pacientes de alto riesgo y se administra después de los ciclos de quimioterapia.²⁹

Los tratamientos específicos son necesarios para mejorar la supervivencia, calidad de vida y disminuir los efectos secundarios de los pacientes y aunque existen algunos de ellos todavía no se aplican con facilidad en la clínica. Las terapias innovadoras más recientes se basan en añadir un tercer agente a las ya usadas citarabina y antraciclinas. Se han desarrollado algunos tratamientos específicos como un anticuerpo dirigido contra el marcador de superficie CD33, el Gentuzumab, antígeno de células del linaje mielóide encontrado

en el 80% de pacientes con AML, conjugado al fármaco Ozogamicina, que muestra un aumento de supervivencia libre de eventos respecto a la quimioterapia.³⁰ También el Midostaurin o el Sorafenib que son inhibidores de la quinasa FLT3 y han mostrado eficacia junto a la quimioterapia en ensayos clínicos en pacientes con la mutación *FLT3-ITD*.^{31,32}

Las causas de la enfermedad a nivel molecular son bastante diferentes entre adultos y niños. Para empezar el número de mutaciones somáticas que se detecta en pacientes pediátricos es menor a 1 por megabase, mientras que en adultos es mayor, llegando incluso a más de 10 mutaciones por mega base.³³

Alteraciones en los genes *RAS*, *KIT* y *FLT3* son más comunes en infantes mientras que mutaciones en genes como *DNMT3A*, *IDH1/2*, *NPM1* o *TP53* son más frecuentes en adultos. Alteraciones en el número de copias son más comunes en pacientes jóvenes mientras que alteraciones en secuencias cortas son más frecuentes en pacientes adultos.^{33,32}

Las alteraciones estructurales genómicas son de baja frecuencia en adultos, sin embargo, son una de las principales causas de la enfermedad en pacientes pediátricos con la presencia de translocaciones cromosómicas recurrentes, en algunos casos pudiendo ser cripticas. Se ha visto una gran asociación entre ciertos genes de fusión y la edad de los pacientes. Mientras que fusiones

Introducción

que afectan a genes como *KMT2A*, *CBF2T3-GLIS2*, *RBM15-MKL1* o *MNX1* entre otras aparecen en pacientes menores a 3 años, las fusiones a partir de *RUNX1*, *CBFB*, *RARA* o *NUP98* entre otras pueden afectar a niños entre los 3-14 años.³²

1.2.3 Origen de la leucemia pediátrica

Tanto la leucemia pediátrica como la de adulto presentan fenotipos comunes, lo que hacía pensar en el pasado que eran las mismas enfermedades. En la actualidad se sabe que representan enfermedades genéticas diferentes. La leucemia en adultos, como tantos otros tipos de tumores, se origina a partir de la acumulación de mutaciones somáticas durante la vida del paciente. Estas mutaciones aumentan la posibilidad de aparición del tumor a medida que envejece el individuo.³⁵ En cambio, en los individuos pediátricos, no existe una ventana de tiempo lo suficientemente amplia como para permitir la acumulación de ese mismo número de mutaciones y se conoce que la principal causa de la enfermedad son translocaciones cromosómicas originadas durante el desarrollo embrionario.³³

Debido a la temprana edad de la mayoría de los pacientes pediátricos es muy posible que las alteraciones que dan lugar a la enfermedad se produzcan antes del nacimiento. Estos pacientes pueden ser diagnosticados de leucemia al nacer, durante los años posteriores o incluso pueden morir antes del parto.³⁶

Las evidencias que las mutaciones causantes de la leucemia ocurren *in utero* han ido en aumento. La primera evidencia fue un estudio de leucemias concordantes en gemelos. Las tres parejas de gemelos estudiadas compartían la translocación en el gen *MLL* y las secuencias eran idénticas entre los hermanos. Se originó la hipótesis de que se genera un clon pre-leucémico en un gemelo y este “metastatiza” al otro gemelo por anastomosis vascular en placentas monocoriónicas.³⁷ Posteriormente se observó como la fusión con el gen *MLL* podía ocurrir en una célula progenitora en un gemelo y trasladarse al otro incluso en gemelos con dos placentas o dicoriónicos.³⁸ La siguiente evidencia se observó cuando se compararon las alteraciones cromosómicas encontradas en pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia con la sangre que impregnaba las tarjetas de Guthrie para testar enfermedades metabólicas. Se encontraron los mismos genes de fusión por PCR, tanto en el paciente en el momento del diagnóstico como en la sangre obtenida del mismo individuo el día de su nacimiento, indicando que la translocación ocurrió *in utero*.³⁹

Mediante un cribado de sangre de cordón umbilical para la detección de la fusión *TEL-AML1* de 567 individuos, se determinó que el 1% de los recién nacidos tiene la fusión *TEL-AML1* en células del linaje de células B, siendo este dato 100 veces mayor que la incidencia de padecer leucemia linfoblástica aguda por esta fusión. Este resultado indica que los recién nacidos que tienen alteraciones cromosómicas son más frecuentes que lo que muestra la incidencia

Introducción

de la enfermedad y por lo tanto es necesario en muchos casos otros eventos que desencadenen la enfermedad.⁴⁰

La causa más frecuente de translocaciones cromosómicas es la rotura de doble cadena del ADN seguida de una reparación errónea por unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés).⁴¹ Estas translocaciones cromosómicas, aunque muy frecuentes en neoplasias hematológicas, son insuficientes en muchos casos para dar lugar a la transformación de la célula leucémica y requieren de sucesivas mutaciones en otros genes después del nacimiento (Fig. 3).³⁶ En algunos casos, pacientes con translocaciones cromosómicas que dan lugar a genes de fusión como *CBF2T3-GLIS2*, fusiones con *KMT2A* o *NUP98-KDM5A* (gen de fusión en el que se centra este trabajo), presentan menos mutaciones en genes somáticos que otros individuos con otros genes de fusión.³³

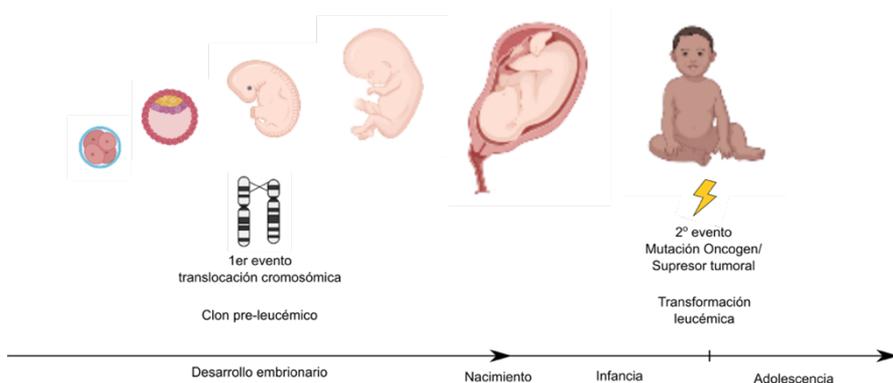


Figura 3. Esquema de la hipótesis establecida en el campo del origen *in utero* de la leucemia y su evolución.

Actualmente los retos más importantes para mejorar nuestro entendimiento sobre la leucemia pediátrica y encontrar tratamientos más efectivos son la identificación de las células de origen de la leucemia durante el desarrollo embrionario⁴²

1.2.4 Modelos de leucemia mieloide aguda pediátrica

Las primeras herramientas experimentales que se han usado para el estudio de la leucemia son las líneas celulares derivadas de muestras primarias de pacientes. Las células primarias tienen un crecimiento limitado y rápidamente se diferencian en cultivo, por lo que la generación de líneas celulares es largo y laborioso.⁴³ Una vez generadas son un modelo barato y simple para estudiar los defectos en la diferenciación o aberraciones en el crecimiento específicas de la leucemia, además de ser una plataforma para el cribado de moléculas o de mutaciones. Sin embargo, estas líneas celulares adquieren características distintas a las células del paciente debido a los cultivos prolongados durante los cuales es frecuente que adquieran gran número de modificaciones genéticas, por lo que se pueden seleccionar clones que muchas veces no son representativos de la enfermedad que se pretende estudiar.⁴⁴

También se ha utilizado una gran variedad de modelos animales, como por ejemplo la mosca, el pez cebra⁴⁵ y el ratón. Los más usados son los modelos murinos, que han sido muy útiles para definir las

Introducción

mutaciones necesarias para el desarrollo de una leucemia, así como una plataforma para testar posibles opciones terapéuticas. Estos modelos se realizan mediante generación de animales transgénicos que integran mediante recombinación homóloga mutaciones que portan los pacientes. Por ejemplo, a través de recombinación homóloga se generó el gen de fusión *MLL-AF9*, encontrado frecuentemente en leucemias pediátricas, y la formación de quimeras con esta mutación generó leucemias que se asemejaban a las que aparecen en humano.⁴⁶ Otra estrategia es modificar genéticamente progenitores hematopoyéticos, como se ha realizado con el oncogén *NUP98-KDM5A*, donde se introdujo mediante transducción retroviral el oncogén de interés en células hematopoyéticas que posteriormente se introducen en la médula ósea del receptor. Estos progenitores mostraron un crecimiento mayor produciendo una leucemia en el ratón.⁴⁷

A pesar de las ventajas de los modelos murinos, no se recapitulan todas las características de la enfermedad en humanos, debido a diferencias en el genoma, desarrollo, funciones celulares, la esperanza de vida y la capacidad de transformación de las células de ratón con respecto a las células humanas. Por ejemplo el modelo con el oncogén *ETV6-RUNX1* no produjo leucemia en ratón⁴⁸ o el modelo de ratón con el oncogén *MLL-AF4* produjo leucemia pero con un periodo de latencia mucho más largo a lo que se observa en humanos.⁴⁹ Estas observaciones sugieren que la célula de origen

puede ser de gran importancia a la hora de desarrollar los modelos de enfermedad.⁴⁴

También se han realizado modelos humanos de leucemia partiendo de muestras primarias de pacientes e introduciéndolas en ratones inmunodeprimidos para expandir este material. Las principales desventajas para estos modelos son que no se consigue reproducir el nicho de la médula ósea de humano en el ratón y el ambiente inmunitario, juntamente con la selección clonal que se produce al cambiar drásticamente a las células leucémicas de ambiente.^{44,50} Esta técnica podría ser especialmente útil para las leucemias pediátricas, sin embargo éstas son particularmente difíciles de trasplantar, por lo que actualmente se buscan condiciones que “humanicen” la médula ósea de los ratones de experimentación.⁵¹

A pesar de todos estos avances y modelos generados, todavía falta mucho conocimiento sobre el proceso de transformación en la leucemia pediátrica, las alteraciones genómicas necesarias y el tipo celular en que se originan. Es necesario seguir desarrollando modelos de enfermedad más precisos y fiables a lo que ocurre en el paciente para generar nuevas terapias específicas para cada una de las alteraciones que podemos encontrar en la leucemia. Recientemente se han generado modelos de la enfermedad usando células madre pluripotentes humanas (hPSC, del inglés human Pluripotent Stem Cells) que como describiremos a continuación representan una alternativa muy prometedora por su capacidad de imitar el proceso de desarrollo embrionario en el laboratorio.^{34,44}

1.3 Células madre

1.3.1 Definición y características

Las células madre se definen por dos características fundamentales: auto renovación y capacidad de diferenciación. Además se clasifican en función del origen, ya que pueden proceder de tejido embrionario o tejido adulto, y de la capacidad de diferenciarse en un mayor o menor número de tipos celulares.⁵²

La capacidad de auto renovación permite a estas células dividirse de forma ilimitada manteniendo las mismas características que la célula de origen, proporcionando una fuente de células constante. La capacidad de diferenciación hace referencia al hecho que la célula madre es capaz de especializarse en sus funciones dando lugar a distintos tipos celulares que puede necesitar el organismo en momentos concretos. Estas células a medida que se diferencian pierden la capacidad de proliferación.

Dependiendo del origen de estas células se pueden clasificar en embrionarias o adultas dependiendo de si son poblaciones sólo presentes durante el desarrollo embrionario o si están en el organismo adulto. Las que proceden del cigoto son totipotentes, tienen la capacidad de dar lugar a células de todos los tejidos del organismo, incluso a los tejidos extraembrionarios. Las células de la masa celular interna del blastocisto son pluripotentes, son capaces de dar lugar a tipos celulares de las tres capas germinales, pero sin

dar lugar a ningún tejido extraembrionario. Las células multipotentes son aquellas que pueden dar lugar a distintos tipos celulares, pero dentro de un linaje, como las HSCs que pueden generar cualquier tipo celular sanguíneo. Por último, tenemos las células unipotentes que solo pueden diferenciarse en un único tipo de célula como las células madre espermatogoniales, que sólo dan lugar a los espermatozoides.⁵²

Las células pluripotentes permiten un cultivo indefinido *in vitro* y tienen la capacidad de generar células de las tres capas germinales. Las células pluripotentes se pueden obtener de dos maneras:

- (i) Mediante el cultivo de células de la masa celular interna de un blastocito, separándolo del trofoblasto. Por éste método se derivaron células pluripotentes embrionarias de ratón en 1981⁵³ y en 1998 células pluripotentes embrionarias humanas.⁵⁴
- (ii) También se pueden desdiferenciar células somáticas adultas con la inducción de 4 factores de transcripción; POU5F1, SOX2, c-MYC y KLF4. La expresión de estos genes permite obtener a una célula adulta las características antes mencionadas para las células madre pluripotentes, dando lugar a células pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). Estos hitos se consiguieron en 2006 para células de ratón⁵⁵ y 2007 para células humanas.⁵⁶

Introducción

La comunidad científica ha establecido criterios específicos para determinar si una línea celular humana se puede considerar pluripotente. Los criterios morfológicos son que las células crecen en colonias compactas de células pequeñas con el núcleo prominente y varios nucleolos visibles. Los criterios moleculares se centran en la expresión de los marcadores de superficie SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81, la expresión de los factores de transcripción *POU5F1*, *SOX2* y *NANOG* y una elevada actividad de la telomerasa. También tienen que ser capaces de diferenciarse a las tres capas germinales a través de diferenciaciones estocásticas o dirigidas.^{52,54,56,57}

1.3.2 Células pluripotentes como modelo del desarrollo y enfermedad

Los modelos animales han sido muy útiles para conocer los principios del desarrollo, así como estudiar la especificación celular y la morfogénesis de tejidos. Además, muchos de los genes implicados y procesos se ven conservados entre especies incluido el humano. A pesar de estas ventajas, existen diferencias en el periodo de gestación, morfología y regulación génica tanto temporal como espacial. Por eso, incluso los modelos de ratón no acaban de replicar en su totalidad la embriogénesis en humano.^{58,59}

Las hPSC se han convertido en una gran herramienta para estudiar el desarrollo embrionario ya que son capaces de diferenciarse a células de las tres capas germinales con grandes similitudes a los

procesos que se producen durante los estadios fetales y embrionarios durante las primeras etapas del desarrollo.⁵⁸ La optimización en los procesos de diferenciación de las hPSC *in vitro* aportan la oportunidad de estudiar y recapitular los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario de una forma controlada y barata.⁵⁹

1.3.3 Hematopoyesis embrionaria

La hematopoyesis es el proceso de diferenciación por el cual se generan las células sanguíneas a partir las células madre y progenitores hematopoyéticos. En los adultos esta se produce en la médula ósea donde las HSCs proliferan y se diferencian.⁶⁰ Las HSCs se generan durante el desarrollo embrionario y van ocupando distintos nichos hasta establecerse definitivamente en la médula ósea y suplir de células sanguíneas al organismo adulto el resto de su vida.⁶¹

La hematopoyesis embrionaria se produce en dos o tres oleadas dependiendo del modelo científico. En el ratón, la primera oleada se produce en el saco vitelino empezando en el día E7.5 de gestación dónde se generan unas estructuras llamadas islas de sangre.⁶² Estas “islas” albergan los primeros progenitores endoteliales y hematopoyéticos que proceden de un progenitor común, el hemangioblasto.⁶³ Las células que se producen en esta hematopoyesis primitiva son eritrocitos grandes y nucleados

Introducción

seguidos de macrófagos, megacariocitos y precursores mieloides. Los eritrocitos primitivos expresan hemoglobinas fetales y permiten la oxigenación del embrión en rápido crecimiento mientras que estos macrófagos contribuyen a las poblaciones de microglía, células de Langerhans y Kupffer.^{61,64-66} En el modelo de tres oleadas, se considera una segunda oleada al momento en que se originan progenitores eritro-mieloides y progenitores linfoides con características fetales y adultas.^{67,68}

La segunda oleada o tercera en el modelo de tres oleadas, se produce en una región llamada aorta-gonado-mesonefros (AGM) entre los días E8.5 y E10.⁶⁹ En esta región aparecen unos progenitores conocidos como endotelio hemogénico, capaces de generar células endoteliales y hematopoyéticas y de donde aparecen las primeras HSCs inmaduras que no son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de un organismo adulto, capacidad de adquieren después del día E10.⁷⁰ Estas pre-HSCs maduran en su transición al hígado fetal dónde se expanden y adquieren marcadores como el MHC tipo 1 y CD45.⁷¹ Por último estas células viajan a la médula ósea, dónde generaran precursores hematopoyéticos el resto de la vida del individuo.⁷²

Usando como modelo biológico las hPSC se han optimizado protocolos que buscan reproducir los procesos de diferenciación hematopoyética. Se han conseguido describir de manera secuencial las poblaciones celulares que van surgiendo durante la

hematopoyesis embrionaria y las señales necesarias para su correcta diferenciación. Se han desarrollado sistemas de diferenciación con co-cultivos de hPSC con líneas celulares que emulan nichos de diferenciación hematopoyética como los co-cultivos con la línea S17 de médula ósea murina, la de saco vitelino endotelial C166⁷³ o las OP9 de médula ósea de ratón.⁷⁴ La generación de cuerpos embrionarios con exposición a citoquinas hematopoyéticas es uno de los sistemas más usados.⁷⁵ En la actualidad prevalecen los sistemas de cultivo que usan medios definidos para controlar mejor las condiciones de la diferenciación y evitar contaminaciones cruzadas con componentes de origen animal no humano.^{76,77}

En estos protocolos de diferenciación se busca inicialmente generar mesodermo ya que las células hematopoyéticas provienen del mesodermo embrionario. Las células que dan lugar a las islas de sangre en la primera oleada expresan el gen *T* (También conocido como Brachyury) y *KDR* (Receptor de VEGF 2). El desarrollo del mesodermo hematovascular se puede analizar con la aparición de los marcadores *KDR*, *PDGFRA*, *APLN*. Una vez se reduce la expresión de *PDGFRA* se producen progenitores hemato-endoteliales, un tipo celular que puede producir tanto células endoteliales como células hematopoyéticas y que expresan los marcadores VE-cadherina, *CD31* y *CD34*. Posteriormente la adquisición del marcador *CD43* permite a la célula volverse más redondeada y menos adherente, proceso que se conoce como la

Introducción

transición endotelio-hematopoyética.⁷⁸ A partir de aquí van apareciendo poblaciones de progenitores hematopoyéticos que van expresando los marcadores CD235a y CD41 para finalmente adquirir el marcador CD45 de compromiso mieloide.⁷⁹

Las hPSC son de gran utilidad por ser una fuente inagotable de material de experimentación y por su capacidad de generar cualquier tipo celular. El desarrollo de modelos de enfermedad se inicia con la modificación genómica de las hPSC para que porten las alteraciones genéticas que causan la enfermedad o la generación de iPSC la reprogramación celular de las células de un paciente. Generalmente su capacidad de reproducir los efectos de la enfermedad y ser un buen modelo de estudio se cumplen cuando la enfermedad es monogénica, muestra alta penetrancia, los eventos importantes ocurren durante las etapas iniciales del desarrollo y está asociada claramente a un tipo celular.⁸⁰

También se ha planteado el uso de modelos celulares basados en hPSC para el cribado de moléculas o fármacos, debido a la gran cantidad de células que se puede disponer en el laboratorio, aspecto limitante en el uso de modelos animales.⁸⁰

Recientemente se han conseguido derivar iPSC de muestras primarias de pacientes con LMA^{81,82} generando modelos humanos de leucemia y pudiendo introducir estas células en ratones para investigar en más profundidad el desarrollo leucémico humano.³⁴

También se han generado modelos con hPSC donde se introducen constructos que albergan el gen de fusión en hPSC para estudiar su efecto durante la diferenciación hematopoyética como el realizado con el oncogén *ETO2-GLIS2*.⁸³

En este trabajo se ha intentado generar un modelo con hPSC para el estudio de la leucemia causada por el gen de fusión *NUP98-KDM5A*.

1.4 NUP98-KDM5A

1.4.1 Estructura y función

El gen de fusión *NUP98-KDM5A* se produce a partir de una translocación críptica entre el cromosoma 11 y el cromosoma 12, $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$. Esta translocación provoca que el intrón 13 del gen *NUP98* se fusione con el intrón 26 del gen *KDM5A* manteniendo el marco abierto de lectura.⁸⁴ La proteína resultante está formada por los 13 primeros exones de *NUP98* y los exones 27 y 28 de *KDM5A* en la mayoría de los casos.⁸⁵ Se mantiene el extremo N-terminal de *NUP98* y los dominios GLFG y GLEBS. En cambio, para *KDM5A* sólo se conserva una pequeña parte de la proteína y mantiene su dominio PHD junto al extremo C-terminal y las señales de localización nuclear⁴⁷ (Fig. 4).

Introducción

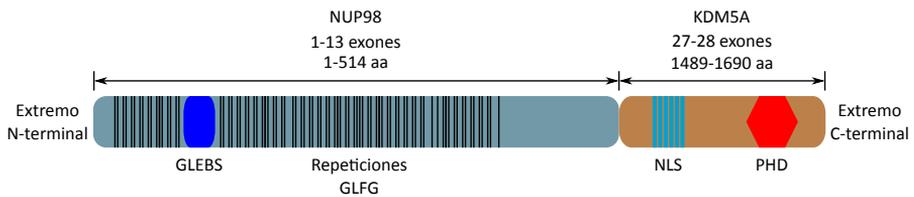


Figura 4. Esquema y dominios de la proteína de fusión NUP98-KDM5A. GLEBS: Gle-2 binding site; NLS: Nuclear localization signal; PHD: Plant homeodomain. Modificado de Wang, et. al. (2009).

Esta proteína de fusión contiene los dominios con los que NUP98 interactúa con otras proteínas, manteniendo posiblemente muchos de sus genes diana y el dominio PHD de KDM5A, dando la posibilidad de unión a la marca H3K4me3.

1.5 NUP98

1.5.1 Complejo del poro nuclear y las nucleoporinas

NUP98 forma parte del complejo del poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés), una asociación de más de 30 proteínas diferentes (Nucleoporinas o Nups) de unos 120-MDa que se reparte por la membrana nuclear y regula el transporte de material entre el citoplasma y el núcleo. Está formado por el complejo Nup93-205 que forma el anillo interior y el complejo Nup107-160 que forma el anillo exterior. Todas estas estructuras están formadas por los Nups estructurales. Los Nups periféricos conforman los filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear y son proteínas mucho más

móviles que funcionan como sitios de anclaje para iniciar o finalizar el transporte en ambos sentidos del poro nuclear (Fig. 5).⁸⁶⁻⁸⁸

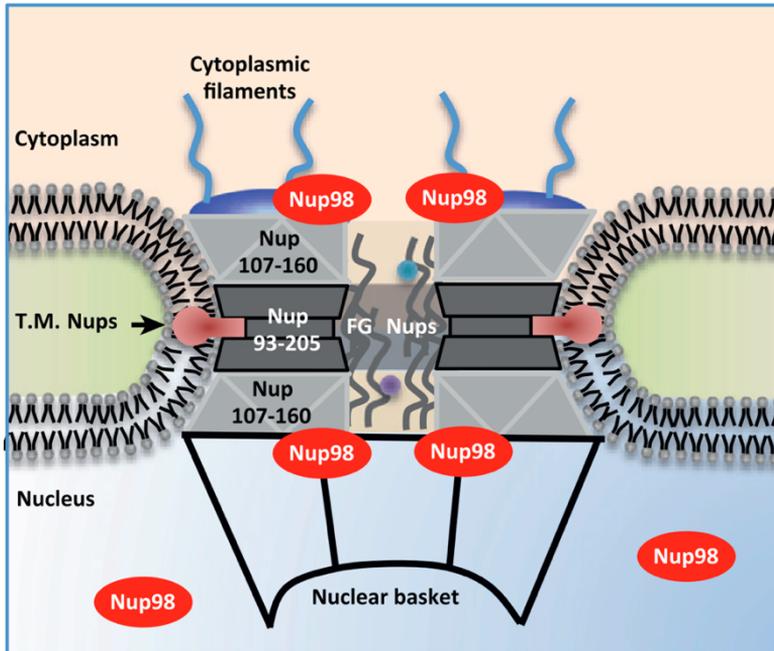


Figura 5. Esquema de la estructura del complejo del poro nuclear. Se pueden observar el anillo interno formado por Nup93-205 unido a los Nups transmembrana. También aparecen los anillos exteriores formados por Nup107-160 y el interior formado por Nups-FG. Se ve representado también los filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear. Resaltado aparecen las localizaciones de NUP98, tanto anclado en el lado citoplasmático y el nuclear, además de su forma soluble en el núcleo. Extraído de Franks, et. Al. (2013).

Introducción

A los Nups periféricos se les han atribuido otras funciones biológicas más allá de regular el transporte de material entre el núcleo y el citoplasma como la regulación de la mitosis o la regulación de expresión génica.^{89,90} El NPC permite el transporte de pequeños iones y polipéptidos de forma difusa y de macromoléculas como mRNA o proteínas de más de 40 kDa de forma activa, a través de proteínas llamadas karioferinas.⁹¹

1.5.2 Estructura y regulación de NUP98

Entre las nucleoporinas más estudiadas está la NUP98, una proteína de 98 kDa presente a ambos lados del complejo del poro nuclear o en forma soluble en el núcleo (Fig. 5).^{86,92}

El gen que lo codifica, *NUP98*, se localiza en el cromosoma 11p15.4 y contiene 34 exones. El locus contiene la información para codificar dos transcritos diferentes generados por empalme alternativo. El precursor *NUP98-96* genera un polipéptido de 186 kDa que se autoproteoliza y genera las dos proteínas NUP96 y NUP98 que se mantienen unidas y son incorporadas al NPC. La otra variante es la que codifica solo la secuencia de NUP98 y de la misma manera se auto-proteoliza pero se favorece que quede libre en el núcleo realizando otras funciones (Fig. 6).^{86,93,94}

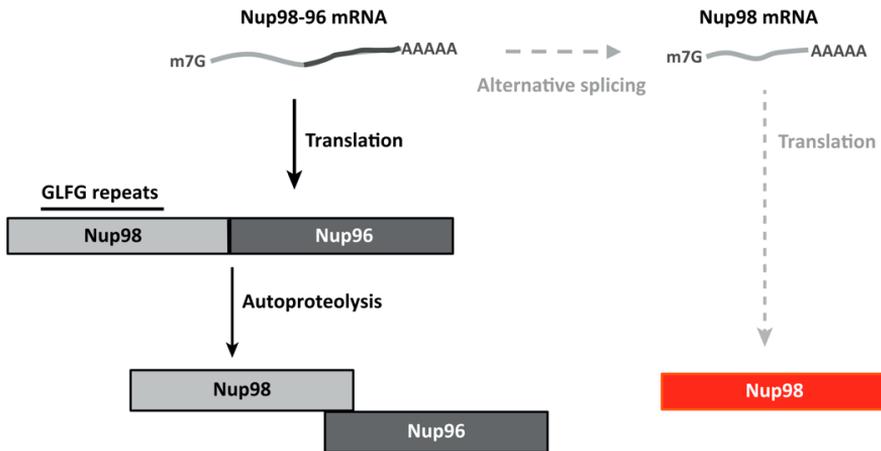


Figura 6. Esquema de la Biosíntesis de las variantes de mRNA y proteínas de NUP98 y NUP96. Extraído de Franks, et. Al. (2013).

Un tercio de las nucleoporinas se encuentran dentro de la categoría de los FG-Nups ya que contienen secuencias repetidas de Phe-X-Phe-Gly o Gly-Leu-Phe-Gly (GLFG). NUP98 es un tipo especial de FG-Nup ya que contiene secuencias de GLFG que no están en tándem.⁹⁵ Estas secuencias FG se ven interrumpidas por un dominio de unión a la secuencia Gle2 (GLEBS).⁹⁶ En la región cercana al extremo C-terminal, encontramos un dominio de unión al ARN que puede tener funciones relacionadas con la exportación de distintos tipos de ARN del núcleo.^{97,98} Por último está el sitio de autoproteólisis donde produce la forma madura de la proteína escindiendo una parte de 6kDa (Fig. 7). Este procesamiento es fundamental para la incorporación de NUP98 al NPC.^{93,99}

Introducción

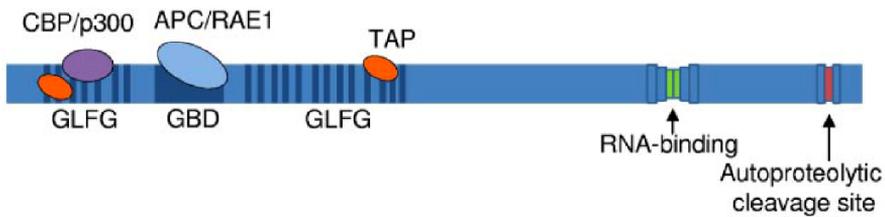


Figura 7. Esquema de los dominios de NUP98 y las proteínas que se unen a ellos. GBD: GLEBS binding domain. Extraído de Gough, et. al. (2011).

1.5.3 Funciones de NUP98

La primera función y más estudiada de las nucleoporinas en general y de NUP98 en particular es la de formar el NPC y regular el transporte de material de forma bidireccional entre el núcleo y el citoplasma.^{86,98} Más recientemente se le están asociando más funciones, como la regulación de la transcripción y participación en la mitosis.¹⁰⁰⁻¹⁰²

NUP98 cuando se transcribe juntamente con NUP96 se traduce y se autoproteoliza formando un complejo con las dos proteínas. Ese complejo de forma muy favorable es incorporado al NPC para realizar funciones de transporte de biomoléculas.^{92,94} Múltiples evidencias demuestran que NUP98 es esencial para la exportación de distintos tipos de ARN desde el núcleo, y que está implicado tanto en la importación como exportación de biomoléculas entre el núcleo y el citoplasma.⁹⁸

NUP98 no se encuentra exclusivamente en el NPC, sino también distribuido por el núcleo, excluyendo el nucléolo.^{92,103} La región GLFG de NUP98, además se ha visto que puede interactuar con CREB-binding protein (CBP)/ p300¹⁰⁴ un co-activador transcripcional y con histona deacetilasas¹⁰⁵ dando más evidencias de que puede regular la expresión génica.

En *Drosophila*, se han identificado posibles genes dianas de NUP98 a partir de ensayos de sobreexpresión/inhibición del gen. La localización del NUP98 libre se relaciona con sitios del genoma activos que tienen la marca epigenética de activación H3K4me3. Los genes identificados como diana de NUP98 están relacionados con la regulación del ciclo celular y la diferenciación.^{106,107}

La unión de NUP98 desde el NPC parece estar relacionada con una remodelación de la cromatina y una inactivación génica.¹⁰⁸ Estas evidencias indican que NUP98 cambia su función dependiendo de si se une a genes inactivos cerca del NPC o a genes altamente transcritos en el nucleoplasma. En células madre, genes en las etapas iniciales de la diferenciación interactúan con NUP98 en el NPC viéndose inhibidos. Posteriormente, cuando empieza su transcripción se ubican lejos de la periferia nuclear manteniendo su unión a NUP98.¹⁰⁹

En humanos se ha descrito la interacción directa de NUP98 con el complejo Wdr82-Set1A/COMPASS (WSC). Este complejo se encarga de la tri-metilación de H3K4. Se ha demostrado como los

Introducción

promotores donde se une NUP98, reclutan el WSC y se activa la expresión génica en células madre hematopoyéticas humanas.^{110,111}

Todas estas evidencias indican que NUP98 cumple una función en la regulación génica, aunque cómo se regula su actividad aún permanece sin elucidar.

Se conoce que NUP98 también participa en el proceso mitótico. Tanto NUP98 como RAE1 se encuentran en extractos mitóticos de células humanas¹⁰⁰ y se ha encontrado evidencia de la interacción de NUP98 con RAE1 a través del dominio GLEBS de NUP98, tanto en el transporte de moléculas como en la regulación de la mitosis. RAE1 tiene una gran similitud con un regulador de la mitosis, BUB3, que también interacciona con la secuencia GLEBS de NUP98.¹¹² Para prevenir la incorrecta y prematura inhibición de la securina, NUP98 y RAE1 interaccionan con complejo promotor de la anafase (APC; por sus siglas en inglés) para evitar entrar en la anafase de forma precipitada evitando aneuploidías. Cuando los cinetocoros están bien formados en la metafase tardía, NUP98 y RAE1 se separan del complejo permitiendo la degradación de la securina y la entrada en anafase.^{101,113} Se ha estudiado la implicación de RAE1 en la formación del huso mitóticos y la polimerización de los microtúbulos de forma independiente del centrosoma. Se ha observado un enriquecimiento de RAE1 en los polos del huso mitóticos y en toda la extensión de los microtúbulos polimerizados. La estabilización de

los microtúbulos ocurre a través de un complejo del que forman parte RAE1 y NUP98.¹¹⁴

Se ha estudiado las localizaciones de algunas proteínas de fusión que contienen NUP98 y se ha visto que durante la interfase se pueden encontrar unidas a NUP98 endógenas fuera del poro nuclear. Durante la mitosis se encuentran en los cinetocoros y los brazos de los cromosomas pudiendo afectar al proceso de mitosis.¹¹⁵

1.5.4 NUP98 y cáncer

La primera vez que se estableció una relación entre *NUP98* y el cáncer fue en 1996 cuando dos estudios independientes mostraron que células leucémicas llevaban la translocación cromosómica t(7;11)(p15;p15), que genera un gen de fusión entre *NUP98* y el gen *HOXA9*.^{116,117} Desde entonces se han identificado oncoproteínas de fusión donde participa NUP98 junto a más de 30 proteínas en tumores hematológicos tales como LMA, síndromes mielodisplásicos^{118,119}, leucemia mielocítica crónica¹²⁰, leucemia linfoblástica aguda de células T^{121,122} y leucemia aguda de fenotipo mixto.¹²³ Está clara la relación entre NUP98 y los desórdenes hematológicos pone en evidencia que NUP98 realiza una función en la hematopoyesis normal.¹¹⁰ Al estar el locus de *NUP98* en el extremo del cromosoma, muchas de las translocaciones en las que

Introducción

aparece son cripticas y no son evidentes en un cariotipo normal, por lo que se requieren técnicas moleculares para su detección.^{124,125}

Los pacientes diagnosticados con genes de fusión con *NUP98* conforman un subgrupo con mal pronóstico. En un estudio con una cohorte de 574 pacientes pediátricos con LMA se determinó que las fusiones que albergan *NUP98* están presentes en el 3.8% de los casos y se observó una clara bajada de la supervivencia global cuando se comparaban pacientes con fusión con *NUP98* o sin *NUP98* (Fig. 8).¹²⁵

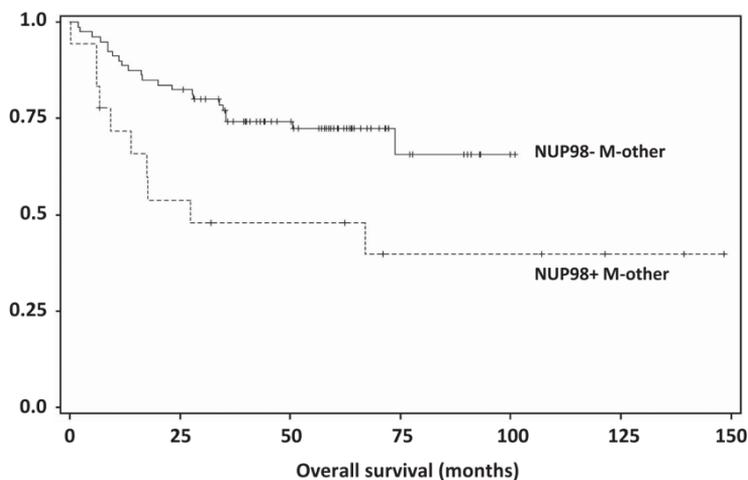


Figura 8. Supervivencia global de pacientes con proteínas de fusión con *NUP98* o sin ella. Extraído de Struski, et. al. (2017).

Las proteínas de fusión donde participa *NUP98* tienen una estructura común, se forman a partir del extremo N-terminal de

NUP98 y el extremo C-terminal de la proteína pareja (Fig. 9). Las fusiones se pueden dividir en dos categorías según la presencia de homeodominio (Dominio de proteína que permite la unión a la región de ADN conocida como *homeobox*) o no. Los genes que aportan el homeodominio son genes HOX como el *HOXA9*, *HOXC11* o *PRRX1*. El resto de genes que se fusionan con *NUP98* tiene dominios más variados como homeodominios de planta (PHD; por sus siglas en inglés) como *KDM5A* o *NSD1* o dominios SET como *KMT2A* o *NSD3* entre otros.¹²⁴

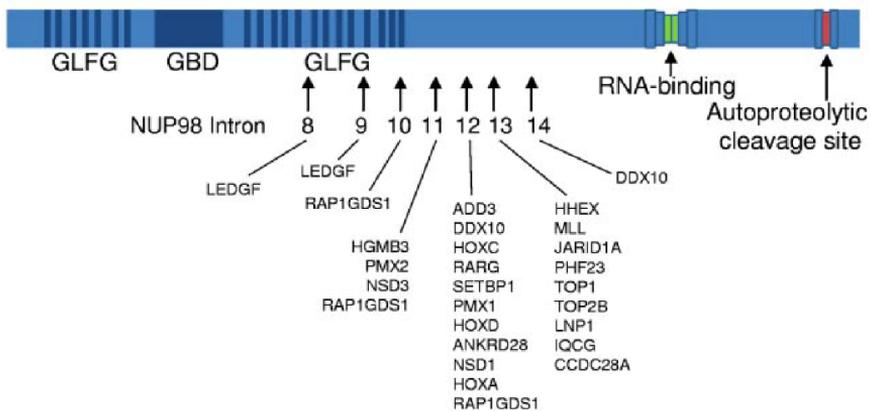


Figura 9. Esquema de los dominios de NUP98 y el intrón de NUP98 donde se translocan el resto de los genes. Extraído de Gough, et. al. (2011).

Los mecanismos que promueven la transformación en las células que llevan estas proteínas de fusión generalmente suponen la alteración de las funciones de NUP98.¹²⁴ Hay cambios en la

Introducción

expresión génica comunes entre las proteínas de fusión que contienen NUP98, como por ejemplo la sobreexpresión de genes del clúster HOXA y HOXB. También existen patrones específicos en cada una de ellas, demostrando que el efecto que aporta el otro gen es de gran importancia.^{125,85,126} La desregulación génica se debe principalmente a cambios epigenéticos y de la cromatina provocados por las proteínas de fusión y factores que se asocian a ellas. Se ha podido observar cómo células que expresan *NUP98-NSD1*, *NUP98-KDM5A* o *NUP98-PHF23* se unen a regiones cercanas a los genes HOX y cambian el perfil epigenético de la zona, permitiendo su expresión. Entre los factores que participan en este proceso se ha visto a EP300 y HDAC1.^{47,127,128}

Las fusiones con NUP98 pueden alterar el proceso mitótico, afectando a la formación del huso mitótico, o mediante una interacción aberrante con CDC20 que produce una entrada prematura en anafase.^{129,130} Además, las fusiones con NUP98 pueden producir cambios en los perfiles de ciclo celular en modelos de ratón y alteraciones cromosómicas en blastos de pacientes^{131,132}

1.6 KDM5A

1.6.1 Familia de las lisina desmetilasas KDM5 y estructura

La familia de desmetilasas KDM5 es la que mayoritariamente se encarga de eliminar las marcas de tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3). Está compuesta por 4 miembros que incluyen:

KDM5A (*RBP2* o *JARID1A*), *KDM5B* (*PLU1*), *KDM5C* (*SMCX*) y *KDM5D* (*SMCY*).^{133,134}

Los 4 miembros tienen dominios parecidos y una estructura similar. Todos contienen los dominios Jumonji cerca del extremo N-terminal o C-terminal (JmjN y JmjC) que actúan como dominio catalítico para eliminar la marca H3K4me3/2, además del dominio C₅HC₂ de tipo dedo de zinc para ayudar a la función catalítica. El dominio ARID reconoce específicamente la secuencia CCGCC en el ADN y es fundamental para la función catalítica. Por último, los dominios PHD sirven para el reconocimiento de los sustratos (Fig. 10).^{133,134}

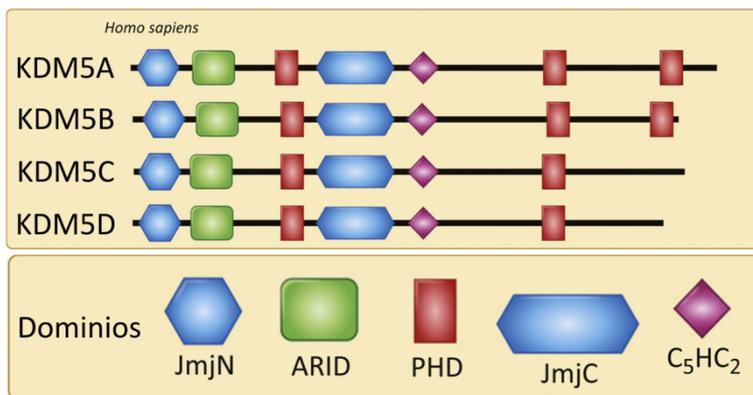


Figura 10. Dominios de los distintos miembros de la familia de KDM5. Modificado de Harmeyer, et. al. (2017).

El gen *KDM5A* se ubica en el cromosoma 12p13.33 y contiene 28 exones. La proteína codificada tiene 1690 aminoácidos y contiene 7

Introducción

dominios. Contiene los mismos dominios catalíticos que los otros miembros de la familia KDM5, pero además contiene 3 dominios PHD. El PHD1 sirve para el reconocimiento de la histona 3 sin metilar. La función del PHD2 no se conoce, pero si se elimina, desestabiliza la proteína y el PHD3 reconoce la marca H3K4me3.^{133,134}

1.6.2 Funciones de KDM5A

Las marcas epigenéticas son modificaciones que sufre el ADN que cambian su regulación sin afectar a la secuencia de nucleótidos. Se conocen una gran variedad de ellas como acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones entre muchas otras. De las más estudiadas son las metilaciones de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1/2/3). Estas metilaciones están relacionadas con regiones de la cromatina activamente transcrita. La mono-metilación H3K4me1 se encuentra en potenciadores para fomentar la transcripción de ciertos genes. La marca H3K4me2 se encuentra en promotores activos o aquellos que se encuentran preparados para una transcripción futura y la marca H3K4me3 se encuentra en regiones de eucromatina con genes activos.^{135,136}

KDM5A al ser una enzima desmetilasa que elimina todas las metilaciones de H3K4 se ha considerado siempre un represor transcripcional ya que al quitar estos grupos metilo se reduce la actividad transcripcional de los genes diana.¹³⁷ Durante la

diferenciación se ha visto que *KDM5A* regula genes como *MFN2*, *BRD8*, *FGF4*, *OTX2*, *HOXA1*, *HOXA5* y *HOXA7* entre otros. En estudios donde se reduce o elimina la expresión de *KDM5A*, los niveles globales de H3K4me3 no aumentan, posiblemente debido al efecto redundante de otras desmetilasas, pero si lo hace en los genes diana aumentando su expresión, observándose un efecto tejido específico.¹³⁸ Sin embargo, también puede actuar como activador transcripcional en regulación de la diferenciación, progresión del ciclo celular y función mitocondrial.¹³⁴ Su función como activador se da cuando otras proteínas con las que interactúa bloquean su función de represor. Una de las interacciones más estudiadas es con RB1 (también conocida como pRB). La proteína RB1 secuestra a *KDM5A* de su función principal dejando a sus genes diana activos al no eliminarse la marca H3K4me3. Esta interacción se ha observado en la salida del ciclo celular e induciendo el proceso de diferenciación.^{134,137,139}

1.6.3 *KDM5A* y cáncer

En varios tipos de cáncer se ha descrito la sobreexpresión de *KDM5A*. Esta produce una mayor proliferación y una bajada de expresión de supresores tumorales. Se ha descrito que *KDM5A* puede reducir la expresión de p53 y p21 de forma indirecta en varios tipos de cáncer.^{134,140} De hecho se ha planteado la inhibición de la expresión de *KDM5A* como tratamiento para tratar diversos tipos de cáncer.¹⁴¹

Introducción

En leucemia la primera vez que se observó a *KDM5A* formar parte de un gen de fusión fue en 2006 como parte de *NUP98-KDM5A*.⁸⁴

1.7 LMA CON EXPRESION DE NUP98-KDM5A

La translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)(q15;q13)$, que produce el gen de fusión *NUP98-KDM5A* se describió por vez primera en un paciente de leucemia megacarioblástica (AMKL) tipo M7.⁸⁴ A partir de ese descubrimiento, se describió la presencia de ese gen de fusión únicamente en pacientes con leucemia tipo M7 o megacarioblástica. Sin embargo, un estudio reciente que engloba 2392 pacientes diagnosticados con LMA pediátrica identificó 47 casos de pacientes con la presencia de *NUP98-KDM5A* en todos los tipos de LMA, desde la M0 a la M7 (2% de los casos).

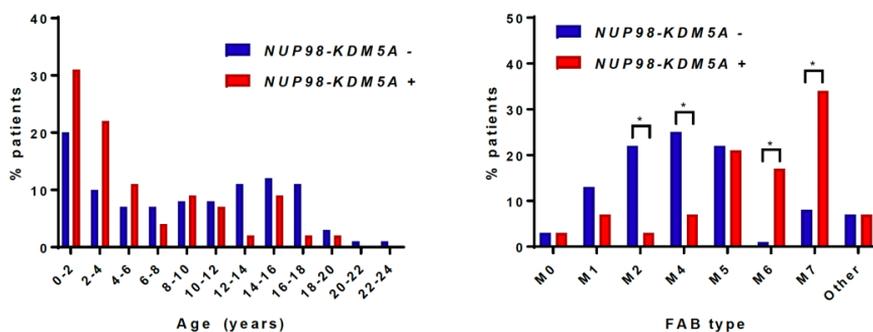


Figura 11. Distribución por edades y por tipos de leucemia de pacientes con o sin *NUP98-KDM5A*. Extraído de Noort, et. al. (2021).

La edad de estos pacientes fue significativamente más baja que la del resto de pacientes encontrándose el pico entre los 0 y 4 años.¹⁴² (Fig. 11).

La supervivencia global de los pacientes positivos para el gen de fusión *NUP98-KDM5A* bajaba significativamente respecto a los pacientes de LMA sin este gen de fusión, por lo que puede ser considerado como un indicador de mal pronóstico.^{142,143} Además, el riesgo de recidiva aumentaba en estos pacientes hasta el 62.6% en comparación con los 42.5% del resto de pacientes.¹⁴² (Fig. 12).

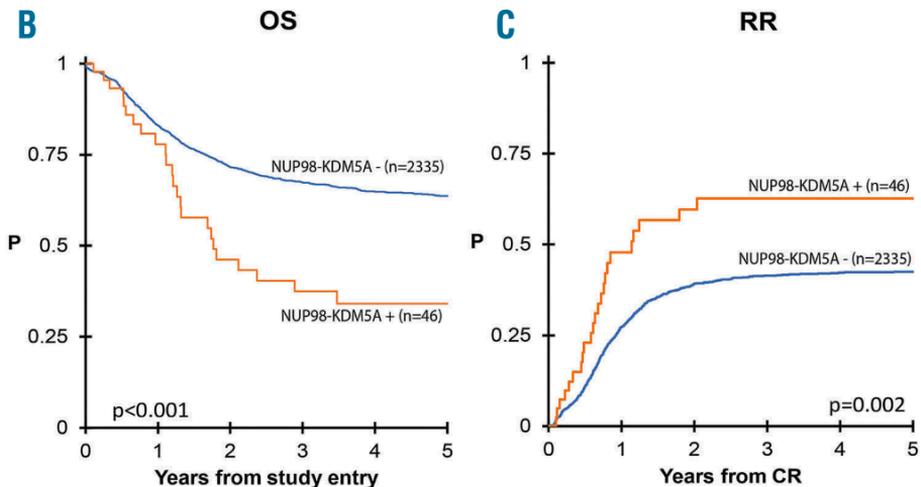


Figura 12. Curva de supervivencia global y de riesgo de recidiva de pacientes con o sin NUP98-KDM5A. Extraído de Noort, et. al. (2021).

En la mayoría de los pacientes de leucemia, se detectan mutaciones secundarias además de la translocación o mutación principal que

Introducción

origina el proceso de transformación. En el caso de *NUP98-KDM5A* algunos estudios sugieren que es un oncogén lo bastante potente para inducir el proceso de transformación por sí mismo.^{142,144} Sin embargo otros estudios encuentran mutaciones secundarias en prácticamente todos los pacientes. Entre las mutaciones secundarias identificadas asociadas a la proteína de fusión se encuentran en complejos de cohesina y CTCF (CCCTC-binding factor), la vía JAK-STAT y el gen *GATA1*. La asociación más fuerte se da entre *NUP98-KDM5A* con el supresor tumoral *RB1*, encontrándose mutado en casi todos los casos. La mutación es una pérdida de un fragmento del locus del gen *RB1*, provocando una bajada de expresión del gen a la mitad respecto a otros pacientes sin esa mutación.^{145,146}

1.7.1 Modelos de NUP98-KDM5A

Diversos estudios han analizado las bases moleculares del proceso de transformación que sufren las células que expresan el gen de fusión *NUP98-KDM5A*.

En 2009 se generó el primer modelo de *NUP98-KDM5A*, en el que al introducir el gen de fusión (y una versión del gen de fusión sin el dominio PHD3) en células hematopoyéticas de ratón a través de la infección con lentivirus, las células proliferaron de manera incontrolada, dando lugar a una leucemia. Este estudio demostró que *NUP98-KDM5A* se une a regiones ricas en H3K4me3,

aumentando la expresión de los genes del clúster HOXA, del *HOXA6* al *HOXA10*, siendo imprescindible el dominio PHD3 para esta unión, ya que la versión del gen sin el dominio PHD3 no generó este efecto. En este artículo se estableció el primer y único modelo mecánico que se tiene sobre la proteína de fusión, en el que NUP98-KDM5A actúa como un dominante negativo, evitando que el KDM5A endógeno elimine las marcas H3K4me3 evitando que los genes del clúster HOXA. Además, recluta gracias a los dominios de NUP98 a otros reguladores epigenéticos como p300 promoviendo aún más la transcripción⁴⁷. (Fig. 13)

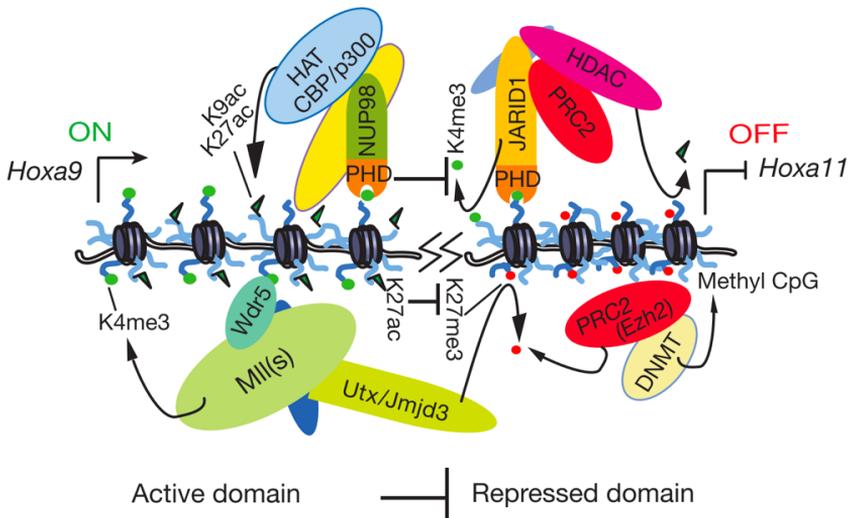


Figura 13. Hipótesis de la función de NUP98-KDM5A sobre los genes HOXA e interacción con reguladores epigenéticos. Extraído de Wang, et. al. (2009).

Introducción

La desregulación de los genes HOXA conjuntamente con los HOXB se ha descrito en todos los estudios que se han realizado sobre la proteína de fusión.^{85,147,148}

En 2019 se generaron modelos de estudio con expresión constitutiva de *NUP98-KDM5A* en células humana de cordón umbilical y también utilizando muestras de pacientes. Se demostró como estas células proliferaban más que las células control y eran capaces de generar leucemias de distintos tipos en modelos de ratón. Además, en xenotrasplantes utilizando muestras de paciente se observó la desregulación de genes tales como los del clúster HOXA y HOXB. Se identificó que la vía JAK-STAT estaba alterada y estas células muestran vulnerabilidad al uso de fármacos que son capaces de revertir la desregulación génica provocada por las alteraciones en la vía JAK-STAT. El problema que presenta este modelo es que los xenotrasplantes generan leucemias de diversos tipos, tanto de linaje mieloide como linfoide, estas últimas nunca vistas en pacientes con *NUP98-KDM5A*. Una posibilidad que explica la aparición de leucemias no presentes en los pacientes puede ser por no utilizar las correctas células de origen que dan lugar a la leucemia.¹⁴⁷

El modelo más reciente se basa en un sistema para la inhibición de *NUP98-KDM5A* en células de ratón regulado por doxiciclina. En este estudio se observó que la expresión de la proteína de fusión es fundamental para el desarrollo de la leucemia y que al reducir su

expresión se produce la diferenciación de las células leucémicas. En este estudio se analizaron También las proteínas de fusión NUP98-NSD1 y NUP98-DDX10 y se determinó que *CDK6* es un gen diana común de las proteínas de fusión con NUP98, donde su inhibición específica puede revertir en cierta medida los efectos de las proteínas de fusión y alargar la supervivencia en estos ratones¹⁴⁸.

2. Hipótesis

La LMA puede aparecer tanto en adultos como en población pediátrica, aunque las causas de la enfermedad son diferentes. En adultos la enfermedad se produce por acumulación de mutaciones durante la vida del individuo en células mieloides inmaduras en la médula ósea, aumentando su incidencia con la edad. En individuos pediátricos existe un pico de incidencia en infantes que no se explica por acumulación de mutaciones y se ha demostrado en algunos casos que se producen alteraciones cromosómicas durante el desarrollo embrionario, y el individuo nace con la mutación que desencadena la enfermedad. Una de las translocaciones causantes de la leucemia mieloide aguda pediátrica es la $t(11;12)(p15;p13)$, que provoca la expresión del gen de fusión NK5A. Este gen de fusión se encuentra en exclusividad en pacientes pediátricos con una media de edad de tres años, indicando que muy probablemente se inicie su expresión durante el desarrollo fetal.

Los modelos animales de la LMA pediátrica no recapitulan fielmente la biología del humano y las líneas celulares no permiten estudiar los mecanismos moleculares y celulares que originan la enfermedad. En cambio, las hPSC permiten imitar el desarrollo embrionario temprano ofreciendo una plataforma de estudio similar al momento donde se producen las translocaciones cromosómicas causantes de la leucemia.

Hipótesis

Por estas razones hipotetizamos que: al expresar NK5A en hPSC, generaremos un modelo de la enfermedad capaz de recapitular eventos que ocurren en los pacientes y podremos profundizar en los mecanismos que inducen el proceso de leucemogénesis.

3. Objetivos

Para poder profundizar en el conocimiento de la LMA ocasionada por proteína de fusión *NUP98-KDM5A*, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Generar la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13) usando el sistema CRISPR/Cas9 en células pluripotentes humanas

1.1 Optimizar las herramientas de edición génica y detección de la translocación cromosómica utilizando células HEK-293

1.2 Generación de la translocación t(11;12)(p15;p13) en células pluripotentes humanas

2. Desarrollar un modelo de células pluripotentes humanas con expresión constitutiva del gen de fusión *NUP98-KDM5A*

2.1 Generar líneas celulares pluripotentes humanas con expresión constitutiva del gen de fusión *NUP98-KDM5A*

2.2 Caracterizar el efecto de la expresión del gen de fusión *NUP98-KDM5A* en el estadio pluripotente

2.3 Analizar el efecto de la expresión constitutiva de *NUP98-KDM5A* durante la diferenciación a las tres capas germinales

2.4 Analizar el efecto de la expresión constitutiva de *NUP98-KDM5A* durante la diferenciación hematopoyética

3. Generar un modelo de expresión inducible del gen de fusión *NUP98-KDM5A* en células pluripotentes humanas

3.1 Generar líneas inducibles para la expresión de *NUP98-KDM5A* utilizando el sistema CRISPR/Cas9

3.2 Analizar el efecto de la expresión de *NUP98-KDM5A* durante la diferenciación hematopoyética

3. Objectives

To gain insight into the understanding of AML caused by NUP98-KDM5A fusion protein, the following objectives were proposed:

1. To generate the chromosomal translocation t(11;12)(p15;p13) using the CRISPR/Cas9 system in human pluripotent stem cells

1.1 To optimize gene editing tools and chromosomal translocation detection using HEK-293 cells

1.2 Generation of the t(11;12)(p15;p13) translocation in human pluripotent stem cells

2. To develop a human pluripotent cell model with constitutive expression of the *NUP98-KDM5A* fusion gene

2.1 To generate human pluripotent stem cell lines with constitutive expression of the *NUP98-KDM5A* fusion gene

2.2 To characterize the effect of expression of the *NUP98-KDM5A* fusion gene at the pluripotent stage

2.3 To analyze the effect of constitutive expression of *NUP98-KDM5A* during differentiation to the three germ layers

2.4 To analyze the effect of constitutive expression of *NUP98-KDM5A* during hematopoietic differentiation

3. To generate a model of inducible expression of the *NUP98-KDM5A* fusion gene in human pluripotent stem cells

3.1 To generate inducible pluripotent stem cell lines for the expression of *NUP98-KDM5A* using the CRISPR/Cas9 system

3.2 To analyze the effect of *NUP98-KDM5A* expression during hematopoietic differentiation

4. Materiales y métodos

4.1 Cultivos celulares

Las líneas de hESC H9 (WA09, Wicell, EEUU) y las líneas de iPSC PBMC1-iPS4F1 (iCMN.1) y PBMC2-iPS4F8 (iPS4F8) fueron mantenidas en estado indiferenciado sin el uso de células de soporte utilizando el medio de cultivo E8¹⁴⁹ sobre placas cubiertas previamente con Matrigel® (BD Bioscience, EEUU, Ref: 356234). Para los experimentos de diferenciación y análisis con citometría de masas, las células fueron cultivadas con el medio iPS-Brew (Miltenyi Biotec, Germany, Ref: 130-104-368). El medio de cultivo se cambiaba a diario y cultivos confluentes se subcultivaban mediante disociación con PBS-EDTA y rascado con rasquetas de cultivo.

Las líneas celulares HEK-293 y HEK-293T fueron cultivadas con el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, EE. UU., Ref: 11965092) alto en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% aminoácidos no esenciales (Non-essential aminoacids, NEAA, Thermofisher, EE. UU., Ref: 11140050) y 100IU/mL de penicilina y estreptomina (Thermofisher, Ref: 15140122). El medio de cultivo se cambiaba cada 2-3 días y se subcultivaban cultivos confluentes mediante disociación con Tripsina (Thermofisher, Ref: 25200072).

Materiales y métodos

La línea celular CHRF-288-11 fue cultivada en suspensión con el medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Thermofisher, Ref: 11875093) suplementado con 10% de FBS y 100IU/mL de penicilina y estreptomina. El medio de cultivo se cambiaba cada 2-3 días y se subcultivaban cuando el cultivo alcanzaba una densidad de 5×10^5 células/mL a 1×10^5 células/mL.

En todos los casos las células se cultivaron en incubador húmedo con una concentración de 21% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Construcciones plasmídicas y generación de líneas celulares

4.2.1. Generación de la translocación cromosómica **t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)**

Para la generación de la translocación t(11;12)(p15;p13)(p15;p13) que da lugar al gen de fusión *NUP98-KDM5A* se utilizaron plásmidos no integrativos pCAG C9G (Proporcionados por la Dra. Sandra Rodríguez; CNIO, Madrid, España). Estos plásmidos albergan secuencias de dos sgRNA para la edición génica cada locus del genoma bajo el promotor constitutivo U6, que tienen como diana el intrón 13 de *NUP98* (5'- GCT AGT ATC GAA CTC CTG GA -3' (+ strand) y 5'- GCT GGT CGT GAA CTG AAC TC -3' (- strand)) y el intrón 26 de *KDM5A* (5'- AGT CGA ACA GAG GTT ACC AG -3' (- strand) y 5'- GAG AAT GGC TTG ATC CCG GG -3' (- strand)). Además, contienen la

secuencia de la nucleasa Cas9 bajo el promotor constitutivo CAG (Chicken β -actin promoter), seguido del gen reportero GFP (Green fluorescence protein) bajo el mismo promotor.

Para la transfección de los plásmidos pCAG C9G se utilizaron varios métodos:

Para las células HEK-293 se utilizaron lípidos catiónicos LipoD293™ DNA transfection reagent (SignaGen Laboratories, EE. UU., Ref: SL100668) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midieron los niveles de GFP a las 48 horas post lipofección y se recogió material para extraer ADN.

Para las células H9 se utilizaron lípidos catiónicos Lipofectamine 3000 reagent (Invitrogen, Ref: L3000001) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sortearon las células positivas para GFP a las 24 horas de la lipofección para enriquecer el cultivo con células que hubieran incorporado el plásmido y se recogió material para extraer ADN.

4.2.2 Generación de la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ utilizando ribonucleopartículas

Para la producción de ribonucleopartículas (RNPs) capaces de generar la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$, se adquirieron

Materiales y métodos

los Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA por encargo a IDT technologies (EE. UU.) para la unión a los locus del genoma de *NUP98* (5'- GCU AGU AUC GAA CUC CUG GAG UUU UAG AGC UAU GCU -3') y de *KDM5A* (5'- AGU CGA ACA GAG GUU ACC AGG UUU UAG UAG AGC UAU GCU -3'). También se adquirió el Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA (IDT Technologies, Ref: 1072532) que se une al crRNA y permite formar el dúplex de ARN que posteriormente se une a la nucleasa Cas9 Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS (IDT Technologies, Ref: 1074181) para formar la RNP siguiendo las instrucciones del fabricante.

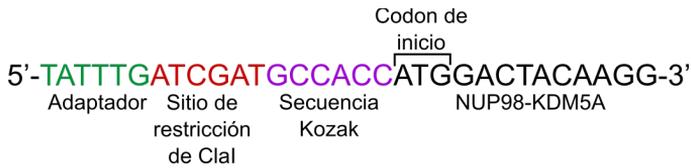
Se realizaron nucleofecciones usando el Human Stem Cell Nucleofector Kit (Lonza, Suiza, Ref: VPH-5012) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la nucleofección en el nucleofector Amaxa™ Nucleofector™ II (Lonza, Ref: AAB-1001) usando el programa A-023.

4.2.3. Expresión constitutiva del gen de fusión *NUP98-KDM5A*

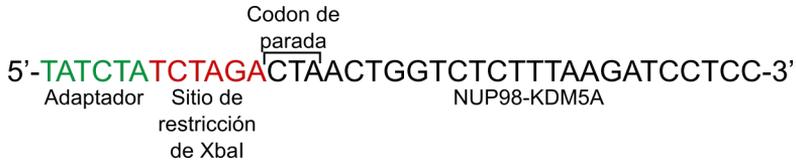
Se obtuvo la secuencia de *NUP98-KDM5A* en un vector pMSCV (Amablemente cedido por el Dr. David Allis, Universidad de Rockefeller, Nueva York, EE. UU.), que se clonó en el vector pRRL-EF1 α -PGK-NeoR. La secuencia de *NK5A* fue amplificada del plásmido pMSCV con cebadores específicos conteniendo colas que añadían sitios de restricción para Clal y XbaI, además de incluir la secuencia Kozak para mejorar la eficiencia de traducción del mRNA.¹⁵⁰ Para

evitar la modificación de la secuencia por error de la polimerasa, se usó la Phusion™ High-fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, EEUU, Ref: F-530S) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cebador sentido



Cebador antisentido



Los parámetros de la PCR fueron los siguientes:

Paso		Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		98°C	30 segundos
35 ciclos	Desnaturalización	98°C	10 segundos
	Alineamiento	61°C	30 segundos
	Elongación	72°C	1 minuto 30 segundos
Elongación final		72°C	10 minutos
Conservación		4°C	Infinito

El producto amplificado se clonó usando las enzimas de restricción Clal y XbaI como dianas de restricción en el vector pRRL-EF1α-PGK-

Materiales y métodos

NeoR. En el vector resultante, pRRL-EF1 α -NK5A-PGK-NeoR (pRRL-NK5A), la expresión del gen de fusión NK5A está controlada por el promotor constitutivo en EF1 α . Este es el promotor del factor de elongación 1 α , utilizado comúnmente para la expresión ectópica en células de mamífero y muy utilizada en expresión de hPSC cuando otros promotores como el del CMV (Citomegalovirus) se silencian en este tipo celular.¹⁵¹ El gen de resistencia a neomicina (NeoR) está bajo el control del promotor constitutivo PGK, el promotor de la fosfoglicerato quinasa, un promotor con expresión constitutiva también en hPSC.¹⁵¹ Este gen confiere la capacidad a las células editadas a inactivar los antibióticos de selección como la neomicina o gentamicina y ser resistentes a su exposición. Para generar líneas control, se utilizó el vector con el promotor EF1 α , pRRL-EF1 α -PGK-NeoR (pRRL-Control) vacío.

Para transducir las hPSC se obtuvieron partículas lentivirales se por co-transfección transitoria en células HEK-293T del plásmido psPAX2 (vector de empaquetamiento), VSV.G (vector de envuelta) y el pRRL-NK5A o pRRL-Control, usando un protocolo estándar de transfección por calcio-fosfato.¹⁵² Los sobrenadantes fueron recogidos a las 48-72 horas después de la transfección y fueron filtrados a través de un filtro de 0.45 μ m y usados frescos para transducir las hPSC junto a Polibreene infection/Transfection reagent (8 mg/mL; Sigma-Aldrich, EE. UU, Ref: TR-1003) e Y-27632 2HCl (iROCK) (10 μ M; Selleckchem, EE. UU, Ref: S1049)

4.2.4. Generación del sistema de expresión de NUP98-KDM5A inducible por doxyciclina

se solicitó a la compañía Twist Bioscience (EE. UU.) la síntesis de una secuencia que contiene los 1542 primeros nucleótidos de *NUP98* y los 4467-5070 nucleótidos de *KDM5A* junto a una secuencia 3xFLAG, obtenida en un vector intermediario pTWIST. La secuencia del transgén se clonó en un vector pTRE3G-rtTA3G-PolyA utilizando las enzimas de restricción AgeI y AclI. Este plásmido de control de expresión génica por doxyciclina de 3ª generación expresa de forma constitutiva el transactivador rtTA3 bajo el promotor CAG. Este transactivador cambia de conformación en presencia de doxyciclina y es capaz de unirse al promotor TRE3G y activar la expresión del gen de fusión. Este plásmido fue diseñado para su integración en el locus AAVS1 ya que alberga la secuencia de brazos de homología para esta región del genoma promoviendo su integración por recombinación homóloga. El locus AAVS1 (primer intrón del gen PPP1R12C) es considerado un sitio seguro del genoma donde expresar de forma robusta genes exógenos.¹⁵³ El plásmido también alberga el gen NeoR para la selección de la edición génica, que se expresa de forma constitutiva bajo el promotor del gen PPP1R12C. Los plásmidos fueron secuenciados a través de la técnica Sanger, en la Unidad de genómica del centro Genyo.

Se linealizó el vector con una digestión con NotI y una precipitación con Acetato de sodio y etanol estándar. La edición génica se realizó

Materiales y métodos

nucleofectando 100 pmoles de Cas9 (IDT Technologies, Ref: 1081058), 120 pmoles de gRNA contra el intron AAVS1 (5'- GGG GCC ACT AGG GAC AGG AT -3', IDT technologies) y 5 µg del vector linealizado en células H9.

Las condiciones de nucleofección son las mismas descritas anteriormente en la sección 4.2.2. Las células transfectadas con plásmidos pRRL o pTRE3G fueron seleccionadas con 100 µg/mL de G418 durante 5-7 días.

Para la obtención de líneas clonales, se procedió a realizar un ensayo de dilución límite. 0.5 células/pocillo. Se dejaron crecer las células por dos semanas comprobando que la colonia formada solo viniese de una sola célula.

4.3 Técnicas genómicas

4.3.1 Extracción de ADN genómico

Extractos de ADN se obtuvieron de pellets celulares utilizando el kit NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue (Macherey-Nagel, Alemania, Ref: 740952), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado y la calidad comprobada por Nanodrop 2000c Spectrophotometer.

4.3.2 PCR

Para la amplificación de secuencias específicas de ADN genómico o plasmídico se utilizó el kit Go Taq® G2 Flexi DNA Polymseras (Promega, EE. UU., Ref: M7805) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lista de los cebadores utilizados y sus secuencias están indicados en la tabla 2.

4.3.3 PCR digital (dPCR)

Para la detección y cuantificación del % de células con la translocación t(11;12)(p15;p13)(p15;p13), se utilizó una sonda marcada con el fluorocromo FAM, que se une a la secuencia de *NUP98* dentro de la región amplificada con los cebadores específicos de la translocación. Como control se utilizó una sonda que se une al gen RNaseP unido al fluorocromo VIC (ThermoFisher, Ref: 4403326).

Cebador sentido: 5'- TGA GGA AAG TCA GCC TCT CTA -3'

Cebador antisentido: 5'- TAC GCA ACT GTC ACC ACT ATT C -3'

Sonda NK5A FAM: 5'- CTT ACA CCT GTA ATC CCA GCA CGT T -3'

Para la reacción de PCR se utilizó el reactivo TaqMan™ Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Ref: 4371355) siguiendo las indicaciones del fabricante junto a las sondas y los cebadores descritos.

Materiales y métodos

La mezcla se cargó en el QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip kit (ThermoFisher, Ref: A26316) utilizando el QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument con las siguientes condiciones de PCR:

Paso		Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		96°C	10 minutos
39 ciclos	Desnaturalización	98°C	30 segundos
	Alineamiento y elongación	50-60°C	2 minutos
Elongación final		50-60°C	7 minutos
Conservación		10°C	Infinito

Los resultados se analizaron en el QuantStudio™ 3D AnalysisSuite Cloud Software.

4.3.4 Extracción de ARN, síntesis de cADN y PCR en tiempo real

ARN total de pellets celulares fue extraído con el NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel, Alemania, Ref: 740955), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue cuantificado y la calidad comprobada por Nanodrop 2000c Spectrophotometer.

Hasta 1 µg de ARN se retrotranscribió a ADN complementario (cADN) utilizando hexámeros aleatorios como cebadores con el

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Suiza, Ref: 04897030001) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de expresión génica se analizaron por PCR cuantitativa (qPCR) usando el Brilliant-III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, EE. UU., Ref: 600882) en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermofisher, EE. UU.) o un QuantStudio 6 Flex Real-time PCR systems (Thermofisher, EE. UU.). Los parámetros usados para todas las qPCRs fueron los siguientes:

Paso		Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		95°C	2 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	95°C	15 segundos
	Alineamiento y elongación	60°C	30 segundos
Elongación final		60°C	10 minutos
Conservación		4°C	Infinito

Los datos fueron analizados con el método de $2^{-\Delta Ct}$ o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando uno o más genes de referencia en Thermofisher cloud (<https://www.thermofisher.com/account-center/cloud-signin-identifier.html>). Se utilizó GAPDH como gen de referencia a menos que se indique lo contrario. La lista de los cebadores utilizados y sus secuencias estás indicados en la tabla 2.

4.3.5 Cuantificación del número de insertos en ADN genómico

Para calcular la cantidad de insertos de plásmido que se introdujeron en las líneas celulares, se realizó una qPCR a partir de ADN. Se usaron cebadores específicos para el gen de fusión y como control se usó una curva de cantidades conocidas de plásmido pTRE3G-NK5A.

4.3.6 RNA-seq

En la unidad de genómica del centro Genyo se realizó extracción total de ARN con el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, EE. UU.) de tres clones control (iPS4F8 C#1, C#2 y C#18) y de tres clones que expresan la proteína de fusión (iPS4F8 NK5A#26, NK5A#27 y NK5A#29). El ARN fue cuantificado y se verificó su integridad con el Bioanalyzer RNA Nano (Agilent Technologies, EE. UU.) presentando valores adecuados de RIN (Número de integridad de ARN, mínimo de RIN de 7). Las muestras fueron secuenciadas en el Nextseq 500 (Illumina).

La unidad de bioinformática del centro Genyo realizó el primer análisis básico de los resultados de la secuenciación utilizando el programa R (R Core Team, 2020). Se realizó el control de calidad con el paquete FastQC (Fast Quality Control) y se eliminaron las secuencias de los adaptadores y de mala calidad con el paquete

CutAdapt. Se realizó el alineamiento del RNA con el paquete RSEM (Robust Structural Equation Modeling with Missing Data and Auxiliary Variables) con los parámetros por defecto y el genoma de referencia GRCh38.p13. Los transcritos con bajo número de lecturas fueron filtrados con el paquete NOISeq a partir de 0.5 lecturas por millón y los datos fueron normalizados utilizando el paquete edgeR bajo el método TMM (Trimmed Mean of M-values) y los parámetros por defecto. Para el análisis de expresión diferencial se siguió el protocolo estándar del paquete DESeq2 de R y se consideraron como genes diferencialmente expresados aquellos con p -valores < 0.05 y $\log_2\text{FoldChange} > 1$ y < -1 . Los mapas de calor muestran la expresión normalizada y se generaron utilizando el paquete pheatmap. El gráfico tipo volcán se generó con el paquete de R, EnhancedVolcano y representa el $\log_2\text{FoldChange}$ y el p -valor de todos los genes y los que están diferencialmente expresados, están destacados en rojo.

El análisis de enriquecimiento en grupos de genes (del inglés, Gene Set Entichment Analysis, GSEA) se realizó con el programa GSEA. Los genes se ordenaron de acuerdo con el test estadístico Wald obtenido de la expresión diferencial y consiste en el $\log_2\text{FoldChange}$ dividido por su error estándar. Comparamos nuestros listados de genes con la colección de datos del MSigDB CGP: Chemical and genetic perturbations. El análisis de componente principal se generó utilizando las lecturas normalizadas de TMM con la librería de R prcomp y se generó el gráfico con el paquete plot3d. Finalmente, el

Materiales y métodos

análisis de correlación fue generado utilizando el método de Spearman comparando los valores de qPCR del gen de fusión contra los niveles de expresión de los demás genes. Los genes correlacionados por el método de Spearman fueron analizados con el programa enrichR (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) utilizando la base de datos ChEA 2016.

4.4 Técnicas de detección de proteínas

4.4.1 Extracción de proteínas y western blot

Extractos totales de proteína se obtuvieron de pellets celulares usando RIPA buffer (Sigma-Aldrich, EE. UU., Ref: R0278) complementado con cOmplete Mini EDTA-Free Protease inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Ref: 11836170001), inhibidores de proteasas (PMSF y DTT) y fosfatase inhibitor cocktail 2 y 3 (Sigma-Aldrich, Ref: P5726 y P0044). Los pellets de células fueron lisados durante 30 minutos a 4°C y centrifugados a 13.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron reservados para la cuantificación de proteínas. Dicha cuantificación se realizó por el método de Bradford usando el Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-rad, EE. UU., Ref: 5000006) y una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA).

Para la extracción de la fracción de histonas se siguió el protocolo de precipitación ácida de Abcam

(<https://www.abcam.com/protocols/histone-extraction-protocol-for-western-blot>). Se cuantificó la proteína con el método de Bradford.

Las proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida con electroforesis tipo SDS-PAGE y transferida a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente y el anticuerpo secundario fue incubado 1 hora a temperatura ambiente. Para medir la señal del anticuerpo secundario se utilizó el Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor Biosciences, EE. UU.). La β -actina se utilizó como control de carga.

La lista de anticuerpos utilizados para western blot están indicados en la tabla 3.

4.4.2 Inmunofluorescencia

Las células adherentes fueron plaqueadas sobre portaobjetos esterilizados y tratados con matrigel®. Las células se fijaban con 4% para-formaldehído en PBS (PFA) (Merck, EE. UU.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra fue bloqueada y permeabilizada con 5% de BSA (p/v) en PBS1x (solución de bloqueo) y 0.2% triton x-100 (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. En

Materiales y métodos

el caso de la línea en suspensión CHR-288-11, se fijaban en tubo con PFA al 2% durante 20 minutos y se permeabilizaban con 0.5% tritón x-100 (v/v) durante 5 minutos. Las células re suspendidas en PBS se dejaban secar sobre un portaobjetos con polilisina. El bloqueo se realizaba después con 1 hora con solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo primario fue realizada durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo en una cámara húmeda. El anticuerpo secundario se incubaba 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad en solución de bloqueo. Se utilizó como medio de montaje el VECTASHIELD® Antifade Mounting Media (Vector laboratorios, EE. UU., Ref: H-1000-10).

Para detectar y analizar el estado de las mitocondrias, se utilizó el Mitotracker® 633 (ThermoFisher, Ref: M22426, proporcionado por el Dr. José Antonio García Salcedo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron las células con 200 mM de Mitotracker® 633 durante 40 minutos.

Las preparaciones fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A.1 (Leica, Alemania) o el microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Leica). Las imágenes fueron analizadas o procesadas con el software FIJI.¹⁵⁴

La lista de anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia está indicada en la tabla 3.

4.4.3 Citometría de flujo

Las células fueron disociadas con TrypLE™ Express (Invitrogen, EE. UU., Ref: 12604013) y la suspensión de células individuales fue lavada con FACS buffer (PBS1x, 5% FBS y 0.5 mM EDTA). La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente en FACS buffer para la tinción de marcadores de superficie. Las células fueron marcadas con 7-aminoaceticinomicina D (7AAD) para evaluar la viabilidad celular (BD Bioscience, EE. UU.). Para la tinción intracelular, se utilizó el FIX & PERM kit para la fijación y permeabilización (Thermofisher, Ref: GAS003) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de ciclo celular se fijaron las células con etanol al 70% frío. Las células se lavaron con PBS1x frío dos veces y se tiñeron con yoduro de propidio (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Ref: P4170) y RNAase A (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Ref: R6513) durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 minutos a 4°C. El perfil de ciclo celular se analizó utilizando el Software Modfit (Verity Software, EE. UU.).

Para el análisis de apoptosis se utilizó el Annexin-V apoptosis detection kit (BD Bioscience, Ref: 559763) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Materiales y métodos

Para la detección de especies reactivas de oxígeno (del inglés, Reactive Oxygen Species, ROS) se utilizó el DCFDA/H2DCFDA – Cellular ROS Assay Kit (Abcam, Reino Unido, Ref: ab113851, proporcionado por el Dr. Per Anderson) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSVerse® y con el software FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences) o Cytobank.¹⁵⁵

La lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo está indicada en la tabla 3.

4.4.4 Arresto mitótico y co-inmunoprecipitación

Las células fueron arrestadas en metafase utilizando nocodazol (Sigma-Aldrich, Ref: M1404) a una concentración de 1 µg/mL durante 16 horas. Las células se liberaron del arresto durante 1 hora antes de su recolección.

Para la co-inmunoprecipitación (Co-IP) de proteínas, las líneas iPS4F8-C#1 y iPS4F8-NK5A#29 fueron arrestadas en mitosis. Células vivas fueron lavadas con PBS1x frío y se levantaron directamente por métodos físicos en IP-Buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ y 1x PIC). Se incubó la muestra durante 30

minutos a 4°C con rotación y se realizó una centrifugación de 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó la proteína total por el método de Bradford. Se incubó 1 mg de proteína en 500 μ L de IP buffer con 4 μ g del anticuerpo α -KDM5A (Abcam, Ref: ab70892) o IgG inespecífica Rabbit IgG Negative Control (Merckmillipore, EE. UU., Ref: SAB5500149) y con 25 μ L de DynabeadsTM Protein G for Immunoprecipitation (ThermoFisher, Ref: 10003D) durante toda la noche a 4°C con rotación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con IP buffer en el DynaMagTM (ThermoFisher, Ref: 12321D) y para la elución se utilizó Nupage loading buffer (ThermoFisher, Ref: NP0007) suplementado con 50 mM de DTT, calentando la muestra a 70°C durante 15 minutos.

Para testar la Co-IP, un Western Blot se realizó utilizando un 10% de input y un cuarto de la elución de la IP para detectar KDM5A utilizando el mismo α -KDM5A. La interacción con RAE1 fue testada en la misma membrana utilizando el α -mrnp41 (Santa Cruz, EE. UU., Ref: sc-374261).

El resto del eluido fue enviado a la Unidad de Proteómica del servicio central de apoyo a la investigación de la Universidad de Córdoba, España. El servicio limpió, digirió, separó por cromatografía UPLC y analizó en el Thermo Orbitrap Fusion (ThermoFisher, Q-OT-qIT) las muestras, siguiendo protocolos estándar. Además, procesaron los

Materiales y métodos

datos crudos utilizando el programa Proteome Discoverer (ThermoFisher, versión 2.1.0.81).

El análisis para detectar los péptidos se llevó a cabo con R, comparando primero los péptidos obtenidos en la Co-IP con α -KDM5A contra los obtenidos de la Co-IP con IgG inespecífica. Se excluyeron del análisis los péptidos obtenidos en la IP de α -KDM5A de iPS4F8-C#1 y sólo los que aparecen exclusivamente en iPS4F8-NK5A#29 fueron considerados interactores candidatos. Se realizó un análisis de Gene Ontology (GO) en el Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (version 15.0), disponible en línea (www.pantherdb.org). Se utilizó el test de sobrerrepresentación con los parámetros por defecto: Test exacto de Fisher, con corrección FDR para múltiples test y como lista de referencia (Background): Homo sapiens whole genome.

4.4.5 CyTOF

Las células se disociaron con Accumax[®] (Innovative Cell Technologies, EE. UU., Ref: AM-105) a 37°C durante 3-5 minutos y se incubaron con 25 μ M de cisplatino durante 1 minuto a temperatura ambiente para la detección de la muerte celular. Se fijaron las células con 1.6% de PFA durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS y se resuspendieron con Cell staining media (CSM, 1x PBS, 0.5% BSA (p/v), 0.02% azida sódica (p/v) (Sigma-Aldrich, Ref: S2002)). Para detectar los niveles de

transcripción, replicación y traducción, las células se incubaron previamente durante 30 minutos a 37°C con 2mM BrdU, 100 µM IdU y 2 µg/mL puromicina respectivamente siguiendo un protocolo publicado anteriormente.¹⁵⁶

Para analizar hasta 20 muestras al mismo tiempo, se marcaron con distintas combinaciones de tres isotopos del paladio. Se lavaron con PBS1x + 0.02% saponina (PBS/S) y se centrifugaron y se añadieron las mezclas de los isótopos de paladio incubándolos durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se paró la reacción con CSM siguiendo un protocolo publicado anteriormente.¹⁵⁷

Una vez la muestra estaba marcada con el paladio se preparó la mezcla de los anticuerpos en un volumen final de 50 µL de CSM por muestra y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante para la tinción de marcadores de superficie. Se lavaron otra vez con CSM, se resuspendieron con metanol y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Se lavaron dos veces más con CSM y se incubaron con la mezcla de anticuerpos intracelulares 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Se lavaron una vez más con CSM y se re suspendieron en solución intercaladora (1.6% PFA en PBS bajo en bario e 100 nM de Cell-ID™ intercalator-Ir (Fluidigm, Ref: 201192B) para marcar el ADN de las células.

Se centrifugaron las muestras para eliminar la solución intercaladora, se lavaron una vez con CSM y dos veces más con agua

Materiales y métodos

doble destilada (ddH₂O). Para pasar la muestra por el aparato, se diluyó la muestra a 1 millón de células/mL en ddH₂O junto con EQ™ Four Element Calibration Beads (Fluidigim, Ref: SKU 201078) y se filtró a través de un filtro de 40 µm. Para pasar la muestra por el CyTOF 2 Helios (Fluidigim) primero se usaron las EQ™ Four Element Calibration Beads para comprobar que la fluídica era correcta.

Los anticuerpos usados para los análisis del CyTOF, están en la tabla 4.

Los datos provenientes del CyTOF se analizaron utilizando los paquetes de R Bioconductor y FlowCore y el GitHub ParkerICI/premessa. Primero, se normalizan los datos con las Calibration Beads. Después se decodificó el código de barras de los isotopos de platino para la identificación de cada muestra. Los posteriores análisis se realizaron en el programa en línea Cytobank.

4.5 Caracterización celular

4.5.1 Ensayo de fosfatasa alcalina

Para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina se utilizó el Alkaline Phosphatase Detection kit (Sigma-Aldrich, Ref: SCR004) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio ZEISS PALM MicroBeam (Zeiss).

4.5.2 Curva de crecimiento y ensayos de formación de colonias (CFU)

Las células se disociaron utilizando TrypLE™ Express y se contaron. Para la curva de crecimiento se sembraron 50.000 células y se cultivaron en medio E8 suplementado con iROCK. Se contaron las células al día 1, 3 y 5. Al día 5 otras 50.000 células se volvieron a sembrar a otro pocillo y se volvieron a contar al día 8 y 10. Para el ensayo de CFU se sembraron 100, 200 y 400 células y se cultivaron en medio E8 suplementado con iROCK. A los 10 días se fijaron las células con etanol al 96% durante 10 minutos y se tiñeron con cristal violeta (0.05%) durante 30 minutos. La señal infrarroja de las colonias teñidas se midió con el Odyssey Infrared System (LI-COR Bioscience, EEUU).

4.5.3 Cariotipos

Para la citogenética, las células fueron incubadas con 0.1 mg/mL de Colcemid (Sigma-Aldrich, Ref: 10295892001) durante 4 horas. El citoplasma fue eliminado con una solución hipotónica de KCl 0.075 M y los núcleos se fijaron con metanol:acético 3:1 (v/v). Para acabar, las metafases fueron fijadas en portaobjetos. Las bandas G se produjeron por un tratamiento con tripsina-Whrigh (GTG) y un mínimo de 20 metafases se analizaron para cada línea celular. Si se detectó alguna alteración cromosómica en alguna metafase, se aumentó el número de metafases analizadas a 30, asignando una

Materiales y métodos

fórmula cariotípica de acuerdo con la nomenclatura del sistema internacional de citogenética humana (ISCN) del 2016. Los cariotipos fueron analizados utilizando un microscopio Leica DM5500 (Leica) y el Ikaron Karyotyping System (Metasystems, Alemania). Todo el proceso fue realizado en la unidad de control de calidad genético y de biomarcadores del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

4.6 Diferenciaciones celulares

4.6.1 Ensayo de diferenciación por cuerpos embrioides

Para la formación de cuerpos embrioides (del inglés, Embryo body, EB), al cultivo de hPSC previamente se le añade 1 mL de Matrigel® diluido 1:6 en KO-DMEM. Se levantan las colonias de hPSC suavemente con rasqueta, se resuspenden medio E6 (E8 sin FGF2 ni TGFβ) en placas de baja adherencia (Corning, EE. UU., Ref: 3471). Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días por 9 días para extracción de ARN o 21 días para la realización de cortes histológicos. Para cortes histológicos, los EB se centrifugaron, se fijan y se embeben en parafina y se enviaron para su análisis a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Clínico San Cecilio.

4.6.2 Diferenciaciones dirigidas a las tres capas germinales

Para las diferenciaciones a cada una de las capas germinales se usó el StemMACS™ Trilineage Differentiation Kit, Human (Miltenyi Biotec, Ref: 130-115-660) siguiendo las instrucciones del fabricante. A los 6 días de diferenciación se prepararon las células para ser analizadas en el CyTOF 2 Helios (Fluidigm, EE. UU.).

4.6.3 Diferenciaciones hematopoyéticas

Para la obtención de progenitores hematopoyéticos a partir de hPSC se utilizó el STEMdiff™ Hematopoietic kit (STEMCELL® Technologies, Canada, Ref: 05310) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las diferenciaciones se analizaron con citometría de flujo para marcadores de diferenciación a día 3, 8 o 12. Además, a día 12 se recogieron células del experimento para extracción de ARN.

4.7 Análisis estadísticos

Todos los datos están expresando como la media \pm SEM (Error estándar de la media; por sus siglas en inglés). Para las comparaciones entre dos grupos de datos siempre se realizó la prueba de t-Student pareada. Para las comparaciones entre dos o más grupos se realizó la prueba de ANOVA tipo-II. Para los análisis de inmunofluorescencia se realizó el test de Mann-Whitney. Para los

Materiales y métodos

análisis de mitosis y cariotipos aberrantes se realizó el test de Chi-cuadrado. Valores de p-valor < 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001 y **** P< 0.0001.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores.	
Gen	Secuencia 5' – 3'Forward/Reverse
18S rARN	GATGGTAGTCGCCGTGCC / GCCTGCTGCCTTCCTTGG
28S rARN	AGAGGTAAACGGGTGGGGTC / GGGGTCGGGAGGAACGG
45S rARN	GAACGGTGGTGTGTCGTT / GCGTCTCGTCTCGTCTCACT
5.8S rARN	ACTCGGCTCGTGCGTC / GCGACGCTCAGACAGG
5S rARN	GGCCATACCACCCTGAACGC / CAGCACCCGGTATTCCCAGG
AAVS1	CTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCC / TGCAGGGGAACGGGGCTCAGTCTGA
ACTNB	CTTCCTGGGTGAGTGGAGAC / TGAGAGGGAAATGAGGGCAG
APLNR	AAAGCCGACTTGCAAACC / TGGACCAAATTGACCCCTAC
B2M	TGCTTTCTTGCCTGGACAC / CGGCCATTTCCACCATGAT
FOXA1	GTGGCTCCAGGATGTTAGGA / GCCTGAGTTCATGTTGCTGA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC / GGCATGGACTGTGGTCATGAG
HOXA10	AGGTGGACGCTGCGGCTAATCTCTA / GCCCCTCCGAGAGCAGCAAAG
HOXA5	GCCCAACCCAGATCTACC / TCAATCCTCCTTCTGCGGG

HOXA6	CAGCAGTACAAACCCGACA / GGTAGCGGTTGAAGTGGAAC
HOXA7	ATCTACCCCTGGATGCGGTC / TTCGTCCTTATGCTCTTTCTTCCA
HOXA9	ATGGCATTAAACCTGAACCG / GTCTCCGCCGCTCTCATTC
LHA-NK5A	AGGCCTCCAGTATTGTTGCT / CTTGCCAAGGACTCAAACCC
MEIS1	AAGCGTCACAAAAAGCGTGG / ATGGTGAGTCCCGTGTCTTG
MIXL1	GGATCCAGGTATGGTTCCAG / GGAGCACAGTGGTTGAGGAT
NANOG	TGCAGTTCAGCCAAATTCTC / CCTAGTGGTCTGCTGTATTACATTAAGG
NK5A	CCGGAATCCGATGTCAGACC / TTCTAGCTTCCGTTTCCGTTTC
OTX2	GACCCGGTACCCAGACATC / GCTCTTCGATTCTTAAACCATAACC
POU5F1	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA / CCTAGTGGTCTGCTGTATTACATTAAGG
REX1	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAA / GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
RHA-NEOR	TGCTTTCTTTGCCTGGACAC / CGGCCATTTTCCACCATGAT
RPL7	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT / GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA

Materiales y métodos

SOX2	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAG / CTCAGTCCTAGTCTTAAAGAGGCAGC
UBC	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA / CCTAGTGGTCTGCTGTATTACATTAAGG

Tabla 3. Anticuerpos.			
Proteína	Anticuerpo	Referencia	Aplicación
Actnb (Actina)	Mouse Monoclonal Anti- β -Actin	Sigma-Aldrich Cat#A5441	WB
Anexina V	PE Annexin V	BD Biosciences Cat# 556421	CF
CD29	Armenian hamster monoclonal anti-CD29	Invitrogen Cat#17-0291-82	CF
CD31	Mouse Anti-CD31 V450	BD Biosciences Cat#561653	CF
CD33	PE mouse anti-CD33	Miltenyi Biotec Cat#130-113-349	CF
CD34	Mouse Anti-CD34 PE-Cy7	BD Biosciences Cat#560710	CF
CD38	FITC mouse Anti-CD38	BD Biosciences Cat#555459	CF
CD41	PE mouse anti-CD41a	BD Biosciences Cat#555467	CF
CD43	Mouse Anti-CD43 APC	BD Bioscience Cat#560198	CF
CD45	FITC Mouse anti-CD45	BD Biosciences Cat#555482	CF
CD56	PE Mouse Anti-CD56	BD Biosciences Cat#561903	CF
CD61	FITC Mouse anti-CD61	eBioscience Cat#11-0619	CF

Materiales y métodos

CKAE1AE3 (Citoqueratina)	Mouse Anti- CKAE1-AE3	DAKO Cat # M3515	IHC
Flag	Mouse Monoclonal ANTI- FLAG® M2	Sigma Cat#F3165	WB
H2AX	Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb	Cell signalling Cat#9718	CF, WB, IF
H3	Rabbit polyclonal anti-Histone H3	Abcam Cat#ab1791	WB, IF
HIF1A	Mouse Anti- Human HIF-1 α	BD Bioscience Cat# 610959	WB
KDM5A	Rabbit polyclonal anti-KDM5A	Abcam Cat# ab70892	WB, IF, IP
KDR (CD309)	PE Mouse anti- CD309	RyD Cat#FAB357P	CF
Lmnb1 (Lamina B)	Goat anti-Lamin B	Santa Cruz Cat#sc-6216	IF
Ncl (Nucleolina)			IF
NUP98	Rat monoclonal [2H10] anti-NUP98	Abcam Cat#ab50610	WB, IF
Pou5f1	Rabbit anti- POU5F1	Abcam Cat# ab19857	IF
Pou5f1	Mouse Anti-Oct- 3/4	BD PharMingen Cat#611203	CF
RAE1	Mouse Anti- mrnp41	Santa Cruz Cat#sc- 374261,	WB
Ssea3	PE Mouse anti- SSEA3	Invitrogen Cat# AB_10854121	CF
Ssea4	Alexa Fluor® 647 Mouse anti-SSEA-4	BD Biosciences Cat# 560796	CF

Materiales y métodos

Tra-1-60-	Mouse anti-TRA1-60-PE	Thermo Fisher Scientific Cat# 12-8863-82	CF
Tra-1-81	Alexa Fluor® 647 Mouse anti-TRA-1-81	BD Biosciences Cat# 560793	CF
Tubb (Tubulina)	Mouse α Tubulin	Santa Cruz Cat#sc-23948	IF
Tubb-III	Mouse Anti- β -III-Tubulin	Millipore Cat # MAB1637	IHC
Vim (Vimentina)	Mouse Anti-Vimentin (V9)	Roche Cat# 05278139001	IHC
<p>WB: Western blot, CF: Citometría de flujo, IHC: Inmunohistoquímica, IF: Inmunofluorescencia, IP: Inmunoprecipitación</p>			

Tabla 4. Anticuerpos usados para el CyTOF.			
Proteína	Anticuerpo	Metal / peso	Referencia
BrdU	Mouse anti-BrdU	Lu / 175	BD Cat# 555627
CD117	Mouse anti-CD117	Yb / 171	Biolegend Cat# 313202
CD123	Mouse anti-CD123	Nd / 144	Biolegend Cat# 306002
CD13	Mouse anti-CD13	Sm / 152	Biolegend Cat# 301717
CD135	Mouse anti-CD135	Er / 170	BD Pharmingen Cat# 558995
CD19	Mouse anti-CD19	Pr / 141	Biolegend Cat# 302202
CD235a	Mouse anti-CD235	In / 115	Biolegend Cat# 3141001B
CD3	Mouse anti-CD3	Nd / 148	Biolegend Cat# 300414
CD31	Mouse anti-CD31	Yb / 171	BioLegend Cat#303102
CD326	Mouse anti-CD326	Eu / 153	BioLegend Cat#324202
CD33	Mouse anti-CD33	Gd / 158	BioLegend Cat# 303419
CD34	Mouse anti-CD34	Nd / 148	Biolegend Cat# 343531
CD41	Mouse anti-CD41	Dy / 164	Biolegend Cat#

Materiales y métodos

			303702
CD43	Mouse anti-CD43	Er / 167	Biolegend Cat# 343202
CD45	Mouse anti-CD45	Y / 89	Biolegend Cat# 304002
CD61	Mouse anti-CD61	In / 113	Biolegend Cat# 306402
CD7	Mouse anti-CD7	Dy / 162	Biolegend Cat# 343102
CD73	Mouse anti-CD73	Sm / 150	Biolegend Cat# 344002
Ciclina B1	Mouse anti-Cyclin B1	Dy / 162	BD Cat#554177
Cpt1a	Mouse anti-CPT1A	Yb / 173	Abcam Cat#ab128568
Eomes	Rabbit anti-EOMES	Er / 166	CST Cat#81493
Gata1	Rabbit anti-GATA1	Dy / 162	CST Cat# 3535
Gata2	Mouse anti-GATA2	Er / 166	Abnova Cat#H00002624- M01
Gata3	Mouse anti-GATA3	Ho / 165	BD Cat#558686
Gata4	Mouse anti-GATA4	Sm / 154	BD Cat#560327
Gata6	Rabbit anti-GATA6	Gd / 160	CST Cat#5851
H3K27ac	Rabbit anti-H3K27ac	Sm / 149	CST Cat#8173
H3K27me3	Rabbit anti-H3K27me3	Yb / 172	CST Cat#9733
H3K4me3	Rabbit anti-H3K4me3	Sm / 154	CST Cat#9727
Hand1	Goat ant-HAND1	Nd / 144	R&D

Materiales y métodos

			Cat#AF3168
HIF1A	Mouse anti-HIF1 alpha	Gd / 155	Abcam Cat#ab1
HLA-DR	Mouse anti-HLA-DR	Yb / 174	Biolegend Cat# 307651
Islet1	Goat anti-ISLET1	Nd / 145	RND Systems Cat#AF1837
Kdr (CD309)	Mouse anti-VEGFR2/KDR	Tb / 159	R&D Cat#MAB3572
Ki67	Mouse anti-Ki-67	Gd / 152	BD Cat# 556003
Lin28a	Rabbit anti-LIN28A	Er / 167	CST Cat#8641
Mtco1	Rabbit anti-MTCO1	Gd / 158	Abcam Cat#ab213648
Nanog	Rabbit anti-Nanog	Tb / 159	CST Cat#4903S
p-H2AX	Mouse anti-p-H2AX	Pr / 141	Millipore Cat#05-636
Pbx1	Rabbit anti-PBX1	Gd / 156	CST customized 4342
pHH3	Rabbit anti-p-HH3	In / 113	CST Cat#3377BF
Pou5f1	Mouse anti-Oct3/4	Nd / 150	BD Cat#561555
Prdm14	Mouse anti-PRDM14	Sm / 149	R&D Cat#MAB6175
Pu.1	Mouse anti-PU.1	Nd / 146	BioLegend Cat#658002
Puromicina	Mouse anti-Puromycin	Gd / 158	Milltenyl Cat#MABE343
Runx1	Mouse anti-RUNX1	Gd / 155	BioLegend Cat#659302
Sox2	Rabbit anti-SOX2	Dy / 163	CST Cat#3579
Ssea3	Rat anti-SSEA-3	Ho / 165	BioLegend Cat#330302
T	Goat anti-Brachyury	Nd / 143	R&D Cat#AF2085

5. Resultados

5.1 Objetivo 1. Generación de la translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ usando el sistema CRISPR-Cas9 en células pluripotentes humanas.

Este objetivo se centra en generar la translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)$, que da lugar al gen de fusión *NUP98-KDM5A*, en la línea de hESC H9 mediante el sistema CRISPR-Cas9.

5.1.1. Diseño, Síntesis y clonaje de los ARN guías

Para poder generar la translocación que origina la proteína de fusión *NUP98-KDM5A* se diseñaron 2 ARN guías (sgRNA, del inglés small guide RNAs) que hibridan con secuencias de los intrones de los genes involucrados en la translocación $t(11;12)(p15;p13)$, que han sido reportados en los pacientes. Los ARN guías son específicos para el intrón 14 de *NUP98* en el cromosoma 11 y para el intrón 26 de *KDM5A* en el cromosoma 12 (Fig. 14A).

Las secuencias escogidas para los sgRNA se sintetizaron como gBlocks (fragmentos de ADN) en la compañía IDT. Combinaciones de estos sgRNA se han clonado en el vector pCAG, que contiene el gen de la nucleasa Cas9 y el reportero GFP (del inglés, Green Fluorescent

Protein). Este reportero nos sirvió para identificar las células donde se está expresando la nucleasa Cas9 junto a los sgRNAs (Fig. 14B).

De esta manera hemos obtenido 4 vectores diferentes:

- pCAG1: sgRNA1 NUP98 + sgRNA1 KDM5A
- pCAG2: sgRNA1 NUP98 + sgRNA2 KDM5A
- pCAG3: sgRNA2 NUP98 + sgRNA1 KDM5A
- pCAG4: sgRNA2 NUP98 + sgRNA2 KDM5A

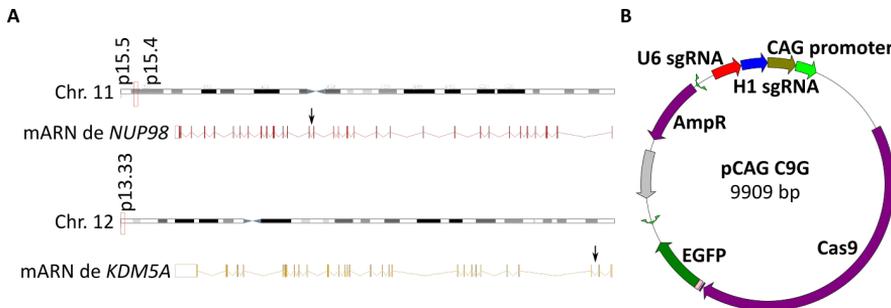


Figura 14. Plásmidos para la generación de la translocación t(11;12). (A) Esquema de la posición de las secuencias diana en los cromosomas 11 y 12 usados para la edición génica. (B) Esquema del plásmido pCAG C9G que contiene la nucleasa Cas9, los dos guías de ARN y el gen EGFP para la selección.

Con estos plásmidos conseguimos que la Cas9 corte en ambos cromosomas al mismo tiempo y por reparación NHEJ se produce la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ generando el gen de fusión con los primeros 14 exones de *NUP98* y los últimos dos exones de *KDM5A*.

Resultados

Los plásmidos se verificaron por ensayos de restricción y secuenciación, tras lo cual se hicieron preparaciones estériles de alta pureza y concentración para su transfección en células.

5.1.2. Determinación de la eficiencia de los sgRNA para generar la translocación t(11;12)(p15;p13) en células HEK-293 y seleccionar los más eficientes

Antes de abordar la generación de la translocación t(11;12)(p15;p13) en hPSC determinamos cuál es la mejor combinación de sgRNAs que produce de forma más eficiente y específica esta translocación en las células embrionarias de riñón humano HEK-293, que es un sistema celular humano más fácil de manejar.

Se procedió a la transfección de los plásmidos con las distintas combinaciones de sgRNA (pCAG1-4) con cloruro de calcio. A las 48 horas después de la transfección, se tomaron imágenes de microscopía en campo claro y de fluorescencia para visualizar la GFP (Fig. 15A). Una fracción de esas mismas células se analizó por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células GFP+ y determinar la eficiencia de transfección de los distintos plásmidos. Los porcentajes obtenidos de células GFP+ oscilaron entre el 61-63% en todas las condiciones por lo que no hay ninguna diferencia en la eficiencia de transfección de los distintos plásmidos. (Fig. 15B).

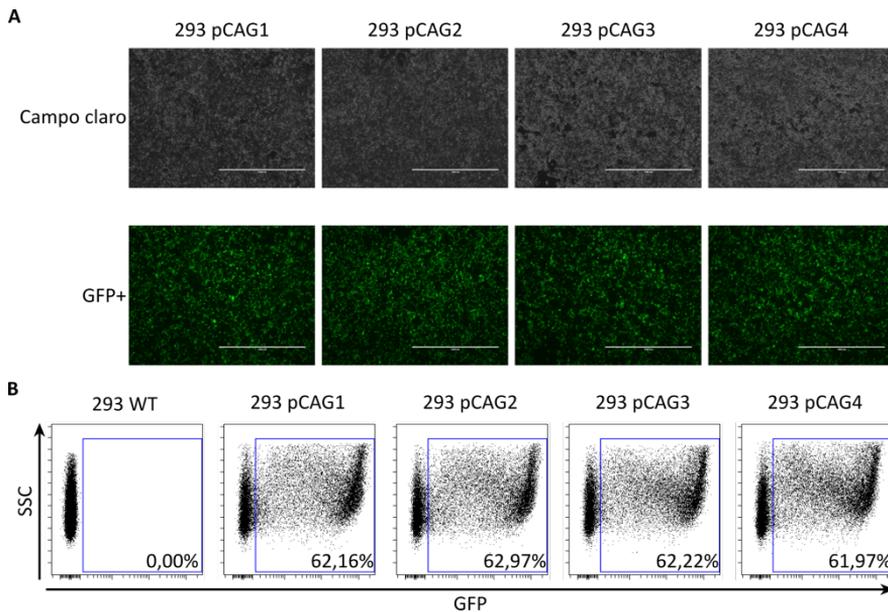


Figura 15. Transfección de los plásmidos pCAG 1 – 4 en células HEK-293. (A) Imágenes en campo claro y fluorescencia para visualizar la GFP a las 48 horas post-transfección. Escala = 1000 μ m. (B) Análisis de la expresión de la GFP mediante citometría de flujo.

5.1.3. Optimización de herramientas de biología molecular para la detección del gen de fusión NUP98-KDM5A

La expresión de la GFP en las células transfectadas indica que, al menos teóricamente, también se expresan la nucleasa Cas9 y los sgRNAs, por lo que es probable que ocurra la edición génica. Para detectar el evento de translocación cromosómica diseñamos dos estrategias de detección del ADN del gen de fusión resultante.

Resultados

5.1.3.1 Detección por PCR

Para poder comprobar la generación de la translocación, se diseñaron cebadores específicos para detectar los productos del gen de fusión esperados tras la edición génica. Utilizando ADN genómico de las líneas de HEK 293 generadas, se analizó por PCR la presencia de *NUP98-KDM5A*. En la Figura 16A se pueden observar los tamaños de producto esperados para cada una de las translocaciones producidas por cada combinación de sgRNAs. Sólo se observó el producto esperado de 236bp en la línea de HEK 293 transfectadas con pCAG1 (293 pCAG1) (Fig. 16B). En el resto de las muestras se obtuvieron productos de PCR inespecíficos (Fig. 16B). El ADN de las células HEK 293 sin editar (293 WT) se usó como control negativo, para comprobar que los cebadores no amplifican ninguno de los productos esperados tras la edición génica (Fig. 16B). El producto de PCR que se obtuvo de las células 293 pCAG1 fue purificado y secuenciado con los mismos cebadores. Tanto para la región de *NUP98* como para la de *KDM5A* obtuvimos la secuencia sin errores hasta que a unos 10 pares de bases antes de la zona de corte de la Cas9 se podían observar secuencias solapadas, lo que significa que había lecturas múltiples de la secuencia (Fig. 16C y D).

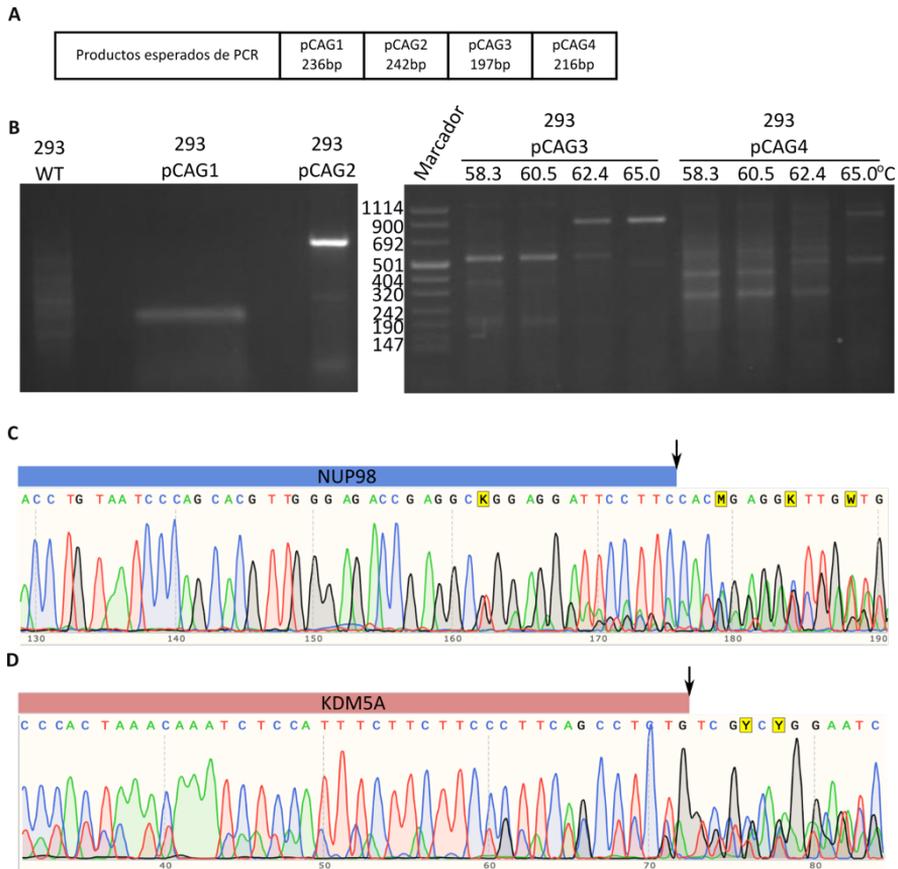


Figura 16. Comprobación de la edición génica en células HEK-293 por PCR y secuenciación. (A) Tamaño de los productos de PCR esperados para cada una de las translocaciones producidas. (B) Gel de agarosa para comprobar la edición génica de ADN genómico de las células sin editar (293 WT) y las células editadas con los distintos plásmidos (293 pCAG1-4). (C) Secuenciación del producto de PCR de la muestra 293 pCAG1 para detectar la secuencia de *NUP98*. (D) Secuenciación del producto de PCR de la muestra 293 pCAG1 para detectar la secuencia de *KDM5A*. Con una flecha resaltado el punto de rotura.

Resultados

Para poder secuenciar de forma correcta un único producto de PCR procedente de las células editadas y poder observar el punto de rotura exacto en estas células, decidimos utilizar el sistema de clonaje AT en bacterias. Realizamos una ligación del producto de PCR producido con el ADN de 293 pCAG1, con extremos acabados en adenina, con el plásmido linealizado pGENT con extremos que acaban en timina. Los productos se clonaron en *E. Coli.* y se secuenciaron 10 clones de bacterias realizándose un análisis de múltiples secuencias usando el software de Comparación de Secuencias Múltiples por Log-Expectativa MUSCLE ([https://hmong.es/wiki/MUSCLE_\(alignment_software\)](https://hmong.es/wiki/MUSCLE_(alignment_software))) teniendo como referencia la secuencia teórica de la translocación. Las secuencias analizadas mostraron similitud al inicio y final mientras que en las zonas centrales cerca del punto de rotura se detectaron inserciones y deleciones procedentes del efecto de la edición génica (Fig. 17A). En la figura 17B, se puede observar la secuencia de *NUP98* seguida de la secuencia de *KDM5A* en uno de los productos de PCR proveniente del ADN de células HEK-293 editadas con el plásmido pCAG1, observándose el punto de rotura único para cada translocación. Estos resultados indican que el plásmido pCAG1 es capaz de generar la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ habiéndose obtenido secuenciaciones con las secuencias de *NUP98* seguidas de *KDM5A*.

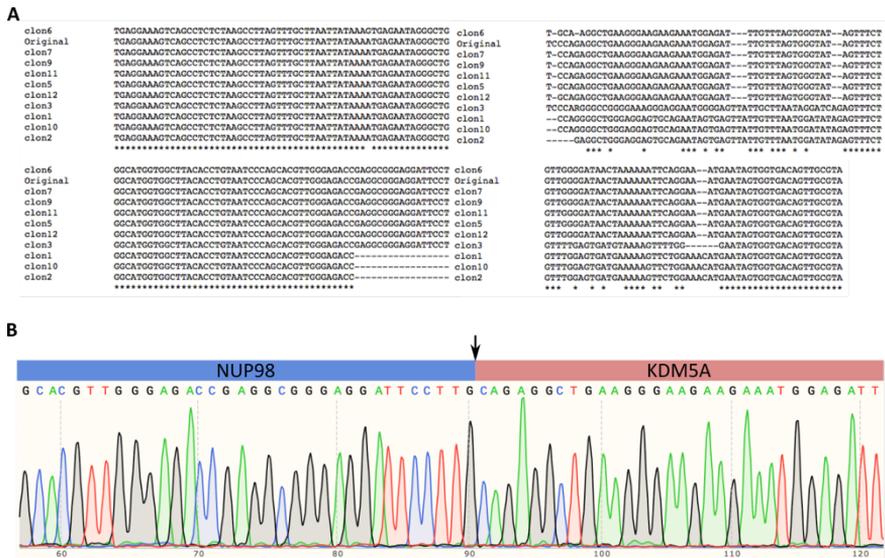


Figura 17. Comprobación de la edición génica en células HEK-293 a través de un clonaje AT y secuenciación. (A) Análisis por el programa en línea MUSCLE de 10 productos de PCR obtenidos a partir del ADN de células HEK-293 pCAG1 y clonados con un clonaje AT en E. Coli. Se muestra con asterisco las regiones totalmente alineadas. (B) Secuenciación de un producto único de PCR de la muestra 293 pCAG1 para detectar la secuencia de NUP98 y KDM5A.

5.1.3.2 Detección por PCR digital (dPCR)

La PCR digital (dPCR, por sus siglas en inglés) es una técnica molecular que permite la cuantificación absoluta de secuencias de ADN a partir de la división en hasta 20000 pocillos de la reacción de PCR. Presenta una alta sensibilidad siendo muy útil a la hora de detectar mutaciones raras además de posibilitar el cálculo de su

Resultados

frecuencia y poder determinar en qué proporción se produce la translocación en nuestras células (Fig. 18A).

Para el diseño de una sonda específica que permita la detección de la translocación por dPCR por señal de un fluoróforo FAM, usamos las secuencias de los productos de PCR obtenidas previamente (Fig. 17A). De esta manera la sonda era capaz de unirse a todas las posibles secuencias generadas de la translocación (Fig. 18B). Esta sonda no puede medir más de 30 pares de bases para que no se produzca señal de fondo al estar demasiado lejos el fluoróforo y el *quencher*.

Para la realización de la dPCR es necesario el material genético que se quiera analizar y las sondas que reconozcan las secuencias de interés. Para la optimización usamos el ADN de células 293 pCAG1, HEK-293 sin transfectar (293 WT) y como control positivo, una mezcla del ADN de células 293 WT con una dilución $1/10^6$ del producto de PCR de las 293 pCAG1. Las sondas utilizadas fueron la sonda específica para el gen de fusión unida al fluoróforo FAM (NK5A - FAM) y el gen control RNaseP unido a un fluoróforo VIC (RNaseP - VIC).

Los datos de la dPCR se generan en forma de un gráfico de puntos, donde cada punto representa un pocillo y ofrece las señales de cada uno de los fluoróforos analizados. El control positivo resultó con señal para ambos fluorocromos, tanto para el gen RNaseP, presente en todas las células humanas como para el gen de fusión, ya que

habíamos introducido el producto de PCR procedente de la edición génica de las 293 pCAG1 como control positivo. (Fig. 18C, primer panel). El ADN de 293 WT sólo dio señal para RNaseP y no dio señal para NK5A (Fig. 18C, segundo panel). Por último, la muestra de 293 pCAG1 dio señal para RNaseP y señal baja pero positiva para NK5A, indicando que se detectó la translocación (Fig. 18C, tercer panel). Al observar la baja señal de NK5A, decidimos observar los perfiles de amplificación de las sondas juntas y por separado, pudiéndose observar una mayor amplificación de la sonda NK5A por separado (Fig. 18D). Por ese motivo decidimos repetir la dPCR con los ADNs de 293 WT y 293 pCAG1 sólo usando la sonda NK5A. Seguía sin aparecer señal positiva en la muestra 293 WT y sólo usando la sonda NK5A, se obtuvo una señal más clara en 293 pCAG1 (Fig. 18E). Conociendo la cantidad de ADN genómico que se utilizó y el número de eventos detectados por la dPCR, estimamos que se había producido la translocación en 1 de cada 4000 células. Esta técnica nos resultará útil para determinar el número de células editadas y programar los experimentos de generación de líneas clonales.

5.1.4 Generación de la translocación t(11;12)(p15;p13)(p15;p13) en células pluripotentes humanas

5.1.4.1. Transfección del plásmido pCAG1 en la línea celular H9

Realizamos una transfección con lípidos catiónicos del plásmido pCAG1 en la línea de hESC H9 (WA09, WiCell). Realizamos un seguimiento de los niveles de GFP durante 48h y observamos que los niveles de GFP descienden a partir de las 24h ya que el plásmido y su expresión es transitoria en las células. El pico de señal de GFP se produce a las 24h post-transfección (Fig. 19A). A las 24h post-transfección realizamos una separación celular por sorter, separando células GFP+, de células GFP- para poder enriquecer la población donde pudo haber ocurrido la edición génica. En las células H9 transfectadas con el plásmido pCAG1 (H9 pCAG1) obtuvimos un 18.94% de células GFP+ (Fig. 19B). La mitad de las células H9 pCAG1 GFP+ se mantuvo en cultivo y otra se procesó para obtener ADN. Para comprobar si en las células GFP+ había ocurrido el evento de translocación cromosómica realizamos una PCR, utilizando como control negativo tanto ADN de las células H9 WT, como de las H9 pCAG1 GFP – y como control positivo, ADN de las células 293 pCAG1. Se obtuvo la banda de amplificación esperada de 236bp en el control positivo y en la muestra H9 pCAG1 GFP+, demostrando que se había generado la translocación en las células H9 (Fig. 19C). Para determinar si el evento de translocación se mantenía en las células H9 pCAG1 GFP+ sorteadas que se habían

Resultados

cultivado, se hizo un seguimiento mediante la obtención de ADN de las células al momento del subcultivo y se realizó una nueva PCR. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la banda correspondiente a la translocación $t(11;12)(p15;p13)$ a partir del primer pase (Fig. 19D), probablemente porque dicha translocación podía conferir una desventaja en cultivo o las células se veían arrestadas en el ciclo celular evitando su expansión.

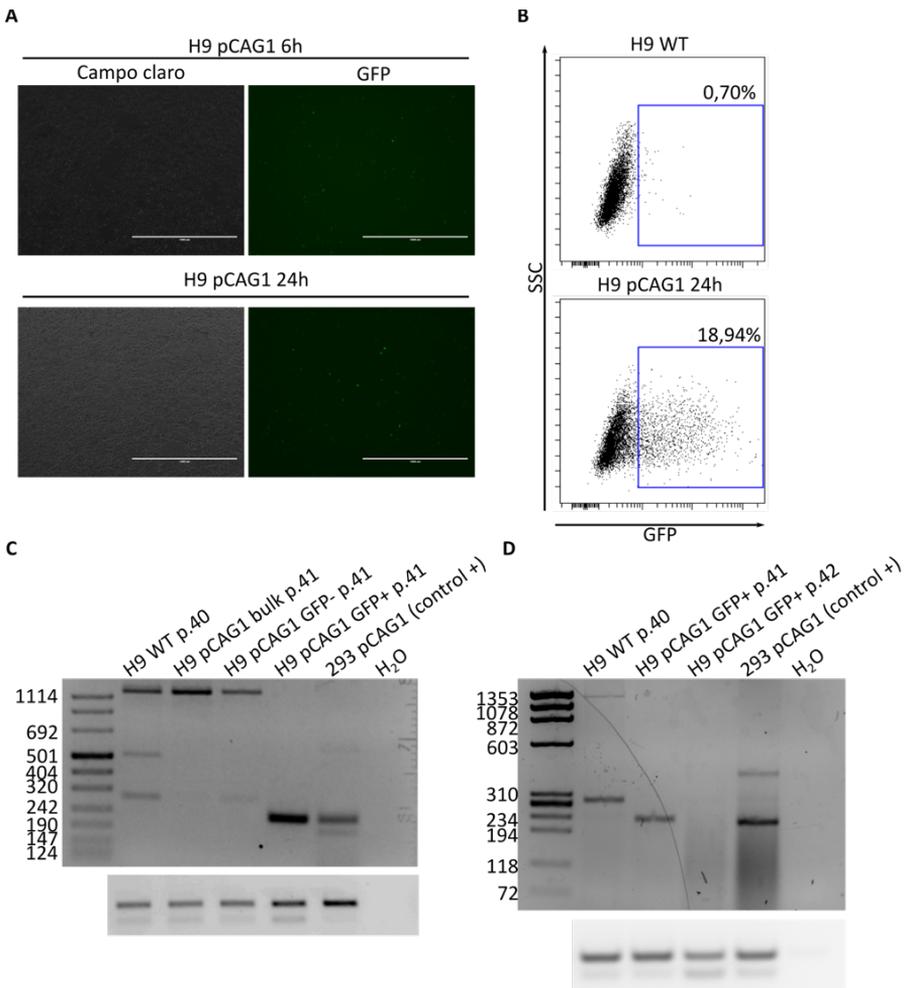


Figura 19. Generación de la translocación t(11;12) hPSC y comprobación por PCR. (A) Imágenes de campo claro y microscopia de fluorescencia de células H9 transfectadas con el plásmido pCAG1 a 6 y 24h post-transfección. Escala = 1000µm. (B) Citometría de flujo de GFP en las células transfectadas a las 24 horas. (C) Gel de agarosa de NK5A para comprobar la edición génica en ADN genómico de las células sin editar (H9 WT) y las células editadas sin sortear (H9 pCAG1 bulk) y sorteadas (GFP +/-). Las 293 pCAG1 fueron usadas de control +. (D) Gel de agarosa de NK5A con para comprobar la edición génica en ADN genómico de las células sorteadas (GFP +) un pase después. Las 293 pCAG1 fueron usadas de control +. El gen de la actina fue usado como control.

5.1.4.2. Nucleofección con ribonucleopartículas (RNP)

Al no ser capaces de mantener la translocación en las células hPSC, decidimos cambiar de estrategia de generación de la translocación utilizando las ribonucleopartículas (RNP). En este caso, son unos complejos RNA-proteína que combinan un crRNA que reconoce la secuencia diana en el genoma, un tracrRNA que permite la unión del complejo y la nucleasa Cas9.

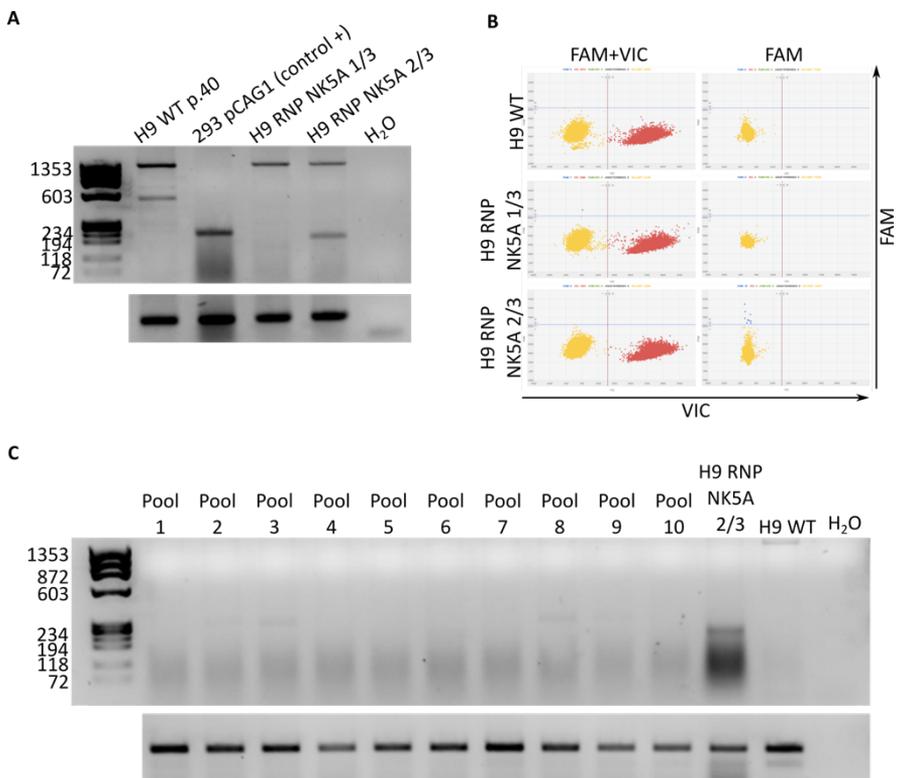
Se ha demostrado como las RNPs producen menor citotoxicidad que los plásmidos en células embrionarias humanas¹⁵⁸. Además de aumentar la eficiencia de la edición ya que se introduce

Resultados

directamente el complejo que realiza la edición a diferencia del plásmido que tiene que ser transcrito.¹⁵⁹

Diseñamos ARN guías para su acoplamiento a la nucleasa Cas9 para la generación de RNP. Una vez generadas, las introdujimos en las H9 a través de nucleofección. Las células generadas se separaron en dos pocillos para probar la supervivencia de distintas densidades de células en el pocillo y se expandieron en cultivo. Lo primero que se hizo fue una PCR y se obtuvo la misma banda de 236bp que en las células 293 pCAG1 en la muestra H9 RNP NK5A 2/3 (El pocillo con 2/3 de las células nucleofectadas, Fig. 20A). También se realizó la dPCR correspondiente para poder determinar el número de células editadas y preparar la estrategia de generación de líneas clonales. Se utilizaron las sondas por separado, para que no interfirieran entre ellas y mejorar la sensibilidad de la técnica. No se obtuvo señal de NK5A ni en las células H9 WT ni en las H9 RNP NK5A 1/3, pero si en las H9 RNP NK5A 2/3, por lo que se puede concluir que la edición se ha producido en las células H9 (Fig. 20B). Los cálculos para saber cuántas células contenían la translocación resultaron que aproximadamente 1 de cada 7400 células eran positivas para la edición génica. Por último, generamos pequeños grupos de 1000 células (pools) provenientes de H9 RNP NK5A 2/3 para intentar enriquecer el cultivo en células positivas ya que vistos los datos anteriores no era viable ir directamente con una generación de clones por dilución límite. Se realizó la PCR para detectar la translocación y no se obtuvo ninguna banda en los pools generados

(Fig. 20C). Al no haber sido capaces de mantener la translocación en el cultivo ni con una eficiencia suficiente decidimos abandonar la generación de este modelo de la enfermedad y pasar a una aproximación más sencilla, la generación de un modelo de expresión constitutiva a través de la edición por lentivirus.



Resultados

Figura 20. Generación de la translocación t(11;12) en hPSC utilizando ribonucleopartículas. (A) Gel de agarosa con para comprobar la edición génica en ADN genómico de las células sin editar (H9 WT) y las células editadas por RNP. Las 293 pCAG1 fueron usadas de control + y el gen de actina como control. (B) Técnica de dPCR para detectar la translocación en células H9 utilizando la sonda para la translocación unida a FAM y la sonda para el gen RNaseP unida a VIC por separado. (C) Gel de agarosa para comprobar la edición génica en ADN genómico de las células sin editar (H9 WT) y distintos pools de H9 editadas. Las H9 RNP NK5A fueron usadas de control + y el gen de la actina como

5.2 Objetivo 2. Desarrollo de un modelo de células pluripotentes humanas con expresión constitutiva del gen de fusión NUP98-KDM5A

Este objetivo se centra en generar un modelo de expresión constitutiva del gen de fusión *NUP98-KDM5A* en hPSC y estudiar su efecto en el estadio pluripotente y la diferenciación.

5.2.1. Generación de líneas hPSC-NK5A

Dado que no obtuvimos un cultivo estable de las hPSC con la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13), decidimos generar líneas estables con expresión constitutiva del gen de fusión a través de la utilización de lentivirus (hPSC-NK5A). El Dr. David Allis (Rockefeller University, NY) amablemente nos proporcionó el plásmido pMSCV que contenía el cDNA de NK5A (Figura 21A). Para la expresión constitutiva en hPSC clonamos la secuencia de NK5A en el plásmido pRRL-EF1a-PGK Neo (Figura 21B) ampliamente usado en el laboratorio. Este plásmido contiene dos promotores constitutivos, el promotor mPGK que controla la expresión del gen de resistencia a neomicina (NeoR) y el promotor EF1 α , que controla la expresión de NK5A. Se confirmó mediante enzimas de digestión que el inserto estaba correctamente clonado observándose el fragmento de 2.2 kb (Figura 21C) y se verificó que la secuencia del gen de fusión era correcta por secuenciación Sanger. Para la producción de partículas lentivirales se transfectaron células HEK-293T mediante cloruro de calcio con los plásmidos empaquetadores (psPAX y pCMV-VSV-G). Generamos lentivirus con el plásmido pRRL-

Resultados

EF1a-PGK-Neo vacío (pRRL-Control) y con el plásmido con la secuencia del gen de fusión

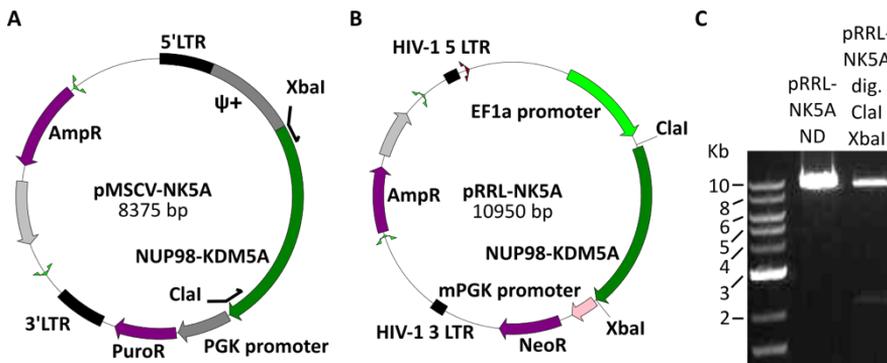


Figura 21. Clonaje del plásmido pRRL-NK5A. (A) Esquema del plásmido pMSCV-NK5A y la localización de los cebadores. (B) Esquema del plásmido pRRL-NK5A después de la ligación. (C) Patrón de corte del pRRL-NK5A (ND, Sin digerir) y digerido con ClaI y XbaI.

(pRRL-NK5A) (Fig. 22). Los lentivirus se utilizaron para infectar tres líneas de hPSC: una línea de hESC H9 y dos líneas de hiPSC generadas en el laboratorio PBMC1-iPS4F1 (iCMN.1)¹⁶⁰ y PBMC2-iPS4F8 (iPS4F8).¹⁶¹ Después de la infección con las partículas lentivirales, cambiamos el medio y 3 días después iniciamos la selección de las células transducidas con neomicina.

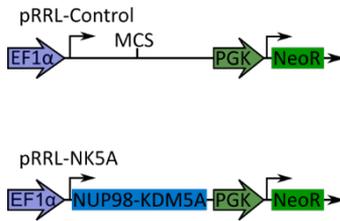


Figura 22. Esquema de los insertos introducidos en las líneas celulares para generar los controles (pRRL-Control) y las que expresan NK5A (pRRL-NK5A).

5.2.2. Caracterización de las líneas hPSC-NK5A

Una vez obtenidas líneas transgénicas estables proseguimos a su caracterización básica. La morfología de las nuevas líneas era la típica de las hPSC, formando colonias compactas con células pequeñas de núcleos prominentes (Fig. 23A) que exhiben actividad de la enzima fosfatasa alcalina (Fig. 23B). Posteriormente realizamos un análisis inmunofenotípico de marcadores de superficie específicos de hPSC mediante citometría de flujo: SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81. Además, analizamos la expresión del factor de transcripción POU5F1. Como se ve en la figura 23C, todas las líneas expresaron todos los marcadores, aunque observamos variaciones en los niveles de expresión, lo cual ocurre con frecuencia en el cultivo de hPSC, donde se han descrito poblaciones heterogéneas en cuanto a la expresión de estos marcadores.¹⁶² Por qPCR analizamos en las hPSC-NK5A la expresión de los 4 factores de transcripción clave para el mantenimiento de la pluripotencia: *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* y *REX1*. Todas las líneas expresaron los 4 genes a niveles de expresión comparables entre la línea que expresa el gen de fusión con respecto a su línea control (Fig. 23D).

Resultados

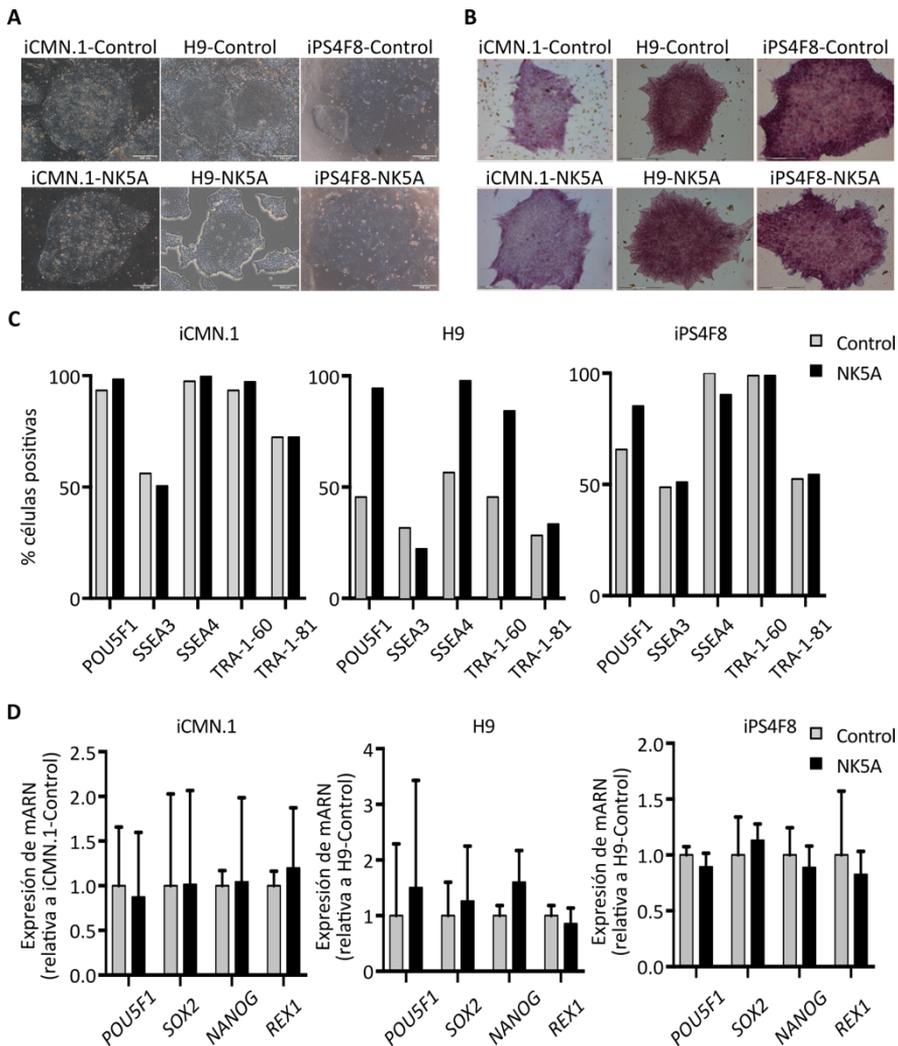


Figura 23. Caracterización de las líneas hPSC-NK5A en estado indiferenciado. (A) Imágenes de campo claro. Objetivo: 4x. Escala: 500µm. (B) Imágenes de la actividad de fosfatasa alcalina. Objetivo: 4x. Escala 150µm. (C) Citometrías de flujo para marcadores de pluripotencia (D) RT-qPCR de genes de pluripotencia.

Para la detección del gen de fusión en las líneas hPSC-NK5A se diseñaron dos cebadores, uno para la secuencia de *NUP98* y otra para la secuencia de *KDM5A* (Fig. 24A), de manera que el producto de la PCR solo pueda aparecer en las líneas con expresión de NK5A.

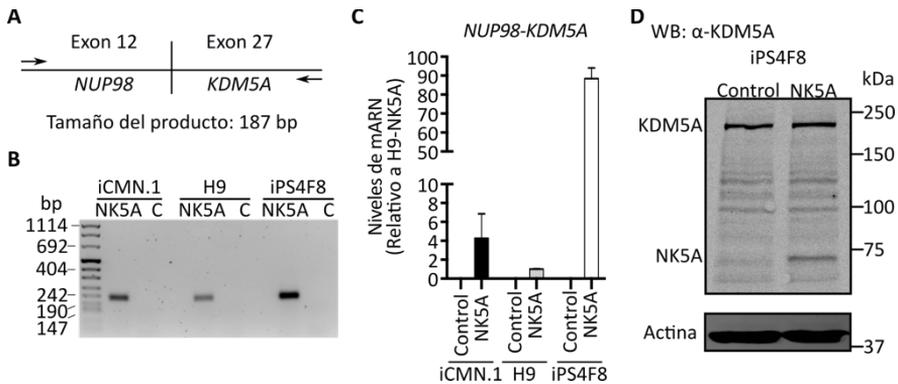


Figura 24. Detección y cuantificación de NUP98-KDM5A. (A) Esquema de los cebadores utilizados para la detección específica del gen de fusión. (B) Gel de agarosa con los productos de qPCR. (C) Niveles de expresión del mRNA de NK5A en las distintas líneas generadas. (D) WB contra KDM5A de las líneas iPS4F8-Control y NK5A. Se usó Actina como control de carga.

Se realizó una qPCR y se corrieron los productos de NK5A en un gel de agarosa, siendo visible un único producto del tamaño esperado para las tres líneas celulares que expresan NK5A e indetectable en las líneas control (Fig. 24B). Además, determinamos la expresión del NK5A en cada línea y observamos que la línea con menor expresión

Resultados

es la H9-NK5A, la línea iCMN.1-NK5A expresaba unas 4 veces más que la H9-NK5A y la iPS4F8 alrededor de 90 veces más (Fig. 24C).

Para analizar la expresión de NK5A a nivel de proteína, realizamos un Western blot con un anticuerpo dirigidos contra KDM5A y únicamente en la línea iPS4F8-NK5A pudimos detectar la proteína de fusión (peso esperado, 71kDa) además de la proteína KDM5A endógena (196 KDa) (Fig. 24D).

Posteriormente estudiamos la expresión de KDM5A endógeno y la proteína de fusión mediante inmunofluorescencia en las líneas hPSC-NK5A usando el mismo anticuerpo anti-KDM5A usado en el WB. Tanto en la muestra H9-Control como en la iPS4F8-Control se observó una tinción punteada indicando la expresión normal de KDM5A (Figura 25). Sin embargo, en líneas que expresan NK5A observamos heterogeneidad en la tinción donde unas células expresaban niveles similares a los controles y otras con mayor intensidad de señal. Además era evidente que en la línea iPS4F8-NK5A era la que tenía un mayor número de células con alta intensidad en la tinción, y dado que esta misma línea era la que expresaba mayores niveles de NK5A a nivel de RNA y en la que pudimos detectar la fusión por WB, este resultado sugería que solo algunas células dentro del cultivo expresaban el gen de fusión: las que presentaban una mayor intensidad en la señal como resultado de la suma de señales de la expresión del KDM5A endógeno y la proteína de fusión en NK5A (Figura 25). Determinando el nivel de

señal basal del KDM5A endógeno con las células de menor intensidad, realizamos un conteo de las células que tenían una alta intensidad en la tinción y determinamos que el 7% de células H9-NK5A y el 25% de iPS4F8-NK5A estarían expresando el gen de fusión.

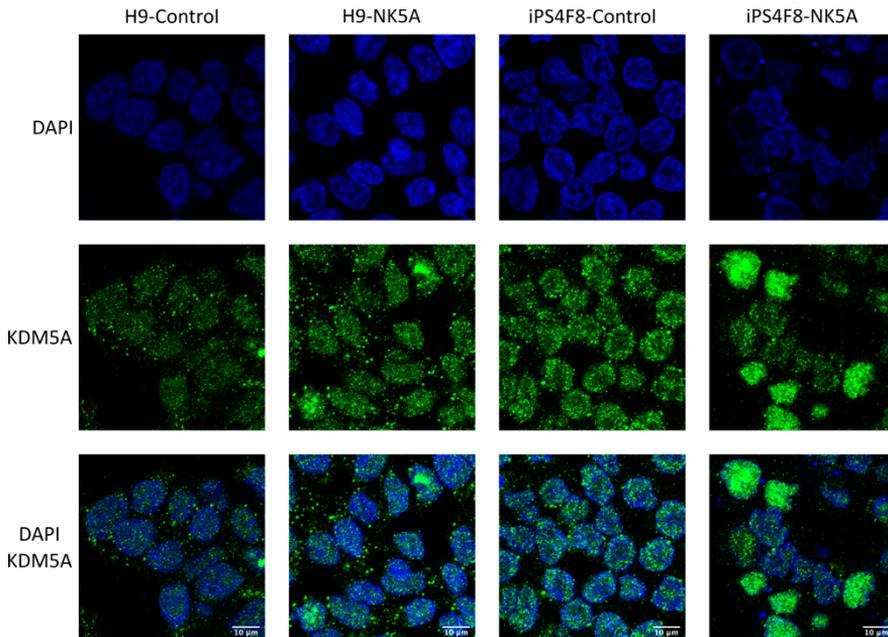


Figura 25. Inmunofluorescencia detectando KDM5A y NUP98-KDM5A en las líneas H9 e iPS4F8 Control y NK5A. Escala: 10 μ m.

Por último, analizamos el cariotipo de las líneas hPSC-NK5A establecidas. Las líneas H9-control y H9-NK5A presentaron cariotipo normal femenino (Fig. 26). La línea iCMN.1 presentó una translocación entre el cromosoma 1 y 14 tanto en la iCMN.1-Control como en la iCMN.1-NK5A, por lo que suponemos que la alteración genómica estaba presente en la línea de origen y decidimos no

Resultados

continuar el estudio de esta línea. La línea iPS4F8-control mostró un cariotipo normal, sin embargo, la línea iPS4F8-NK5A mostró un cariotipo en mosaico, donde un 54% de células tenían un cariotipo normal, 19% de células presentaban una translocación entre el cromosoma 1 y 11 y 27% de células una translocación con el cromosoma 2 y otro cromosoma sin identificar (Fig. 26).

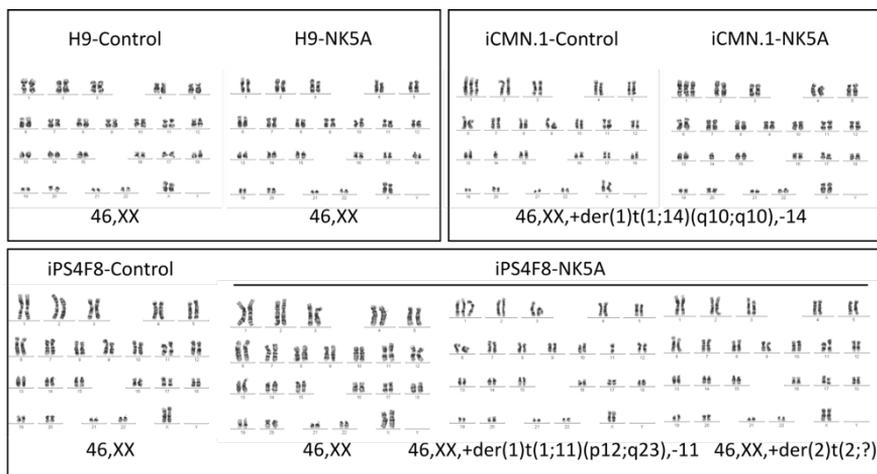


Figura 26. Cariotipos de las líneas generadas.

5.2.3. Generación de línea clonales hPSC-NK5A

Nuestros resultados de inmunofluorescencia y citogenética nos indicaban que las líneas hPSC-NK5A constituían cultivos heterogéneos en donde solo una proporción de células expresaba el gen de fusión, por lo que decidimos generar clones y obtener cultivos homogéneos de células con expresión de NK5A. Para la línea H9-NK5A decidimos seleccionar grupos de células enriquecidos en

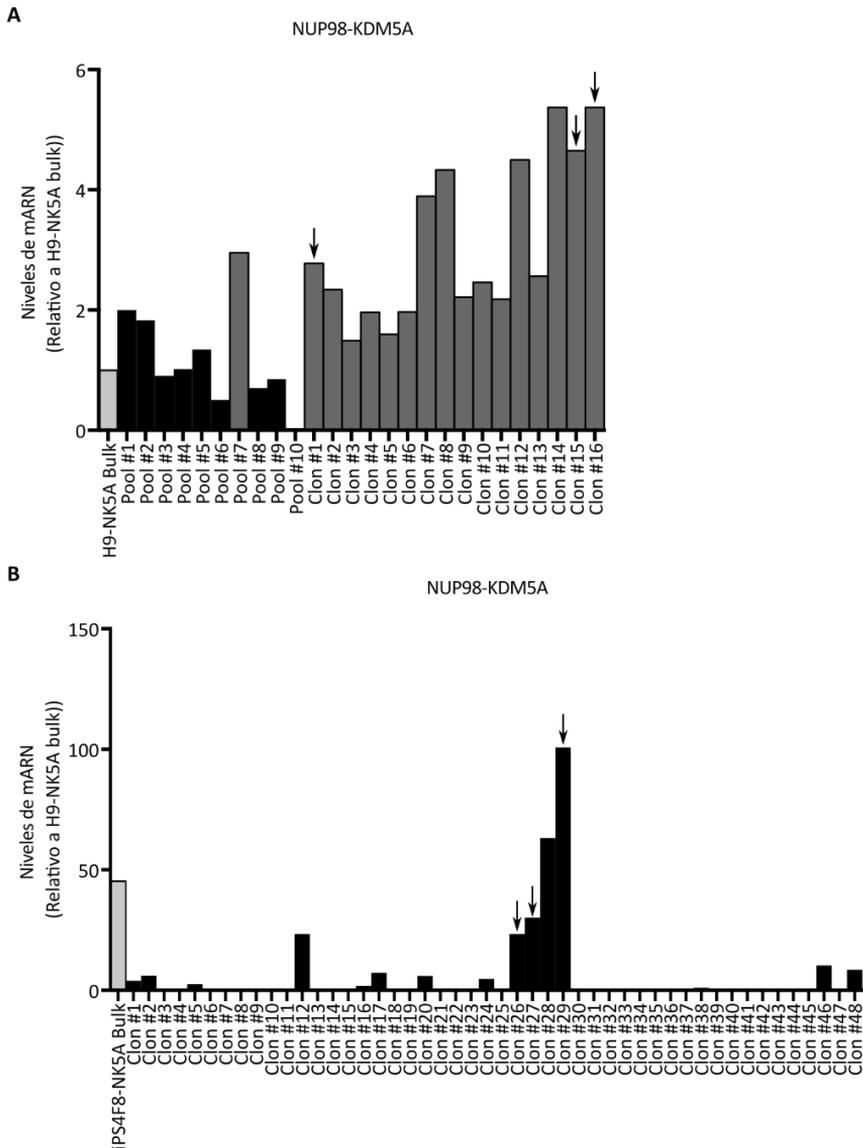


Figura 27. Análisis de los niveles de expresión de NK5A en los clones generados. (A) Análisis por qPCR de los niveles de mRNA de NK5A de los pools generados a partir de la línea H9-NK5A y de los clones generados a partir de H9-NK5A pool #7. (B) Análisis por qPCR de los niveles de mRNA de NK5A de los clones generados a partir de iPS4F8-NK5A.

Resultados

la expresión de NK5A debido a que los datos de inmunofluorescencia sugerían que muy bajo porcentaje de células tenían expresión de NK5A (Fig. 25). Una vez seleccionado el grupo de células #7 de H9-NK5A, procedimos a generar clones por la técnica de la dilución límite, al igual que hicimos para las demás líneas celulares (Fig. 27A). Se obtuvieron clones de distintos niveles de expresión, siendo los clones iPS4F8-NK5A los que tenían una expresión uno mucho mayor que los clones H9-NK5A (Fig. 27B). Dado que no están descritos los niveles de expresión de NK5A en células de pacientes, decidimos escoger tres clones de cada línea celular con distintos niveles de expresión (Marcados con flechas, Fig. 27B). También se generaron clones de las líneas control.

Después se realizó un WB con la línea original iPS4F8-NK5A y los clones NK5A #26, NK5A #27 y NK5A #29 para detectar el gen de fusión y la proteína KDM5A endógena. Como se puede ver en la figura 28A, los niveles de expresión de la proteína NK5A se correspondían con los niveles del ARNm en los clones, siendo el clon #26 el que tiene una menor expresión y el clon #29 el que tiene la mayor expresión. No se detectó ninguna diferencia en los niveles de expresión del KDM5A endógeno en ninguno de los clones. También se realizó una IF para detectar el gen de fusión y la proteína KDM5A endógena en los clones iPS4F8-Control#2 y NK5A#29, donde observamos los niveles basales de KDM5A en el control y mientras que en NK5A#29 confirmamos una mayor intensidad de señal, siendo además homogénea, lo que nos confirmó que teníamos

líneas clonales de expresión homogénea de la proteína de fusión (Fig. 28B).

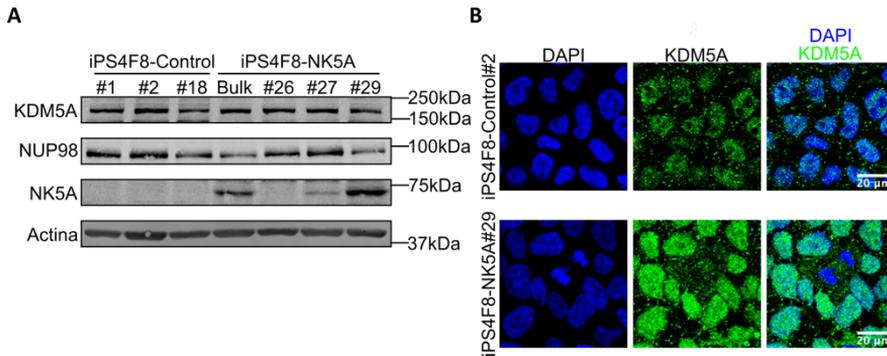


Figura 28. Detección de NUP98-KDM5A en las nuevas líneas clonales generadas. (A) WB contra KDM5A y NUP98 de los clones iPS4F8-Control y NK5A. Actina como control de carga. (B) IF detectando KDM5A y NUP98-KDM5A en las líneas clonales iPS4F8 Control#2 y NK5A#29. Objetivo: 40x. Escala: 20µm.

Al igual que la línea parental iPS4F8-NK5A, los clones presentan una morfología típica pluripotente y además son positivos para la actividad de la fosfatasa alcalina (Fig. 29A). Por citometría de flujo se comprobó que expresan los marcadores de superficie típicos de pluripotencia TRA-1-60 y SSEA4 (Fig. 29B).

Resultados

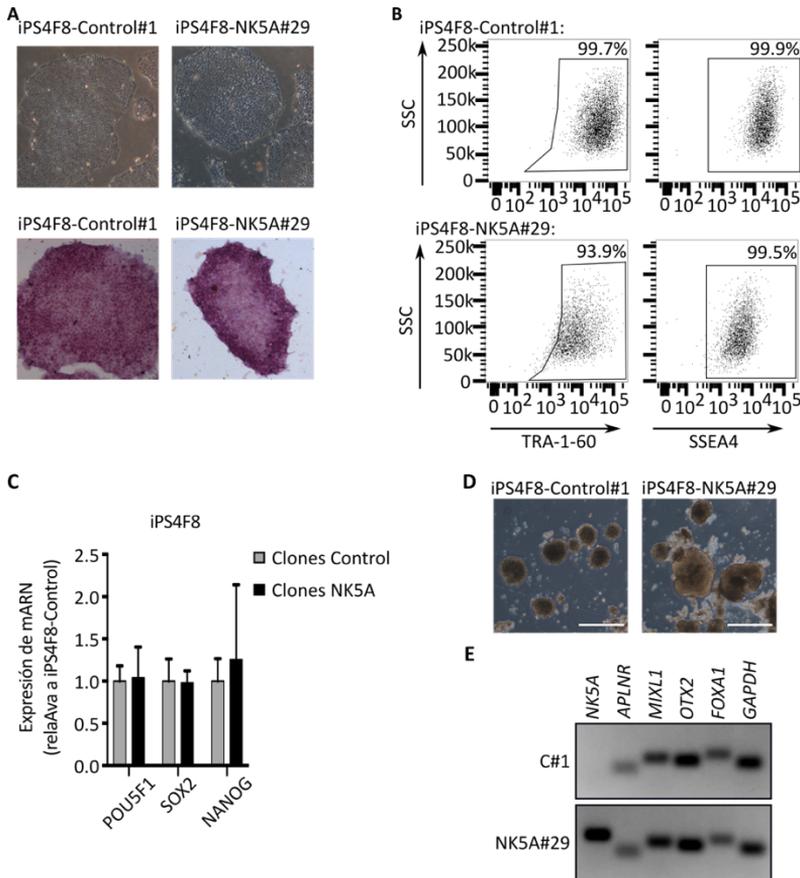


Figura 29. Caracterización de pluripotencia de los clones iPS4F8.

(A) Arriba: Imágenes de campo claro de los clones C#1 y NK5A#29. Objetivo: 4x. Abajo: Tinción de la actividad de fosfatasa alcalina en los clones C#1 y NK5A#29. Objetivo: 4x. (B) Citometrías de flujo para TRA-1-60 y SSEA4 en los clones C#1 y NK5A#29. (C) RT-qPCR de los genes de pluripotencia POU5F1, SOX2 y NANOG en los distintos clones. (D) Imágenes de EBs del Control#1 y NK5A#29 a día 9 de diferenciación. Escala: 500 μ m. (E) Gel de agarosa de productos de PCR de niveles de mRNA en el control#1 y NK5A#29. Control de carga, GAPDH

Por qPCR se determinó que expresan los factores de transcripción fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia POU5F1, SOS2 y NANOG (Fig. 29C). Por último, se midió la capacidad del Control#1 y NK5A#29 de generar diferenciación espontánea hacia las tres capas germinales con la formación de cuerpos embrionarios (Fig. 29D). Al día 9 se recogieron los cuerpos embrionarios y se procesaron para analizar por qPCR la expresión del gen de fusión y de marcadores de diferenciación de las tres capas germinales: *APLNR* y *MIXL1* para mesodermo, *OTX2* para ectodermo y *FOXA1* para endodermo. Como se ve en la figura 29E, las líneas clonales fueron capaces de diferenciar a las tres capas germinales.

5.2.4. Caracterización fenotípica de las líneas clonales hPSC-NK5A

Tras los primeros pases en cultivo pudimos observar que las líneas clonales H9-NK5A- #1, #14 y #15 crecían de manera similar a los controles, mientras que las líneas clonales iPS4F8-NK5A #26, #27 and #29 tenían un menor ritmo de crecimiento. Por ese motivo realizamos curvas de crecimiento de los clones iPS4F8-control y -NK5A, y observamos que los clones los clones iPS4F8-NK5A tenían un crecimiento significativamente menor ($p < 0.05$) que los clones control a partir del día 3. Esas diferencias en el crecimiento se mantuvieron durante los días 5, 8 y 10 (Fig. 30). Dado que la sobrevivencia, la proliferación y la muerte celular son los principales

Resultados

factores que determinan el ritmo del cultivo de las hPSC¹⁶³ decidimos estudiar si la expresión de NK5A afectaba estas funciones en hPSC.

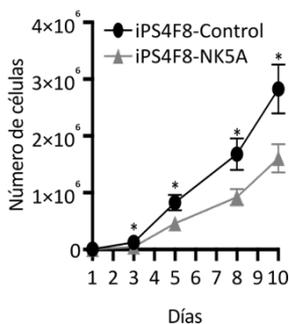


Figura 30. Curva de crecimiento de los clones iPS4F8-Control y -NK5A a día 1, 3, 5, 8 y 10. A día 5 se replaquearon las células para seguir el experimento. Test t-student * < 0.05.

Para estudiar su capacidad de supervivencia cultivamos las líneas clonales bajo condiciones de estrés plaqueando células individuales a baja densidad (100, 200 y 400 células por placa) (Fig. 31A). Después de 15 días en cultivo, teñimos las colonias con cristal violeta y analizamos. En los clones iPS4F8-NK5A observamos una reducción significativa del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas sembradas con 200 y 400 células, con respecto a los clones iPS4F8-Control (Fig. 31B). Sin embargo, en las líneas clonales H9-NK5A no observamos ninguna diferencia en la capacidad de formar UFC, con respecto a H9-Control (Fig. 31C).

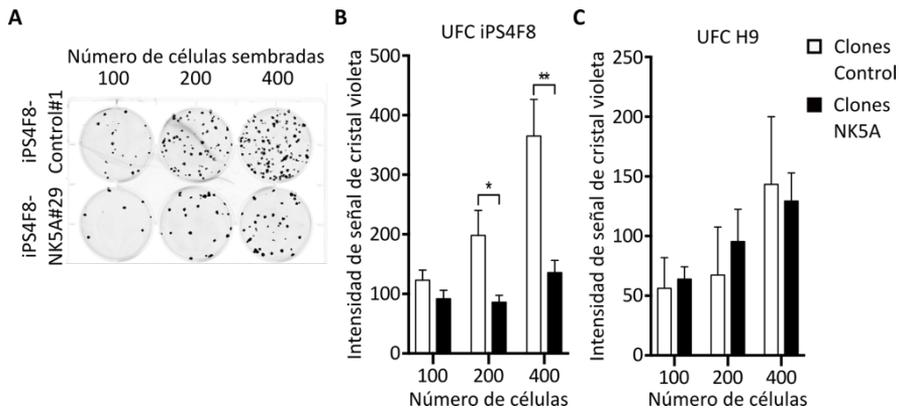


Figura 31. Señal de unidades formadoras de colonia en las líneas iPS4F8 y H9 . (A) Ejemplo de un ensayo de Unidades Formadoras de colonias. (B) Señal medida de cristal violeta medida por UFC de las líneas clonales iPS4F8-NK5A y -Control. (C) Señal medida de cristal violeta medida por UFC de las líneas H9-NK5A y -

Dado que detectamos problemas en el crecimiento de las líneas con alta expresión de NK5A, decidimos analizar el perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo (Fig. 32A). En los clones iPS4F8-NK5A se pudo observar una reducción significativa de células en G1 ($16.8 \pm 0.52\%$ vs $25.2 \pm 1.72\%$) y un incremento de células en G2/M, (23.5 ± 1.24 vs $13.5 \pm 1.79\%$) con respecto a los clones Control, lo que sugería un bloqueo de las células en la fase G2/M. No se observaron diferencias en la fase S (Fig. 32B). En cuanto a los clones H9-NK5A, no se observó ninguna diferencia en los perfiles del ciclo celular con respecto a H9-Control (Fig. 32C).

Resultados

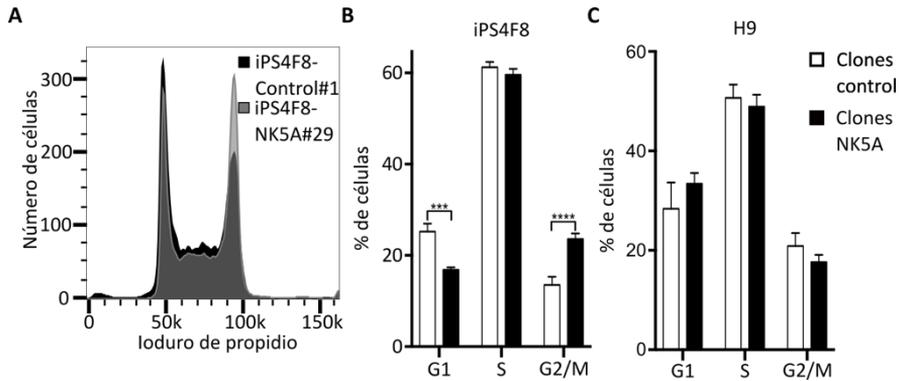


Figura 32. Perfil de ciclo celular de las líneas iPS4F8 y H9. (A) Ejemplo de perfil de ciclo celular analizado por ioduro de propidio. (B) Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular en los clones iPS4F8-NK5A y - Control. (C) Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular en los clones H9-NK5A y H9-Control. N=3 para cada línea. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Dado que el efecto en el cultivo de las hPSC con alta expresión de NK5A podría deberse a un efecto en muerte celular, realizamos ensayos de apoptosis, midiendo la incorporación del colorante de viabilidad 7AAD y la expresión de Anexina V, para detectar las células en proceso de muerte celular, mediante citometría de flujo (Fig. 33A). Observamos un aumento significativo de células en apoptosis (Anexina V+) en los clones iPS4F8-NK5A respecto a los clones control (Fig. 33B).

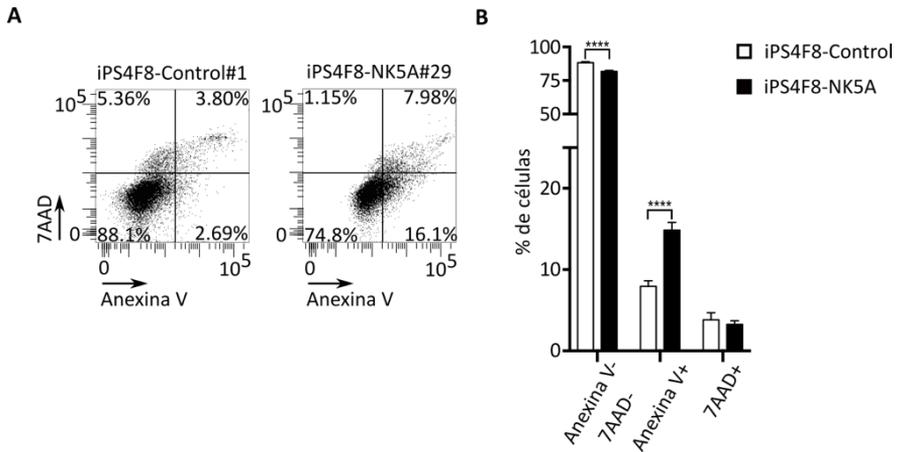


Figura 33. Niveles de apoptosis de las líneas iPS4F8. (A) Ejemplo de citometría de flujo analizando niveles de Anexina V y 7AAD. (B) Porcentaje de células positivas o negativas para Anexina V y 7AAD. Clones Control: #1, #2 y #18, Clones NK5A: #26, #27 y #29.

5.2.5. Caracterización molecular de las líneas clonales iPS4F8-NK5A

Para analizar los efectos de la proteína de fusión NK5A en hPSC a nivel molecular realizamos la secuenciación de mRNA de los tres clones iPS4F8-Control y los tres clones iPS4F8-NK5A. Visualizamos la distribución de los datos de acuerdo con los perfiles genéticos obtenidos mediante un análisis de componentes principales. Como se observa en la Figura 34A, las muestras iPS4F8-NK5A se agrupan juntas entre ellas y separadas de los controles, lo que indica su similitud en expresión génica. Un total de 652 genes estaban diferencialmente expresados entre las muestras iPS4F8-NK5A y las

Resultados

iPS4F8-Control (p -valor ajustado < 0.05 y Fold change (FC) absoluto > 1) (Fig. 34B). Al representar los genes diferencialmente expresados (GDE) (p -valor ajustado < 0.05 y FC absoluto > 1) en un mapa de calor, se puede observar que el 70% de los GDE están sobre expresados (475 genes), frente al 30% que están infra expresados (195 genes) (Fig. 34C). Para comprender mejor los procesos biológicos afectados por la expresión de NK5A, realizamos un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (del inglés, Gene set enrichment analysis, GSEA) con el fin de identificar posibles asociaciones entre los GDE con fenotipos y/o funciones previamente reportadas en bases de datos. Entre los primeros 13 grupos de genes funcionales en los GDE estaban enriquecidos encontramos un conjunto de genes diana de la proteína de fusión NUP98-HOXA9 en etapas tempranas del proceso leucémico (FWER (Tasa de error familiar o Family-wise error rate en inglés) p -valor < 0.096), una oncoproteína muy relacionada con la NUP98-KDM5A (Fig.34D y 34E). También aparecieron grupos de genes relacionados con genes bivalentes, con el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2, por sus siglas en inglés) y la marca epigenética H3K27me3. Usando un p -valor FWER muy restrictivo de 0.05 para evitar la elección de resultados falsos positivos, elegimos los primeros 7 grupos de genes significativamente enriquecidos y estos estaban asociados con hipoxia, indicando que la expresión de NK5A afecta a la regulación de genes relacionados con hipoxia. Decidimos entonces explorar el patrón de los GDE con las mayores diferencias de expresión entre las iPS4F8-NK5A y las iPS4F8-Control dentro de los primeros 8

grupos funcionales relacionados con la hipoxia. Realizamos análisis de enriquecimiento con las bases de datos de interacciones de proteínas con el genoma, ChEA-ChIP-X y TRANSFAC, indicándonos genes dianas de HIF1A, encontrando que el 43% de los genes desregulados (61/140) son dianas directas del factor Inducible por la Hipoxia-1A (HIF1A del inglés, Hypoxia inducible factor 1 alpha) (Fig.34F). HIF1 es la proteína reguladora de los cambios transcripcionales que ocurren en hipoxia y está compuesta por las subunidades HIF1A y HIF1B. Mientras que la subunidad HIF1B está expresada de forma constitutiva, la subunidad HIF1A está regulada a nivel postraduccional siendo degradada constantemente en condiciones de normoxia. En hipoxia la proteína es estabilizada e interacciona con otras proteínas junto a HIF1B para regular la transcripción de genes.¹⁶⁴

Para determinar si existía una correlación entre los niveles de expresión de NK5A y los genes dianas de HIF1A realizamos un análisis de correlación positiva entre el nivel de mRNA de NK5A y los niveles de expresión de todos los genes analizados en cada clon iPS4F8-NK5A (Fig. 34G).

Utilizando la herramienta informática EnrichR realizamos el análisis de correlación de Spearman ($r > 0.9$ y $p\text{-valor} < 0.05$) mostrando que la expresión de los genes diana de HIF1A estaban asociados de manera significativa con el incremento en la expresión de NK5A (Fig. 34H).

Resultados

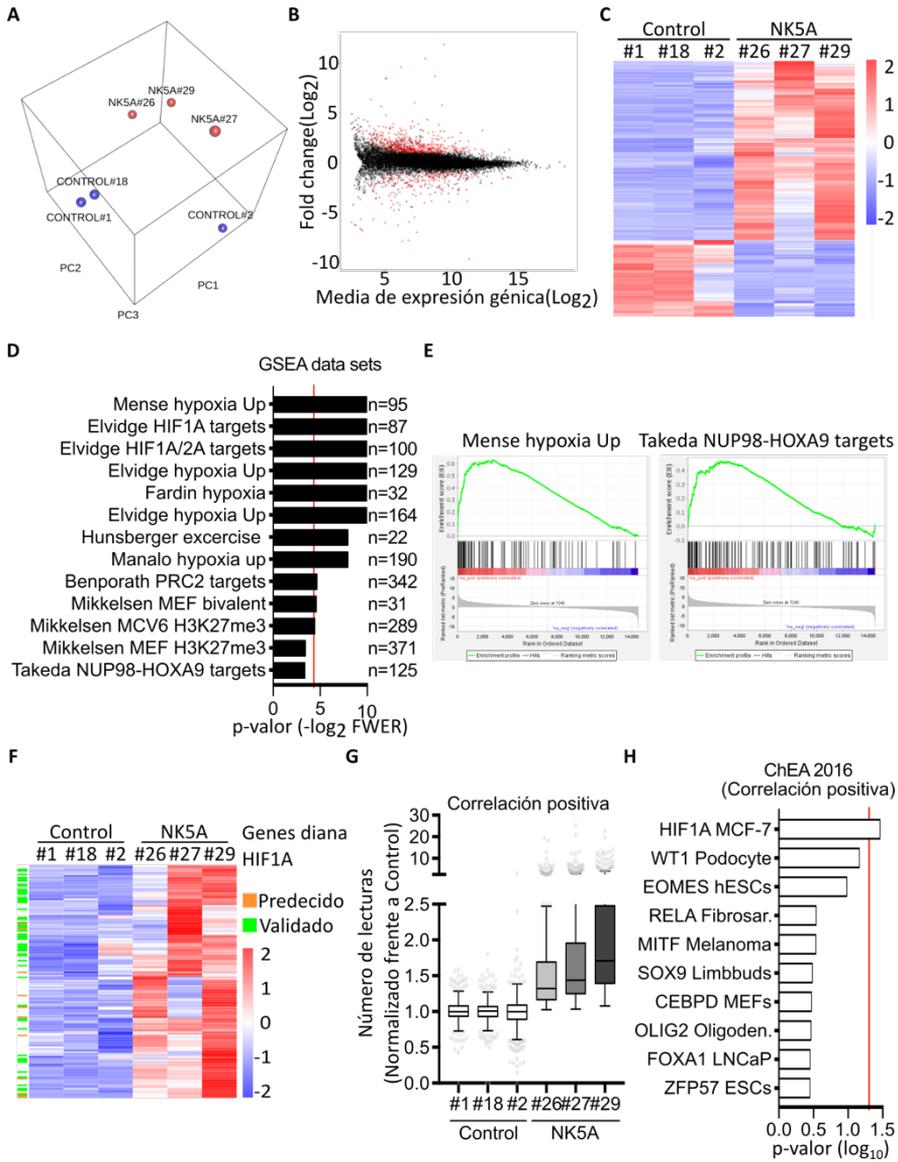


Figura 34. Análisis de transcriptómica de los clones iPS4F8. (A) Análisis de componentes principales (B) Gráfico de puntos de la media de expresión génica vs. El FC. En rojo están los genes con un p-valor ajustado < 0.05 . (C) Mapa de calor jerarquizado de los genes diferencialmente expresados ($FC \log_2 > 1$ o < -1 y p-valor ajustado < 0.05). (D) Primeros 13 grupos de genes funcionales del análisis GSEA (E) Gráficos de enriquecimiento de GSEA para algunos grupos de genes relevantes. (F) Mapa de calor jerarquizado de los primeros 8 grupos de genes de GSEA relacionados con hipoxia. Resaltados los genes diana de HIF1A de la base de datos Harmonizome. (G) Gráfico de cajas Tukey mostrando las lecturas de genes normalizadas con una correlación de Spearman positiva ($r > 0.9$ y p-valor < 0.05) con la expresión por mRNA de NK5A en los diferentes clones. (H) Primeros 10 grupos de genes enriquecidos de la base de datos ChEA 2016 de los genes correlacionados positivamente por Spearman ($r > 0.9$ y p-valor < 0.5). La línea roja en (D) y (H) es p-valor < 0.05 .

Dado que se ha descrito que NK5A tiene un papel en la regulación de la transcripción de genes con promotores bivalentes pudiéndose unir a la marca de histona H3K4me3, como por ejemplo en los genes del clúster HOXA¹⁶⁵, decidimos comprobar si los GDE estaban bajo promotores bivalentes. Comparamos los GDE en el RNA-seq con una base de datos de genes bivalentes descritos en hPSC¹⁶⁶. En este

Resultados

análisis observamos que el 49,5% de los GDE son genes que tienen promotores bivalentes en hPSC (Fig. 35A). Por otro lado quisimos analizar si los GDE estaban relacionados con las dianas descritas de NUP98¹⁰⁹ y KDM5A (GEO accession GSM1003446) en hPSC y observamos que solo un bajo porcentaje de estos los GDE son diana NUP98 o de KDM5A (10.3% y 1.69%, respectivamente) (Fig. 35B). Estos datos nos indica que la proteína de fusión puede estar desregulando genes diana nuevos que no pertenecen a las dianas habituales de NUP98 y KDM5A.

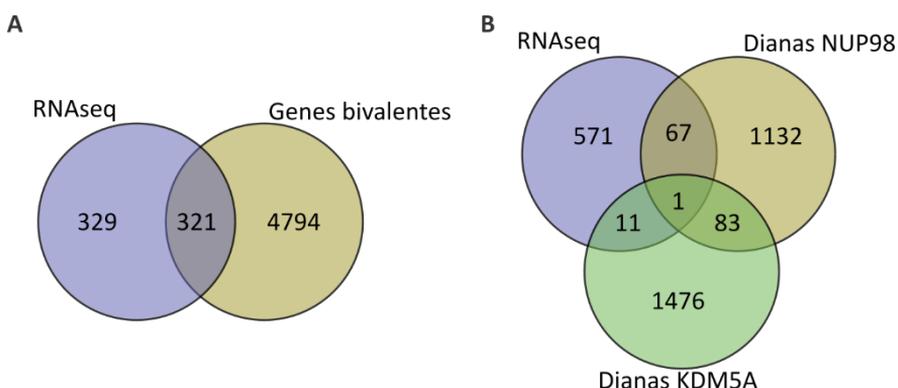


Figura 35. Comparación entre los datos de RNA-seq, genes bivalentes y dianas moleculares de NUP98 y KDM5A. (A) Diagrama de Venn entre los genes desregulados en el RNA-seq y un conjunto de genes bajo promotor bivalente EN hPSC. (B) Diagrama de Venn entre los genes desregulados en el RNA-seq y los genes diana de NUP98 y KDM5A en hPSC.

5.2.6. Las células que expresan NUP98-KDM5A muestran un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y daño en el ADN

Los análisis moleculares indican que NK5A confiere una marca genética hipóxica a las hPSC, mostrando la desregulación de muchas dianas moleculares de HIF1A, por lo que decidimos investigar la expresión de la proteína HIF1A en los clones iPS4F8-Control y iPS4F8-NK5A (Fig. 36A). Realizamos un western blot de proteína total de las células obtenidas en condiciones de normoxia y observamos que los niveles de HIF1A fueron casi indetectables en las células iPS4F8-Control, lo cual era esperado dado que la subunidad HIF1A es sensible a la concentración de oxígeno y se degrada en normoxia (Fig. 36A). Sin embargo, en las células iPS4F8-NK5A los niveles de HIF1A aumentaron de forma significativa, indicando que en estas células la proteína HIF1A es estabilizada por un mecanismo distinto a la hipoxia (Fig. 36B).

Resultados

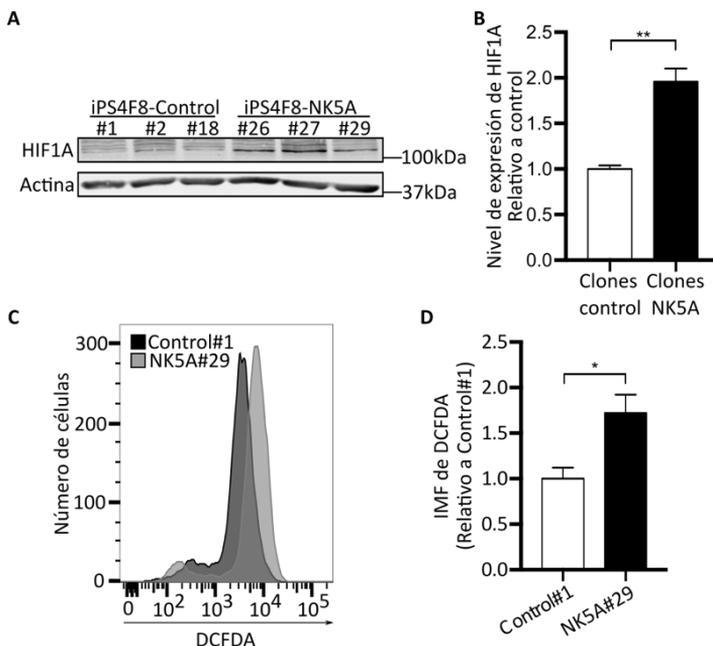


Figura 36. Expresión de HIF1A y producción de ROS en los clones iPS4F8-Control y NK5A. (A) WB para HIF1A. La Actina fue usada como control de carga. (B) Cuantificación de la expresión de HIF1A, n=3. (C) Ejemplo de citometría de flujo midiendo los niveles de ROS. (D) Niveles de ROS en el control#1 y NK5A#29, n=3.

Uno de los mecanismos conocidos para la estabilización de HIF1A en condición de normoxia es el incremento de especies reactivas de oxígeno (del inglés, Reactive oxygen species, ROS¹⁶⁷), por lo que decidimos analizar los niveles de ROS por citometría de flujo en los clones control#1 y el NK5A#29 (Fig. 36C). El clon NK5A#29 mostró un incremento significativo de los niveles de ROS comparado con el control#1 (Fig. 36D).

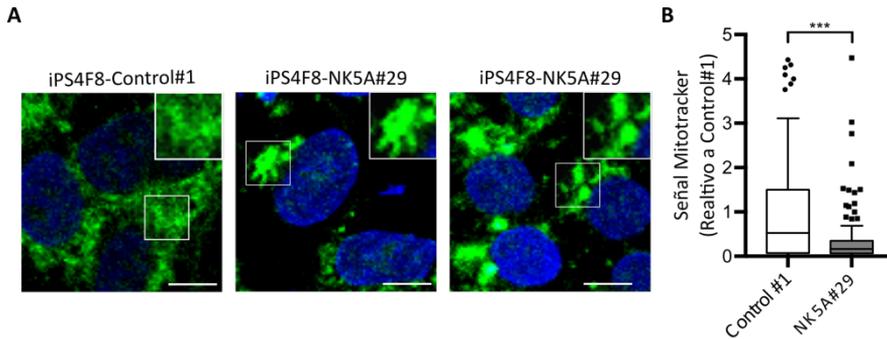


Figura 37. Análisis de las mitocondrias en las células iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. (A) Imágenes representativas de la tinción con Mitotracker®. DAPI (Azul), Mitotracker (Verde). Escala: 10µm. (B) Gráfico de cajas Tukey de la señal de Mitotracker por célula. Control#1, n= 137, NK5A#29, n=121.

La mayor fuente de ROS de la célula es la mitocondria¹⁶⁸, por lo que quisimos valorar su morfología y masa en las células que expresan la proteína de fusión mediante una tinción de mitocondrias totales con Mitotracker®. En la línea iPS4F8-Control#1, observamos una red mitocondrial repartida por todo el citoplasma de las células de forma homogénea formada por mitocondrias alargadas (Fig. 37A, panel de la izquierda). Por otra parte, las mitocondrias del clon NK5A#29 mostraron una morfología mucho más difusa y fragmentada (Fig. 37A, panel central y derecho). Además, al cuantificar la señal de Mitotracker por célula, se pudo observar un descenso significativo de la masa mitocondrial en las células que expresan NK5A respecto al control (Fig. 37B).

Resultados

El aumento de ROS en la célula puede provocar daño en el ADN¹⁶⁹, por lo que analizamos si las células que expresaban NK5A presentaban un incremento en daño en el ADN. Analizamos la acumulación de histona fosforilada H2AX (p-H2AX), que es un indicador temprano de daño en el ADN y está implicado en la respuesta de daño en el ADN¹⁷⁰ (DDR, DNA damage respons, por sus siglas en inglés). Mediante western blot observamos un aumento en los niveles de expresión de p-H2AX en la línea NK5A#29 comparada con el control#1 por WB (Fig. 38A). Por inmunofluorescencia vimos un aumento significativo en el número de células positivas para p-H2AX en la línea NK5A#29 respecto al control#1 (Fig. 38B y C). Los niveles de p-H2AX incrementados fueron más evidentes durante la mitosis, indicando que se pueden producir más daños y una mayor activación de la DDR durante la división células (Fig. 38D y E).

Estos datos indican que la proteína de fusión NK5A afecta la homeostasis mitocondrial, alterando la morfología de la mitocondria y produciendo un incremento en ROS y daño en el ADN.

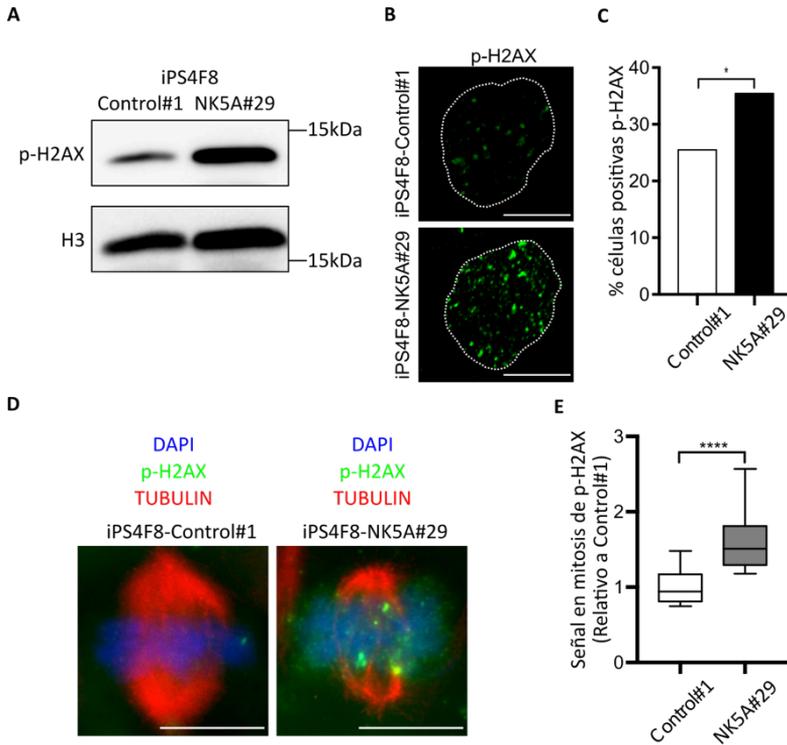


Figura 38. Análisis del daño a ADN en los clones iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. (A) WB para p-H2AX. H3 se usó como control de carga. (B) IFs para p-H2AX. Los núcleos se muestran con una línea discontinua. Escala: 10 μ m. (C) Porcentaje de células ¿totales o en interfase? positivas para p-H2AX, n=300 para cada clon. (D) IF detectando p-H2AX y α -tubulina durante la mitosis de Control#1 y NK5A#29. Escala: 10 μ m. (E) Gráfico de cajas Tukey de la señal de p-H2AX en células mitóticas. Control#1, n=14 y NK5A#29, n=22.

5.2.7. La proteína de fusión NUP98-KDM5A provoca alteraciones en la mitosis y la aparición de cariotipos aberrantes

Nuestros resultados mostraban que la expresión de *NUP98-KDM5A* producía una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular (Fig. 32A y B) y de daño al ADN en la mitosis (Fig. 38D y E), lo que sugería que podría estar afectando el proceso de mitosis. Decidimos investigar la mitosis en células iPS4F8 control (WT y Control#2) y en los clones NK5A#27 y #29 mediante inmunofluorescencia marcando para la α -tubulina con el fin de detectar la formación del huso mitótico, y DAPI para observar la segregación de los cromosomas. En nuestros análisis observamos todas las fases de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) y clasificamos si eran normales o aberrantes (Fig. 39). En general, las iPS4F8-Control presentaron mitosis normales, sin embargo, los clones iPS4F8-NK5A presentaron muchos errores en las distintas fases de la mitosis (Fig. 39). Entre las aberraciones detectadas encontramos la aparición de multipolos, puentes de ADN y trozos de ADN presentes en el cuerpo medio de la telofase (Fig. 39).

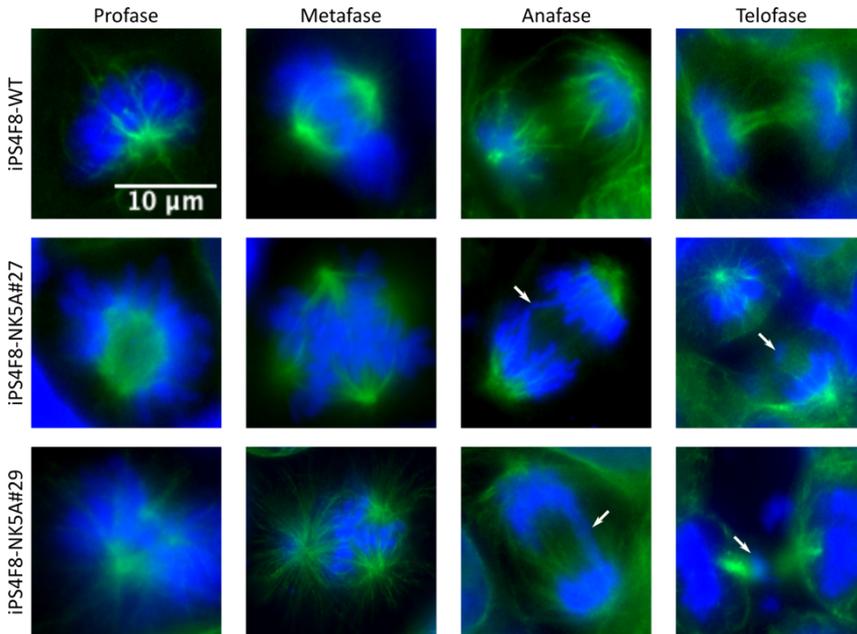


Figura 39. Inmunofluorescencia detectando α -tubulina (verde) y ADN (Azul) en las líneas iPS4F8-WT y -NK5A#27 y #29. Se muestra una imagen representativa de cada una de las fases mitóticas.

Dado que problemas durante la división celular puede producir cariotipos alterados se realizaron cariotipos de todos los clones iPS4F8-Control y -NK5A a distintos pases (+20 y +30) para determinar si acumulaban alteraciones cariotípicas. Previamente se había determinado que mientras la línea original iPS4F8-Control tenía un cariotipo normal, la línea iPS4F8-NK5A original presentaba un cariotipo en mosaico (46, XX 54%/ 46, XX+der(1)t(1;11) (q12;q23) 19%/ 46,XX inv(2)(p13q21) 27%) (Fig. 13 y tabla 1). Los clones

Resultados

control mantuvieron un cariotipo normal a los dos pases analizados (Tabla 1). Sin embargo, en las líneas que expresan NK5A encontramos varias alteraciones en el cariotipo: la línea iPS4F8-NK5A original presentó un enriquecimiento de la inversión del cromosoma 2 inv(2)(p13q21), siendo el cariotipo dominante al pase +30. Esta alteración también estaba presente en todas las células de los clones NK5A#26 y NK5A#29. La línea NK5A#27 presentó un cariotipo normal durante los 30 pases (Tabla 5).

Línea celular	P0	+20	+30
Control#1		46, XX	46, XX
Control#2		46, XX	46, XX
Control#18		46, XX	46, XX
NK5A Bulk	46, XX [20]/ 46, XX+der(1)t(1;11)(q12;q23) [7]/ 46,XX inv(2)(p13q21)[10]	46, XX [5]/ 46, XX+der(1)t(1;11)(q12;q23) [5]/ 46,XX inv(2)(p13q21)[21]	46, XX inv(2)(p13q21)
NK5A#26		46, XX inv(2)(p13q21)	46, XX inv(2)(p13q21)
NK5A#27		46, XX	46, XX
NK5A#29		46, XX inv(2)(p13q21)	46, XX inv(2)(p13q21)

Tabla 5. Cariotipos a pase +20 y +30 de las líneas iPS4F8-Control, -NK5A bulk y clones -NK5A.

Durante los análisis citogenéticos se observó que en los clones iPS4F8-NK5A aparecían con bastante frecuencia aberraciones cromosómicas no recurrentes, es decir que no se mantienen en el cultivo (Fig. 40A). Después de cuantificar, determinamos que en las iPS4F8-Control el 0.47% (4/137) de las metafases analizadas presentaron cariotipos alterados no recurrentes, mientras que en los clones iPS4F8-NK5A fue el 10.58% (17/163) (Fig. 40B). Cabe

destacar que en los clones iPS4F8-NK5A la aparición de cariotipos aberrantes no recurrentes fue consistente con el porcentaje de células que presentaron problemas en la mitosis (Fig. 40C). Las alteraciones cariotípicas encontradas en los cariotipos alterados no recurrentes fueron de distintos tipos: Monosomias, trisomias, translocaciones e inversiones (Fig. 40D).

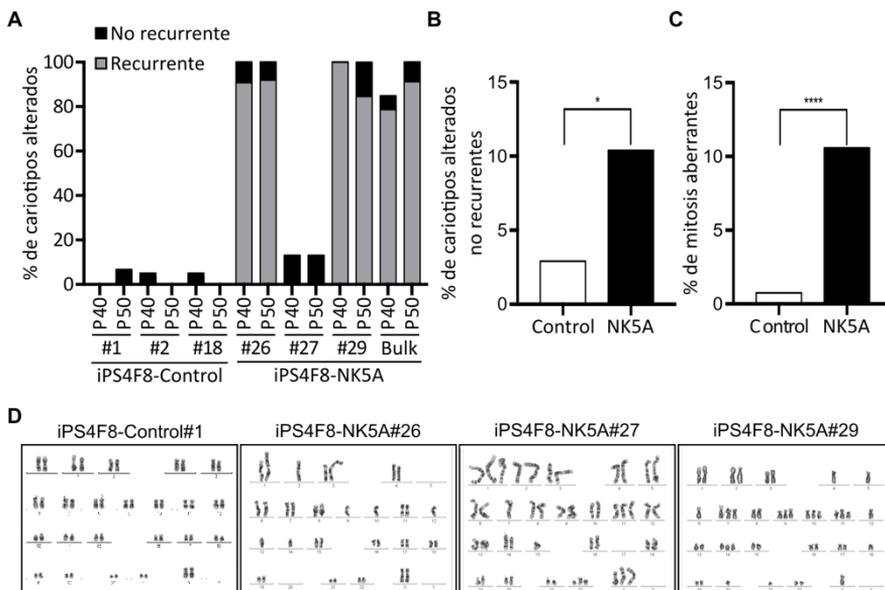


Figura 40. Análisis citogenéticos de los clones iPS4F8- Control y NK5A. (A) Cuantificación de anomalías cromosómicas recurrentes y no recurrentes (B) Cuantificación de los cariotipos alterados no recurrentes de. Control, n=137 y NK5A, n=163. (C) Cuantificación de mitosis aberrantes detectadas en las, n= 200 mitosis por línea. (D) Ejemplos de un cariotipo normal del clon Control#1 y de cariotipos alterados encontrados en NK5A#26, #27 y #29.

Resultados

Se ha descrito como proteínas de fusión donde NUP98 forma parte, pueden unirse al complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C, anaphase promoting complex/cyclosome por sus siglas en inglés) atenuando el punto de control del huso mitótico y promoviendo errores en la mitosis.^{129,130} En nuestro modelo, se ha podido observar por inmunofluorescencia que no hay interacción entre KDM5A o NK5A y CDC20 en ninguna fase de la mitosis aunque si se pudo determinar altos niveles de la fusión en todo el proceso mitótico (Fig. 41).

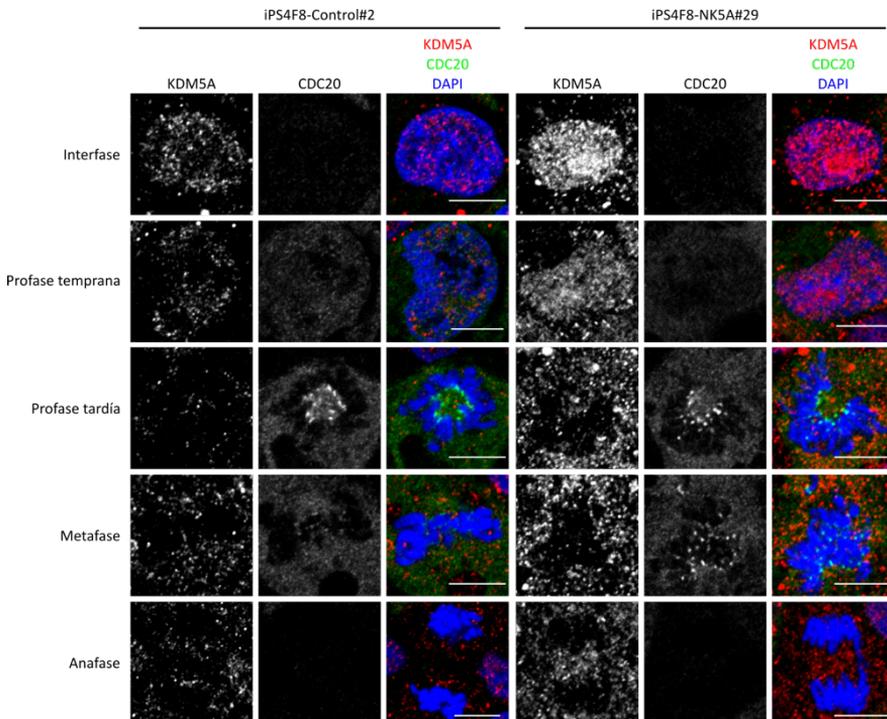


Figura 41. Inmunofluorescencia detectando KDM5A (Rojo), CDC20 (verde) y ADN (Azul) en las líneas iPS4F8-Control#2 y -NK5A#29. Se muestra una imagen representativa de cada una de las fases mitóticas.

5.2.8. NUP98-KDM5A interacciona con RAE1 durante la mitosis

Al detectar que la expresión NK5A produce la alteración del proceso mitótico decidimos realizar análisis proteómicos para identificar si esto es consecuencia de una interacción proteína-proteína con NK5A durante la fase de mitosis. Para arrestar las células en mitosis, tratamos las células iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 con nocodazol durante 16 horas (tiempo estimado del ciclo celular en hPSC¹⁷¹) y comprobamos una clara acumulación de células en la fase G2/M (Fig. 42A y Fig. 42B). Mediante WB analizamos la expresión de NUP98-KDM5A en extractos celulares de iPS4F8-Control#1 y -NK5A#29 en cultivos asincrónicos y arrestados en mitosis y observamos que en arresto mitótico la expresión de la proteína KDM5A endógena disminuye mientras que la de la proteína de fusión NK5A se incrementa (Fig. 42C).

Para el análisis proteómico realizamos una inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo anti-KDM5A en células iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 arrestadas en mitosis. El experimento se realizó por duplicado y fue analizado en la unidad de proteómica de la Universidad de Córdoba mediante LC-ms/ms (Cromatografía líquida con espectrometría de masas).

Resultados

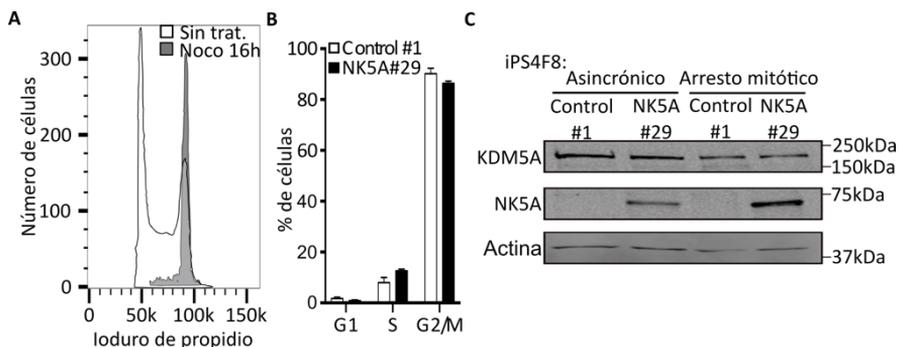
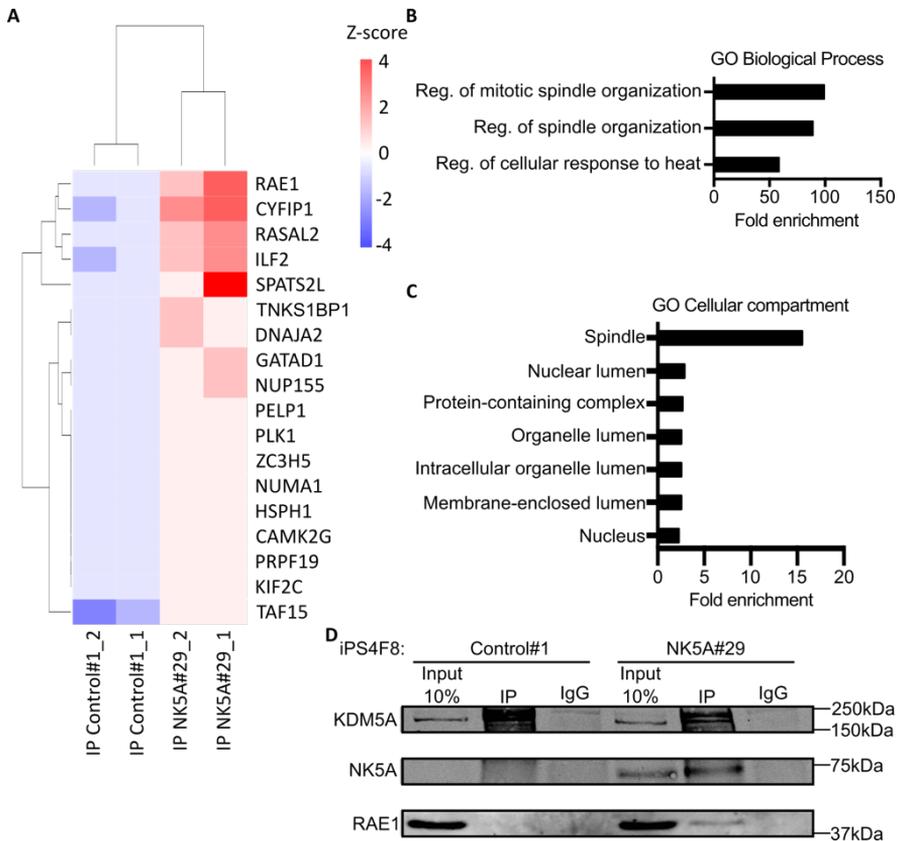


Figura 42. Acumulación de NK5A en células arrestadas en mitosis. (A) Perfil de ciclo celular de iPS4F8-NK5A#29 sin tratar y después de 16 horas de tratamiento con nocodazol. (B) Porcentaje de células iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 en cada una de las fases del ciclo celular después del tratamiento con nocodazol. (C) WB contra KDM5A y NUP98-KDM5A de células iPS4F8-Control#1 y -NK5A#29 en estado asincrónico y arrestadas en mitosis. La actina se usó como control de carga.

Una vez obtenido el listado de péptidos y dado que el anticuerpo anti-KDM5A reconoce tanto la proteína endógena KDM5A como la proteína de fusión NK5A, se excluyeron del análisis todas las proteínas identificadas en la IP de las iPS4F8-Control#1. Se obtuvo una lista de 18 posibles proteínas que interaccionan específicamente con la proteína de fusión (Fig. 43A) y mediante la herramienta informática PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships) determinamos que participan en procesos de regulación del huso mitótico (Fig. 43B) y que se localizan principalmente en el huso celular (Fig. 43C). Del listado de proteínas

que interaccionan con NK5A la de mayor Z-score, fue RAE1 (RNA export 1), una proteína que interacciona normalmente con NUP98 durante la mitosis y se sabe puede interaccionar con oncoproteínas de fusión con NUP98.^{101,129} Para validar la interacción de NUP98-KDM5A con RAE1, realizamos una IP de extractos mitóticos de iPS4F8-NK5A#29 y -Control#1 con el anticuerpo anti-KDM5A y analizamos por WB usando un anticuerpo anti-RAE1. Observamos que RAE1 inmunoprecipita únicamente en la muestra de iPS4F8-NK5A, confirmando la interacción directa entre ambas proteínas durante la mitosis (Fig. 43D).



Resultados

Figura 43. Interactoma de NK5A durante la mitosis. (A) Mapa de calor de dos inmunoprecipitaciones (IP) independientes de KDM5A de Control#1 y NK5A#29 arrestadas en mitosis. Está representada la normalización por Z-score de los péptidos detectados en el IP para KDM5A contra el IP de una IgG inespecífica. (B) Ontología génica (GO, por sus siglas en inglés) de los procesos biológicos de los interactores de NK5A. (C) GO de los compartimentos celulares de los interactores de NK5A. Se utilizó la prueba estadística de las proteínas sobrerrepresentadas en la fracción de NK5A (total de 18 proteínas), realizado en el software online PANTHER (v14.1) utilizando la prueba exacta de Fisher. Los resultados muestran FDR $p < 0.05$. (D) WB contra KDM5A y RAE1 de las IP para KDM5A de las células arrestadas con nocodazol de las células Control#1 y NK5A#29.

Por último, se quiso estudiar el proceso de mitosis en la línea celular CHRF-288-11, una línea derivada de paciente que expresa NK5A, para estudiar algunos fenotipos ya observados en los clones NK5A en estadio pluripotente. Se realizaron IFs para visualizar las mitosis, marcando con α -tubulina y DAPI. Principalmente se observó una desorganización generalizada de los cromosomas durante la metafase y anafase. Además, se observó la presencia de mitosis con más de dos polos (Fig. 44A), al igual que en las mitosis de los clones NK5A (Fig. 39). También se realizó una IP con el anticuerpo α -KDM5A extractos mitóticos de la línea CHRF-288-11 para comprobar la

interacción de NK5A con RAE1. Se pudo demostrar la presencia de RAE1 en esos extractos mitóticos, confirmando que la interacción RAE1-NK5A también se da en la línea celular CHRF-288-11 (Fig. 44B).

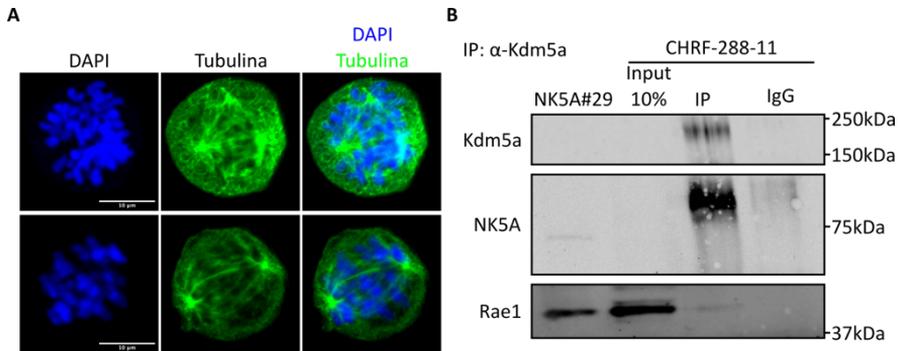


Figura 44. Análisis de la mitosis en las células CHRF-288-11. (A) IF detectando α -tubulina (verde) y ADN (Azul) en la línea CHRF-288-11. (B) WB contra KDM5A y RAE1 de las IP para KDM5A de las CHRF-288-11 arrestadas con nocodazol.

5.2.9. Otros efectos nucleares producidos por la proteína de fusión NUP98-KDM5A en hPSC

5.2.9.1 NUP98 en la envoltura nuclear

Se ha descrito que las proteínas de fusión con NUP98 en su estructura pueden interactuar con el propio NUP98 endógeno no fosforilado durante la interfase.^{115,172} Previamente habíamos comprobado que la expresión de NK5A no afecta a la expresión ni localización de la proteína KDM5A endógena (Fig. 15A y B) y quisimos comprobar también la expresión y localización de NUP98

Resultados

endógeno en las iPS4F8-NK5A. Realizamos un WB de extractos de cultivos asincrónicos de los clones iPS4F8-Control y los clones iPS4F8-NK5A y no observamos cambios apreciables en los niveles de la proteína endógena NUP98 (Fig. 45A). También realizamos un WB para NUP98 en células arrestadas en mitosis y se pudo observar en la línea Control#1 la presencia de la proteína NUP98 en estado fosforilado, mientras que no se observó fosforilación en NUP98 en la línea NK5A#29 (Fig. 45B). NUP98 resulta fosforilada por múltiples quinasas al iniciarse el proceso mitótico para poder dismantelar la envoltura nuclear.¹⁷³

Estudiamos la localización de NUP98 por IF en el Control#1 y #18 y NK5A#27 y #29 (Fig. 45C) y observamos una reducción significativa de la expresión de NUP98 en envoltura nuclear de las células NK5A#27 y #29 al comparar con los controles (p-valor < 0.0001) (Fig. 45D). Una menor presencia de NUP98 en la envoltura nuclear de las células NK5A sugiere que la proteína de fusión podría estar secuestrando al NUP98 endógeno afectando a la integridad del núcleo. Se ha observado como proteínas de fusión que contiene parte de NUP98 afectan a la envoltura nuclear afectando a otras proteínas como las laminas¹⁷⁴, por lo que decidimos analizar por IF la expresión de la Lamina B (Fig. 45E). Se detectó una reducción significativa en la línea NK5A#29 respecto a la línea Control#2 (p-valor < 0.0001) (Fig. 45F).

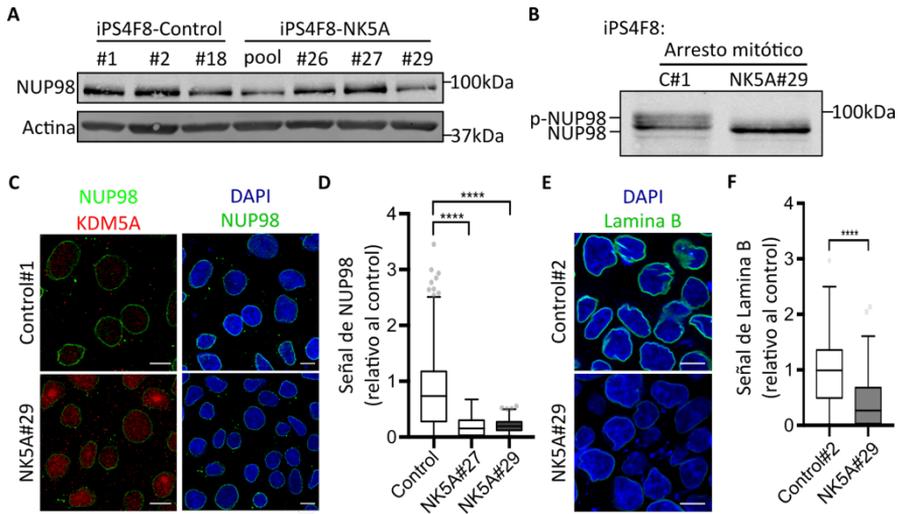


Figura 45. Estudio de la expresión y localización de la proteína NUP98 endógena en iPS4F8-Control y iPS4F8-NK5A. (A) WB contra NUP98 de células en cultivo asincrónico. Se utilizó la Actina como control de carga. (B) WB contra NUP98 de iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 arrestadas en mitosis. (C) IF contra NUP98 (verde), KDM5A (rojo) y Dapi (Azul) en las líneas iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. (D) Cuantificación de los niveles de NUP98 por IF entre el grupo control (Contol#1 y #18, n = 214) y las líneas NK5A#27 (n = 134) y #29 (n = 202). € IF contra LaminB (verde) y Dapi (Azul) en las líneas iPS4F8-Control#2 y NK5A#29. (F) Cuantificación de los niveles de LaminB por IF entre las líneas iPS4F8-Control#2 (n = 171) y NK5A#29 (n = 157).

Estos hallazgos parecen indicar que existe una desregulación en la localización y fosforilación del NUP98 endógeno provocando una

Resultados

menor presencia de proteínas estructurales en la envoltura nuclear de las células que expresan NK5A.

5.2.9.2. Efecto de la expresión de NK5A en la estructura y función del nucléolo

En las IF realizadas para detectar la proteína de fusión NUP98-KDM5A, llamó nuestra atención que la señal del anticuerpo anti-KDM5A dentro del nucléolo era muy intensa en las células iPS4F8-NK5A (Fig. 25 y 28B), por lo que realizamos una IF contra KDM5A y nucleolina y confirmamos que había una clara acumulación de KDM5A y NK5A dentro del nucléolo (Fig. 46A). Analizamos el posible efecto de la acumulación de KDM5A en la estructura y organización del nucléolo mediante una IF de la proteína nucleolar, la nucleolina (Fig. 46B). Como se observa en la Figura 46C, la expresión de la nucleolina era significativamente menor en el clon NK5A#29 comparado con el Control#1. Se ha descrito como proteínas de fusión como AML1-ETO, MLL-AF4 o MLL-AF9, causante de leucemia, tienen localización nucleolar y pueden provocar una desregulación de la función de este orgánulo.^{175,176}

Para determinar si la expresión de NK5A afectaba a la función del nucléolo, analizamos en nuestros datos del RNA-seq los genes que muestran una correlación negativa con la expresión de NK5A. Mediante un análisis de Spearman ($r < -0.8$ y $p\text{-valor} < 0.05$) se obtuvo una lista de genes correlacionados negativamente con la expresión de NK5A (Fig. 46D). Esta lista de genes fue analizada con

la herramienta EnrichR obteniendo los grupos funcionales que se asocian a estos genes. Entre los primeros 10 grupos de genes funcionales que aparecieron en la base de datos Reactome 2016, los 6 primeros tienen que ver con la función del nucléolo de procesamiento y modificación de ARN ribosómico (rARN) y ARN de transferencia (tARN) (Fig. 46E).

La función más estudiada del nucléolo es la de ser la localización subcelular dónde se producen y procesan los rARN 5.8S, 18S, 28S y 45S, piezas fundamentales para la formación de los ribosomas y la traducción de proteínas. Los niveles de rARN pueden verse alterados si se afecta la función nucleolar.¹⁷⁷

Para comprobar si la función nucleolar estaba afectada, analizamos la expresión de rARN en los clones iPS4F8-Control y iPS4F8-NK5A. En el clon NK5A#26 observamos un aumento significativo en la expresión del rARN 5S, 18S y 28S respecto a los controles, mientras que en los clones NK5A#27 y NK5A#29 se ve un descenso significativo del rARN 5.8S y 28S, además del 45S solo en el NK5A#29 (Fig. 46F).

Resultados

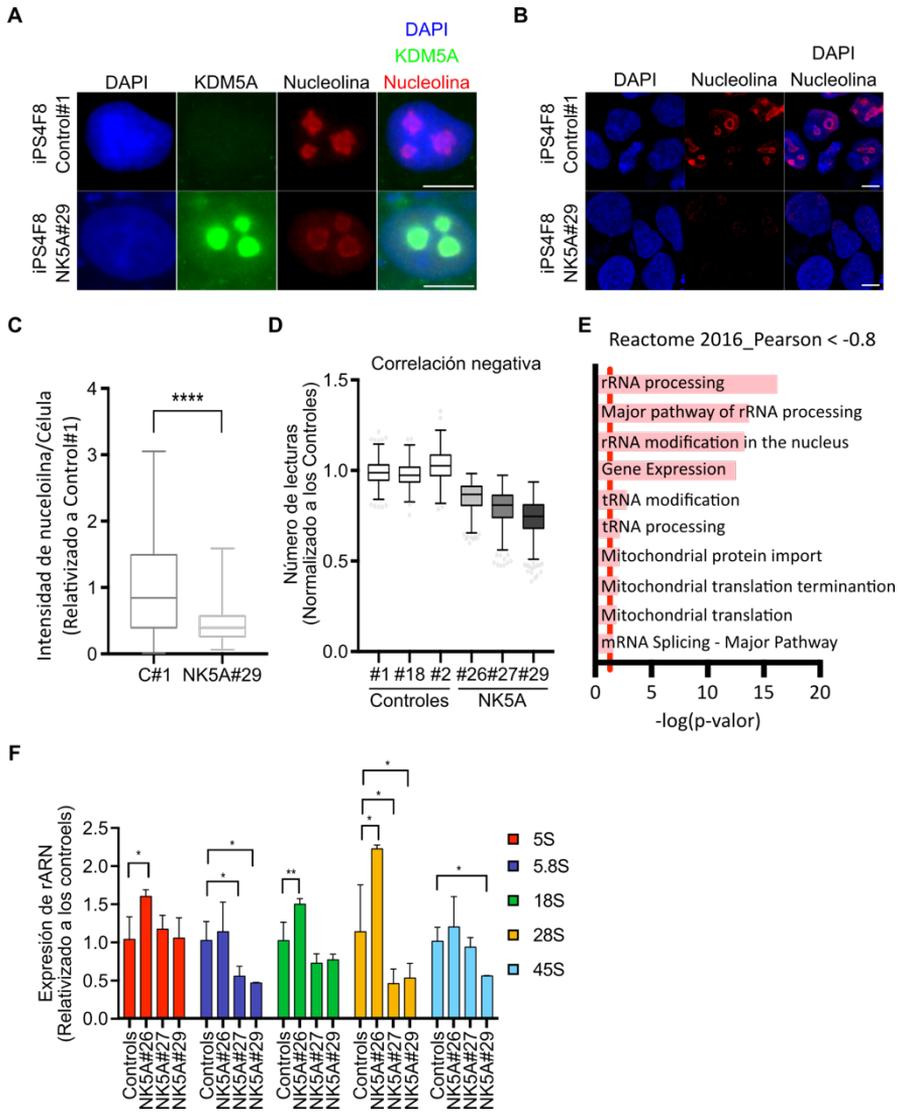


Figura 46. Análisis del efecto de la expresión de NUP98-KDM5A en el nucléolo. (A) IF de Nucleolina y KDM5A en el iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. Escala: 10 μ m. (B) IF de Nucleolina en el iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. Escala: 10 μ m. (C) Gráfico de cajas Tukey de la señal de nucleolina por célula. Control#1, n= 129, NK5A#29, n=116. (D) Gráfico de cajas Tukey mostrando las lecturas de genes normalizadas con una correlación de Spearman negativa ($r < -0.8$ y p-valor < 0.05) con la expresión por mRNA de NK5A en los diferentes clones. (E) Primero 10 grupos funcionales de genes enriquecidos de la base de datos Reactome 2016 de los genes correlacionados negativamente por Spearman ($r < -0.8$ y p-valor < 0.05). La línea roja en es p-valor < 0.05 .(F) qPCR de genes de ARN ribosómico en las distintas líneas control y NK5A.

Estos últimos datos nos sugieren que existe un efecto en la cantidad de proteína de fusión y su efecto en la función nucleolar. Una mayor expresión de NK5A afecta negativamente a la síntesis de rARN procedente del nucléolo. En cambio, en el clon NK5A#26 con una menor expresión de NK5A se observó un aumento de rARN procedentes del nucléolo y del rARN 5S, gen ubicado fuera del nucléolo.

5.2.10. Análisis de la diferenciación de las hPSC con expresión de NUP98-KDM5A

5.2.10.1. Análisis de la diferenciación temprana a las tres capas germinales mediante citometría de masas (CyTOF)

Durante el desarrollo de este trabajo, realicé una estancia internacional de doctorado en la Universidad de Stanford, California, en la que se aplicó citometría de masas (CyTOF) al estudio de la diferenciación temprana de las líneas celulares iPS4F8-Control y NK5A. La citometría de masas es una técnica que fusiona la citometría de flujo con la detección de metales por espectrometría de masas. Con anticuerpos unidos a metales se permite la detección de más de 50 marcadores a la vez en las muestras analizadas.¹⁷⁸

Diseñamos un panel de marcadores para analizar las células en estadio pluripotente y así verificar algunos de nuestros resultados previamente descritos, aprovechando la capacidad de análisis del CyTOF, juntamente con la experiencia del laboratorio de destino.

Las líneas iPS4F8-Control#2 y iPS4F8-NK5A#29 fueron incubadas con IdU (Incorporación durante la síntesis de ADN), BRU (Incorporación durante la síntesis de ARN) y puromicina (Incorporación durante la traducción de proteínas) para medir los procesos de duplicación, transcripción y traducción. Al mismo tiempo, se incubó con cisplatino justo antes de su recolección para excluir las células muertas del análisis. Los resultados muestran que las células

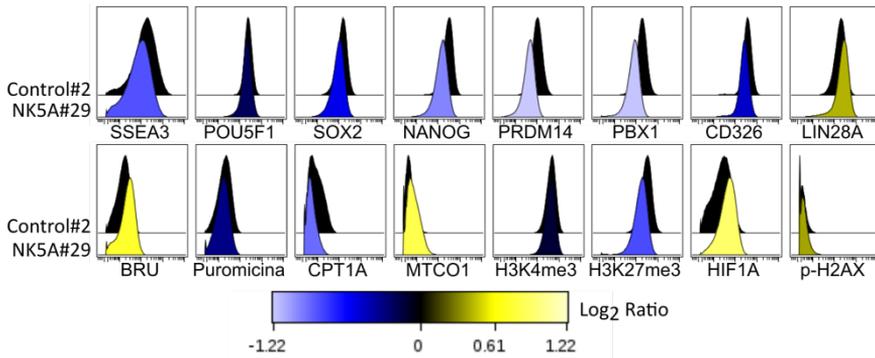
NK5A#29 tienen menor expresión de marcadores de pluripotencia como SSEA3, SOX2, NANOG, PRMD14, PBX1 y CD326 y mayor expresión de LIN28A, mientras que no se observan cambios en la expresión de POU5F1 al comparar con el Control#2 (Fig. 47A). Los resultados obtenidos de expresión de genes (Fig. 29C) no concuerdan con los niveles de proteína en los genes *SOX2* y *NANOG*, además de disminuir otros marcadores de pluripotencia, pudiendo afectar a la capacidad de diferenciación de estas células. Los niveles de transcripción se ven aumentados, en consonancia con los datos de RNA-seq de un mayor número de genes sobreexpresados en las células que expresan NK5A (Fig. 34B y C), aunque eso no se traduce en un aumento de la traducción de proteínas (Fig. 47A). Mientras los niveles de H3K4me3 se mantienen iguales en ambas líneas, los niveles de H3K27me3 disminuyen en las células NK5A#29 indicando un aumento en la transcripción de genes bivalentes, también observado en datos del RNA-seq (Fig. 34D).

En cuanto al análisis de la función mitocondrial observamos como la proteína MTCO1, indicador de la masa mitocondrial, está aumentada en las células NK5A#29 y el marcador CPT1A, indicador de la capacidad de transporte de ácidos grasos a la mitocondria se ve disminuido indicando una menor función mitocondrial (Fig. 47A). Estos datos parecen indicar que la función mitocondrial está comprometida como indican nuestros datos anteriores (Fig. 37A y B). Los niveles de HIF1A aumentaron en la línea NK5A#29 detectando un aumento de los niveles de p-H2AX (Fig. 47A).

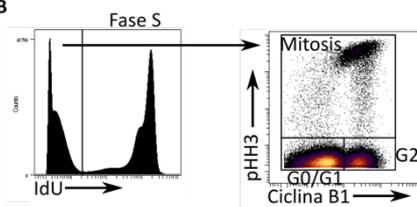
Resultados

Para explorar con más detalle los cambios en el ciclo celular que habíamos observado previamente (Fig. 32A y B), marcamos las células con IdU para discriminar las células en fase S además de marcarlas con Ciclina B1 para determinar si están en fase G2 y pHH3, marcador de mitosis (Fig. 47B). No se observaron diferencias entre los porcentajes en ninguna de las fases del ciclo celular. Dado a que previamente habíamos observado un incremento en el marcador de daño celular H2AX en las células que expresan NK5A (Fig. 38),

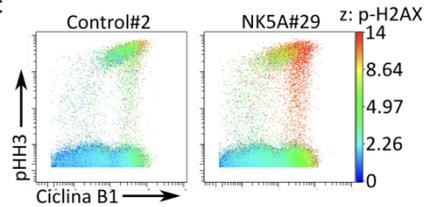
A



B



C



D

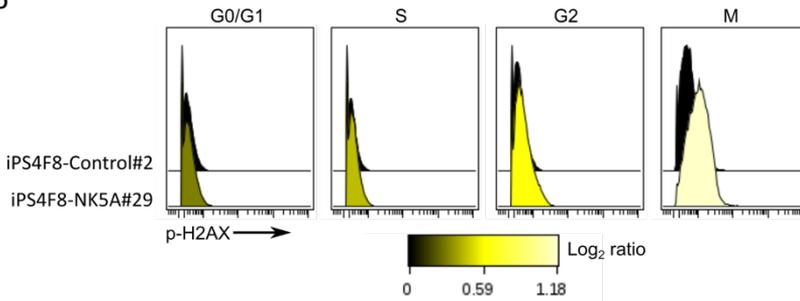


Figura 47. Análisis por CyTOF de las líneas iPS4F8-Control#2 y NK5A#29 en estado indiferenciado. (A) Histogramas de los marcadores analizados mostrando la ratio de Log_2 de la expresión de cada marcador relativizado al Control#2. (B) Ejemplo del análisis de la fase S a partir del Histograma de IdU. Dentro de la población negativa para IdU, gráfico de puntos con los marcadores Ciclina B1 y pHH3, para observar las distintas fases del ciclo celular. (C) Gráfico de puntos para observar las fases del ciclo celular y representado en una escala de color, los niveles de p-H2AX. (D) Histogramas de los niveles de p-H2AX en las distintas fases del ciclo celular. Mostrando la ratio de Log_2 de la expresión relativizado al Control#2.

estudiamos su expresión en las distintas fases del ciclo celular y observamos que las células NK5A#29 muestran un aumento en la expresión de p-H2AX a medida que avanzan las fases del ciclo celular, encontrando el nivel más elevado durante la mitosis (Fig. 47C y D).

Estos análisis en CyTOF corroboran nuestras observaciones previas de un aumento en la transcripción y una desregulación de la marca epigenética H3K27me3, además de determinar una disfunción mitocondrial y un aumento de los niveles de HIF1A. Por último, hemos comprobado nuestros resultados anteriores del aumento de daño en el ADN durante la mitosis.

Resultados

Posteriormente estudiamos la capacidad de diferenciación de las células iPS4F8-Control#2, Control#18 y las NK5A#29 hacia las tres capas germinales de forma dirigida usando un kit comercial.

Después de 6 días, en las células diferenciadas a ectodermo y endodermo no se apreciaban cambios a nivel de morfología de células entre los clones iPS4F8-Control y el clon NK5A#29 (Fig. 48A, B). Sin embargo, en las células diferenciadas a mesodermo se podían observar claras diferencias en morfología entre los clones iPS4F8-Control y el clon NK5A#29. Mientras que en los clones iPS4F8-Control las células producidas formaban una monocapa, en NK5A#29 se observaron estructuras en 3D que no aparecían en los controles (Fig. 48C). Además, no se observaron diferencias en el número de células en las diferenciaciones a ectodermo ni endodermo (Fig. 48D y E), mientras en la diferenciación a mesodermo encontramos un aumento significativo en el número de células del clon NK5A#29 respecto a los clones iPS4F8-Control (Fig. 48F).

Se diseñó un panel con marcadores de pluripotencia para observar su decaimiento durante la diferenciación y las tres capas germinales con SOX2 para ectodermo, EOMES, GATA4 y GATA6 para endodermo y ISLET1 y HAND1 para mesodermo.

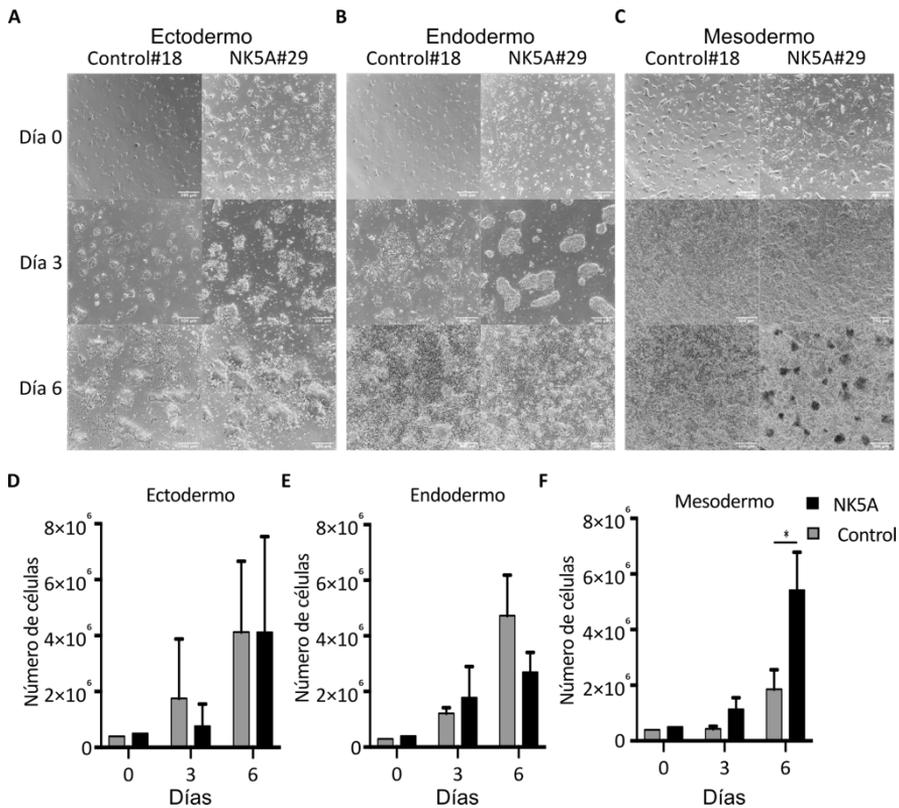


Figura 48. Diferenciaciones a las tres capas germinales de las líneas iPS4F8. (A) Imágenes en campo claro de las diferenciaciones a ectodermo a distintos días de las líneas C#2 y NK5A#29. Objetivo 4x. Escala 500µm. (B) Imágenes en campo claro de las diferenciaciones a endodermo a distintos días de las líneas C#2 y NK5A#29. Objetivo 4x. Escala 500µm. (C) Imágenes en campo claro de las diferenciaciones a mesodermo a distintos días de las líneas C#2 y NK5A#29. Objetivo 4x. Escala 500µm. (D) Curva de crecimiento de las líneas Control (C#2, C#18) y NK5A#29 durante la diferenciación a ectodermo, n=3. (E) Endodermo, n=3. (F) Mesodermo, n=3. Media ± SEM. * p < 0.05.

Resultados

Al día inicial de la diferenciación (día 0), todas las líneas celulares expresaban altos niveles de los marcadores de pluripotencia POU5F1, SOX2 y NANOG y bajos niveles de los marcadores de diferenciación. Tanto en el Control#18 como en NK5A#29, a día 6 de la diferenciación hacia las tres capas germinales se observó una disminución en la expresión de los factores de pluripotencia de POU5F1 y NANOG (Fig. 49A). Igualmente, en los clones iPS4F8-Control#18 y -NK5A#29, se observó de manera similar el incremento en la expresión de SOX2 en las células diferenciadas hacia ectodermo y el incremento de la expresión de los marcadores EOMES, GATA4 y GATA6 en las células diferenciadas a endodermo, y el incremento en la expresión de los marcadores HAND1 e ISLET1 en las células diferenciadas hacia mesodermo (Fig. 49A). Finalmente, dentro de la población de mesodermo, se analizaron los marcadores CD34 y KDR para profundizar en los marcadores que se producen esta capa germinal, pero no se observaron cambios significativos entre iPS4F8-Control#18 y -NK5A#29 (Fig. 49B y C).

Estos resultados sugieren que NK5A tiene un efecto en la diferenciación a mesodermo ya que las células que expresan la proteína de fusión mostraron una mayor capacidad de proliferación en la diferenciación a mesodermo comparado con las células control, mientras que no se observó dicha diferencia en las diferenciaciones a ectodermo ni endodermo. Este efecto en la diferenciación a mesodermo no se observó en los marcadores analizados ya que se obtuvieron resultados similares tanto en

iPS4F8-Control#18 y NK5A#29, al igual que en los marcadores de ectodermo y endodermo.

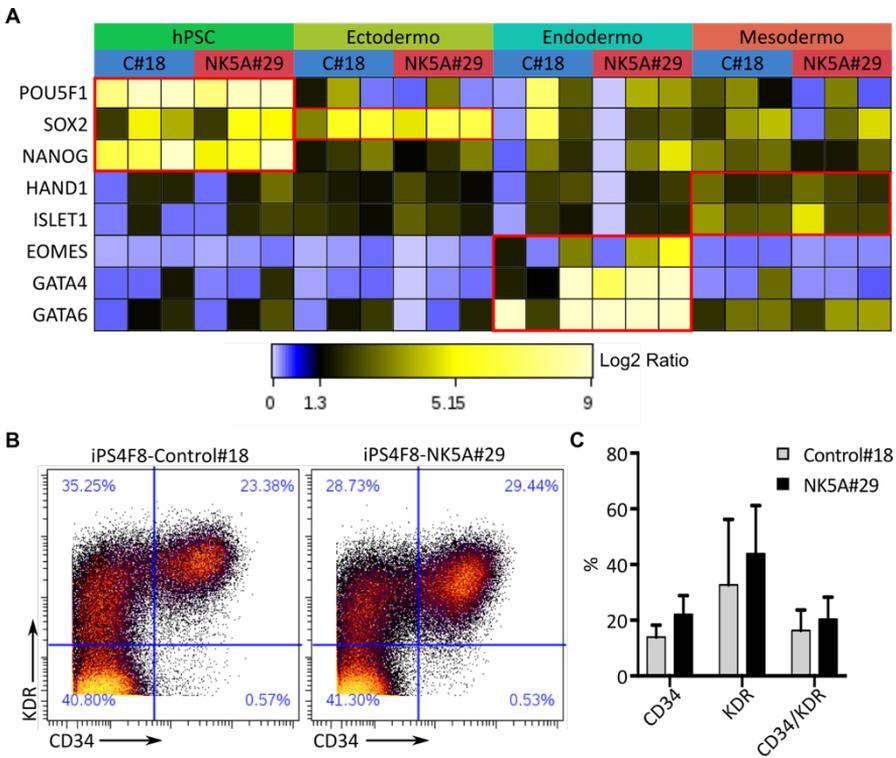


Figura 49. Análisis por CyTOF de marcadores de diferenciación de las tres capas germinales. (A) Mapa de calor de 8 marcadores de pluripotencia y de capas germinales. El color representa la ratio Log_2 de expresión relativizado a la muestra que tiene menor señal para cada marcador. Los cuadros rojos representan los marcadores específicos de cada estadio de diferenciación. (B) Gráfico de puntos mostrando CD34 y CD309 (KDR) en las líneas Control#18 y NK5A#29. (C) Gráfico de barras de los marcadores CD34 y CD309 (KDR) de las líneas C#18 y NK5A#29, $n=3$. Media \pm SEM.

Resultados

5.2.10.3. Análisis de la diferenciación hematopoyética.

Posteriormente caracterizamos el efecto de la expresión de *NUP98-KDM5A* en la diferenciación hematopoyética de las hPSC. Para conseguirlo se utilizó un kit comercial con una fase inicial de inducción de mesodermo y una segunda fase de diferenciación hematopoyética. En la figura 50A se muestra el esquema del protocolo de diferenciación. Diferenciamos los clones iPS4F8-Control#1 y NK5A#29.

Para iniciar el proceso, se sembraron pequeños trozos de colonia de hPSC. Al día 3 se observó como las colonias se expandieron generando zonas de mayor densidad en el interior de la colonia, como indica el protocolo. Al día 8, las colonias se habían expandido aún más ya ocupando una gran parte del espacio. A partir del día 8, el cultivo colapsaba y fue imposible analizar las diferenciaciones a después de ese punto (Fig. 50B).

Para poder determinar el estadio de diferenciación de las células se analizaron distintos marcadores a día 3 y día 8 de la diferenciación. Se analizaron marcadores para las distintas poblaciones que van apareciendo durante la diferenciación hematopoyética: Células pluripotentes (SSEA4), mesodermo (CD56 y KDR), progenitor hematoendotelial (CD34 y CD31) y progenitor hematopoyético (CD43). A inicio de la diferenciación, las hPSC expresan el marcador SSEA4, este va decayendo en expresión a medida que la célula se

diferencia. Las células que avanzan hacia la diferenciación mesodérmica empiezan a expresar CD56. De esta población CD56⁺ aparecen los marcadores KDR para determinar el mesodermo tardío. A continuación de esta población CD56⁺KDR⁺ se empieza a expresar el marcador CD34 y a continuación el CD31, típico de progenitores hemato-endoteliales. Estos progenitores CD34⁺CD31⁺ al continuar con su especificación hematopoyética, expresan CD43, marcador de célula hematopoyético primitivo, para acabar perdiendo el CD34.⁷⁹

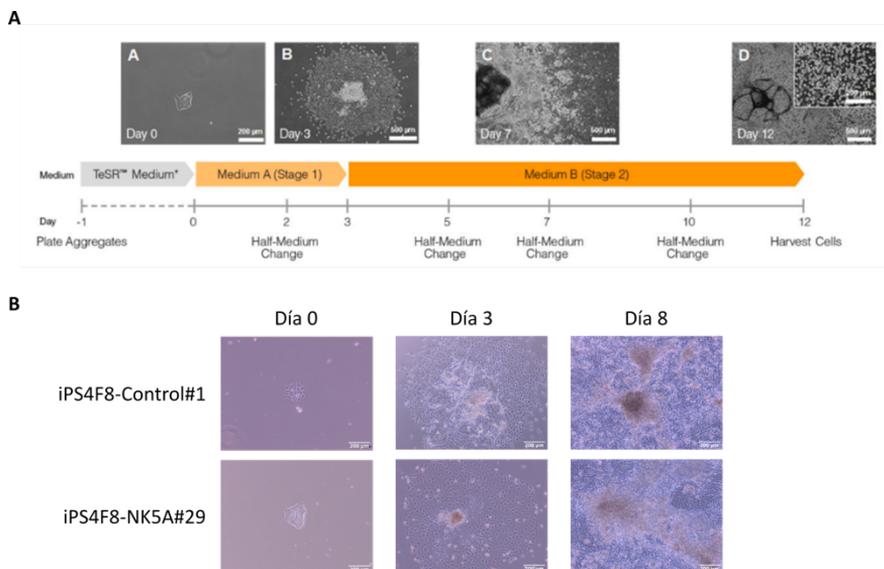


Figura 50. Diferenciación hematopoyética de los clones iPS4F8-Control#1 y NK5A#29. (A) Esquema del protocolo de diferenciación y fotografías de ejemplo. (B) Imágenes de campo claro de las células iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 usadas en las diferenciaciones hematopoyéticas a distintos días. Objetivo 4x. Escala: 200μm.

Resultados

Como era esperado, la expresión del marcador de pluripotencia SSEA4 se pierde a medida que avanza la diferenciación, sin haber diferencias significativas entre iPS4F8-Control#1 y NK5A#29 (Fig. 51A). En cuanto a los marcadores de mesodermo, se observó como el CD56 bajaba de expresión entre el día 3 y 8 en las iPS4F8-Control#1, en cambio aumenta su expresión en las NK5A#29, siendo significativa respecto al Control#1 (Fig. 51B). En la expresión de KDR no se observaron diferencias significativas entre la línea control y la que expresa proteína de fusión (Fig. 51C).

En ambas líneas vemos la expresión del marcador CD34 al día 3 que incrementa a día 8, mientras que la expresión de CD31 no se observa hasta el día 8. Sin embargo, a día 8 la expresión de CD34 y CD31 es significativamente menor en NK5A#29 con respecto al Control#1 (Fig. 51D y E). Además, se observó una producción significativamente menor de progenitores endoteliales ($CD34^+CD31^+CD43^-$) en las células iPS4F8-NK5A#29 respecto al Control#1 (Fig. 50F) y la misma tendencia para la población de progenitores hematopoyéticos ($CD34^+CD43^+$) (Fig. 51G). No se obtuvieron en ningún caso células hematopoyéticas primitivas $CD34^-CD43^+$.

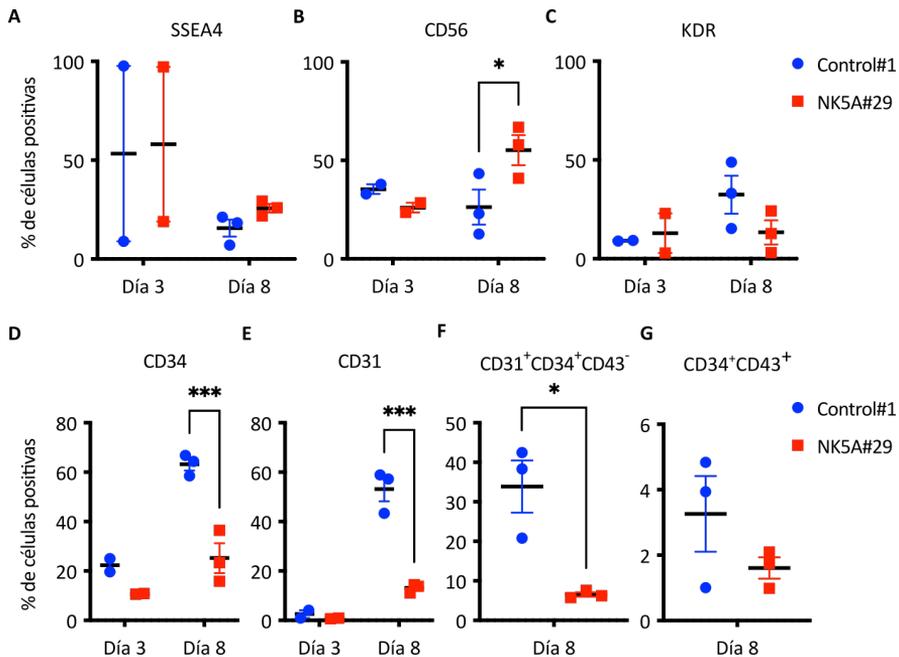


Figura 51. Marcadores analizados durante la diferenciación hematopoyética. (A) Resultados de citometría de flujo para SSEA4. (B) CD56. (C) KDR. (D) CD34. (E) CD31. (F) CD34⁺CD31⁺CD43⁻. (G) CD34⁺CD43⁺. A día 3 n=2, día 8 n=3. Test ANOVA tipo II. * p < 0.05, *** p < 0.001.

Estos resultados indican que las células que expresan NK5A sufren un bloqueo de la diferenciación en el estadio del mesodermo, ya que observamos una mayor expresión de CD56 y una bajada de las distintas poblaciones de progenitores hemato-endoteliales y hematopoyéticos.

Resultados

Al observar como el cultivo colapsaba alrededor de día 10, se decidió utilizar un sistema de diferenciación hematopoyética de co-cultivo con la línea celular OP9, derivada del estroma de médula ósea de ratón que permite imitar la señalización que sufren las células durante la diferenciación hematopoyética. No se consiguió avanzar más en la diferenciación y por ese motivo se planteó la estrategia de generar un modelo inducible que no expresara NK5A en el estado indiferenciado.

5.3. Objetivo 3 Desarrollo de un modelo de expresión inducible de NUP98-KDM5A en células pluripotentes humanas utilizando el sistema CRISPR/Cas9

Este objetivo se centra en la generación de un modelo de expresión inducible del gen de fusión NK5A en hPSC y estudiar el efecto de su inducción durante la diferenciación hematopoyética.

A partir de los datos del apartado anterior, se pudo concluir que la línea celular iPS4F8 tiene problemas para diferenciar más allá de la población CD34⁺. Además, las células que expresan NK5A muestran un bloqueo claro de la diferenciación hematopoyética posiblemente por una expresión demasiado temprana de NK5A. Por estos motivos, el modelo de expresión constitutiva desde el estadio pluripotente no consigue ser útil para el estudio del efecto de la proteína de fusión durante la diferenciación hematopoyética, al no ser posible obtener poblaciones de progenitor hematopoyético. Por este motivo planteamos la generación de un sistema inducible de expresión de la proteína de fusión para poder modular la expresión de NK5A en distintos momentos de la diferenciación, además de cambiar la línea celular base donde generar el modelo a una línea embrionaria como la H9, para obtener mejores diferenciaciones hematopoyéticas.

5.3.1. Generación de las líneas H9-iNK5A

Para la edición génica de la línea de hESC H9 (WA09) utilizamos un sistema de recombinación homóloga que introduce de manera

Resultados

dirigida en el locus AAV1S del genoma el inserto con la secuencia codificante de NK5A (que contiene una secuencia FLAG) bajo un promotor regulable por doxiciclina mediante CRISPR/Cas9. El inserto contiene brazos de homología que dirigen la recombinación homóloga en el locus AAVS1, el gen de resistencia a neomicina, y el transactivador rtTA3 que sólo en presencia de doxiciclina se une al promotor TRE3G, permitiendo la transcripción de *NUP98-KDM5A* (Fig. 52A). Se diseñaron parejas de cebadores dentro y fuera del constructo para comprobar si el vector se insertó en el locus deseado. En la Figura 52A se muestra la región que reconocen los distintos cebadores: la pareja en rojo sólo reconoce el locus sin editar, mientras que los cebadores azul y verde en combinación con los rojos permiten detectar la inserción dentro del sitio deseado. Como era de esperar, la línea no editada H9 WT sólo presenta amplificación con la pareja de cebadores roja, ya que no existe ningún inserto en su genoma. La línea editada original, H9 iNK5A *Bulk*, presenta amplificación con las tres combinaciones de cebadores, ya que contiene células sin editar, células con un alelo editado (heterocigoto) y células con los dos alelos editados (homocigoto). También generamos líneas clonales a partir de la línea original y los dos clones analizados, H9 iNK5A#5 y H9 iNK5A #16, sólo presentan amplificación con las combinaciones de cebadores rojo/azul y rojo/verde, mostrando que los dos alelos fueron editados (Fig. 52A). Realizamos mediante qPCR una recta patrón con cantidades conocidas de plásmido, para cuantificar el número de insertos que presenta cada línea celular y determinamos

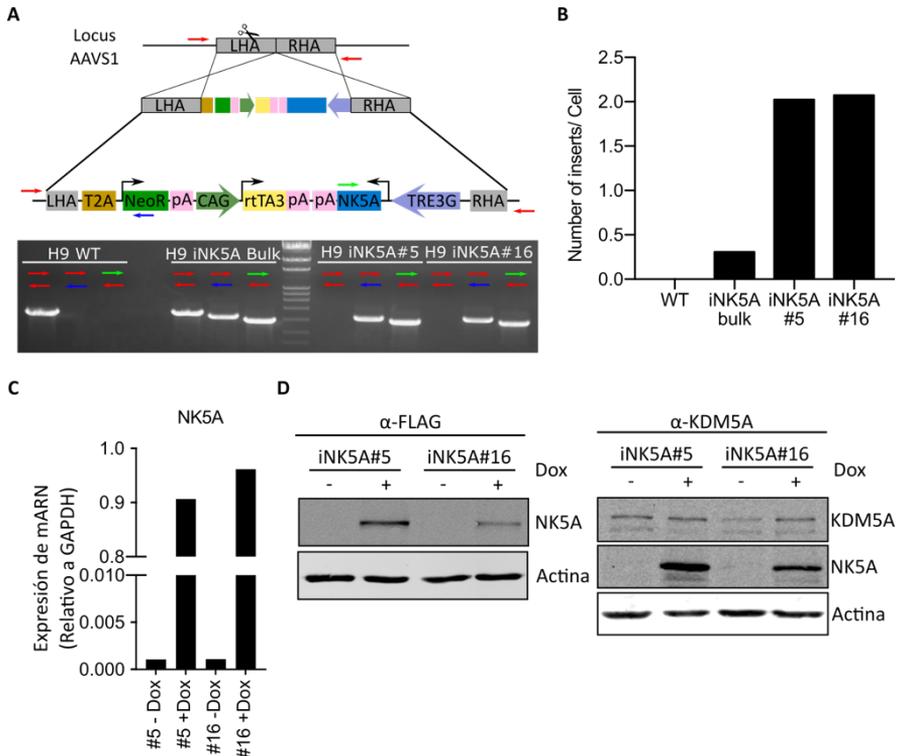


Figura 52. Generación y caracterización de hPSC de expresión de NK5A inducible por doxiciclina. (A) Esquema del constructo introducido por recombinación homóloga en el locus AAVS1. Las flechas indican los distintos cebadores utilizados para las PCR (B) Gráfico representando el número de insertos detectados en el genoma de las distintas líneas analizadas. (C) Análisis de RT-qPCR para detectar los niveles de expresión NK5A en las líneas clonales sin y con tratamiento de 2 µg/mL de doxiciclina. Relativizado al gen control GAPDH. (D) WB para detectar la proteína de fusión utilizando un anticuerpo anti-FLAG o anti-KDM5A en los clones iNK5A#5 y #16 al inducir con doxiciclina. La actina fue utilizada como control de carga.

Resultados

que la línea original H9 iNK5A presenta alrededor de 0.3 insertos/célula y los clones H9 iNK5A#5 y #16 2 insertos/célula. (Fig. 52B). Posteriormente comprobamos el funcionamiento del sistema inducible en los clones añadiendo 2µg/mL de doxiciclina al medio de cultivo durante 48 horas. Realizamos una qPCR para detectar la expresión de NK5A y observamos que, aunque había pequeños niveles de expresión del gen de fusión en ausencia de doxiciclina, estos niveles eran insignificantes respecto a la inducción de NK5A en presencia de doxiciclina, que se incrementaban entre 600-800 veces (Fig. 52C). También comprobamos la expresión de proteína de fusión mediante WB usando un anticuerpo anti FLAG (Fig. 54D) y anti-KDM5A (Fig. 52D), donde solo se detecta NK5A en los clones después del tratamiento con doxiciclina.

5.3.2. Caracterización de las líneas H9 iNK5A

Una vez comprobado el funcionamiento del sistema de expresión inducible en las líneas H9iNK5A, caracterizamos las líneas generadas para comprobar si mantienen el fenotipo pluripotente. Tanto la línea H9 iNK5A *bulk* como los dos clones, mantienen la morfología característica de hPSC, formando colonias compactas de células pequeñas (Fig. 53A). Al generar líneas clonales es importante comprobar que no se haya seleccionado células con alteraciones cromosómica, por lo que se realizaron cariotipos a las líneas H9 iNK5A#5 y #16, que mostraron un cariotipo femenino normal (Fig. 53B). Se analizaron por qPCR los factores de transcripción típicos de

pluripotencia, *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* y *REX1* y se comprobó que todas las líneas expresan estos factores a niveles comparables a la línea H9 WT (Fig. 53C).

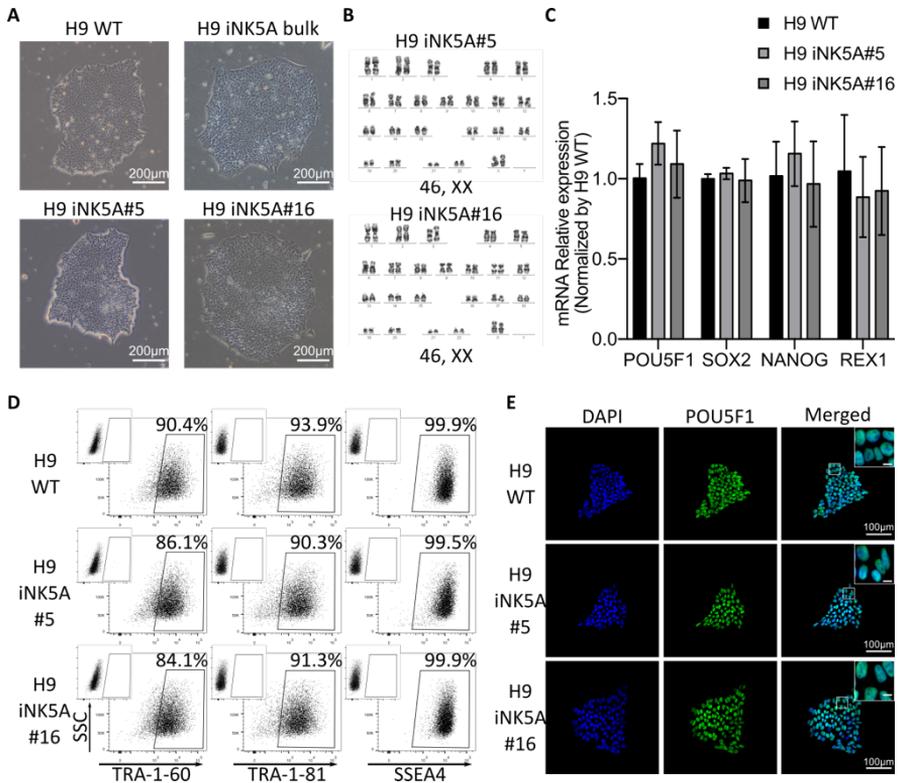


Figura 53. Caracterización de las líneas H9 iNK5A. (A) Imágenes de campo claro mostrando la morfología de las colonias. Objetivo: 4x. Escala: 200µm. (B) Cariotipos. (C) Expresión de genes de pluripotencia en las distintas líneas analizada por qPCR, n=3. Media ± SEM. (D) Expresión de los marcadores de superficie asociados a pluripotencia analizadas por citometrías de flujo para (E) IF para detectar POU5F1 en las distintas líneas. Objetivo: 10x. Escala: 100µm. Escala zoom: 10µm.

Resultados

La expresión de marcadores de superficie de pluripotencia Tra-1-60, TRA-1-81 y SSEA4 fue confirmada por citometría de flujo en las líneas H9 WT, iNK5A#5 y #16 (Fig. 53D). También se analizó la expresión de la proteína de POU5F1 con una IF donde se puede apreciar a nivel de célula única la expresión de dicho factor de transcripción en todas las líneas celulares (Fig. 53E).

5.3.3. Validación del modelo de expresión inducible de NK5A durante la diferenciación estocástica de cuerpos embrionarios.

Para comprobar la funcionalidad del sistema de inducción y el efecto de la expresión de *NUP98-KDM5A* durante un proceso de diferenciación, generamos cuerpos embrionarios (del inglés Embryoid bodies, EBs) de las líneas H9 WT y los dos clones H9 iNK5A #5 y #16 y los cultivamos para su diferenciación estocástica a las tres capas germinales, en ausencia o presencia de doxiciclina. Después de 21 días las dos líneas clonales al diferenciarse en presencia de doxiciclina generaron EBs más pequeños y menos compactos que los generados en ausencia de doxiciclina o los EBs de H9 WT (Fig. 54A). Mediante WB comprobamos que la proteína de fusión NK5A únicamente se expresaba en los EBs de las líneas H9 iNK5A#5 y #16 en presencia de doxiciclina (Fig. 54B).

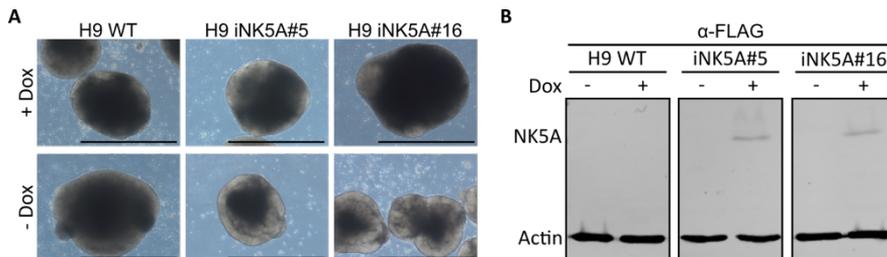


Figura 54. Generación de EBs de las líneas H9 WT y H9 iNK5A #5 y #16 en presencia o ausencia de doxiciclina. (A) Imágenes de campo claro de los EBs a día 21 de diferenciación. Objetivo: 4x. Escala: 1000 μ m. (B) WB de anti-flag para detectar la proteína de fusión NUP98-KDM5A en los EBs a día 21 de diferenciación. La actina fue utilizada como control de carga.

A los 21 días de diferenciación, se prepararon los EBs para análisis de histología e inmunohistoquímica. Mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) observamos que los EBs de H9 WT y de los clones H9 iNK5A en ausencia de doxiciclina, tenían una constitución homogénea formados principalmente por células pequeñas con cromatina homogénea y nucléolos prominentes (Fig. 55A). En contraste, los EBs de las líneas H9 iNK5A #5 y #16 cultivados en presencia de doxiciclina, tenían una constitución mucho más heterogénea y estaban compuestos por células con diferente tamaño y morfología, con algunas estructuras pseudo-epiteliales, áreas de estroma central fibroso y estructuras rosetoides (Fig. 55B). Realizamos inmunohistoquímicas para distintos marcadores de diferenciación a las tres capas germinales, Citoqueratina AE1/AE3 (CK AE1 AE3) para endodermo, la cadena III beta de Tubulina (TUBB-

Resultados

III) para ectodermo y Vimentina para mesodermo. Tanto las H9 WT cómo las líneas H9 iNK5A cultivadas sin doxiciclina presentan un gran número de células con positividad para más de un marcador, lo que indica bajo nivel de diferenciación (Fig. 55A y B).

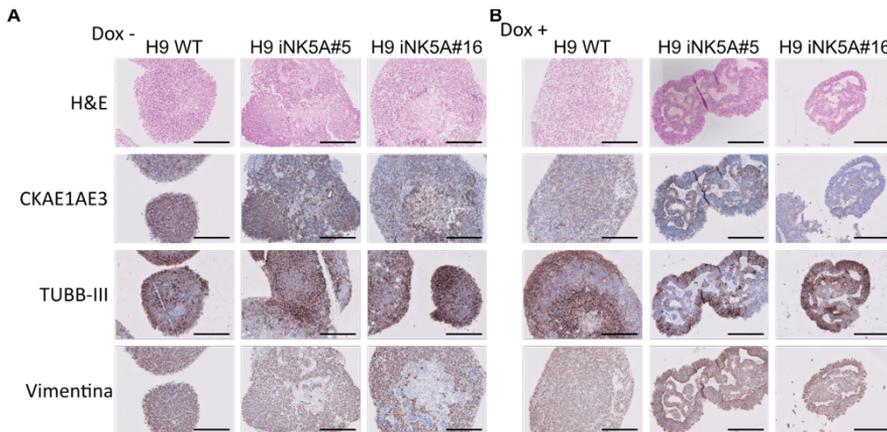


Figura 55. Histología e inmunohistoquímica de los EBs generados de las distintas líneas. (A) Imágenes de tinciones de hematoxilina & eosina (H&E), CKAE1AE3, TUBB-III, Vimentina de las H9 WT y los clones H9 iNK5A cultivados en ausencia de doxiciclina. Objetivo: 10x. Escala: 100µm. (B) Imágenes de tinciones de hematoxilina & eosina (H&E), CKAE1AE3, TUBB-III, Vimentina de las H9 WT y los clones H9 iNK5A cultivados en presencia de doxiciclina. Objetivo: 10x. Escala: 100µm.

En cambio, los EBs de las líneas H9 iNK5A cultivadas en presencia de doxiciclina, muestran un mayor grado de diferenciación celular, presentando estructuras más diferenciadas con una clara tinción de los marcadores de las capas germinales. Las tinciones de CKAE1AE3

y Vimentina se encontraban principalmente en la región basal de estructuras pseudo-epiteliales y rosetoides, mientras que la tinción de TUBB-III se encontraba principalmente en las regiones externas de los EBs (Fig. 55B).

5.3.4. Inducción de la proteína de fusión NUP98-KDM5A durante la diferenciación hematopoyética

Una vez que comprobamos la funcionalidad de nuestro modelo inducible de expresión de *NUP98-KDM5A*, analizamos el efecto de su expresión durante la diferenciación hematopoyética. En la leucemia pediátrica no está claro el tipo celular en el que se origina la enfermedad, por lo que decidimos analizar el efecto de la inducción de NK5A en dos poblaciones celulares distintas que aparecen durante la diferenciación *in vitro* de las hPSC. Diferenciamos durante 12 días las líneas H9 WT y los clones H9 iNK5A #5 y #16 en ausencia o presencia de diferentes dosis de doxiciclina: 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ empezando al día 3 de la diferenciación, para estimar el efecto en los niveles de expresión de *NUP98-KDM5A* (Fig. 56).

Resultados

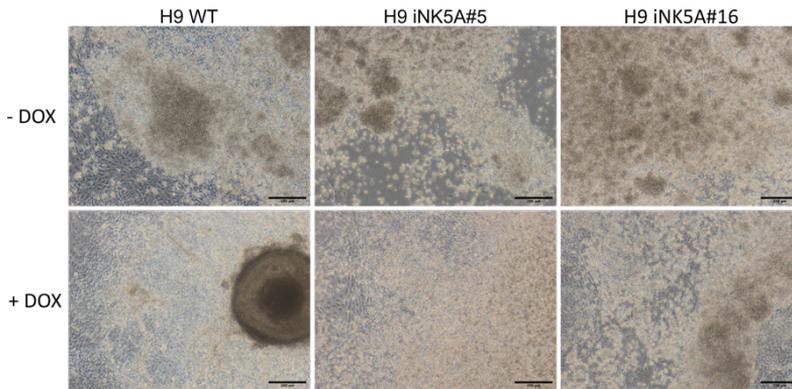


Figura 56. Imágenes de campo claro de diferenciación hematopoyética a día 12 de las líneas H9 WT, iNK5A#5 y #16 . Objetivo 4x. Escala: 200 μ m.

Se observó una relación directa entre la dosis de doxiciclina y los niveles de NK5A en los clones H9 iNK5A #5 y #16 (Fig. 57A), y también que la dosis de 2 μ g/mL produjo una reducción significativa del 50% en la viabilidad celular en ambos clones. Sin embargo, las distintas dosis de doxiciclina no tuvieron ningún efecto en la viabilidad celular en las células control (Fig. 57B). Como el cultivo con la dosis de 2 μ g/mL de doxiciclina mostró elevada muerte celular, se decidió excluirlo de análisis posteriores.

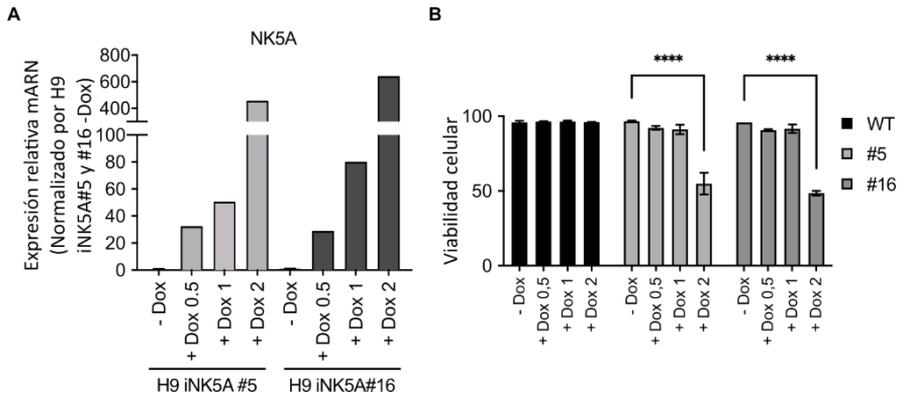


Figura 57. Efecto de las distintas dosis de doxiciclina en inducción de NK5A y la viabilidad celular durante la diferenciación hematopoyética. (A) Análisis de RT-qPCR de los niveles de mRNA de NK5A de las líneas clonales iNK5A#5 y #16 con 0.5, 1 o 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina (B) Citometrías de flujo para determinar la viabilidad celular por exclusión de marcaje con 7AAD, $n=3$. Media \pm SEM. Test ANOVA, **** $p < 0.0001$.

Para determinar el efecto de NK5A durante la diferenciación hematopoyética y aprovechar la posibilidad de controlar temporalmente la expresión del gen de fusión, analizamos la diferenciación hematopoyética de las líneas H9 WT and H9 iNK5A #5 y #16, induciendo la expresión de NK5A con 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina a partir del día 3 que es cuando se produce el mesodermo y del día 5, cuando aparecen los primeros progenitores hemato-endoteliales.¹⁷⁹ A día 12 analizamos por citometría de flujo la diferenciación a progenitores hemato-endoteliales ($\text{CD31}^+\text{CD34}^+\text{CD43}^-$), progenitores hematopoyéticos ($\text{CD34}^+\text{CD43}^+$) y células hematopoyéticas primitivas ($\text{CD34}^-\text{CD43}^+$). Al inducir la expresión de

Resultados

NK5A a día 3 en los clones H9 iNK5A observamos una reducción significativa tanto de células CD34⁺ (Fig. 58A) y CD31⁺ (Fig. 58B), como de progenitores hematopoyéticos y casi no se producen células CD43⁺ (Fig. 58C y D).

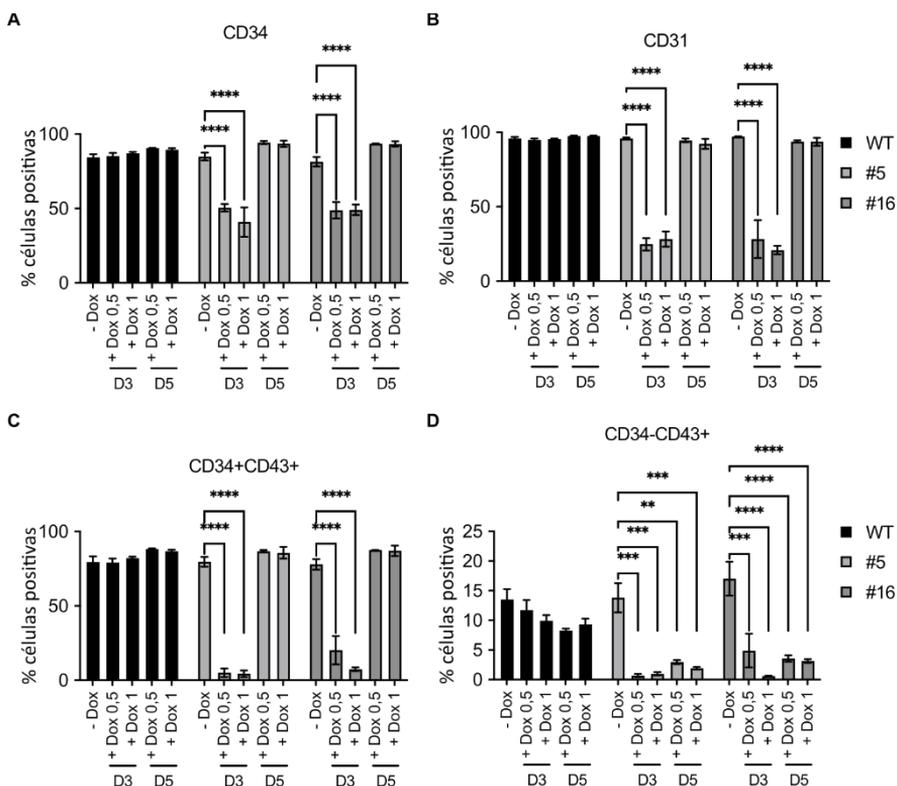


Figura 58. Efecto de la inducción de NK5A durante la diferenciación hematopoyética de hPSC. (A) Citometrías de flujo para determinar la expresión de CD34, (B) CD31, (C) CD34+CD43+, (D) CD34-CD43+, n=3. Media \pm SEM. Test ANOVA, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Sin embargo, la inducción del NK5A a día 5 en los clones H9 iNK5A solo afectó la producción de células hematopoyéticas primitivas (CD34⁻CD43⁺) (Fig. 58D). Cabe destacar que, en los experimentos en ausencia de doxiciclina, los clones H9 iNK5A mostraron niveles de diferenciación comparables con la línea H9 WT (Fig. 58 A-D).

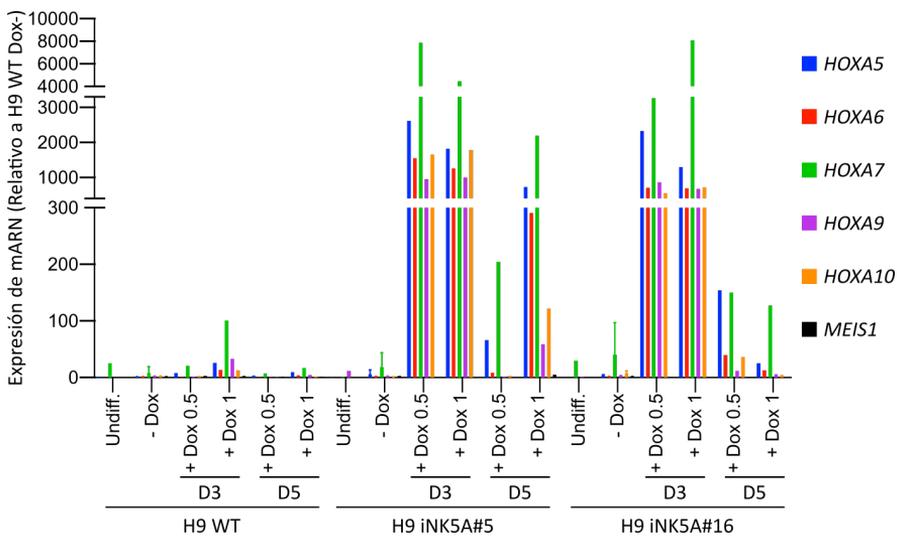


Figura 59. Análisis de expresión de mRNA de *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* y *MEIS1*. Los genes *GAPDH*, *HPRT*, *18S* y *RPL7* se utilizaron como genes normalizadores.

También determinamos el efecto de la inducción de NK5A en genes dianas de NK5A.^{47,147} Se analizó la expresión de los genes *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* y *MEIS1* (gen específico de hematopoyesis no afectado por la fusión) en H9 WT y los clones H9 iNK5A. En este estudio preliminar observamos que la expresión de

Resultados

NK5A durante la diferenciación hematopoyética induce la expresión de los genes del clúster HOX-A, diana de NK5A, pero no de *MEIS1*, siendo mayores los niveles de expresión cuando se induce NK5A a día 3 (Fig. 59).

6. Discusión

La LMA pediátrica se presenta como una de las mayores causas de mortalidad infantil por cáncer y es uno de los mayores retos médicos consiguiendo sólo entre un 20 a 70% de supervivencia dependiendo del tipo de LMA.^{29,33} Ha habido muy pocos avances en los tratamientos que se utilizan principalmente debido a la baja frecuencia de la enfermedad y a la alta variedad de alteraciones genéticas que presenta.¹⁸⁰ Por ese motivo entendemos que es de vital importancia generar modelos de la enfermedad que permitan su estudio sin la necesidad de depender de las muy escasas muestras de pacientes para poder avanzar en el conocimiento que se tiene de cada alteración particular. Se ha observado que muchas de las alteraciones genéticas asociadas a las leucemias pediátricas ya están presentes en el momento del nacimiento, por lo que estas mutaciones ocurren durante el desarrollo.^{36,42} La fusión *NUP98-KDM5A* está restringida casi en su totalidad a la población pediátrica¹⁴² lo que sugiere que también tiene su origen durante el desarrollo embrionario.

Son escasos los modelos de estudio de la leucemia con expresión del gen de fusión *NUP98-KDM5A*, aunque han logrado algunos avances importantes. En un modelo de ratón generado a partir de la expresión de *NUP98-KDM5A* en progenitores hematopoyéticos, se induce el proceso de transformación leucémico debido a que la proteína de fusión al contener el dominio PHD de *KDM5A* es capaz

de unirse a la marca de histonas H3K4me3 en los promotores de los genes del clúster HOX-A, evitando que se apaguen y bloqueando la diferenciación hematopoyética.⁴⁷ Estos bloqueos de la diferenciación se pueden explicar con el aumento de expresión de genes del clúster HOX-A, ya que se conoce que los niveles de estos genes son elevados en los progenitores hematopoyéticos y su expresión se reduce al continuar con la diferenciación hematopoyética.¹⁸¹ En otro estudio se generaron modelos de ratón con expresión regulable de tres proteínas de fusión que involucran *NUP98*, entre ellas *NUP98-KDM5A*, en progenitores hematopoyéticos. A través de análisis de ocupación de cromatina y RNA-seq se identificaron genes diana de las proteínas de fusión, identificando a *CDK6* como un gen diana común de todas estas proteínas de fusión y su posible utilidad como diana terapéutica.¹⁴⁸ La expresión de *NUP98-KDM5A* en progenitores hematopoyéticos humanos promueve el bloqueo de su maduración y auto renovación sostenida en el tiempo y también la capacidad de generar leucemia en xenotrasplantes. Se observó la sobreexpresión de genes del clúster HOX-A y HOX-B además de otros genes y se generaron distintos tipos de leucemias, incluso leucemias de linfoblástica B, nunca vista para este gen de fusión sin poder dar ninguna explicación.¹⁴⁷ Aunque muy útiles estos modelos, fallan en explicar porque la proteína de fusión provoca un proceso de transformación leucémica durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario además de no identificar en que población celular se da el evento de translocación. Por ese motivo nosotros

Discusión

nos hemos centrado en desarrollar modelos para el estudio de *NUP98-KDM5A* en las etapas más tempranas del desarrollo humano usando hPSC.

Utilizamos la edición génica mediada por el sistema CRISPR/Cas9 para reproducir la translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ que provoca la expresión del gen de fusión *NUP98-KDM5A* en hPSC, y así generar un modelo de la enfermedad lo más cercano posible a la realidad. Nuestros colaboradores Raúl Torres y Sandra Rodríguez del CNIO, Madrid, habían demostrado previamente la utilidad de este sistema de edición génica para la generación de la translocación cromosómica $t(11;22)$ en hPSC.¹⁸²

Establecimos las herramientas moleculares y condiciones experimentales para generar la translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)$ en células humanas de riñón embrionario HEK-293. Generamos con éxito la translocación en HEK-293, que comprobamos mediante secuenciación del gen de fusión *NUP98-KDM5* que incluía el punto de rotura. Usando estas mismas herramientas editamos la línea de hESC H9 y mediante PCR convencional y dPCR demostramos que se había generado la translocación $t(11;12)(p15;p13)$. Sin embargo, durante la expansión de las células editadas, no fuimos capaces de volver a demostrar la presencia de la translocación. Estos resultados indican que la translocación $t(11;12)(p15;p13)$ y/o la expresión de *NUP98-KDM5A*

en hPSC podría estar induciendo la muerte o diferenciación de estas células promoviendo su selección negativa.

La pérdida de las células que portan la translocación t(11;12) durante el cultivo se puede explicar de varias formas. Se ha demostrado que las roturas de doble hebra en el ADN generadas por la nucleasa Cas9 inducen un arresto del ciclo celular mediada por el eje p53-p21-pRB¹⁸³, además p53 también induce apoptosis en hPSC editadas con CRISPR/Cas9.¹⁸⁴ En nuestras células, la edición génica podría estar provocando una menor proliferación y una mayor muerte celular causando la pérdida de la población editada. Dado que se ha demostrado que la inhibición transitoria de p53 aumenta significativamente la supervivencia de las células editadas con el sistema CRISPR/Cas9¹⁸⁴, se podría plantear una inhibición temporal de p53 que está demostrado que está bien tolerada por las hPSC.^{185,186} No obstante, con la inhibición de p53 se debe monitorizar el efecto que puede provocar en las células y las mutaciones no deseadas que se podrían generar y por este motivo no se quiso continuar con esta idea, ya que se pretendía generar un modelo sólo con la translocación t(11;12)(p15;p13), sin mutaciones adicionales.

Por otra parte, la haploinsuficiencia es la situación en la que la célula pierde una copia funcional de un gen y la copia restante no es suficiente para mantener el fenotipo normal de la célula. Un estudio reciente ha identificado más de 650 genes haploinsuficientes

Discusión

esenciales para las hPSC, entre los cuales se ha identificado a *KDM5A*.¹⁸⁷ Una consecuencia de la generación de la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ es la pérdida de un alelo de *NUP98* y otro de *KDM5A*, generando una situación de haploinsuficiencia. Esta esencialidad en *KDM5A* podría explicar la pérdida de la población positiva para la translocación durante la expansión del cultivo celular.

Aunque la generación de la translocación $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ no es viable en hPSC en estado indiferenciado, se podría intentar su generación en otro tipo celular, como los progenitores hematopoyéticos obtenidos durante la diferenciación hematopoyética desde hPSC, obteniendo un modelo más cercano a la realidad de los pacientes.

La imposibilidad para generar una línea de hPSC estable con la translocación cromosómica $t(11;12)(p15;p13)(p15;p13)$ nos hizo plantear un modelo más sencillo de la enfermedad a partir de la sobreexpresión del gen de fusión *NUP98-KDM5A* a través de transducción por lentivirus de un vector de expresión constitutiva. Usando este sistema generamos tres líneas de hPSC transgénicas, una línea embrionaria (H9) y dos de iPSC (iCMN.1 y iPS4F8), generadas en nuestro laboratorio a partir de células mononucleares de sangre periférica. Todas las líneas mantuvieron sus características pluripotentes, aunque mostraron una gran diferencia en los niveles de expresión de *NUP98-KDM5A*, siendo la línea H9-

NK5A la que presentó una menor expresión y la línea iPS4F8-NK5A una mayor expresión. Dado que la línea iCMN.1 mostró alteraciones cromosómicas en la línea original descartamos su uso en el proyecto.

Las líneas H9-NK5A e iPS4F8-NK5A generadas mostraron heterogeneidad en la expresión de NK5A y por ese motivo generamos líneas clonales para poder estudiar en una población homogénea el efecto de la proteína de fusión. Tanto para las células H9-NK5A como para las PS4F8-NK5A elegimos tres clones con diferentes niveles de expresión de la proteína de fusión. En la caracterización en estado indiferenciado de los clones de H9-NK5A no observamos ningún cambio fenotípico respecto a las células control, posiblemente debido a los bajos niveles de expresión de NK5A. Sin embargo, los clones iPS4F8-NK5A mostraron dificultades en la proliferación, menor resistencia al estrés, así como mayores niveles de apoptosis.

Para estudiar a nivel molecular los efectos de la expresión de la proteína de fusión en los clones iPS4F8-NK5A, se realizó un RNA-seq. Lo primero que pudimos observar es que dentro de los genes diferencialmente expresados (GDE) entre los clones iPS4F8-NK5A y los -Control había más genes sobre expresados (475) que infra expresados (195). Además, en un análisis de GSEA de los genes sobre expresados, se obtuvieron listas de genes relacionadas con genes bivalentes. Eso puede estar relacionado con una de las

Discusión

funciones descritas de NUP98-KDM5A, que puede actuar como dominante negativo de KDM5A y evitar la inhibición de la expresión de genes bajo un promotor bivalente, al evitar que KDM5A elimine la marca epigenética de activación H3K4me3. Se conoce que KDM5A tiene la capacidad de unirse a esta marca epigenética a través del dominio PHD3, y este dominio se mantiene en la proteína de fusión NUP98-KDM5A.⁴⁷ Comparamos los genes desregulados del RNA-seq con una base de datos de genes bajo promotores bivalentes (marcados con H3K4me3 y H3K27me3) en hPSC¹⁶⁶ y observamos que la mitad de los GDE estaban bajo promotor bivalente. Estos análisis nos sugieren que en nuestro modelo la proteína de fusión está desregulando preferencialmente genes con promotores bivalentes, aunque también adquiere nuevas dianas génicas ya que sólo el 10% de los GDE son diana de NUP98¹⁰⁹ y el 2% son dianas de KDM5A en hPSC (GEO accession GSM1003446).

Quisimos confirmar estos resultados en nuestros análisis con el CyTOF y determinamos que en las células que expresan NK5A hay un aumento de la transcripción global, así como una bajada de los niveles de la marca H3K27me3, indicando que NK5A produce un incremento en la expresión de genes regulados por esta marca epigenética.

A partir de nuestro análisis de Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA) observamos que los GDE estaban significativamente enriquecidos en genes que son dianas directas de

HIF1A o están relacionados con condiciones de hipoxia. Este hallazgo nos resultó muy interesante ya que la adaptación a la hipoxia se considera uno de los mayores determinantes de la progresión hacia la malignidad de un tumor.¹⁸⁸ La alta expresión de proteína HIF1A se asocia con una baja prognosis en LMA adulta y LLA pediátrica.^{189,190} Además la estabilización de HIF1A en condiciones de normoxia es necesaria para la supervivencia de las células madre leucémicas en LMA.¹⁹¹ También se ha sugerido que la sobreexpresión de elementos de respuesta a la hipoxia es esencial para la evolución del tumor, induciendo inestabilidad cromosómica y plasticidad celular para mejorar la adaptación al medio.¹⁹²

En condiciones hipóxicas se estabiliza la proteína HIF1A para poder responder a la falta de oxígeno ¹⁹³. En condiciones de normoxia HIF1A se degrada y su expresión es casi indetectable, como observamos en los clones iPS4F8–Control. Sin embargo, los clones iPS4F8-NK5A tenían una mayor expresión de HIF1A, indicando la existencia de algún mecanismo de estabilización de la proteína en normoxia. La forma más habitual de degradación de HIF1A en alta concentraciones de O₂ es su hidroxilación por las prolil-hidroxilasas y degradación por el proteosoma.¹⁹⁴ En el RNA-seq aparece sobre expresado en todos los clones que expresan NK5A el gen *EGLN1* (También conocido como *PHD2*), una prolil-hidroxilasa que marca a HIF1A para su degradación en condiciones de normoxia. Esta enzima se puede inhibir por altos niveles de ROS y en consecuencia se puede estabilizar HIF1A en condiciones de normoxia.^{167,195} Analizamos la

Discusión

producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en nuestras líneas celulares y efectivamente encontramos incrementada su producción en las células que expresan NK5A. Es posible que en los clones iPS4F8-NK5A los niveles elevados de ROS induzcan la estabilización de HIF1A a través de la inhibición de EGLN1 y como un mecanismo compensatorio *EGLN1* se sobre expresa para regular los niveles de HIF1A en las células que expresan NK5A.

Una de las mayores fuentes de ROS celular proviene de la mitocondria, y su producción puede aumentar cuando esta no funciona correctamente.^{168,196} Las mitocondrias de las células iPS4F8-NK5A se mostraron fragmentadas y formando acúmulos a diferencia de la red mitocondrial filamentosa y estructurada de las células control. Además, en el RNA-seq se observó una bajada de expresión de genes relacionados con la función mitocondrial. También se ha descrito en modelos de xenotrasplante de progenitores hematopoyéticos humanos con expresión de NK5A la desregulación de genes relacionados con la importación de proteína a la mitocondria.¹⁴⁷ Estos resultados sugieren una mal función mitocondrial en las células que expresan NK5A. Nuestros resultados indican que una mitocondria dañada provocaría la acumulación de ROS, los cuales podría estar estabilizando HIF1A¹⁹⁷ y dando lugar a la firma hipóxica de las células que expresan NK5A.

Otra consecuencia en la célula de una mayor producción de ROS es el aumento en el daño en el ADN. Observamos que la expresión de

NK5A provoca un incremento global en la forma fosforilada de la histona H2AX (p-H2AX), un marcador temprano del daño al ADN. También advertimos que la expresión de p-H2AX era más evidente durante la mitosis. Confirmamos estos resultados al analizar por CyTOF que los niveles de p-H2AX van aumentando conforme avanza el ciclo celular, llegando a su pico de máxima expresión durante la mitosis, indicando un incremento en roturas de doble cadena que podrían generar inestabilidad genómica.¹⁶⁹

En nuestros análisis también encontramos un incremento en la fase G2/M del ciclo celular en los clones iPS4F8-NK5A respecto a los Control. Se sabe que daño en el ADN y roturas de doble cadena inducidas por daño oxidativo pueden provocar arrestos en la fase G2/M del ciclo celular.^{169,198}

Estos resultados nos hicieron prestar atención al proceso de mitosis y observamos que las células que expresan NK5A mostraban un mayor número de mitosis aberrantes. Detectamos la formación de múltiples polos, de puentes de ADN y fragmentos de ADN rotos durante la telofase. Durante la caracterización inicial de la línea iPS4F8-NK5A, ya pudimos observar que presentaba alteraciones cariotípicas mientras la línea control no mostraba ninguna alteración. Analizamos entonces el cariotipo de los distintos clones a diferentes pases y detectamos que la aparición de aneuploidías se incrementaba significativamente en los clones iPS4F8-NK5A. Toda esta variedad de mitosis aberrantes en las células iPS4F8-NK5A

Discusión

explica el incremento en las alteraciones cromosómicas (trisomías, monosomías y translocaciones), mostrando que las células iPS4F8-NK5A son genéticamente inestables. Los cariotipos complejos son raros en algunas fusiones que albergan NUP98, como NUP98-NSD1¹⁹⁹, aunque en un estudio se observó como todos los pacientes de AMKL que albergaban NK5A (10) tenían el cariotipo alterado²⁰⁰, fenotipo que se observa en nuestro modelo.

Algunas de las alteraciones que observamos en la mitosis se pueden explicar con el aumento de daño en el ADN, ya que se ha descrito que las roturas de doble cadena ocasionan errores en la segregación de los cromosomas.²⁰¹ En cambio, la formación de múltiples polos puede ser causado por la interferencia de NK5A con la función de NUP98 en el proceso de mitosis. Durante una mitosis normal, NUP98 interacciona con RAE1 para participar en la regulación de la división celular y de formación del huso mitótico.^{101,202} Se ha demostrado como la desregulación de RAE1 puede llevar a la formación de husos mitóticos múltiples.²⁰³ En nuestro trabajo demostramos que NUP98-KDM5A interacciona con RAE1 durante la mitosis y esta interacción puede estar secuestrando a RAE1 lejos del complejo APC/CDH1 interfiriendo con la formación correcta de los husos mitóticos y la regulación de la salida de la mitosis. También demostramos la interacción de NUP98-KDM5A con RAE1 en la línea celular CHR-288-11 (derivada de un paciente que acarrea la fusión NUP98-KDM5A), en la que además observamos la formación de múltiples husos mitóticos y una desorganización generalizada de los

cromosomas durante la mitosis. Este mecanismo parece común entre algunas proteínas de fusión que contienen NUP98¹²⁹, aunque no se había demostrado aún para la proteína de fusión NUP98-KDM5A.

Por otra parte, observamos que los clones iPS4F8-NK5A tienen niveles significativamente menores de NUP98 endógeno en la envoltura nuclear con respecto a los controles. Debido a la capacidad de unión de NUP98 consigo mismo durante la interfase¹¹⁵, se podría especular que la proteína de fusión secuestra parte del NUP98 que debería ir a formar parte del complejo del poro nuclear, lo que podría desestabilizar la envoltura nuclear como ya se ha observado con otras nucleoporinas.²⁰⁴ Además, en las células que expresan NK5A observamos una disminución significativa de la cantidad de Lamina B, indicando que afecta a la organización de la envoltura nuclear, como se ha descrito con otras fusiones que contienen NUP98.¹⁷⁴ Además se ha observado como la reducción en los niveles de Lamina B es un hecho común en neoplasias mieloides y este hecho en células madre hematopoyéticas causa una mayor capacidad de autorrenovación e inestabilidad genómica.²⁰⁵ En las células arrestadas en mitosis observamos que NUP98 se encuentra fosforilado en las células Control, mientras que en las células que expresan NK5A NUP98 se encuentra hipofosforilado. Al entrar la célula en mitosis, NUP98 es fosforilado por PLK1 y otras quinasas para poder desensamblar el complejo del poro nuclear y seguir con la desestructuración controlada de la envoltura nuclear.¹⁷³ Es

Discusión

interesante que en nuestros análisis proteómicos PLK1 apareció como uno de los interactores de NK5A durante la mitosis, por lo que NK5A podría estar secuestrando PLK1 y de esta manera afectar a la fosforilación del NUP98 endógeno, interfiriendo en la correcta desestructuración del núcleo y provocando errores en la mitosis.^{206,207}

En las células que expresan NK5A observamos una clara acumulación de señal de proteína de fusión en los nucléolos, además de una disminución de la proteína nucleolar Nucleolina, lo que sugiere que podría estar afectada la función nucleolar. Una de las funciones del nucleolo es el procesamiento de ARN ribosómico (rARN) y en un análisis de correlación negativa de los datos del RNA-seq con los niveles de expresión de NK5A en los distintos clones IPS4F8-NK5A, las categorías más significativas estaban relacionadas con el procesamiento de rARN. Comprobamos por PCR que los clones iPS4F8-NK5A con mayor expresión de la proteína de fusión presentaban una disminución significativa de la expresión de algunos rARN, pudiendo indicar una interferencia de la proteína de fusión en el buen funcionamiento del nucleolo.

Una vez caracterizado el fenotipo que provoca la expresión de *NUP98-KDM5A* en los clones iPS4F8-NK5A en estado indiferenciado, comenzamos la caracterización del modelo durante la diferenciación celular realizando diferenciaciones dirigidas hacia las tres capas germinales. Realizamos el seguimiento de marcadores

durante la diferenciación y como era de esperar detectamos la disminución en la expresión de los marcadores de pluripotencia POU5F1 y NANOG. En la diferenciación a ectodermo aumentaron los niveles de SOX2, en endodermo aumentaron los niveles de EOMES, GATA4 y GATA6 y en mesodermo los niveles de HAND1, ISLET1, KDR y CD34 tanto en las líneas control como en las líneas que expresan NK5A. Estos datos indican que la proteína de fusión no afecta a la aparición de los marcadores analizados para las tres capas germinales. Sin embargo, observamos un aumento claro de la proliferación celular en el clon iPS4F8-NK5A#29 respecto a las células control al diferenciarlas a mesodermo, mientras que en la diferenciación a ectodermo y endodermo no observamos dichas diferencias, lo que sugiere que la proteína de fusión promueve la proliferación de células en el linaje mesodérmico.

Posteriormente analizamos el efecto de la expresión de NK5A en la diferenciación hacia el linaje hematopoyético con las líneas iPS4F8. Las células que expresan NK5A presentaron un incremento en la expresión del marcador de mesodermo temprano CD56 con respecto a las células control. En cambio, la producción de progenitores hemato-endoteliales ($CD34^+CD31^+CD43^-$) y progenitores hematopoyéticos ($CD34^+CD43^+$) es significativamente menor en los clones iPS4F8-NK5A respecto a los controles. Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína de fusión produce un bloqueo en la diferenciación en el linaje mesodérmico, evitando que prosiga la diferenciación hematopoyética normal.

Discusión

Además, se ha demostrado como las aneuploidías alteran la capacidad de diferenciación de las células pluripotentes^{208,209}, por ese motivo los clones iPS4F8-NK5A no son un buen modelo para la diferenciación hematopoyética, ya que acarrean alteraciones cromosómicas que podrían enmascarar el efecto de NK5A.

Para modelar el desarrollo de la LMA pediátrica con expresión de la fusión NUP98-KDM5A de manera más efectiva planteamos la generación de un sistema de expresión de NK5A inducible por doxiciclina y poder controlar de forma temporal la expresión de NK5A. Generamos líneas clonales de H9-iNK5A que mantuvieron el fenotipo pluripotente y el cariotipo normal. Validamos el funcionamiento de nuestro modelo en la diferenciación espontánea de EBs y observamos que la inducción de NK5A al día 1 de la diferenciación es compatible con la diferenciación a tipos celulares de las tres capas germinales. Sin embargo, las células que expresaban NK5A produjeron EBs más pequeños que contenían estructuras más diferenciadas que los EBs controles, indicando que la expresión del gen de fusión impacta en la diferenciación a las tres capas germinales.

Experimentos en modelos de ratón, demuestran que la célula donde se produce la alteración genética que desencadena la transformación leucémica afecta a la latencia, el fenotipo y la agresividad de la leucemia.^{210,211} Se ha observado en leucemias con genes de fusión tales como *ETO2-GLIS2*, *NUP98-KDM5A* y fusiones

con MLL que hay una clara relación entre el tipo de leucemia que se desarrolla y la edad de los pacientes, siendo la leucemia AMKL la más restringida a pacientes de menor edad.²¹⁰ Esto podría indicar que el tipo celular en que se produce el evento de translocación cromosómica en los pacientes determina el fenotipo final de la leucemia, además del tiempo de latencia hasta que se manifiesta la enfermedad. En el caso de *NUP98-KDM5A* se ha observado principalmente en pacientes con AMKL, pero existen casos reportados en todos los subtipos de AML.¹⁴² Esto sugiere que dependiendo de la célula de origen donde se produce la translocación $t(11;12)(p15;p13)$ se podría estar produciendo un bloqueo en la diferenciación de una población hematopoyética u otra, dando lugar a distintos tipos de leucemia.

Por este motivo estudiamos el efecto de la expresión de NK5A en distintas poblaciones durante la diferenciación hematopoyética. Primero confirmamos que de la inducción a dosis crecientes de doxiciclina correspondía con una mayor expresión de NK5A y observamos que a partir de la inducción con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina los niveles de expresión de la proteína de fusión producían un aumento de la muerte celular, indicando que unos niveles demasiado elevados de NK5A no son viables en las células. En los experimentos se indujo la expresión de NK5A en dos poblaciones distintas: progenitores mesodérmicos y progenitores hemato-endoteliales, días 3 y 5 de la diferenciación hematopoyética. Con la expresión a partir de día 3 de NK5A observamos un bloqueo

Discusión

temprano en la diferenciación ya que no se generaron células CD34⁺, CD31⁺ y CD43, de manera similar al efecto de la expresión constitutiva de NK5A. Esto sugiere que las células se mantuvieron expresando marcadores mesodérmicos y no consiguieron avanzar en la diferenciación hematopoyética. En cambio, con la inducción a día 5, observamos que no se afectaban las poblaciones hematopoyéticas (CD31⁺CD34⁺CD43⁻), ni los progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD43⁺, pero las células H9-iNK5A mostraron el bloqueo en la diferenciación de células hematopoyéticas tempranas CD34⁻CD43⁺.

Además comprobamos que NK5A induce un aumento en la expresión de algunas de sus dianas conocidas, como son los genes *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9* y *HOXA10*, como ocurre de manera similar en otros tipos de leucemia con expresión de fusiones que involucran NUP98,⁹¹ mientras que no afectó los niveles de expresión *MEIS1*, como ha sido descrito para otro modelo de *NUP98-KDM5A* en células humanas.¹⁴⁷

En definitiva, el modelo que hemos generado de expresión inducible de NK5A muestra un gran potencial para modelar la leucemia ya que permitirá expresar el gen de fusión en distintas poblaciones hematopoyéticas además de explorar mecanismos moleculares que provoquen el bloqueo de la diferenciación, el aumento de proliferación o la inestabilidad genómica observada en estos pacientes.

7. Conclusiones

1. Es posible generar la translocación cromosómica t(11;12)(p15;p13) en hPSC utilizando el sistema CRISPR/Cas9, sin embargo las células editadas se seleccionan negativamente al expandir el cultivo.
2. La expresión ectópica del gen NK5A de forma constitutiva en células pluripotentes humanas no afecta sus propiedades en estado indiferenciado.
3. Se puede observar una clara dependencia a la dosis de NK5A, ya que la línea H9-NK5A no mostró ningún fenotipo debido al bajo nivel de expresión del gen de fusión, a diferencia de la línea iP4F8-NK5A.
4. Las líneas de hPSC clonales con mayor expresión de NK5A tienen menor proliferación, mayor apoptosis y arresto parcial en la fase G2/M del ciclo celular.
5. Los análisis moleculares de las hPSC que expresan NK5A indican que existe una firma hipóxica por un aumento de expresión de genes diana de HIF1A, además de haber una desregulación de genes con promotores bivalentes.

6. Las líneas de clones de hPSC que expresan NK5A muestran la subunidad HIF1A estabilizada en condición de normoxia, incremento en la producción de ROS, daño mitocondrial y un incremento en el marcador de daño de ADN p-H2AX
7. En hPSC, la expresión de NK5A produce mitosis aberrantes e inestabilidad genómica provocadas en parte por la interacción entre NK5A y RAE1 y la acumulación de daño en el ADN durante la mitosis.
8. En hPSC que expresan NK5A, las diferenciaciones dirigidas a las tres capas germinales no muestran diferencias en la adquisición de marcadores, pero sí un aumento de la proliferación de los progenitores mesodérmicos
9. La expresión constitutiva de NK5A en hPSC provoca un bloqueo de la diferenciación en mesodermo evitando la producción de progenitores hemato-endoteliales.
10. La expresión de NK5A en la línea de paciente CHR2-288-11 muestra fenotipos similares a los observados en hPSC, como las mitosis aberrantes y la interacción con RAE1.
11. El momento de inicio de inducción de la expresión de NK5A en la línea H9-iNK5A durante la diferenciación hematopoyética condiciona en qué población celular se

Conclusiones

produce el bloqueo de la diferenciación, además de condicionar los niveles de expresión de los genes diana de NK5A.

7. Conclusions

1. It is possible to generate the chromosomal translocation t(11;12)(p15;p13) in hPSC using the CRISPR/Cas9 system, however the edited cells are negatively selected upon culture expansion.
2. Constitutive ectopic expression of the NK5A gene in human pluripotent cells does not affect their undifferentiated state properties.
3. A clear dose dependence of NK5A can be observed, as the H9-NK5A cell line did not show any phenotype due to the low level of expression of the fusion gene, unlike the iPS4F8-NK5A cell line.
4. Clonal hPSC lines with higher expression of NK5A have lower proliferation, higher apoptosis, and partial arrest in the G2/M cell cycle phase.
5. Molecular analyses of hPSC expressing NK5A indicate that there is a hypoxic signature due to increased expression of HIF1A target genes, in addition to deregulation of genes with bivalent promoters.
6. Clonal hPSC lines expressing NK5A show stabilized HIF1A subunit in normoxic condition, increased ROS production, mitochondrial damage, and an increase in the DNA damage marker p-H2AX.

Conclusions

7. In hPSC, NK5A expression results in aberrant mitoses and genomic instability caused in part by the interaction between NK5A and RAE1 and accumulation of DNA damage during mitosis.

8. In hPSC expressing NK5A, direct differentiations to three germ layers did not show any differences in marker acquisition, but increased proliferation of mesodermal progenitors.

9. Constitutive expression of NK5A in hPSC causes a blockage of mesoderm differentiation preventing the production of hematopoietic progenitors.

10. NK5A expression in the patient line CHR-288-11 shows phenotypes like those observed in hPSC, such as aberrant mitoses and interaction between NK5A and RAE1.

11. The time of onset of induction of NK5A expression in the H9-iNK5A line during hematopoietic differentiation determines in which cell population the differentiation blockage occurs, in addition, determines the expression levels of NK5A target genes.

8. Referencias

1. What Is Cancer? - National Cancer Institute.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
4. David, A. R. & Zimmerman, M. R. Cancer: An old disease, a new disease or something in between? *Nat. Rev. Cancer* **10**, 728–733 (2010).
5. Wild, C., Weiderpass, E. & Stewart, B. *World Cancer Report 2020. International Agency for Research on Cancer* (2020).
6. Mariotto, A. B., Enewold, L., Zhao, J., Zeruto, C. A. & Robin Yabroff, K. Medical care costs associated with cancer survivorship in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **29**, 1304–1312 (2020).
7. Gerstung, M. *et al.* The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature* **578**, 122–128 (2020).
8. White, M. C. *et al.* Age and cancer risk: A potentially modifiable relationship. *Am. J. Prev. Med.* **46**, 1–16 (2014).
9. Henry C. Pitot, M.D., P. D. The Molecular Biology of Carcinogenesis. *Cancer* **72**, 962–970 (1993).
10. Balaburski, G. M., Budina, A. & Murphy, M. E. Oncogenes and tumor suppressor genes in autophagy. *Autophagy and Cancer* 127–143 (2013) doi:10.1007/978-1-4614-6561-4_7.
11. Martínez-Jiménez, F. *et al.* A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 555–572 (2020).
12. Mertens, F., Johansson, B., Fioretos, T. & Mitelman, F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 371–381 (2015).
13. Carrassa, L. & Damia, G. DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **60**, 139–151 (2017).
14. Bhakta, N. *et al.* Childhood cancer burden: a review of global estimates. *Lancet Oncol.* **20**, e42–e53 (2019).

15. Kattner, P. *et al.* Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* **38**, 673–682 (2019).
16. Kentsis, A. Why do young people get cancer? *Pediatr. Blood Cancer* **67**, 139–148 (2020).
17. Kaatsch, P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 277–285 (2010).
18. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
19. Vardiman, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 16–20 (2010).
20. Thomas, R. H. Historical Review. *Ger. Life Lett.* **5**, 66–68 (1951).
21. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, V. J. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. in *WHO Classification of Tumours series* (International Agency for Research on Cancer, 2001).
22. Creutzig, U. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood* **120**, 3167–3205 (2012).
23. De Kouchkovsky, I. & Abdul-Hay, M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* **6**, (2016).
24. Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L. & Bhatla, T. Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* **46**, 229–241 (2016).
25. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–458 (1976).
26. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2406 (2016).
27. Zeidan, A. M. *et al.* Patterns of care and clinical outcomes with cytarabine-anthracycline induction chemotherapy for

Referencias

- AML patients in the United States. *Blood Adv.* **4**, 1615–1623 (2020).
28. Dombret, H. & Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 53–61 (2016).
 29. Elgarten, C. W. & Aplenc, R. Pediatric acute myeloid leukemia: Updates on biology, risk stratification, and therapy. *Curr. Opin. Pediatr.* **32**, 57–66 (2020).
 30. Gamsi, A. S. *et al.* Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: Results from the randomized phase III children's oncology group Trial AAML0531. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3021–3032 (2014).
 31. Watt, T. C. & Cooper, T. Sorafenib as Treatment for Relapsed or Refractory Pediatric Acute Myelogenous Leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **50**, 1018–1025 (2008).
 32. Schlenk, R. F. *et al.* Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. *Blood* **133**, 840–851 (2019).
 33. Bolouri, H. *et al.* The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat. Med.* **24**, 103–112 (2018).
 34. Mercher, T. & Schwaller, J. Pediatric Acute Myeloid Leukemia (AML): From Genes to Models Toward Targeted Therapeutic Intervention. *Front. Pediatr.* **7**, (2019).
 35. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in Acute Myeloid Leukemia. **150**, 264–278 (2013).
 36. Greaves, M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum. Dev.* **81**, 123–129 (2005).
 37. Ford, A. M., Ridge, S. A., Cabrerat, M. E. & Mahmoud, H. Trithorax-Related Oncogene in Infant Leukaemias. **363**, 358–360 (1993).
 38. Gill Super, H. *et al.* Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. *Blood* **83**, 641–644 (1994).
 39. Gale, K. B. *et al.* Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in

- neonatal blood spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13950–13954 (1997).
40. Mori, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8242–8247 (2002).
 41. Michael Ghadimi, B. & Ried, T. *DNA Repair and Chromosomal Translocations. Chromosomal Instability in Cancer Cells* (2015). doi:10.1007/978-3-319-20291-4.
 42. Cazzola, A. *et al.* Prenatal Origin of Pediatric Leukemia: Lessons From Hematopoietic Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2021).
 43. Pabst, C. *et al.* Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo. *Nat. Methods* **11**, 436–442 (2014).
 44. Milan, T. *et al.* Pediatric leukemia: Moving toward more accurate models. *Exp. Hematol.* **74**, 1–12 (2019).
 45. Cagan, R. L., Zon, L. I. & White, R. M. Modeling Cancer with Flies and Fish. *Dev. Cell* **49**, 317–324 (2019).
 46. Corral, J. *et al.* An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: A method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**, 853–861 (1996).
 47. Wang, G. G. *et al.* Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* **459**, 847–51 (2009).
 48. Rodríguez-Hernández, G. *et al.* Modeling the process of childhood ETV6-RUNX1 B-cell leukemias. *Oncotarget* **8**, 102674–102680 (2017).
 49. Chen, W. *et al.* Murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* **108**, 669–677 (2006).
 50. Krivtsov, A. V. *et al.* Patient Derived Xenograft (PDX) Models Recapitulate the Genomic-Driver Composition of Acute Leukemia Samples. *Blood* **124**, 286–286 (2014).
 51. Reinisch, A., Hernandez, D. C., Schallmoser, K. & Majeti, R. Generation and use of a humanized bone-marrow-ossicle niche for hematopoietic xenotransplantation into mice. *Nat.*

Referencias

- Protoc.* **12**, 2169–2178 (2017).
52. De Los Angeles, A. *et al.* Hallmarks of pluripotency. *Nature* **525**, 469–78 (2015).
 53. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–6 (1981).
 54. Thomson, J. a *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
 55. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
 56. Yamanaka, S. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72 (2007).
 57. Romito, A. & Cobellis, G. Pluripotent stem cells: Current understanding and future directions. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
 58. Patterson, M. *et al.* Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res.* **22**, 178–193 (2012).
 59. Zhu, Z. & Huangfu, D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development* **140**, 705–17 (2013).
 60. Jagannathan-Bogdan, M. & Zon, L. I. Hematopoiesis. *Development* **140**, 2463–2467 (2013).
 61. Golub, R. & Cumano, A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Mol. Dis.* **51**, 226–231 (2013).
 62. 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).
 63. Palis, J. & Yoder, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* **29**, 927–936 (2001).
 64. Xu M, J. *et al.* Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* **97**, 2016–2022 (2001).
 65. 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).
66. Kingsley, P. D. *et al.* Ontogeny of erythroid gene expression. *Blood* **121**, e5–e13 (2013).
 67. Neo, W. H., Lie-A-Ling, M., Fadlullah, M. Z. H. & Lacaud, G. Contributions of Embryonic HSC-Independent Hematopoiesis to Organogenesis and the Adult Hematopoietic System. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
 68. Dzierzak, E. & Bigas, A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* **22**, 639–651 (2018).
 69. Medvinsky, A. & Dzierzak, E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897–906 (1996).
 70. Zovein, A. C. *et al.* Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **3**, 625–636 (2008).
 71. Kieusseian, A., de la Grange, P. B., Burlen-Defranoux, O., Godin, I. & Cumano, A. Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Dev.* **139**, 3521–3530 (2012).
 72. Cumano, A. & Godin, I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 745–85 (2007).
 73. 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).
 74. Nakano, T. Lymphohematopoietic development from embryonic stem cells in vitro. *Semin. Immunol.* **7**, 197–203 (1995).
 75. Daley, G. Q. From Embryos to Embryoid Bodies. Generating Blood form Embryonic Stem Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **996**, 122–131 (2003).
 76. 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**, (2011).
 77. Ruiz, J. P. *et al.* Robust generation of erythroid and multilineage hematopoietic progenitors from human iPSCs

Referencias

- using a scalable monolayer culture system. *Stem Cell Res.* **41**, 1–26 (2019).
78. Vodyanik, M. a, Thomson, J. a, Slukvin, I. I. & Dc, W. embryonic stem cell differentiation cultures Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. **108**, 2095–2105 (2013).
79. 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).
80. Avior, Y., Sagi, I. & Benvenisty, N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 170–182 (2016).
81. Argyraki, A. *et al.* Stage-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Map the Progression of Myeloid Transformation To Transplantable Leukemia. *Cell Stem Cell* **20**, 315–328 (2017).
82. Chao, M. P. *et al.* Human AML-iPSCs Reacquire Leukemic Properties after Differentiation and Model Clonal Variation of Disease. *Cell Stem Cell* **20**, 329–344.e7 (2017).
83. Bertuccio, S. N. *et al.* The Pediatric Acute Leukemia Fusion Oncogene ETO2-GLIS2 Increases Self-Renewal and Alters Differentiation in a Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Model. *HemaSphere* **4**, e319 (2020).
84. Laura J. C. M. van Zutven, 1 EmineO ˆ nen, 2 Sandra C. J. M. Velthuisen, 2 Ellen van Drunen, 2 Anne R. M. von Bergh, 2 & MarryM. van den Heuvel-Eibrink, 3 Angelo Veronese, 4 Cristina Mecucci, 5 Massimo Negrini, 4 Georgine E. de Greef, 6 and H. Berna Beverloo2*. Identification of NUP98 Abnormalities in Acute Leukemia: JARID1A (12p13) as aNew Partner Gene. *Genes. Chromosomes Cancer* **52**, 873–886 (2006).
85. de Rooij, J. D. E. *et al.* NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Leukemia* **27**, 2280–2288 (2013).
86. Franks, T. M. & Hetzer, M. W. The role of Nup98 in

- transcription regulation in healthy and diseased cells. *Trends Cell Biol.* **23**, 112–117 (2013).
87. Jühlen, R. & Fahrenkrog, B. Moonlighting nuclear pore proteins: tissue-specific nucleoporin function in health and disease. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 593–605 (2018).
 88. Hampoelz, B., Andres-Pons, A., Kastritis, P. & Beck, M. Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex. *Annu. Rev. Biophys.* **48**, 515–536 (2019).
 89. Miranda ML, E. S. Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell* **72**, 132–5 (2011).
 90. Forbes, D. J., Travesa, A., Nord, M. S. & Bernis, C. Nuclear transport factors: Global regulation of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 78–90 (2015).
 91. Gough, S. M., Slape, C. I. & Aplan, P. D. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: Common themes and new biologic insights. *Blood* **118**, 6247–6257 (2011).
 92. Griffis, E. R., Xu, S. & Powers, M. A. Nup98 Localizes to Both Nuclear and Cytoplasmic Sides of the Nuclear Pore and Binds to Two Distinct Nucleoporin Subcomplexes. *Mol. Biol. Cell* **14**, 600–610 (2003).
 93. Rosenblum, J. S. & Blobel, G. Autoproteolysis in nucleoporin biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11370–11375 (1999).
 94. Fontoura, B. M. A., Blobel, G. & Matunis, M. J. A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: Proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J. Cell Biol.* **144**, 1097–1112 (1999).
 95. Radu, A., Moore, M. S. & Blobel, G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* **81**, 215–222 (1995).
 96. Pritchard, C. E. J., Fornerod, M., Kasper, L. H. & Van Deursen, J. M. A. RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J. Cell Biol.* **145**, 237–253 (2000).
 97. Iwamoto, M., Asakawa, H., Hiraoka, Y. & Haraguchi, T.

Referencias

- Nucleoporin Nup98: A gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes to Cells* **15**, 661–669 (2010).
98. Powers, M. A., Forbes, D. J., Dahlberg, J. E. & Lund, E. The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J. Cell Biol.* **136**, 241–250 (1997).
 99. Sun, Y. & Guo, H.-C. Structural constraints on autoprocessing of the human nucleoporin Nup98. *Protein Sci.* **17**, 494–505 (2008).
 100. Matsuoka, Y. *et al.* Identification and characterization of nuclear pore subcomplexes in mitotic extract of human somatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 417–423 (1999).
 101. Jeganathan, K. B., Malureanu, L. & Van Deursen, J. M. The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**, 1036–1039 (2005).
 102. Capitanio, J. S., Montpetit, B. & Wozniak, R. W. Nucleoplasmic Nup98 controls gene expression by regulating a DEXH/D-box protein. *Nucleus* **9**, 1–8 (2018).
 103. Griffis, E. R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J. & Powers, M. A. Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1282–1297 (2002).
 104. Kasper, L. H. *et al.* CREB Binding Protein Interacts with Nucleoporin-Specific FG Repeats That Activate Transcription and Mediate NUP98-HOXA9 Oncogenicity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 764–776 (1999).
 105. Bai, X. T. *et al.* Trans-repressive effect of NUP98-PMX1 on PMX1-regulated c-FOS gene through recruitment of histone deacetylase 1 by FG repeats. *Cancer Res.* **66**, 4584–4590 (2006).
 106. Kalverda, B., Pickersgill, H., Shloma, V. V. & Fornerod, M. Nucleoporins Directly Stimulate Expression of Developmental and Cell-Cycle Genes Inside the Nucleoplasm. *Cell* **140**, 360–371 (2010).
 107. Capelson, M. *et al.* Chromatin-Bound Nuclear Pore Components Regulate Gene Expression in Higher Eukaryotes. *Cell* **140**, 372–383 (2010).
 108. Kalverda, B. & Fornerod, M. Characterization of genome-

- nucleoporin interactions in *Drosophila* links chromatin insulators to the nuclear pore complex. *Cell Cycle* **9**, 4812–4817 (2010).
109. Liang, Y., Franks, T. M., Marchetto, M. C., Gage, F. H. & Hetzer, M. W. Dynamic Association of NUP98 with the Human Genome. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
 110. Franks, T. M. *et al.* Nup98 recruits the Wdr82-Set1A/COMPASS complex to promoters to regulate H3K4 trimethylation in hematopoietic progenitor cells. *Genes Dev.* **31**, 2222–2234 (2017).
 111. Sump, B. & Brickner, J. H. Nup98 regulation of histone methylation promotes normal gene expression and may drive leukemogenesis. *Genes Dev.* **31**, 2201–2203 (2017).
 112. Wang, X. *et al.* The Mitotic Checkpoint Protein hBUB3 and the mRNA Export Factor hRAE1 Interact with GLE2p-binding Sequence (GLEBS)-containing Proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 26559–26567 (2001).
 113. Jeganathan, K. B., Baker, D. J. & Van Deursen, J. M. Securin associates with APCCdh1 in prometaphase but its destruction is delayed by Rae1 and Nup98 until the metaphase/anaphase transition. *Cell Cycle* **5**, 366–370 (2006).
 114. Blower, M. D., Nachury, M., Heald, R. & Weis, K. A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* **121**, 223–234 (2005).
 115. Dudek, S. M. *et al.* Nup98-Homeodomain Fusions Interact with Endogenous Nup98 during Interphase and Localize to Kinetochores and Chromosome Arms during Mitosis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 4042–4056 (2010).
 116. Huang, Y. *et al.* Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat. Genet.* **12**, 154–158 (1996).
 117. Borrow, J. *et al.* The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. **12**, 159–167 (1996).
 118. Arai, Y. *et al.* The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of de novo and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene,

Referencias

- NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10. *Blood* **89**, 3936–3944 (1997).
119. Nishiyama, M. *et al.* 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosom. Cancer* **26**, 215–220 (1999).
 120. Yamamoto, K., Nakamura, Y., Nakamura, Y., Saito, K. & Furusawa, S. Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *Br. J. Haematol.* **109**, 423–426 (2000).
 121. Hussey, D. J., Nicola, M., Moore, S., Peters, G. B. & Dobrovic, A. The (4;11)(q21;p15) translocation fuses the NUP98 and RAP1GDS1 genes and is recurrent in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 2072–2079 (1999).
 122. Panagopoulos, I. *et al.* Fusion of NUP98 and the SET binding protein 1 (SETBP1) gene in a paediatric acute T cell lymphoblastic leukaemia with t(11;18)(p15;q12). *Br. J. Haematol.* **136**, 294–296 (2007).
 123. Pan, Q. *et al.* A new fusion gene NUP98-IQCG identified in an acute T-lymphoid/myeloid leukemia with a t(3;11)(q29q13;p15)del(3)(q29) translocation. *Oncogene* **27**, 3414–3423 (2008).
 124. Michmerhuizen, N. L., Klco, J. M. & Mullighan, C. G. Mechanistic insights and potential therapeutic approaches for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood* **136**, 2275–2289 (2020).
 125. Struski, S. *et al.* NUP98 is rearranged in 3.8% of pediatric AML forming a clinical and molecular homogenous group with a poor prognosis. *Leukemia* **31**, 565–572 (2017).
 126. Calvo, K. R., Sykes, D. B., Pasillas, M. P. & Kamps, M. P. Nup98-Hoxa9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* **21**, 4247–4256 (2002).
 127. Wang, G. G., Cai, L., Pasillas, M. P. & Kamps, M. P. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and

- leukaemogenesis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 804–812 (2007).
128. Rio-Machin, A. *et al.* The molecular pathogenesis of the NUP98-HOXA9 fusion protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **31**, 2000–2005 (2017).
 129. Salsi, V. *et al.* NUP98 fusion oncoproteins promote aneuploidy by attenuating the mitotic spindle checkpoint. *Cancer Res.* **74**, 1079–1090 (2014).
 130. Salsi, V., Fantini, S. & Zappavigna, V. NUP98 fusion oncoproteins interact with the APC/CCdc20 as a pseudosubstrate and prevent mitotic checkpoint complex binding. *Cell Cycle* **15**, 2275–2287 (2016).
 131. Puthiyaveetil, A. G., Reilly, C. M., Pardee, T. S. & Caudell, D. L. Non-homologous end joining mediated DNA repair is impaired in the NUP98-HOXD13 mouse model for myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* **1**, 112–116 (2013).
 132. Bisio, V. *et al.* NUP98-fusion transcripts characterize different biological entities within acute myeloid leukemia: A report from the AIEOP-AML group. *Leukemia* **31**, 974–977 (2017).
 133. Harmeyer, K. M., Facompre, N. D., Herlyn, M. & Basu, D. JARID1 Histone Demethylases: Emerging Targets in Cancer. *Trends in Cancer* **3**, 713–725 (2017).
 134. Kirtana, R., Manna, S. & Patra, S. K. Molecular mechanisms of KDM5A in cellular functions: Facets during development and disease. *Exp. Cell Res.* **396**, 112314 (2020).
 135. Santos-Rosa, H. *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407–411 (2002).
 136. Heintzman, N. D. *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 311–318 (2007).
 137. Klose, R. J. *et al.* The Retinoblastoma Binding Protein RBP2 Is an H3K4 Demethylase. *Cell* **128**, 889–900 (2007).
 138. Beshiri, M. L. *et al.* Coordinated repression of cell cycle genes by KDM5A and E2F4 during differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18499–18504 (2012).
 139. Benevolenskaya, E. V., Murray, H. L., Branton, P., Young, R. A. & Kaelin, W. G. Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Mol. Cell* **18**, 623–635

Referencias

- (2005).
140. Hu, D. *et al.* KDM5A Regulates a Translational Program that Controls p53 Protein Expression. *iScience* **9**, 84–100 (2018).
 141. Yang, G. J. *et al.* Pharmacological inhibition of KDM5A for cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **226**, 113855 (2021).
 142. Noort, S. *et al.* The clinical and biological characteristics of NUP98-KDM5A pediatric acute myeloid leukemia. **106**, 630–634 (2021).
 143. Hara, Y. *et al.* Patients aged less than 3 years with acute myeloid leukaemia characterize a molecularly and clinically distinct subgroup. *Br. J. Haematol.* **188**, 528–539 (2020).
 144. Wang, G. G. *et al.* Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* **459**, 847–851 (2009).
 145. Lopez, C. K., Malinge, S., Gaudry, M., Bernard, O. A. & Mercher, T. Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia: Multitasking Fusion Proteins and Oncogenic Cooperations. *Trends in Cancer* **3**, 631–642 (2017).
 146. De Rooij, J. D. E. *et al.* Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat. Genet.* **49**, 451–456 (2017).
 147. Cardin, S. *et al.* Human models of NUP98-KDM5A megakaryocytic leukemia in mice contribute to uncovering new biomarkers and therapeutic vulnerabilities. *Blood Adv.* **3**, 3307–3321 (2019).
 148. Schmoellerl, J. *et al.* CDK6 is an essential direct target of NUP98 fusion proteins in acute myeloid leukemia. *Blood* **136**, 387–400 (2020).
 149. 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).
 150. Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**, 947–950 (1987).
 151. Norrman, K. *et al.* Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. *PLoS One* **5**, (2010).

152. Montes, R. *et al.* Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* **117**, 4746–4758 (2011).
153. Smith, J. R. *et al.* Robust, Persistent Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells Is Achieved with AAVS1-Targeted Integration. *Stem Cells* **26**, 496–504 (2008).
154. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
155. Kotecha, N., Krutzik, P. O. & Irish, J. M. Web-Based Analysis and Publication of Flow Cytometry Experiments. *Curr Protoc Cytom.* (2010) doi:10.1002/0471142956.cy1017s53. Web-Based.
156. Kimmey, S. C., Borges, L., Baskar, R. & Bendall, S. C. Parallel analysis of tri-molecular biosynthesis with cell identity and function in single cells. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
157. Zunder, E. R. *et al.* Palladium-based Mass-Tag Cell Barcoding with a Doublet-Filtering Scheme and Single Cell Deconvolution Algorithm. *Nat Protoc.* **10**, 316–333 (2015).
158. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, Ji.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019 (2014).
159. Hendel, A. *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 985–989 (2015).
160. Montes, R. *et al.* Generation and characterization of the human iPSC line PBMC1-iPS4F1 from adult peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res.* **15**, 614–617 (2015).
161. Montes, R. *et al.* GENYOi004-A: An induced pluripotent stem cells (iPSCs) line generated from a patient with autism-related ADNP syndrome carrying a pTyr719* mutation. *Stem Cell Res.* **37**, 101446 (2019).
162. Nagano, K., Yoshida, Y. & Isobe, T. Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. *Proteomics* **8**, 4025–4035 (2008).
163. Barbaric, I. *et al.* Time-lapse analysis of human embryonic stem cells reveals multiple bottlenecks restricting colony

Referencias

- formation and their relief upon culture adaptation. *Stem Cell Reports* **3**, 142–155 (2014).
164. Ke, Q. & Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **70**, 1469–1480 (2006).
 165. Wang, G. G. *et al.* Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* **459**, 847–851 (2009).
 166. Court, F. & Arnaud, P. An annotated list of bivalent chromatin regions in human ES cells : a new tool for cancer epigenetic research. **8**, 4110–4124 (2017).
 167. Movafagh, S., Crook, S. & Vo, K. Regulation of hypoxia-inducible Factor-1a by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* **116**, 696–703 (2015).
 168. Brand, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 14–31 (2016).
 169. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* **25**, 101084 (2019).
 170. Yuan, J., Adamski, R. & Chen, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. *FEBS Lett.* **584**, 3717–3724 (2010).
 171. BECKER, K. A. *et al.* Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells is Supported by a Shortened G1 Cell Cycle Phase. *J. Cell. Physiol.* **211(3)**, 736–747 (2006).
 172. Mendes, A., Jühlen, R., Bousbata, S. & Fahrenkrog, B. Disclosing the Interactome of Leukemogenic NUP98-HOXA9 and SET-NUP214 Fusion Proteins Using a Proteomic Approach. *Cells* **9**, (2020).
 173. Laurell, E. *et al.* Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry. *Cell* **144**, 539–550 (2011).
 174. Fahrenkrog, B., Martinelli, V., Nilles, N. & Fruhmans, G. Expression of Leukemia-Associated Nup98 Fusion Proteins Generates an Aberrant Nuclear Envelope Phenotype. 1–24 (2016) doi:10.1371/journal.pone.0152321.
 175. Bakshi, R. *et al.* The leukemogenic t(8;21) fusion protein AML1-ETO controls rRNA genes and associates with

- nucleolar-organizing regions at mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* **121**, 3981–3990 (2008).
176. Karole, A. M., Chodisetty, S., Ali, A., Kumari, N. & Tyagi, S. Novel sub-cellular localizations and intra-molecular interactions may define new functions of Mixed Lineage Leukemia protein. *Cell Cycle* **17**, 2684–2696 (2018).
 177. Boisvert, F. M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J. & Lamond, A. I. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585 (2007).
 178. Bendall, S. C. *et al.* Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. *Science (80-.).* **332**, 687–696 (2011).
 179. 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**, 553–567 (2012).
 180. Lonetti, A., Pession, A. & Masetti, R. Targeted Therapies for Pediatric AML: Gaps and Perspective. *Front. Pediatr.* **7**, 1–11 (2019).
 181. Slany, R. K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* **94**, 984–993 (2009).
 182. Torres-Ruiz, R. *et al.* Efficient Recreation of t(11;22) EWSR1-FLI1+ in Human Stem Cells Using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports* **8**, 1408–1420 (2017).
 183. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Med.* **24**, 927–930 (2018).
 184. Ihry, R. J. *et al.* P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **24**, 939–946 (2018).
 185. Qin, H. *et al.* Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 5842–5852 (2007).
 186. Schlaeger, T. M. *et al.* A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.* **33**, 58–63 (2015).
 187. Sarel-Gallily, R., Golan-Lev, T., Yilmaz, A., Sagi, I. &

Referencias

- Benvenisty, N. Genome-wide analysis of haploinsufficiency in human embryonic stem cells. *Cell Rep.* **38**, 110573 (2022).
188. Al Tameemi, W., Dale, T. P., Al-Jumaily, R. M. K. & Forsyth, N. R. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–15 (2019).
189. Deeb, G. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **35**, 579–584 (2011).
190. Wellman, S. *et al.* Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* **18**, 926–933 (2004).
191. Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P. & Liu, Y. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* **8**, 399–411 (2011).
192. Jing, A. *et al.* Expression-based analyses indicate a central role for hypoxia in driving tumor plasticity through microenvironment remodeling and chromosomal instability. *npj Syst. Biol. Appl.* **4**, (2018).
193. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647 (1997).
194. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (80-.)*. **294**, 1337–1340 (2001).
195. Brüne, B. & Zhou, J. Nitric oxide and superoxide: Interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc. Res.* **75**, 275–282 (2007).
196. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, (2000).
197. Patten, D. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: The essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3247–3257 (2010).
198. Shaltiel, I. A., Krenning, L., Bruinsma, W. & Medema, R. H.

- The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* **128**, 607–620 (2015).
199. Michmerhuizen, N. L., Klco, J. M. & Mullighan, C. G. Mechanistic insights and potential therapeutic approaches for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood* **136**, 2275–2289 (2020).
 200. De Rooij, J. D. E. *et al.* Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat. Genet.* **49**, 451–456 (2017).
 201. Bakhoun, S. F., Kabeche, L., Compton, D. A., Powell, S. N. & Bastians, H. Mitotic DNA Damage Response: At the Crossroads of Structural and Numerical Cancer Chromosome Instabilities. *Trends in Cancer* **3**, 225–234 (2017).
 202. Cross, M. K. & Powers, M. A. Nup98 regulates bipolar spindle assembly through association with microtubules and opposition of MCAK. *Mol. Biol. Cell* **22**, 661–672 (2011).
 203. Wong, R. W., Blobel, G. & Coutavas, E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19783–19787 (2006).
 204. Zhou, L. & Panté, N. The nucleoporin Nup153 maintains nuclear envelope architecture and is required for cell migration in tumor cells. *FEBS Lett.* **584**, 3013–3020 (2010).
 205. Reilly, A. *et al.* Lamin B1 deletion in myeloid neoplasms causes nuclear anomaly and altered hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell* **29**, 577-592.e8 (2022).
 206. Chatel, G. & Fahrenkrog, B. Nucleoporins: Leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell. Signal.* **23**, 1555–1562 (2011).
 207. Linder, M. I. *et al.* Mitotic Disassembly of Nuclear Pore Complexes Involves CDK1- and PLK1-Mediated Phosphorylation of Key Interconnecting Nucleoporins. *Dev. Cell* **43**, 141-156.e7 (2017).
 208. Zhang, M. *et al.* Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential. *EMBO J.* **35**, 2285–2300 (2016).
 209. Na, J., Baker, D., Zhang, J., Andrews, P. W. & Barbaric, I.

Referencias

- Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein Cell* **5**, 569–579 (2014).
210. Lopez, C. K. *et al.* Ontogenic changes in hematopoietic hierarchy determine pediatric specificity and disease phenotype in fusion oncogene– driven myeloid leukemia. *Cancer Discov.* **9**, 1736–1753 (2019).
211. Stavropoulou, V. *et al.* MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell* **30**, 43–58 (2016).