



**UGR** | Universidad  
de **Granada**

**Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina**



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

TESIS DOCTORAL

**“SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH: MODELOS CELULARES HUMANOS  
PARA ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE VECTORES LENTIVIRALES PARA  
TERAPIA GÉNICA”**

Almudena Sánchez Gilabert

Director de la tesis:

Dr. Francisco Martín Molina

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Almudena Sánchez Gilabert  
ISBN: 978-84-9163-134-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45266>



El doctorando / *The doctoral candidate* **Almudena Sánchez Gilabert** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: **Francisco Martín Molina**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

*Guarantee, by signing this doctortal thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

Granada, Enero de 2017 / *January 2017*

Director de la tesis / *Thesis supervisor;*

Francisco Martín Molina

Doctorando / *Doctoral candidate:*

Almudena Sánchez Gilabert

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*





*A mi madre,  
que aunque se fue antes de tiempo  
dejó amor para toda una vida.  
Porque soy quien soy  
por la educación que recibí.  
Porque te quiero cada día más  
y sigo pensando que me tocó  
la mejor de todas las madres.*



## AGRADECIMIENTOS

*A Paco, quien es primero persona y luego jefe. Quien me permitió formar parte de su equipo, ha confiado en mí y me ha enseñado a hacerme las preguntas adecuadas, a resolver mis dudas y a proponer soluciones. Gracias por tener paciencia, por apoyarme desde el principio, y por tu dirección y revisión durante el tramo final.*

*A Migue, Marién y Pili, por dejarme formar parte de este proyecto tan bonito, permitiéndome aportar un granito de arena para mejorar la calidad de vida de algunos pequeños.*

*A María, WASP girl junior, porque tu llegada al proyecto supuso un empujón fuerte. Por demostrar tu confianza en mí. Por las horas compartidas delante del citómetro, por celebrar cada experimento y por compartir y resolver las dudas y agobios.*

*A Ana, quien consigue convertir los peores días en los más memorables y agradables. Por las bandas sonoras, los pasillos convertidos en pistas de baile, por hacer de las escaleras camas que se despiden, por imaginar las peores de las situaciones con las soluciones más alocadas y divertidas. Por hacer que las plaquetas vuelen, que los “helpe meee” se conviertan en vocabulario diario y por asumir que un Hocus-pocus no es tan raro.*

*A Sabina, quien tras su pequeña coraza y timidez esconde una persona increíble, que he tenido la fortuna de conocer. Que aunque “no vino a Granada para hacer amigos” se lleva una muy grande.*

*Al resto del grupo 12, que están o han estado, Per, Karim, Darío, Juanjo, Eliana, Giuseppe, Piero, Sara, Marina, Crisitina, a todos, gracias por hacer de éste un ambiente tan agradable.*

*También quiero agradecer a muchos de los compañeros de GENYO. Carmen, Javi, Silvia, Carlos Peris, Angélica, Inma, Joan, Luz y Antonio, por formar la mejor sala de estudio y ser los limones más anaranjados. A Raquel Vilar, Ester, Marta, David Cano, Alex Rubio, Pablo, Thomas, Angelina, Sarita, Nieves, Joel, Carlos Baliñas, Belén, Rosi, Mariadel, Julia, Marina...sois muchos (siento si me dejo a alguien) y sois muy grandes. Y gracias también a las unidades de apoyo, a Raquel Marrero, por saber encontrar todas las plaquetas, Fernando y Olivia, gracias.*

*Pero además, si el apoyo científico es importante, el personal lo es más. Me voy no sólo con una tesis, sino con una gran familia granáina. Si la vida es una fiesta, no podría haber elegido mejores compañeros de baile.*

*A Luis Javier y Helena, que me habéis dejado formar parte de vuestra vida. Que con vuestra sabiduría y locura me aconsejáis y apoyáis. Por las comidas, los conciertos, las tapillas, por todo. Y a Noa, por sacarme siempre una sonrisa ;)*

*A Meri, la hermana pequeña más cuqui que se puede tener, mi compi de piso. Hiciste que una casa se convirtiera en hogar, viviendo una película con brochazos, pintura y banda sonora de fondo. Gracias por las noches en vela, las risas, la complicidad, la confianza. Gracias por las conversaciones en el balcón, por compartir la locura de “dentro de cinco años...”. Gracias por hacer que baste con una mirada. Porque hemos pasado por todo juntas, y contigo todo es más fácil.*

*A Eli, esa pelirroja que vino desprendiendo alegría a cada paso. Porque contagias tu locura, porque transmites felicidad. Por los momentos compartidos, por convertirme en tu mejor público, por hacer de cada día una fiesta inolvidable.*

A Ana, otra vez, porque esta familia sin ti no es lo mismo. Por los linceos atrapados en rotondas, las películas dramáticas más cómicas, las llamadas desde cabinas a Dori, porque se fue la luz, y ella me dijo que me iba a cuidar y de angelito no tiene nada. Pero sobretodo, por los días de nieve y sierra. Gracias. (“Guagruinca también te lo agradece”).

A Suyi, por tener la capacidad de infundir seguridad a quien no la tiene. Por tu dulzura, por tu alegría, por tu sinceridad. Por crear momentos divertidos y “si surge la gana, surgirá”, veeela y verás. Gracias.

A Eva, quien apareció para aumentar aún más el grado de locura de esta familia. Porque eres única. Por las gafas de pajitas, las noches de baile, las tapas en la Almudena, el atún bruselo. Por estar cuando lo necesité.

A Óscar, gracias por estar siempre ahí al lado (durante mucho tiempo literalmente). Por ese congreso en Madrid, por tu risa con E que me contagia. Por convertirte en una de las personas más importantes de mi época en Granada.

A Mariché, por los besos de buenos días, por las risas, la coralina, las comidas de “dieta”, las noches de karaoke, por la alegría que desprendes, gracias.

A Elliot, quién se convirtió en amigo en tiempo récord. Por soportar las charlas científicas por la noche y las conversaciones interminables entre Meri y yo. Por hacerme ver que lo que yo creía imposible no lo es.

A Alex, por los momentos musicales, los “protocolos” culinarios, por hacerme ver las palmeras con otros ojos, por las risas, las marmotas y los osos perezosos.

Y cómo no, a quién ha formado parte de mi vida siempre. A María, que ha hecho su “séneca” en Granada. Por los viajes en coche, los floreros de Granada, los festivales y las mujeres de verde. Gracias por saber todo de mí, desde la distancia, por el interés, por ser y estar. Y al resto de Xanxos: Miguel, Ana, Elena, Laura, Sara, Julio, Pedro, Dani, Ricardo, David y Caña, por todos los momentos compartidos.

Por supuesto, también a mis Putitis, Irene, Fon, Mar y Rafo, que sois capaces de convertir cualquier situación en la más divertida e irreal. Por los polluelos que éramos al llegar a la UPV y crecer juntos. Y a Guillermo, por llegar a darte cuenta de que “para ser rubia, soy lista y todo”, por los piques, los juegos, las “croqueten” holandesas, por estar siempre ahí. Os quiero.

Por último y más importante, a toda mi familia. En especial a mi padre, que representa el pilar de mi vida. Porque tu apoyo ha sido fundamental a lo largo de todo el camino. A mis tíos Paco y Paloma, quienes me enseñan con su ejemplo y a quienes quiero con locura. También a mis tías Amalín y Marta, por transmitirme siempre esa confianza en mí, os quiero mucho. Y para terminar a Marta, mi hermana mayor, mi ejemplo a seguir. Porque eres mi mitad, porque sin ti la vida perdería mucha magia. Porque creo que no eres consciente del tipo de persona que eres, la alegría que transmites, la inteligencia, la paz, la locura. Porque querer más a alguien es imposible. Y porque “Tú eres eso”, ahora y siempre.

Gracias a todos.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>21</b> |
| 1.1. EL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH .....  | 21        |
| 1.1.1. <i>Genética de WAS</i> .....  | 23        |
| 1.1.2. <i>Actividad fisiológica de WASP</i> .....  | 24        |
| 1.1.3. <i>Función de WASP en hematopoyesis</i> .....                                       | 26        |
| 1.1.4 <i>Función de WASP en el sistema inmunológico</i> .....                              | 26        |
| 1.1.4.1. Células T .....   | 27        |
| 1.1.4.2. Células B .....   | 28        |
| 1.1.4.3. Células mieloides .....   | 29        |
| 1.1.5. <i>Función de WASP en megacariocitos y plaquetas</i> .....                          | 29        |
| 1.2. ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA GÉNICA PARA WISKOTT-ALDRICH .....                         | 32        |
| 1.2.1. <i>Mejora de vectores lentivirales para terapia génica de Wiskott-Aldrich</i> ..... | 34        |
| 1.3. HEMATOPOYESIS, MEGACARIOPOYESIS Y TROMBOPOYESIS .....                                 | 36        |
| 1.3.1. <i>Hematopoyesis</i> .....  | 36        |
| 1.3.1.1. Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético .....                           | 36        |
| 1.3.1.2. Hematopoyesis en el adulto .....  | 37        |
| 1.3.1.3 Megacariopoyesis y trombopoyesis .....   | 39        |
| 1.4. MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE WISKOTT-ALDRICH .....                            | 42        |
| 1.4.1. <i>Diseño de modelos celulares mediante herramientas de edición génica</i> .....    | 43        |
| 1.4.2. <i>Líneas celulares humanas inmortalizadas</i> .....                                | 43        |
| 1.4.2.1. Células K562 .....  | 44        |
| 1.4.2.2. Células MEG-01 .....  | 45        |
| 1.4.3. <i>Células madre embrionarias humanas (hESCs)</i> .....                             | 46        |
| 1.4.3.1. Diferenciación hematopoyética a partir de hESCs .....                             | 47        |
| 1.4.3.2. Generación de MKs y PLTs a partir de hESCs .....                                  | 49        |
| 1.4.3.3 Edición génica de hESCs para modelos celulares .....                               | 49        |
| 1.4.4. <i>HSCs</i> .....   | 50        |
| 1.4.4.1 Obtención de MKs y PLTs a partir de HSCs .....                                     | 51        |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO E HIPÓTESIS</b> .....                                     | <b>55</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>63</b> |
| 4.1. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO .....  | 63        |
| 4.2. PRODUCCIÓN DE VECTORES Y TRANSDUCCIÓN .....   | 65        |
| 4.3. EDICIÓN GÉNICA DE HESCS .....   | 67        |
| 4.4. PREPARACIÓN DE DNA Y DE RNA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RTqPCR) .....           | 68        |
| 4.5. DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA DE LAS LÍNEAS INMORTALIZADAS .....                     | 69        |
| 4.6. DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA DE HESCS .....   | 69        |
| 4.7. DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA A PARTIR DE HESCS .....                                 | 70        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.8. DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA A PARTIR DE HSCS .....  | 71         |
| 4.9. AISLAMIENTO DE PLTs DE SANGRE PERIFÉRICA .....   | 72         |
| 4.10. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS .....   | 72         |
| 4.11. ENSAYO DE ACTIVACIÓN: UNIÓN DE PAC-1 .....  | 72         |
| 4.12. ENSAYO DE ACTIVACIÓN: FLUJO DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR.....  | 72         |
| 4.13. CITOMETRÍA DE FLUJO.....  | 73         |
| 4.14. INMUNOFLUORESCENCIA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL .....   | 74         |
| 4.15 ANÁLISIS.....  | 75         |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>79</b>  |
| 5.1. OBJETIVO1: ESTABLECER UN MODELO CELULAR WASKO EN hESCs, PARA EL ESTUDIO DE WISKOTT-ALDRICH.....  | 79         |
| 5.1.1. <i>Editar el locus WAS en hESCs mediante herramientas de edición génica .....</i>  | 79         |
| 5.1.2. <i>Validar el modelo de hESCs WASKO .....</i>  | 81         |
| 5.1.3. <i>Rescate de los defectos funcionales mediante VL .....</i>   | 90         |
| 5.2. OBJETIVO 2: DESARROLLAR NUEVOS VLS PARA TG DE WAS.....   | 92         |
| 5.2.1. <i>Desarrollo de Vls reporteros .....</i>  | 92         |
| 5.2.2. <i>Desarrollo de nuevos Vls terapéuticos.....</i>  | 93         |
| 5.3. OBJETIVO 3: ANALIZAR SI LOS VLS MIMETIZAN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE WASP EN LÍNEAS HUMANAS INMORTALIZADAS.....   | 94         |
| 5.3.1. <i>Vls reporteros expresando eGFP: Análisis en MEG-01.....</i>   | 94         |
| 5.3.1.1. <i>Diferenciación de MEG-01 hacia linaje megacariocítico y patrón de expresión de WASP durante este proceso.....</i>   | 95         |
| 5.3.2.1. <i>Análisis del patrón de expresión de eGFP de los diferentes vectores reporteros durante la diferenciación de MEG-01 hacia linaje megacariocítico. ....</i> | 98         |
| 5.3.2. <i>Vls terapéuticos expresando WASP: Análisis en K562_ WASKO .....</i>   | 100        |
| 5.4. OBJETIVO 4: ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO DE VLS EN MKs Y PLTs DERIVADOS DE HSCs. .   | 102        |
| 5.4.1. <i>Aislar y diferenciar HSCs a MKs y PLTs. ....</i>  | 102        |
| 5.4.2. <i>Analizar el perfil de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica y producción de las PLTs. ....</i>  | 107        |
| 5.4.3. <i>Estudiar el comportamiento de Vls reporteros, durante megacariopoyesis y trombopoyesis.....</i>   | 111        |
| 5.4.4. <i>Comparar el comportamiento de Vls-WAS durante megacariopoyesis y trombopoyesis. Rescate funcional.....</i>  | 112        |
| 5.4.4.1. <i>Vectores lentivirales de segunda generación. ....</i>   | 112        |
| 5.4.4.2. <i>Vectores lentivirales de tercera generación .....</i>   | 117        |
| <b>6. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>125</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>141</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>145</b> |

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Promotores endógenos de WASP .....  | 24 |
| Figura 2. Proteína WASP .....   | 25 |
| Figura 3. Funciones de WASP en células del sistema inmunológico .....   | 27 |
| Figura 4. Modelo Jerárquico de la hematopoyesis .....   | 38 |
| Figura 5. Modelo re-definido de la hematopoyesis .....  | 39 |
| Figura 6. Megacariopoyesis .....  | 41 |
| Figura 7. Uso de ZFNs para editar el locus WAS .....  | 45 |
| Figura 8. Propiedades de las hESCs .....  | 47 |
| Figura 9. Uso de las ZFNs para editar el locus WAS .....  | 68 |
| Figura 10. Protocolo de diferenciación megacariocítica a partir de hESCs .....  | 70 |
| Figura 11. Protocolo de diferenciación hematopoyética a partir de hESCs .....   | 71 |
| Figura 12. Análisis de los niveles de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica .....   | 76 |
| Figura 13. Cariotipo de las hESCs usadas .....  | 79 |
| Figura 14. Generación de líneas celulares hESCs WASKO utilizando ZFNs .....   | 80 |
| Figura 15. Incremento de hematopoyesis en células hESCs WASKO .....   | 82 |
| Figura 16 Análisis funcional de células CD34+CD45+ derivadas de hESCs-WASKO .....   | 83 |
| Figura 17. La diferenciación megacariocítica y producción de PLTs no está disminuida en células hESCs-WASKO .....   | 85 |
| Figura 18. La diferenciación megacariocítica y la producción de PLTs está incrementada en células hESCs-WASKO .....                                       | 87 |
| Figura 19. Los MKs y las PLTs derivados de líneas celulares hESCs-WASKO mimetizan alteraciones fenotípicas y funcionales presentes en pacientes WAS ..... | 89 |
| Figura 20. Las AND-1_WASKO transducidas con el VL WW-puro expresan WAS .....  | 90 |
| Figura 21. La expresión ectópica de WAS en células AND-1_WASKO restaura el desarrollo normal de MKs y PLTs y su función .....                             | 91 |
| Figura 22. Esquema representativo de los VLs reporteros .....   | 93 |
| Figura 23. Esquema representativo de los VLs-WAS de segunda generación .....  | 93 |
| Figura 24. Esquema representativo de los VLs-WAS de tercera generación .....  | 94 |
| Figura 25. La estimulación de células MEG-01 con ácido valproico induce maduración megacariocítica .....  | 96 |
| Figura 26. La expresión de WASP decrece durante la maduración megacariocítica, en células MEG-01 .....  | 97 |



|   |     |
|---|-----|
| Figura 27. La expresión de WASP está inversamente relacionada con la maduración, en células MEG-01 .....  | 98  |
| Figura 28. La expresión de eGFP disminuye durante la diferenciación megacariocítica .....   | 99  |
| Figura 29. WASP incrementa tras la diferenciación megacariocítica en células K562 y la presencia del promotor alternativo en VLs-WAS mimetiza el patrón .....                               | 101 |
| Figura 30. Las HSCs mantienen marcadores de pluripotencia tras más de tres semanas en cultivo y la presencia de progenitores megacariocíticos depende del origen de las células CD34+ ..... | 103 |
| Figura 31. Las HSCs son capaces de diferenciarse a MKs y producir PLTs in vitro .....   | 104 |
| Figura 32. Los MKs y las PLTs derivados de HSCs in vitro son funcionales .....  | 106 |
| Figura 33. La expresión de WASP disminuye durante la diferenciación megacariocítica y la producción de PLTs .....   | 108 |
| Figura 34. La expresión de WASP disminuye durante la maduración megacariocítica .....   | 109 |
| Figura 35. Las PLTs producidas in vitro tienen los mismos niveles de expresión de WASP que las PLTs de sangre periférica .....  | 110 |
| Figura 36. La expresión de eGFP derivada de VLs reporteros mimetiza el patrón de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica .....  | 112 |
| Figura 37. Detección de WASP mediante citometría de flujo en MKs .....  | 113 |
| Figura 38. La presencia del promotor alternativo en VLs-WAS conlleva una expresión más fisiológica de WASP en PLTs .....  | 115 |
| Figura 39. La expresión ectópica de WASP en células HSCs de paciente WAS rescata la formación de nódulos de actina en PLTs .....  | 116 |
| Figura 40. La presencia del promotor alternativo, en los LVs clínicos, genera un patrón de expresión de WASP más fisiológico, durante megacariopoyesis y en PLTs .....                      | 118 |
| Figura 41. La expresión ectópica de WASP en HSCs de paciente WAS rescata la funcionalidad de MKs y PLTs .....   | 121 |
| Figura 42. Modelo propuesto de la expresión de WASP durante la megacariopoyesis y trompoyesis .....   | 138 |

## **ABREVIATURAS**

### NOTA

A lo largo del texto se utilizarán abreviaturas de varios términos en inglés. Esto es debido al uso extendido del inglés en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas en inglés de manera cotidiana en el lenguaje científico. Para simplificar el texto se mantendrán éstas últimas.

**7AAD:** /-aminoactinomicina D

**AGM:** Aorta-gónada-mesonéfro

**APC:** Alofocianina

**BCR:** Receptor de células B, del inglés *B Cell Receptor*

**bFGF:** Factor de crecimiento fibroblástico básico, del inglés *basic Fibroblastic Growth Factor*

**BMP4:** Proteína morfogenética ósea 4, del inglés *Bone Morphogenetic protein-4*

**CD29:** Itgb1, del inglés *Integrin beta 1*

**CD31:** PECAM, Molécula de Adhesión celular entre plaquetas y endotelio 1, del inglés *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*

**CD34:** Sialomucina, marcador de células progenitoras hematopoyéticas

**CD38:** Del inglés *cyclic ADP ribose hydrolase*

**CD41a:** ITGA2B, del inglés *Integrin subunit alpha 2b*

**CD42b:** Glicoproteína 1b cadena alfa

**CD43:** Sialoforina o Leucosialina, SPN, del inglés *Sialophorin o Leukosialin*

**CD45:** PTPRC, Receptor Tipo C de Proteína Tirosin Fosfatasa, del inglés *Protein Tyrosin Phosphatase receptor type C*

**CD61:** ITGB3, del inglés *Integrin beta-3*

**CD90:** GPI, del inglés *Glycophosphatidilinositol*

**CD133:** Prominin-1

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**CFUs:** Unidades formadores de colonias

**CLPs:** Progenitores linfoides comunes, del inglés *Common Leukocyte Progenitors*

**CMPs:** Progenitores mieloides comunes, del inglés *Common Myeloid Progenitors*

**CRISPR/Cas9:** Del inglés *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9*.

**DCs:** Células dendríticas, del inglés *Dendritic Cells*

**DBS:** Rotura en la doble hebra del DNA, del inglés *Double Stand Break*

**DMS:** Sistema de demarcación de la membrana, del inglés *Demarcation Membrane System*

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**DNA:** Ácido desoxi-ribonucleico

**EBs:** Cuerpos embrionarios, del inglés *Embryoid Bodies*

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *EthyleneDiamineTetraAcetic*

**FACS:** Asilamiento celular activado por fluorescencia, del inglés *Fluorescence activated cell sorting*

**FBS:** Suero Fetal Bovino

**FCR:** Receptores tipo Fc

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**Flt3-L:** Ligando de Flt3, del inglés *Fms-related Tyrosine Kinase 3 ligand*

**FSC:** Medida relacionada con el tamaño celular en citometría de flujo, del inglés *Forward Scatter*

**G-CSF:** Factor de estimulación de colonias de granulocitos, del inglés *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

**GMPs:** Progenitores granulocitos-macrófagos, del inglés *Granulocyte-Macrophage Progenitors*

**GSF:** Factor de estimulación de granulocitos, del inglés *Granulocyte Stimulating Factor*

**hCMV:** Citomegalovirus humano, del inglés *human CytoMegalovirus*

**hESCs:** Células madre embrionarias humanas, del inglés *human Embryonic Stem Cells*

**HLA:** Antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leukocyte Antigen*

**HPCs:** Células progenitoras hematopoyéticas, del inglés *Hematopoietic Progenitors Cells*

**HSCs:** Células madre hematopoyéticas, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*

**ICM:** Masa interna celular del blastocisto, del inglés *Inner Cell Mass*

**IL-3:** Interleucina 3

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-11:** Interleucina 11

**IMS:** Sistema de invaginación de la membrana, del inglés *Invagination Membrane System*

**iPSCs:** Células madre pluripotentes inducidas, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*

**Lin:** Marcador celular, linaje

**LT-HSCs:** *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*

**M-CSF:** Factor de estimulación de colonias de macrófagos, del inglés *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

**MOs:** Macrófagos

**MEPs:** Progenitores Megacariocíticos-Eritroides, del inglés *Megakaryocyte-Erythroid Progenitors*

**mESCs:** Células madre embrionarias de ratón, del inglés *mouse Embryonic Stem Cells*

**MFI:** Intensidad mediana de fluorescencia, del inglés *Median of Fluorescence Intensity*

**MKs:** Megacariocitos

**MPPs:** Progenitores multipotentes, del inglés *MultiPotent Progenitors*

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**NKs:** Células *Natural Killer*

**N-WASP:** Proteína WASP neuronal

**OP9:** Línea celular establecida a partir del estroma de la médula ósea de ratones recién nacidos con fenotipo osteopetrótico producido por una mutación en el gen M-CSF que les impide producir M-CSF funcional

**PBS:** Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate buffered saline*

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PE:** Ficoeritrina

**Pe-Cy7:** Ficoeritrina-cianina 7

**PKC:** Protein Kinasa C

**PLTs:** Plaquetas

**PMA:** Forbol-12-miristato-13-acetato

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RT:** Temperatura ambiente, del inglés *Room Temperature*

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real, del inglés *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

**SCF:** Factor de células madre, del inglés *Stem Cell Factor*

**SIN-VLs:** Vector lentiviral autoinactivado

**SEM:** Error estándar de la media, del inglés *Standard Error of the Mean*

**SR-1:** Del inglés *Stem Regenin 1*

**SSC:** Parámetro de medida relacionado con la granularidad celular en citometría, del inglés *Side Scatter*

**ST-HSCs:** *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*

**TALEN:** Nucleasa *Transcription Activator-Like Effector*

**TB:** Tampón Tyrode's, del inglés *Tyrode's Buffer*

**TCR:** Receptor de células T, del inglés *T cell Receptor*

**TG:** Terapia Génica

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante beta-1, del inglés *Transforming Growth Factor*

**TPO:** Trombopoyetina

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio vascular, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

**VPA:** Ácido Valproico

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VLs:** Vector lentiviral

**WAS:** Síndrome de Wiskott-Aldrich

**WAS:** Gen mutado en el Síndrome de Wiskott-Aldrich

**WASKO:** *WAS Knock-out*

**WASP:** *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*

**WAVE:** Familia de proteínas WASP con homología a verprolina

**WT:** *Wild-type*

**XLN:** Neutropenia ligada al cromosoma X, del inglés *X-Linked Neutropenia*

**XLT:** Trombocitopenia ligada al cromosoma X, del inglés *X-Linked Thombocytopenia*



## **RESUMEN**

El **síndrome de Wiskott-Aldrich** es una inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el gen *WAS*, afectando a todo el linaje hematopoyético. La expresión de *WAS* está regulada por dos promotores; promotor proximal, de 1.6Kb, situado justo en el sitio de inicio de la transcripción y el promotor proximal o distal, de 0.6Kb, situado a 6Kb aguas arriba del promotor proximal. El gen *WAS*, de expresión específica de linaje hematopoyético, codifica una proteína multimodular citoplasmática (WASP) cuya función más estudiada es la integración de señales extracelulares con la nucleación de la actina y la reorganización del citoesqueleto celular. Sin embargo el rol de WASP en el linaje megacariocítico resulta controvertido con evidencias que indican una función más especializada de WASP en plaquetas.

Actualmente el único tratamiento curativo para pacientes con *WAS* es el trasplante de médula ósea. Sin embargo, este tratamiento no está siempre disponible ni está exento de efectos secundarios severos. Por ello, la **terapia génica** (TG) emerge como una alternativa real al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. En la actualidad, se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos de TG para el tratamiento de pacientes con *WAS* utilizando células madre hematopoyéticas (HSCs) modificadas genéticamente con un vector lentiviral (VL) que expresa el gen *WAS* a través del promotor proximal del propio gen *WAS* (el vector lentiviral WW1.6). A pesar de que la gran mayoría de los pacientes se han recuperado de la inmunodeficiencia y manifestaciones autoinmunes, en muchos casos persiste la **microtrombocitopenia y en algunos** casos también los **sangrados** y hemorragias. Las razones de que esta estrategia repare con éxito los defectos funcionales de células T, B y macrófagos (causantes de la inmunodeficiencia), pero no tenga el mismo éxito en plaquetas son desconocidas. Una hipótesis es que los vectores lentivirales utilizados (WW1.6), consiguen una expresión adecuada de WASP en células linfoides y mieloides pero no en las células del linaje megacariocítico. Esto produciría una “peor” expresión de WASP en megacariocitos y plaquetas y, por tanto, unos peores resultados en cuanto a reparación de los defectos funcionales de las mismas. Estos problemas de eficiencia en la restauración de la trombocitopenia no fueron detectados en los modelos animales utilizados en los ensayos preclínicos, reflejando la necesidad de desarrollar nuevos modelos para estos estudios.

En base a lo mencionado anteriormente, la presente tesis se ha centrado en los siguientes objetivos: 1- Estudiar el papel de WASP durante la megacariopoyesis y a la trombopoyesis en células humanas. Esto permitirá entender los resultados de los ensayos clínicos actuales y los requerimientos para mejorar dichos resultados, 2- Analizar si el patrón de expresión de los vectores terapéuticos mimetizan la expresión endógena de WASP durante estos dos procesos. De esta manera se podrá investigar donde está el

problema de los vectores actuales y como mejorarlos y 3– Desarrollar nuevos vectores terapéuticos e investigar la capacidad de los mismos para reparar los defectos funcionales de los megacariocitos y plaquetas, así como de otros tipos celulares linfoides y mieloides. La idea final es proponer una nueva estrategia de TG para WAS basada en nuevos VLs que muestren mejores perfiles de expresión en el linaje megacariocítico y mantengan la capacidad de restauración de los defectos funcionales encontrados en las células hematopoyéticas de los pacientes con WAS.

El papel de WASP durante el desarrollo megacariocítico permanece en debate abierto, con resultados controvertidos y la necesidad de esclarecerlos es clave para la mejora de vectores lentivirales terapéuticos. Con tal finalidad hemos desarrollado los primeros modelos celulares de WAS en células madre embrionarias humanas mediante edición genómica con Zinc-Finger Nucleasas (ZFNs) (AND-1\_WASKO\_C1.1 y AND-1\_WASKO\_C1.2: depositadas en el Banco Nacional de Líneas Celulares). Estas líneas embrionarias deficientes para WASP nos han permitido estudiar por primera vez el papel de esta proteína durante el desarrollo hematopoyético y megacariocítico. Los datos generados con este modelo indican que la ausencia de WASP produce un adelantamiento de la diferenciación hematopoyética temprana y megacariocítica. Proponemos, por lo tanto, que WASP juega un papel de regulador negativo en estos procesos y es por lo tanto importante determinar cómo se comportan los vectores terapéuticos a lo largo de estos procesos. En particular, dado que los VLs actuales son deficientes reparando la trombocitopenia, nuestros esfuerzos se han centrado en realizar estos estudios en la megacariopoyesis y la trombopoyesis.

Para ello, en primer lugar estudiamos la **cinética de expresión fisiológica de WASP** durante el proceso de diferenciación megacariocítica utilizando modelos celulares humanos (MEG-01 y K562), así como HSCs. Estos estudios mostraron que los niveles de WASP intracelular disminuyen progresivamente conforme progresa la diferenciación megacariocítica hacia la generación de plaquetas. A continuación, utilizamos líneas celulares humanas deficientes para WAS (K562WASKO) así como HSCs procedentes de pacientes WAS para analizar cuál de los **vectores lentivirales terapéuticos** mimetiza mejor el patrón endógeno de WASP durante la diferenciación megacariocítica. Nuestros resultados muestran que el vector AW, que expresa WAS a través de fragmentos de los promotores proximal y alternativo del gen WAS, presenta el mejor perfil de expresión y es por lo tanto el mejor candidato para un futuro ensayo clínico. Finalmente se validó la utilidad de dicho vector para su uso como herramienta terapéutica comprobando la capacidad de los mismos para **rescatar los defectos funcionales observados en megacariocitos y plaquetas**.

# **INTRODUCCIÓN**





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El síndrome de Wiskott-Aldrich

En 1937, Alfred Wiskott describió por primera vez tres hermanos caracterizados por trombocitopenia (bajo número de plaquetas), diarrea sanguinolenta, episodios de fiebre e infecciones recurrentes de oído. Debido al historial familiar, propuso que estos pacientes sufrían una nueva “trombopatía hereditaria”. Posteriormente, en 1954, Robert Aldrich publicó un caso con un fenotípico clínico similar, de una familia americana de origen holandés, que a lo largo de 6 generaciones presentaba 16 de 40 varones, pero no mujeres, fallecidos a causa de una enfermedad similar a la descrita por el Dr. Wiskott, mostrando una clara herencia ligada al cromosoma X. Hoy en día el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) está definido como un desorden hereditario ligado al cromosoma X asociado a inmunodeficiencia, microtrombocitopenia (bajo número de plaquetas y de menor tamaño), eczema y un riesgo mayor a padecer desórdenes autoinmunes y a desarrollar neoplasias, principalmente leucemias.

WAS tiene un fenotipo clínico variable que está correlacionado con el tipo de mutación que presenta el gen WAS. Debido a una pérdida total de la proteína, o de su función, resulta la forma más severa de la enfermedad, WAS. Otra forma más atenuada es la trombocitopenia ligada al cromosoma X (XLT), que, al igual que WAS, está caracterizada por una microtrombocitopenia crónica. Existe un tercer fenotipo clínico, como consecuencia de mutaciones en este gen, que dan lugar a una ganancia de función y desencadena en neutropenia ligada al X (XLN) (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Enfermedades relacionadas con WAS.**

| Enfermedad | Efecto de la mutación    | Expresión de WASP                     | Características clínicas   |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|--|
| WAS        | Pérdida de función       | Generalmente ausente                  | Microtrombocitopenia, eczema (desde moderado a severo), infecciones recurrentes o severas.<br>Complicaciones: autoinmunidad, desarrollo de leucemias |
| XLT        | Pérdida de función       | Generalmente presente a bajos niveles | Microtrombocitopenia, desde leve hasta moderado eczema, infecciones menores recurrentes.<br>Complicaciones: Autoinmunidad                            |
| XLN        | Auto-inhibición afectada | Presente                              | Neutropenia, monocitopenia.<br>NK-citopenia y mielodisplasia   |

## *Introducción*

La esperanza de vida es de 20 años en ausencia de tratamiento (Sullivan et al. 1994). La muerte resulta principalmente por infecciones, complicaciones en el sangrado, enfermedades autoinmunes y neoplasias.

El tratamiento convencional es paliativo, basándose en el uso de antibióticos profilácticos, para tratar las infecciones; transfusiones de plaquetas, para mejorar el sangrado; inmunoglobulinas, para aquellos pacientes que presentan deficiencia de anticuerpos, e inmunosupresores, al menos intermitentemente, cuando se dan manifestaciones autoinmunes. También está recomendada la esplenectomía que revierte, en parte, la trombocitopenia, incrementando el número de plaquetas en sangre. Sin embargo, incrementa el riesgo a sufrir septicemia, por lo que pacientes que se han sometido a la cirugía requieren profilaxis con antibióticos para toda la vida.

A pesar de los avances en clínica, los pacientes WAS tienen mal pronóstico a no ser que logren una reconstitución de su sistema hematológico e inmunológico (Pai & Notarangelo 2010). El trasplante de células hematopoyéticas es, actualmente, el único tratamiento curativo. Sin embargo, no siempre es posible encontrar un donante HLA compatible de la misma familia. Donantes familiares con HLA diferente y donantes con HLA compatibles, pero no relacionados, han tenido peor éxito en cuanto al tratamiento de estos pacientes. La supervivencia global ha mejorado mucho, en todos los tipos de trasplantes, y se sitúa en torno al 90% con todos los tipos de donante. Sin embargo, el riesgo de sufrir complicaciones persiste, y varía en función del donante. Mientras que las complicaciones están menos presentes en trasplantes de hermanos con HLA compatible (33.6%), éste aumenta en trasplantes de donantes compatibles no relacionados (46.7%), supone un 66% en trasplantes de donantes familiares HLA-no compatible y llega hasta un 71% cuando se trasplantan células hematopoyéticas de sangre de cordón de donantes no relacionados parcialmente compatibles (Moratto et al. 2011). Además de la compatibilidad HLA con el donante y la relación del mismo con el paciente, hay que tener en cuenta la edad del paciente. Se ha observado que los pacientes menores de 5 años sometidos a trasplante tienen mejor pronóstico que aquellos mayores de 5. Además, estudios hechos a largo tiempo, post-trasplante muestran una serie de efectos secundarios, como es el desarrollo de autoinmunidad temprana, reactivación de infecciones virales o incluso problemas neurológicos y enfermedades autoinmunes, años posteriores al trasplante. A esto se añade el riesgo a que el trasplante sea rechazado, debido a un régimen mieloablativo incompleto, que deriva en un rechazo o el establecimiento de quimeras, que pueden terminar en el desarrollo de enfermedades autoinmunes o en la persistencia de la microtrombocitopenia (Moratto et al. 2011; Shin et al. 2012). Es por ello que el desarrollo de terapias alternativas debe ser tenido en cuenta para el tratamiento de WAS. Y es, justamente, la optimización de estas terapias en lo que se centra esta tesis.

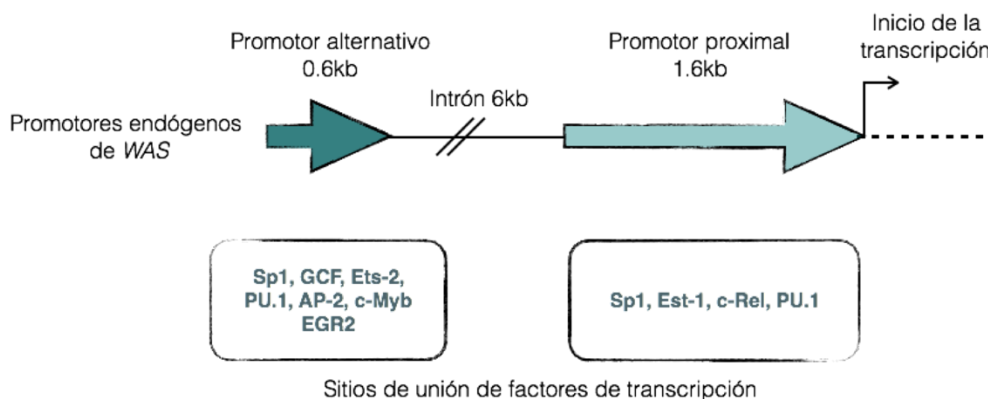
### 1.1.1. Genética de WAS

WAS está causado por mutaciones en el gen WAS. Éste fue descrito en 1994 por Derry y colaboradores mediante clonación posicional. El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.22-p11.23) (Derry et al. 1994).

WAS está formado por 12 exones, que dan lugar a un cDNA de 1.8kb que se traduce en una proteína de 502 aminoácidos, la proteína WASP, particularmente rica en residuos de prolina. Su expresión está restringida al linaje hematopoyético y está regulada bajo la actividad de dos promotores específicos (**Figura 1**):

- Promotor proximal: Fue descrito en 1998, como primera secuencia reguladora del gen WAS. Éste se localiza justo adyacente al sitio de inicio de la transcripción y comprende una secuencia de 1,6Kb. Aunque no encontraron, a lo largo de la secuencia, caja TATA ni regiones ricas en islas CG sí dieron con diferentes secuencias reguladoras, susceptibles de unión a diferentes factores de transcripción conocidos por expresarse en células hematopoyéticas. Este promotor cuenta con dos sitios de unión para Ets-1 (uno distal y otro proximal al sitio de inicio de la transcripción), uno para c-Re1 y otro para PU.1. Es conocido que Ets-1 está altamente expresado en células T e implicado en el control transcripcional de varios genes, tanto mieloides como linfoides. PU.1, por su parte, está particularmente implicado en regulación de genes hematopoyéticos en células megacariocíticas y células B (Petrella et al. 1998). Los ensayos de Petrella *et al.* demostraron que un fragmento de tan solo 170-pb son suficientes para otorgar expresión hemato-específica. Posteriormente, Martín y colaboradores describieron que un fragmento de las primeras 500-pb del promotor proximal es suficiente para lograr una expresión fisiológica de WAS, específica de linaje hematopoyético, en el contexto de un vector lentiviral auto-inactivado (Martín, M. Toscano, et al. 2005).
- Promotor alternativo: Un año después, Hagemann y Kwan describían la identificación de un segundo promotor específico de WAS, una secuencia de 0.6Kb. Mediante mapeo de restricción se detectó que éste se localizaba a 6Kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. Al igual que el promotor proximal, pudieron detectarse en éste secuencias susceptibles a unión con diferentes factores de transcripción. En ambos promotores se describieron sitios de unión para PU.1. Salvo por este sitio, ambos promotores son considerablemente diferentes. En el promotor alternativo se describieron varios sitios potenciales para unión de Sp1 y AP-2, dos sitios de unión para c-Myb y otro para EGR2, y en contraste con el promotor proximal se observó también la

presencia de un posible sitio de unión para Ets-2, además de dos secuencias de unión al represor GCF (Hagemann & Kwan 1999).



**Figura 1. Promotores endógenos de WASP.** El promotor proximal de 1.6kb se localiza inmediatamente adyacente al sitio de inicio de la transcripción. El promotor alternativo o distal, de 0.6kb, está situado 6kb aguas arriba del primero. Se muestran los diferentes sitios de unión para factores de transcripción en cada uno de los promotores (caja situada debajo del promotor).

Las diferencias encontradas entre ambos promotores, y con respecto a los diferentes sitios de unión a factores de transcripción sugiere que su actividad puede variar en función del linaje celular y del estado de diferenciación o desarrollo. La presencia de sitios de unión para c-Myb, Ets-2 y PU.1 sugieren que el promotor alternativo podría tener un papel más importante en el linaje mielóide (Hagemann & Kwan 1999).

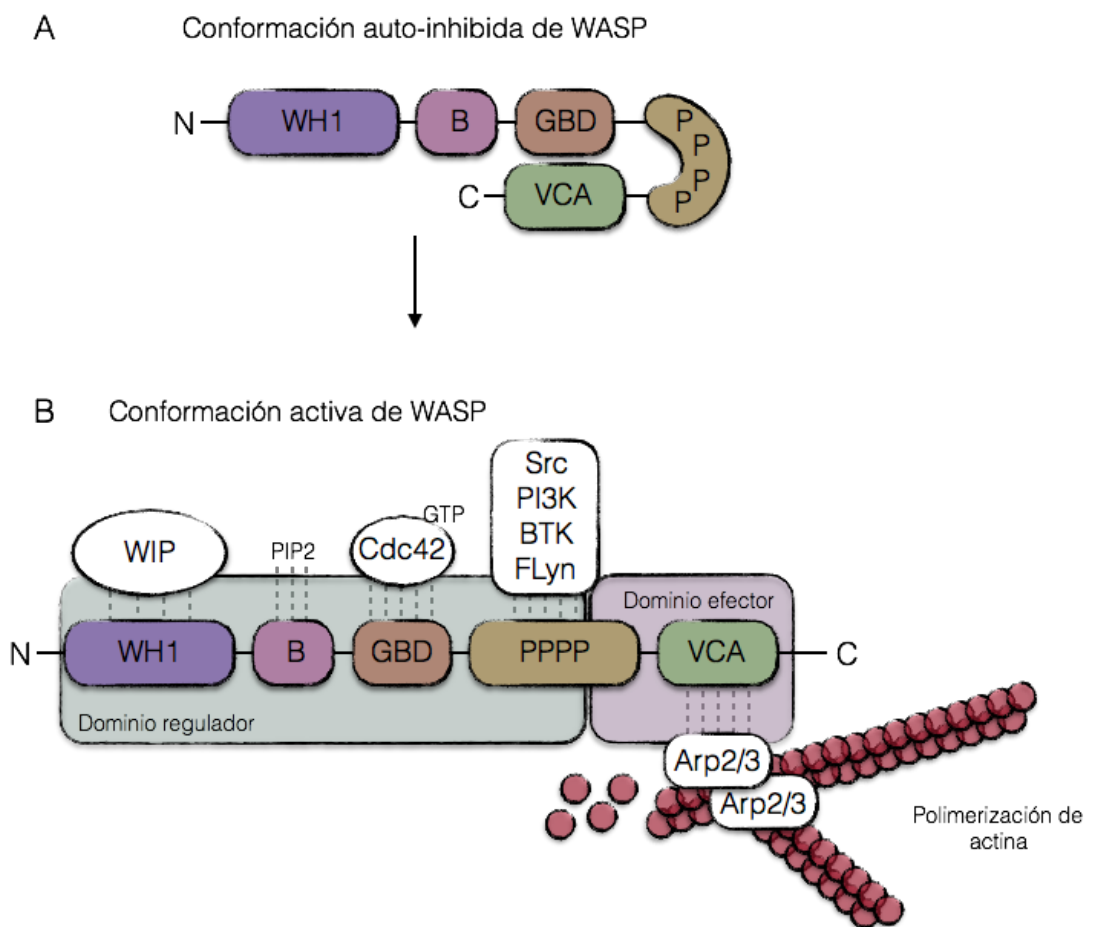
### 1.1.2. Actividad fisiológica de WASP

Como se ha comentado anteriormente, WAS se expresa específicamente en linaje hematopoyético, y codifica una proteína de 502 aminoácidos rica en residuos de prolina, WASP.

Los mecanismos biológicos responsables del fenotipo patológico de WAS están directamente relacionados con la desregulación de la polimerización de actina, en células hematopoyéticas, como resultado de una deficiencia de WASP. WASP pertenece a una familia de proteínas que incluye la proteína WASP neuronal (N-WASP) y la familia de proteínas WASP con homología a verprolina (WAVE), que participan en la transducción de señales celulares, desde la superficie celular hasta el citoesqueleto de actina.

Esta familia de proteínas está organizada por varios dominios funcionales (**Figura 2**). Así pues, en el extremo C-terminal contiene un dominio VCA que une monómeros de

actina y el complejo Arp2/3 (del inglés *actin related protein*), estimulando la polimerización de actina. El dominio VCA está compuesto por un dominio de homología a verprolina (V), otro dominio con homología a cofilina (C) y una región ácida (A). La región N-terminal participa en la unión a WIP (WASP-Interacting Protein), así como de otras proteínas o lípidos, jugando un papel regulador de su actividad y localización. Esta región N-terminal presenta un dominio de homología WASP1 (WH1) seguido de una región básica (B) y el dominio de unión a GTPasa (GBD; del inglés *GTPase Binding Domain*) (Snapper & Rosen 1999; Thrasher 2009).



**Figura 2. Proteína WASP.** En situaciones normales WASP presenta una conformación auto-inhibida, en la cual se dan interacciones intramoleculares entre el dominio de homología a verprolina (VCA) y el dominio de unión a GTPasa (GBD), lo cual previene la unión del complejo nucleador de actina Arp2/3. La proteína Cdc42, de la familia de GTPasas Rho, es el principal activador de WASP, por unión con el dominio GBD, lo cual causa cambios conformacionales que libera el dominio VCA del dominio GDB.

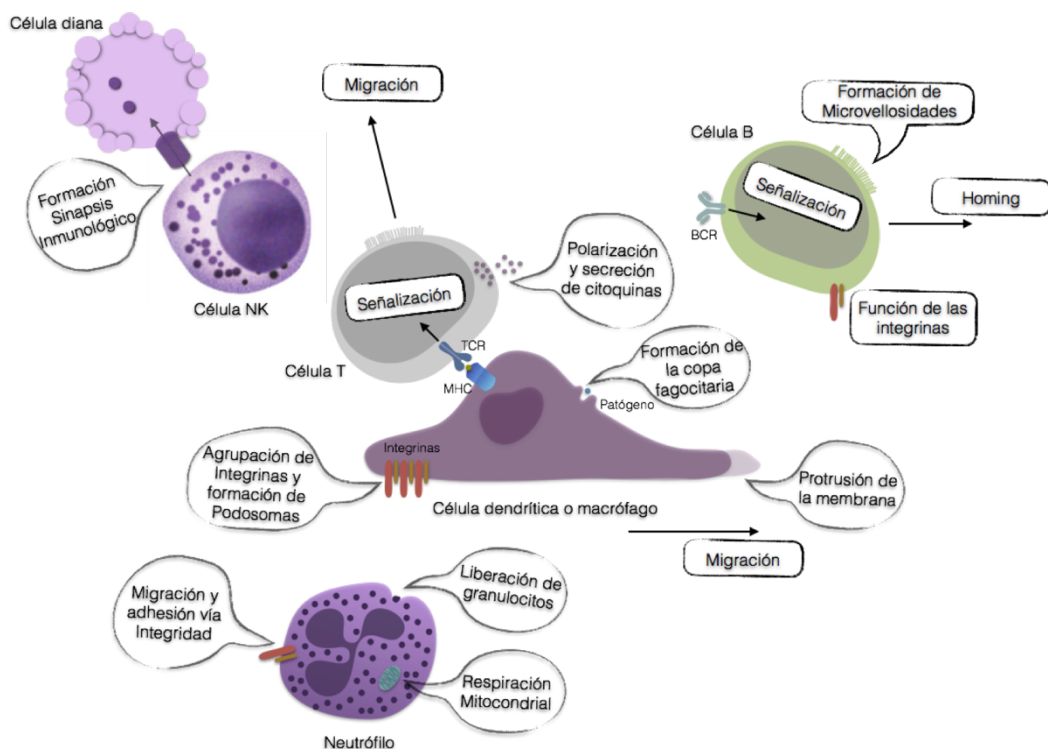
La regulación de la activación de WASP se da mediante cambios conformacionales en la misma (**Figura 2**). Cuando WASP está inactiva adopta una forma auto-inhibida en la cual la región VCA interacciona con el dominio GBD (**Figura 2A**). Debido a esta forma inactiva, el complejo Arp2/3 no puede unirse. La proteína WIP, que interacciona con el dominio WH1, parece jugar un papel importante en el mantenimiento de esta configuración en ausencia de señales activadoras (Ramesh et al. 1997). Tras la estimulación celular varios factores, entre los que se encuentran Cdc42, PIP<sub>2</sub> y proteínas con dominio SH3, inician la activación de WASP por fosforilación de la Y291 (Higgs & Pollard 2000) (**Figura 2B**). La desestabilización de la forma auto-inhibida permite el inicio de la polimerización de monómeros de g-actina mediante el complejo Arp2/3 (Yarar et al. 1999).

### 1.1.3. Función de WASP en hematopoyesis

La expresión de WASP comienza en los primeros estados de la diferenciación hematopoyética y se expresa en todo el linaje hematopoyético completo (Parolini et al. 1997; Muñoz et al. 2012). Su papel en la hematopoyesis temprana todavía se desconoce. Tanto pacientes como modelos animales exhiben algunas anomalías en cuanto a parámetros hematopoyéticos se refiere (Massaad et al. 2013; Charrier et al. 2013). Las citopenias observadas que afectan a varios linajes hematopoyéticos podrían estar relacionadas con reacciones autoinmunes, defectos en la supervivencia o defectos durante los últimos estados de diferenciación/maduración, y esto concuerda con un posible papel de WASP como regulador de la homeostasis hematopoyética. El hecho de que el desarrollo hematopoyético no se vea gravemente comprometido sugiere un posible papel redundante entre las proteínas de la familia de proteínas WASP, como se ha sido descrito durante el desarrollo de las células T en el timo (Cotta-de-Almeida et al. 2007). Sin embargo, la importancia funcional de WASP parece depender del estado de diferenciación durante el desarrollo de las células hematopoyéticas. Mujeres que son portadoras de mutaciones en el gen *WAS* muestran inactivación del cromosoma X aparentemente no aleatorio, en diferentes linajes hematopoyéticos periféricos, así como en progenitores tempranos (Wengler et al. 1995).

### 1.1.4 Función de WASP en el sistema inmunológico

La ausencia completa de WASP conlleva a defectos pronunciados en la función de múltiples células hematopoyéticas de todos los linajes, resultando en microtrombocitopenia, linfopenia progresiva y funciones celulares anormales tanto en células linfoides como mieloides. En el sistema inmunológico, ambas respuestas, humoral y celular, tanto del sistema innato como del adaptativo, se ven afectados a diferentes niveles (**Figura 3**).



**Figura 3. Funciones de WASP en células del sistema inmunológico.** WASP se requiere para muchas funciones de células inmunológicas, tanto linfoides como mieloides. Algunas de ellas, como la fagocitosis y la formación de podosomas, están relacionadas con el papel de WASP en la regulación de la polimerización de nuevas ramificaciones de los filamentos de actina. Otras funciones de WASP dependen de su actividad como proteína puente para hacer efectivas complejas señales mediadas por receptores de antígeno o integrinas. BCR: receptor de células B; NK: natural killer; TCR: receptor de células T.

#### 1.1.4.1. Células T

La adhesión, organización y migración celular son eventos críticos para el desarrollo y función de las células T. Una vez desarrolladas, las células T salen del timo, entran en órganos linfoides periféricos, son activadas tras entrar en contacto con células presentadoras de antígeno y finalmente, ejercen su función como células citotóxicas efectoras, reguladoras o colaboradoras. Todos esos eventos celulares están bajo la influencia de la reorganización del citoesqueleto, de la dinámica de la actina. Los defectos principales de las células T deficientes para WASP están relacionados con interacciones aberrantes con las células presentadoras de antígeno y con fallos en la migración celular, los cuales subrayan los defectos inmunológicos descritos en pacientes WAS.

Los pacientes WAS manifiestan linfopenia de células T durante la infancia y adolescencia, como consecuencia de un desarrollo anormal de células T en el timo, así como por una mayor susceptibilidad a la apoptosis, potencialmente a través de la sobre-



regulación de rutas de muerte mediadas por FAS (Rengan et al. 2000; Park et al. 2004). El papel crítico de WASP en la homeostasis de las células T humanas ha sido demostrado *in vivo*, ya que se ha observado que células que sufren una segunda mutación en WASP, la cual conlleva a una restauración de su expresión, tienen ventaja selectiva. Esta reversión espontánea ocurre en hasta un 11% de pacientes WAS, pero en todos los casos este fenómeno de ventaja selectiva se ha restringido, casi en su totalidad, a linfocitos T (Wada et al. 2001; Wada et al. 2003; Stewart et al. 2007).

La superficie de las células T de pacientes presentan un menor número de proyecciones de tipo microvellosidades, apuntando a un defecto en la arquitectura del citoesqueleto de actina (Kenney et al. 1986). Consistente con esta observación, las células T de pacientes tienen comprometida la polimerización de actina y la reorganización del citoesqueleto de actina cuando son estimuladas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 inmovilizados (Molina et al. 1992; Massaad et al. 2011). Otro hecho fundamental es que WASP es reclutada, normalmente, durante la sinapsis inmunológica. En ausencia de WASP, el ensamblaje de los filamentos de actina, y el reclutamiento de otras proteínas participantes en la sinapsis inmunológica se ve afectada en respuesta a la estimulación del receptor de células T (TCR). Aunque esto puede variar en función de la estimulación que conlleva a la sinapsis inmunológica y aquellas que utilizan WASP como una proteína de andamiaje resultan en defectos en la polarización de citoquinas y en un bloqueo de su secreción (Morales-Tirado et al. 2004; Trifari et al. 2006; Morales-Tirado et al. 2009).

#### **1.1.4.2. Células B**

Aunque el desarrollo de células B no está gravemente afectado en pacientes con WAS ni en modelos ratones, las células B deficientes para WASP tienen desventaja selectiva, comparada con las células B normales. Como consecuencia los recuentos de linfocitos B, especialmente de células B de la zona marginal del bazo, son significativamente menores, en ratones WASP<sup>-/-</sup> (Westerberg et al. 2005; Westerberg et al. 2008; Recher et al. 2012; Westerberg et al. 2012). Tanto las células B de pacientes como de ratones WASP<sup>-/-</sup> tienen menos microvellosidades, al igual que ocurre con las células T, y más cortas. Además, presentan daños en el citoesqueleto de actina, que conlleva a fallos en la formación de filopodios, que son menos móviles, con menor extensión y se agregan menos a superficies preparadas con anticuerpos que células B normales (Westerberg et al. 2005). Estos defectos en el citoesqueleto pueden ser la causa de la deficiencia de migración que presentan las células B en ausencia de WASP, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como los fallos en la homeostasis de células B periféricas, principalmente de células B de la zona marginal del bazo (Westerberg et al. 2008).

Las células B de pacientes y ratones WASP<sup>-/-</sup> proliferan de forma normal, y no tienen afectada la señalización celular derivada de la activación del receptor de células B

(BCR) (Snapper & Rosen 1999). Sin embargo, líneas celulares humanas inmortalizadas, de pacientes WAS proliferan peor y muestran menores niveles de  $Ca^{2+}$  inmovilizado, cuando son estimuladas con anticuerpos frente a inmunoglobulinas de superficie (Simon et al. 1992). Por otro lado, el silenciamiento selectivo de WASP en células B (Recher et al. 2012), y en el compartimento de células B de ratones (Becker-Herman et al. 2011), mostró que las células B deficientes para WASP son hiperproliferativas. Además, este silenciamiento selectivo llevó a un aumento de la producción de auto-anticuerpos y al desarrollo de autoinmunidad (Recher et al. 2012).

Por todo ello, los estudios realizados parecen indicar que la ausencia de WASP conlleva a hiper-respuestas de las células B y afecta a la tolerancia inmunológica contribuyendo a la autoinmunidad observada en pacientes y en modelos animales.

#### **1.1.4.3. Células mieloides**

Las células de linaje mieloides, al igual que las linfoides, presentan defectos debido a la ausencia de WASP. Un papel fundamental en una parte importante de estas células, como son células dendríticas (DCs) o macrófagos (M0s) muestran defectos en la fagocitosis (Lorenzi et al. 2000; Leverrier et al. 2001), lo cual está íntimamente relacionado con el papel fundamental que juega WASP en la formación de la invaginación de la membrana que dará lugar a la copa fagocítica (Tsuboi & Meerloo 2007). Además, monocitos, M0s y DCs de pacientes y de modelos animales *knock-out* para WASP (WASKO) muestran fallos para la formación de podosomas (Linder et al. 1999; Burns et al. 2001). De forma similar, la formación de filopodios y lamelipodios, que se producen en la parte frontal de una célula en movimiento, es defectuosa, y todo tipo de migración, incluyendo la derivada por quimiotaxis, está afectada en esos tipos celulares (Bouma et al. 2009; Jones et al. 2002). Los defectos en migración afectan tanto al *homing* de las células inmune a sitios de inflamación como a la iniciación de la respuesta inmune adaptativa en los tejidos linfoides secundarios.

También hay evidencias que indican que WASP puede jugar un papel importante en la señalización de células *natural killer* (NKs), así como actividad citotóxica defectiva, como resultado de la sinapsis inmunológica, que no llega a establecerse de forma normal, entre las NKs y sus células diana. La activación de células NKs *in vivo* está comprometida, en ausencia de WASP por las pocas interacciones intracelulares, particularmente con DCs, las cuales son requeridas para la correcta activación de células NKs a través de la sinapsis inmunológica entre DCs-células NKs (Borg et al. 2004).

#### **1.1.5. Función de WASP en megacariocitos y plaquetas**

A diferencia del sistema inmunológico, donde los defectos asociados a la ausencia de WASP han sido ampliamente caracterizados, las causas que subyacen tras la

microtrombocitopenia, observada en todos los pacientes WAS y en pacientes XLT, son menos conocidas, y aún hoy la función de WASP en megacariopoyesis y trombopoyesis es controvertida.

Dada la enorme dificultad para obtener células de médula ósea, junto con su reducido número de plaquetas, la generación de modelos WASKO, tanto murinos (Snapper et al. 1998), como humanos (Molina et al. 1992; Toscano et al. 2013) ha sido fundamental para entender el papel de WASP en la patología. Los modelos murinos han arrojado luz sobre el papel de WASP y su ausencia en la formación de las plaquetas (PLTs). La inactivación total de WASP reproduce la trombocitopenia, la cual va de moderada a severa en función del fondo genético y del individuo, sin embargo la microcitosis (células de menor tamaño) no se ha reproducido (Sabri et al. 2006; Prisolovsky et al. 2008; Marathe et al. 2009).

La microtrombocitopenia es prácticamente universal en pacientes con WAS (con un recuento plaquetario del 10%, respecto a un individuo sano), sin embargo la severidad de la misma es variable. Aproximadamente la mitad de los pacientes tiene trombocitopenia severa, con recuento plaquetario  $<20.000$  PLTs/ $\mu$ L. Además, la severidad está relacionada con el riesgo de sangrado, incluyéndose, entre los más serios, sangrando intracraneal, gastrointestinal u oral, los cuales son las principales causas de morbilidad y mortalidad, hasta en un 21% de los casos (Buchbinder et al. 2014).

A pesar de todas estas evidencias, los mecanismos por los cuales se ven afectadas las plaquetas como resultado de la ausencia de WASP son menos conocidos, y de hecho siguen presentando gran controversia. Algunos autores han publicado que los pacientes con WAS presentan una diferenciación megacariocítica normal, describiendo que la formación de plaquetas no está afectada (Gröttum et al. 1969; Haddad et al. 1999). Con esto, el motivo de la microtrombocitopenia se basaría, principalmente, en la eliminación de las plaquetas por macrófagos residentes en el bazo y/o en otros tejidos debido a su defectos morfológicos/fenotípicos (p.e. elevada exposición de fosfatidilserina en su superficie)(Gröttum et al. 1969; Dupuis-Girod et al. 2003; Shcherbina, Rosen, et al. 1999; Rengan et al. 2000). En la misma dirección, otros grupos han descrito la presencia de un número elevado de megacariocitos (MKs) en médula, y un desarrollo anormal de las proplaquetas, generando así plaquetas de menor tamaño y con menor número de gránulos y mitocondrias (Luthi et al. 2003; Sabri et al. 2006; Schulze et al. 2006). Sabri y colaboradores identificaron un papel crítico de WASP en la biogénesis de las PLTs, por inhibición de la formación de proplaquetas a través del receptor de colágeno I. Estos mismos autores mostraron que la ausencia de WASP llevaba a una maduración prematura de los MKs, acumulándose éstos en médula ósea. Ese estudio, apoya la idea de

que WASP participa como un efector intrínseco negativo de la megacariopoyesis *in vivo* (Sabri et al. 2006).

En cuanto a la activación de las PLTs, el papel de WASP continúa siendo un tema controvertido. Varios grupos han descrito que la deficiencia de WASP en PLTs no afecta ni a su activación, ni al cambio morfológico ni a la polimerización de actina, mostrando también desarrollo normal de filopodios (Gross et al. 1999; Rengan et al. 2000). Se ha descrito también que las PLTs presentan baja adhesión y agregación, como consecuencia de la falta de WASP (Gröttum et al. 1969; Tsuboi et al. 2006), mientras que otros autores han publicado que estas PLTs presentan cambios morfológicos normales, pero que la agregación y liberación de micropartículas están incrementadas (Gross et al. 1999; Shcherbina, Rosen, et al. 1999; Shcherbina et al. 2001).

El hecho de que algunos autores hayan descrito que la polimerización de actina en PLTs deficientes para WASP sea normal, podría ser un indicador de que WASP no es indispensable para ello, en estas células. De hecho, se ha descrito que en ausencia de WASP, el complejo nucleador de actina, Arp2/3, permanece completamente funcional, sugiriendo que otras proteínas, tales como WAVE-2 o cortactina, podrían estar activándolo (Falet et al. 2002). Sin embargo, recientemente Poulter y colaboradores han demostrado que WASP juega un papel esencial en formación de nódulos de actina, a través de una ruta dependiente de WASP-Arp2/3. La formación de esos nódulos es más frecuente en la extensión de PLTs sobre fibrinógeno. Estos autores describen que la ausencia de WASP impide la formación de estos nódulos, afectando, por lo tanto, a su funcionalidad, observando defectos suaves en ensayos estáticos *in vitro*, en adhesión y agregación plaquetaria, pero viéndose defectos más severos bajo ensayos que mimetizan el flujo arterial. De acuerdo con esto, en ausencia de WASP, las PLTs no son capaces de unirse eficientemente a colágeno o fibrinógeno, aludiendo por lo tanto a que las interacciones PLT-PLT y PLT-sustrato están afectadas (Poulter et al. 2015).

También se ha descrito que WASP en las PLTs está involucrada tanto en eventos de señalización celular *outside-in* (recepción y transducción de un estímulo externo, con el fin de generar una respuesta celular) (Shcherbina et al. 2010), como en eventos *inside-out* (respuesta celular generada como consecuencia de la recepción previa de un estímulo externo) (Shattil et al. 1998).

Dejando a un lado los diferentes roles que puede tener WASP, en relación con el citoesqueleto de actina y su remodelación, recientemente se ha publicado un nuevo papel de WASP en PLTs, regulando la secreción de factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1). Como se ha comentado previamente, WASP permanece en una conformación auto-inhibida, hasta que es activada por fosforilación de la Tyr-291 (Tyr-293 en ratones).

Se ha descrito que cuando esto ocurre, WASP co-localiza con gránulos ricos en TGF- $\beta$ -1, impidiendo así su liberación. Estos autores han observado que la ausencia de actividad de WASP, como puede deberse a la falta de la misma, o la inhibición de su activación, lleva a que los gránulos permanezcan libres en el citosol, de modo que se imposibilita la regulación de liberación de TGF- $\beta$ -1. Esto, además, pone de manifiesto que WASP debe tener una función más especializada en plaquetas, además de la polimerización de actina (Kim et al. 2013).

### 1.2. Estado actual de la terapia génica para Wiskott-Aldrich

Los desórdenes monogénicos de la médula ósea, entre los que se encuentra WAS, consisten en un gran número de diversas condiciones, desde síndromes que afectan a la médula y varias hemoglobinopatías anémicas hasta una amplia gama de más de 250 inmunodeficiencias primarias (Al-Herz et al. 2014). Los tratamientos actuales son diferentes para cada enfermedad e incluyen profilaxis frente a las infecciones y transfusiones de productos derivados de la sangre, como inmunoglobulinas, eritrocitos y plaquetas (Hoernes et al. 2011; Chandrakasan & Kamat 2013; Pachlopnik Schmid et al. 2014). Sin embargo, como se ha comentado previamente, el único tratamiento curativo, hasta la fecha, es el trasplante de médula ósea, que ha sido la única vía para lograr reconstitución funcional permanente. A pesar del incremento de donantes de médula ósea registrados, algunos pacientes nunca llegan a encontrar un donante compatible. En esos casos, la terapia génica usando las propias células del paciente corregidas *ex vivo* puede ofrecer una estrategia potencialmente más segura y eficaz.

El primer ensayo clínico para el tratamiento de WAS fue llevado a cabo en Hannover, en 2006 e incluía 10 pacientes, con donantes con HLA no idéntico disponibles. Tras el condicionamiento con Busulfan se transdujeron células madre hematopoyéticas (HSCs) CD34<sup>+</sup>, obtenidas a partir de sangre periférica inmobilizada o directamente de médula ósea, con vectores gamma-retrovirales con LTR intacto. 9 de los 10 pacientes rescataron la expresión génica en compartimentos mieloides y linfoides, con un incremento en número de plaquetas y función y recuento normalizado de células T, NK y linfocitos B. Además, las infecciones recurrentes descendieron drásticamente, así como el sangrado y la sintomatología autoinmune (Boztug et al. 2010). Sin embargo, y a pesar del claro beneficio clínico que mostró el ensayo, los resultados fueron eclipsados por el desarrollo de leucemias agudas en 7 de los 9 pacientes. Posteriores investigaciones mostraron que hubo dominancia clonal con integraciones en oncogenes, como LMO2 (seis casos de leucemia linfoblástica aguda de células T), MECOM (dos casos de leucemia mieloide aguda) y MN1 (un caso de leucemia mieloide aguda) (Braun et al. 2014).

A diferencia de los vectores gamma-retrovirales, los vectores lentivirales (VLs), que derivan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), han mostrado ser sistemas integrativos mucho más seguros, y por lo tanto más adecuados (Wiznerowicz & Trono 2005; Toscano et al. 2004). Son estables, fáciles de concentrar y tienen un amplio tropismo, capaces de infectar tanto células en división como células quiescentes (Naldini et al. 1996; Kay et al. 2001). Es por ello que varios grupos han desarrollado VLs auto-inactivados (SIN-VLs), expresando WASP bajo diferentes promotores, y en varios sistemas modelo (Martín, M. Toscano, et al. 2005; Dupré et al. 2006; Marangoni et al. 2009; Avedillo Díez et al. 2011; Bosticardo et al. 2011).

Especial interés recae sobre un VL que expresa WASP bajo el promotor proximal endógeno de WAS, de 1,6kb (VL-w1.6W o W1.6), que mostró resultados prometedores en varios ensayos preclínicos, en términos de seguridad a largo plazo y eficacia (Bosticardo et al. 2011). Este vector fue posteriormente utilizado para ensayos clínicos que se están desarrollando en Boston, Londres, Milán y París. El ensayo de Milán (identificador #NCT01515462 de Telethon-RCCS San Raffaele-GlaxoSmithKline), trató 3 pacientes con WAS moderado (clasificación clínica entre 3-4) con trasplante autólogo de células HSCs transducidas con VL-w1.6W. Los resultados, tras 20-32 meses de seguimiento post-TG, han mostrado resultados estables y efectivos en cuanto a repoblación de células transducidas (Aiuti et al. 2013; Castiello et al. 2015) con expresión de WASP tanto en compartimento mielóide como linfóide. Se ha observado un claro beneficio clínico con reconstitución funcional del sistema inmunológico, disminuyendo las infecciones severas recurrentes, así como el eczema y una mejora en el sangrado. Además estudios de integración han mostrado distintos sitios de integración, resultando en una reconstitución del sistema hematopoyético policlonal, indicando por tanto que los VLs de última generación son una herramienta más segura que los vectores gamma-retrovirales utilizados en los primeros ensayos clínicos (Aiuti et al. 2013).

El ensayo llevado a cabo en Londres y París (identificadores #NCT01347242 y #NCT02333760 por Genethon) incluía 7 pacientes, WAS severo (con una clasificación clínica >5). 24 meses post-TG los autores han publicado el primer seguimiento de los pacientes, donde han mostrado un claro beneficio clínico. El eczema severo, presente en todos los pacientes, ha sido resuelto, así como la función inmunológica relacionada con las células T. Se requiere un seguimiento de largo plazo para evaluar la reconstitución de la inmunidad humoral, aunque hay evidencias de acumulación de células B WASP<sup>+</sup>, lo cual es alentador (Hacein-Bey Abina et al. 2015).

Uno de los principales signos invariables de WAS es la tendencia al sangrado, como resultado de la microtrombocitopenia. En ambos ensayos clínicos, tanto el de Milán, como el de Londres y París, a pesar del claro beneficio clínico e inmunológico, y

aunque han mostrado un incremento en el número de plaquetas, la microtrombocitopenia persiste en todos los pacientes (salvo en uno de ellos, que tiene número normal de plaquetas, resultado de una esplenectomía previa a la TG), aunque los episodios de sangrado han disminuido (Aiuti et al. 2013; Hacein-Bey Abina et al. 2015). El hecho de que la microtrombocitopenia persista, ya se había observado antes, tras trasplante alogénico de HSC, y se había asociado a quimerismo del compartimento mielóide (Moratto et al. 2011). Los recuentos plaquetarios de ambos ensayos clínicos se encuentran en el extremo inferior de los recuentos obtenidos tras trasplante de médula ósea. El rescate del número de plaquetas puede estar relacionado con la dosis de HSCs recibidas, pero quizá también por la necesidad de un VL que tenga una expresión más robusta de WASP. Cabe recordar la importancia que recae en lograr expresión fisiológica del transgén, en TG. Puesto que una deficiencia podría impedir una reconstitución completa del fenotipo afectado, y un aumento de la proteína, o su regulación, podría tener repercusiones negativas, en función de si la proteína en exceso pudiese resultar tóxica o llevarse a una desregulación de las funciones que de ella dependen.

### 1.2.1. Mejora de vectores lentivirales para terapia génica de Wiskott-Aldrich

Aunque todos estos resultados son muy alentadores, Astrakhan y colaboradores, en 2012, publicaron un trabajo donde se ponía en duda la fuerza del promotor proximal de WAS, utilizado en los ensayos clínicos, para alcanzar los niveles de WASP en células madre hematopoyéticas, tanto humanas como murinas, sugiriendo la necesidad de explorar promotores más robustos (Astrakhan et al. 2012).

Teniendo en cuenta los ensayos de Petrella et al. en 1998, que demostraron que un fragmento de sólo 170pb del promotor proximal (con dos sitios de unión a factores de transcripción Ets-1, uno para c-Re1 y otro para PU.1) era suficiente para otorgar expresión específica de linaje hematopoyético (Petrella et al. 1998), nuestro grupo describió, en 2005, que la presencia de un fragmento de 500pb del promotor proximal en un SIN-VL era suficiente para regular la expresión de WASP en linaje hematopoyético, con idéntica expresión que bajo el control del promotor proximal completo, de 1.6kb (Martín, M. Toscano, et al. 2005). Resultados en la misma línea obtuvieron Charrier y colaboradores, estudiando la expresión de WASP en varios tipos celulares como células B, células T, dendríticas y células CD34+ de pacientes WAS (Charrier et al. 2007). Además, se ha comprobado que el potencial de diferenciación de células progenitoras transducidas, tanto humanas (Martín, M. Toscano, et al. 2005; Charrier et al. 2007) como murinas (Charrier et al. 2005) no se ve afectado por la inserción del vector.

Sin embargo, como se ha comentado previamente (apartado “1.1. Genética de WAS), el gen WAS está regulado por dos promotores, el promotor proximal, de 1.6kb, y el promotor alternativo (0.6kb) que se encuentra a 6kb aguas arriba del promotor proximal,

y que parece tener un papel predominante en el control de la expresión de WASP en linaje mielóide, dado que presenta sitios de unión a factores de transcripción c-Myb, Ets-2 y PU.1 (Hagemann & Kwan 1999).

Para estudiar la implicación real que podía tener la presencia del promotor alternativo en la regulación de la expresión de WASP derivada de VLs, Frecha y colaboradores, generaron VLs reporteros, regulando la expresión de eGFP bajo diferentes promotores endógenos de WAS. El primero de ellos, WE, cuya expresión venía regulada por el fragmento de 0.5kb previamente descrito del promotor proximal, y el segundo de ellos, AWE, que regulaba la expresión del gen reportero mediante este mismo fragmento, pero además un fragmento de 387pb del promotor alternativo de WAS (ver Figura 1). Tras transducir HSCs CD34+ humanas con ambos vectores, los análisis de diferenciación *in vitro in vivo* revelaron que el vector AWE lograba una mejora significativa en la expresión de eGFP en megacariocitos y en células del linaje mieloides, comparando con el vector WE (Frecha et al. 2008)..

Otra forma de regular y mejorar la expresión de transgenes derivados de VLs, evitando además su silenciamiento, es la inclusión, en los vectores, de aisladores. Estos aisladores son secuencias reguladoras complejas que actúan *in cis* y evitan el silenciamiento de los transgenes por efecto de la heterocromatina, donde pueden integrarse, y bloquean el efecto *enhancer* que podría tener el transgén sobre los genes que lo rodeen (Chung et al. 1997; Wei et al. 2005).

En nuestro grupo, además, se desarrolló un nuevo aislador, IS2, basado en la combinación de un SAR sintético (SAR2) y el HS4-650 (Benabdellah et al. 2014). Los elementos SAR son secuencias de DNA no codificantes, altamente conservadas que se han utilizado para mejorar el patrón de expresión de transgenes derivados de plásmidos (Giannakopoulos et al. 2009) y de retrovirus (Dang et al. 2000), y el HS4 es uno de los aisladores mejor caracterizados y comúnmente utilizado, que posee ambas actividades, aislando al transgén del genoma, impidiendo tanto actividad *enhancer* del vector sobre el genoma, así como evitando el silenciamiento del transgén, por influencia de la cromatina sobre el vector (Ryu et al. 2007). HS4-650 hace referencia a un fragmento del HS4 original (Arumugam et al. 2009). El aislador IS2, insertado en orientación *reverse*, previene el silenciamiento, reduce la variabilidad de expresión e incrementa los niveles de expresión en células madre embrionarias humanas (hESCs) indiferenciadas y en HSCs derivadas de hESCs (Benabdellah et al. 2014). La combinación de estos elementos aisladores, junto con la presencia de ambos promotores endógenos de WAS, podría suponer una mejora en la actividad de VLs para el tratamiento de WAS.



### 1.3. Hematopoyesis, megacariopoyesis y trombopoyesis

#### 1.3.1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de formación de las células del sistema hematopoyético (**Figura 4**). El sistema hematopoyético consta de más de 10 tipos celulares diferentes con varias funciones. Los leucocitos representan varios tipos celulares especializados con funciones en inmunidad innata y adquirida. Los eritrocitos transportan O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, mientras los megacariocitos generan plaquetas para la coagulación y reparación de heridas. Todos los tipos celulares son generados a partir de las HSCs, que residen en la médula ósea, el sitio principal de hematopoyesis en el adulto. La sangre es uno de los tejidos más plásticos y dinámicos, con millones de células “viejas” que son repuestas por células “nuevas” a cada segundo. En situaciones de emergencia, como anemia o infección, el número de células sanguíneas crece rápidamente, volviendo a la normalidad tras la recuperación. El tiempo de vida de algunos tipos celulares maduros varía desde horas hasta años. Las células hematopoyéticas son el primer tejido en formarse durante el desarrollo embrionario, con una dinámica compleja, apareciendo a distintos tiempos de desarrollo y originando distintos tipos celulares en distintas localizaciones anatómicas. Existen 2 etapas con propiedades y características claramente definitorias en las cuales se puede dividir la hematopoyesis: la hematopoyesis embrionaria y la adulta.

##### 1.3.1.1. Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético

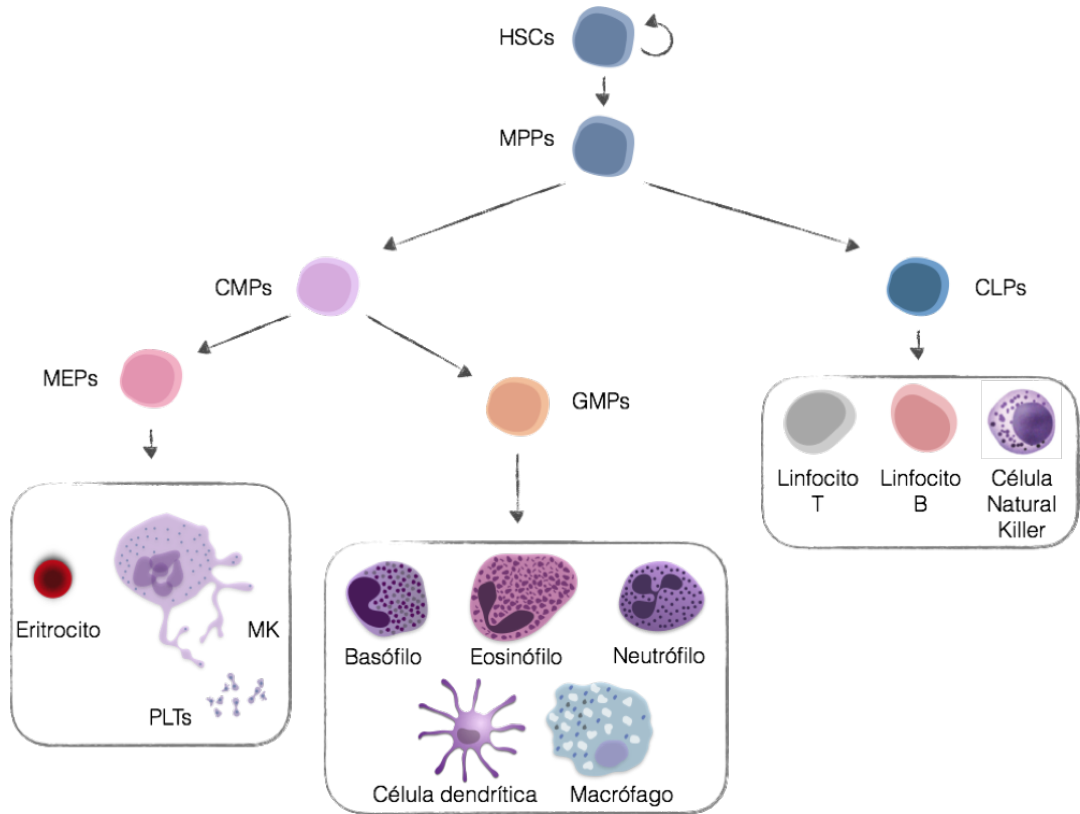
El conocimiento actual sobre el desarrollo embrionario del sistema hematopoyético proviene de estudios en animales modelos, siendo los modelos murinos los más estudiados. En el ratón, la hematopoyesis se inicia entre los días embrionarios 7.0-7.5 en una estructura extra-embionaria denominada saco vitelino, donde las células hematopoyéticas se encuentran rodeadas de células endoteliales, dentro de unas estructuras llamadas islas sanguíneas (Maximow 1924). Esta primera “oleada” de producción de HSCs permite la generación de progenitores eritroides primitivos, que expresarán la hemoglobina fetal, macrófagos embrionarios y MKs. Dado que estas células no son capaces de diferenciarse a células T, ni son HSCs trasplantables, esta hematopoyesis está definida como hematopoyesis primitiva (Yoder 2014; Ackermann et al. 2015; McGrath et al. 2015). El saco vitelino es el sitio principal de la hematopoyesis hasta aproximadamente E10.0, cuando las primeras HSCs son detectadas en estructuras intra-embionarias. Las HSCs definitivas, de tipo adulto, provienen de una estructura, desarrollada a día E10.0, denominada AGM (aorta-gónada-mesonefro) (Medvinsky & Dzierzak 1996). A partir de las células endoteliales de la aorta ventral aparecen pequeños clústeres de células que expresan marcadores hematopoyéticos, que son liberados a la circulación (Jaffredo et al. 1998). Estos clústeres están formados por pre-HSCs que maduran progresivamente hasta dar lugar a las HSCs definitivas (Boisset et al. 2015).

Estas HSCs definitivas se forman a partir de una población única de células endoteliales de la pared ventral de la aorta dorsal, definidas como endotelio hemogénico (Boisset et al. 2010). Así pues, durante los estadios tempranos del desarrollo, las HSCs y las células endoteliales comparten la expresión de algunos marcadores de superficie, como son CD31, VE-Caderina, c-Kit y CD34 (Choi et al. 2012; Julien et al. 2016).

### **1.3.1.2. Hematopoyesis en el adulto**

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

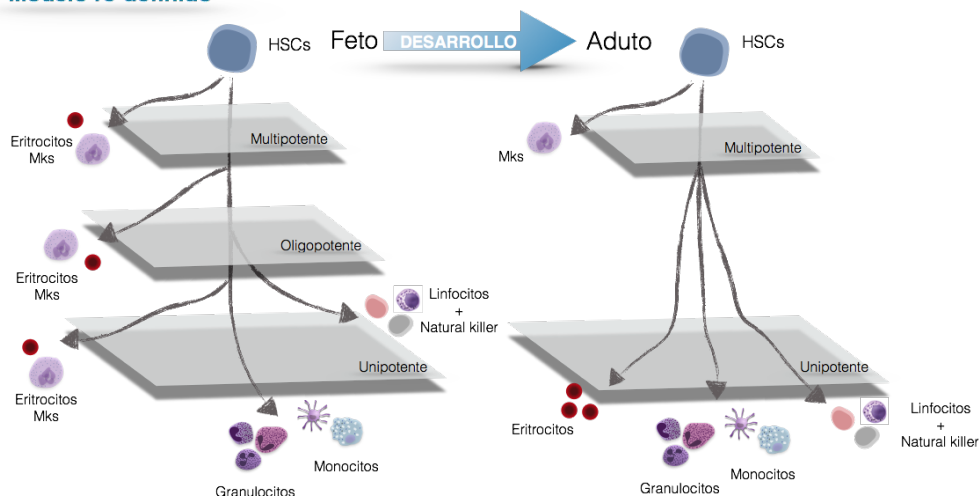
Tradicionalmente se ha considerado la diferenciación hematopoyética en mamíferos como un proceso jerárquico, donde las HSCs se encuentran en el ápice de dicha jerarquía (**Figura 4**). A partir de ellas se generan los distintos tipos de progenitores, cuya potencialidad decrece a medida que se diferencian, para dar lugar a todas las células del sistema hematopoyético. Las HSCs se pueden clasificar según su capacidad de colonizar la médula ósea de ratones. De este modo, se pueden encontrar HSCs capaces de repoblar médula ósea de ratones trasplantados durante largo plazo, *Long-term* HSCs (LT-HSCs) (Osawa et al. 1996; Morrison et al. 1997), o corto plazo, *Short-term* HSCs (ST-HSCs) (Yang et al. 2005). En la versión clásica de la hematopoyesis, estas células dan en un primer lugar a progenitores multipotentes (MPPs) que posteriormente originan progenitores mieloides comunes (CMPs) y progenitores linfoides comunes (CLPs). Éstos últimos a su vez generan las células de linaje linfóide (linfocitos T, B y células NKs). Los CMPs, por su parte, dan lugar a dos nuevos progenitores, con menor potencialidad, los progenitores eritroides-megacariocíticos (MEPs) y los progenitores granulocitos-macrófagos (GMPs). De los MEPs derivan los eritrocitos y los MKs, y de estos últimos, las plaquetas, mientras que los GMPs pueden diferenciarse a granulocitos (basófilos, eosinófilos, neutrófilos) y macrófagos (Rieger & Schroeder 2012).



**Figura 4. Modelo jerárquico de la hematopoyesis.** Sistema clásico de la hematopoyesis, sistema donde las HSCs ocupan la cima. Sistema bi-potencial. Las HSCs dan lugar a los MMPs que son bi-potenciales, pudiendo dar lugar a células de linaje mieloide o células del linaje linfocítico (HSC: célula madre hematopoyética; MPP: progenitor multipotente; CMP: progenitor mieloide común; LMP: progenitor linfocito común; MEP: Progenitor megacariocítico-eritroide; GMP: progenitor de granulocitos-monocitos)

Sin embargo, existen varios trabajos que apoyan la idea de una visión más dinámica y no tan jerarquizada de la hematopoyesis. Debili y colaboradores, reportaron la existencia de distintas rutas de la diferenciación megacariocítica dependiendo del origen de las HSCs (Debili *et al.* 2001). Más recientemente se ha publicado otro artículo que apoya esta idea y definiendo que la hematopoyesis es un proceso dinámico que varía a lo largo del desarrollo del individuo, siendo así diferente la hematopoyesis si se habla de HSCs en hígado fetal, de cordón umbilical o de médula ósea de adultos. En este trabajo, Notta *et al.*, mediante aislamiento celular y ensayos funcionales describen que existe una mayoría de progenitores oligopotentes en hígado fetal, mientras que la médula ósea está compuesta básicamente por progenitores unipotentes. El modelo que se desprende de este estudio (Figura 5) se basa en dos niveles: el superior, compuesto por células multipotentes, como HSCs o MPPs, y el inferior, compuesto por progenitores unipotentes comprometidos, postulando la no existencia de CMPs, en adultos (Notta *et al.* 2015).

## Modelo re-definido



**Figura 5. Modelo re-definido de la hematopoyesis.** El modelo re-definido propone un cambio durante el desarrollo en la arquitectura de los progenitores desde el feto, donde algunas HSCs y progenitores son multipotentes, hasta el adulto, donde el compartimento de HSCs es multipotente, pero los progenitores son unipotentes. Los planos grises representan niveles teóricos de diferenciación.

### 1.3.1.3. Megacariopoyesis y trombopoyesis

Los MKs son células poliploides derivadas de células madre hematopoyéticas que residen en la médula ósea, representando tan sólo un 0.4% del total de células en la médula (Levine 1980).

La megacariopoyesis es el proceso por el cual las HSCs se diferencian a células grandes, poliploides, denominadas MKs, mientras que por trombopoyesis se entiende la generación y liberación de PLTs, a partir de los MKs.

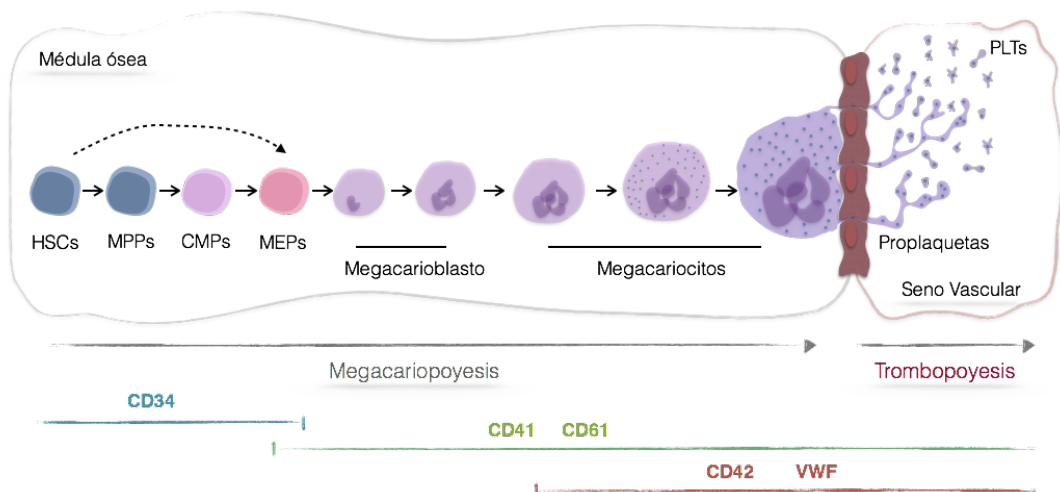
El proceso de megacariopoyesis y la producción de las PLTs ocurren en la médula ósea, en nichos vasculares y osteoblásticos altamente especializados con un microambiente complejo, donde los gradientes de citoquinas, factores de crecimiento, calcio, oxígeno e interacciones adhesivas regulan la megacariopoyesis y la migración megacariocítica (Bastian et al. 1999). Como se ha descrito en el apartado anterior, inicialmente la megacariopoyesis incluía el paso de HSCs a MPPs, de estos a CMPs y por último a un último progenitor bipotencial MEP, con capacidad de dar lugar tanto a MKs como a eritrocitos (**Figura 5**). Sin embargo, estudios más recientes como el previamente comentado de Notta *et al.*, o el trabajo de Woolthius *et al.*, de 2015 y 2016 respectivamente, sugieren que los MKs podrían surgir, además, directamente de un *pool*

de HSCs ya comprometidas hacia linaje megacariocítico, saltándose por tanto el resto de progenitores, creándose así una ruta alternativa para la obtención de MKs (Woolthuis & Park 2016) (**Figura 5**). Por los resultados del trabajo de Notta et al., esto estaría relacionado con el diferente estado de desarrollo del individuo, siendo diferente para fetos y neonatos, que para adultos (Notta et al. 2015).

Durante la diferenciación megacariocítica, los MKs más inmaduros sufren ciclos celulares incompletos repetidamente, en los cuales la mitosis no llega a completarse, deteniéndose en anafase tardía, con fallos tanto en cariocinesis como citocinesis, lo que se conoce como endomitosis (Geddis & Kaushansky 2006). Los MKs pasan primero por una etapa proliferativa, 2N, en la cual la progresión del ciclo celular es idéntica al de cualquier otra célula hematopoyética. Tras esto empiezan a sufrir endomitosis y acumulan DNA, llegando a presentar una ploidía de 128N, en un único núcleo poli-lobulado, andes de proceder a la maduración final y consecuente formación de proplaquetas (Machlus et al. 2014). Se ha descrito que los MKs, que son los únicos tipos celulares que requieren la poliploidización como parte intrínseca de su maduración, son incapaces de acabar la mitosis, presentando fallos en la citocinesis, y por tanto en la consecución de la división celular (Lordier et al. 2008). Sin embargo, un estudio posterior demostró que MKs poliploides son capaces de completar el ciclo celular, dando lugar a células hijas con menor ploidía, pero poliploides. Ello podría explicar la propagación de MKs de baja ploidía (Leysi-Derilou et al. 2010). En cuanto a la presencia de un único núcleo poli-lobulado, Lordier et al., en 2012, describieron que si bien la cariocinesis está afectada en los megacariocitos, dando lugar a células con una única masa nuclear, poli-lobulada, unida entre sí por puentes nucleares citoplasmáticos, esta afectación es mayor cuanto mayor es la ploidía, viéndose así MKs 2N o 4N, que sí dividen los núcleos pero no llegan a realizar una citocinesis completa, dejando como resultado células con múltiples masas nucleares, o células poli-nucleadas (Lordier et al. 2012).

La maduración de los MKs está caracterizada, además, por la formación progresiva de una compleja red de membranas en el citoplasma, denominada originalmente sistema de demarcación de la membrana (DMS). Este nombre fue propuesto inicialmente, cuando el modelo de producción de plaquetas no contemplaba la formación de proplaquetas, y se entendía que éstas eran producidas por división o “demarcación” del citoplasma del MK en pequeños fragmentos que formarían las plaquetas. Sin embargo, actualmente la formación de esta red compleja de membranas se denomina sistema de invaginación de la membrana (IMS) (Radley & Haller 1982). El IMS deriva de la membrana plasmática, mantiene el contacto con el ambiente extracelular y funciona como reservorio de membrana para la formación de proplaquetas (Behnke 1968; Nakao & Angrist 1968; Behnke 1969). Durante la maduración de los MKs, éstos acumulan en su citoplasma gránulos específicos, que son esenciales para la función

de las PLTs y que se incluirán en las proplaquetas mediante movimientos de los microtúbulos (Patel et al. 2005; Richardson et al. 2005). Todos estos cambios citoplasmáticos tienen lugar en el nicho osteoblástico de la médula ósea. Tras su maduración los MKs migran hacia el nicho vascular de la médula, donde producen largas extensiones del citoplasma originadas a partir de un único sitio de la membrana plasmática de los MKs; esas extensiones son inicialmente gruesas, pero luego van alargándose, hasta formar estructuras ramificadas largas y delgadas, que so finalmente las proplaquetas (**Figura 6**). Durante la formación de las proplaquetas, el núcleo poli-lobulado permanece en el MK maduro hasta que el cuerpo celular total del MK se transforma en proplaquetas (Italiano et al. 1999). El paso final de la producción de las PLTs ocurre en el flujo sanguíneo. De las proplaquetas son liberados fragmentos anucleados, más grandes que las PLTs, denominadas pre-plaquetas, que gracias a las fuerzas presentes en el flujo sanguíneo acaban adquiriendo el tamaño y morfología normal de las PLTs (Thon et al. 2010).



**Figura 6. Megacariopoyesis.** Durante la megacariopoyesis las HSCs van formando diferentes progenitores, cada vez con menor pluripotencia, hasta formar los megacariopolastos. Existen rutas alternativas que proponen que los MEPs e incluso los megacarioblastos pueden surgir directamente de HSCs sin pasar por progenitores intermedios. Los megacarioblastos sufren cambios morfológicos que implican el incremento del tamaño, núcleos polilobulados, poliploidia, aparición de gránulos, sistema de invaginación de la membrana y por último formación de proplaquetas, que liberarán las PLTs al torrente sanguíneo. La expresión de CD61 y CD41 son indicadores de diferenciación megacariocítica temprana, mientras que la expresión de CD42 y vWF se asocian con la maduración de los progenitores.

La trombopoyetina (TPO) es la principal reguladora de la megacariopoyesis y trombopoyesis, a través de la unión con su receptor c-Mpl en MKs, induciendo su dimerización y activando una serie de cascadas de señalización intracelulares que incluyen a PI3K-Akt, MAPK, y ERK1/2. A diferencia de otros receptores de citoquinas, c-

Mpl no tiene actividad tirosina quinasa intrínseca por lo que necesita reclutar a otras quinasas citosólicas como JAK-2 a su cola citoplasmática. Esto conlleva a la fosforilación de c-Mpl y recluta a otros factores activadores de la transcripción como los factores STAT3 y STAT5. Otras citoquinas, como IL-3 y IL-6, y especialmente, el SCF actúa sinérgicamente en con la activación por TPO, donde SCF incrementa la señalización de STAT5 en progenitores megacariocíticos activando a JAK2 y quinasa Src (Yu & Cantor 2012).

En cuanto a la caracterización fenotípica de la diferenciación megacariocítica y producción de trombocitos, se ha visto que con la aparición de los progenitores megacariocíticos comienza a expresarse la glicoproteína GPIIb (CD41b), que se asocia con la GPIIIa ( $\beta$ 3, CD61) para formar el receptor del fibrinógeno. La glicoproteína GPIb o CD42 es considerada como un marcador de maduración final de MKs, siendo también detectado en células progenitoras no-megacariocíticas (Yu & Cantor 2012).

### 1.4. Modelos celulares para el estudio de Wiskott-Aldrich

Como se ha comentado previamente, dado que WAS es una enfermedad rara, el acceso a muestras biológicas de paciente, para el estudio de WAS *in vitro*, es muy limitado. Es por ello que nace la necesidad del uso de modelos para el estudio de las implicaciones funcionales de WASP y su fisiología, así como para la realización de ensayos pre-clínicos para testar la eficacia y bioseguridad de diferentes herramientas para su tratamiento.

El desarrollo de modelos de enfermedades es una herramienta esencial para el estudio de las bases moleculares de varias patologías, permitiendo, además, el desarrollo de nuevas terapias. El uso de organismos modelo ha hecho posible la clarificación de los mecanismos celulares que subyacen tras diversas enfermedades humanas. Los animales modelo más ampliamente utilizados con estos fines son los modelos murinos, basándose en diferentes herramientas de ingeniería genética. En lo referente a modelos murinos, tuvo gran impacto el desarrollo de modelos murinos “humanizados”, en los cuales diferentes tipos de células humanas se injertan en el ratón, de modo que funcionan como si dentro del propio cuerpo humano se tratase (Legrand et al. 2006; Shultz et al. 2007; Zhang et al. 2009). Haciendo uso de modelos murinos humanizados, con HSCs humanas, es posible analizar enfermedades hematológicas e inmunológicas *in vivo*. Sin embargo, a pesar de gran potencial de estos modelos, debido a las diferencias fisiológicas entre animales modelo y humanos, hay cuestiones que quedan sin resolver. Un ejemplo de la limitación de los animales modelo, en general, son los modelos murinos de WAS, donde la característica más común y prevalente de la enfermedad, la microtrombocitopenia, no se reproduce por completo, dependiendo mucho del fondo genético, y por tanto de cada

animal por separado (Sabri et al. 2006; Prisolovsky et al. 2008; Marathe et al. 2009). Si a esto sumamos que, como se ha comentado previamente, los ensayos clínicos actuales no logran rescatar la trombocitopenia en los pacientes tratados, nace la necesidad de establecer modelos celulares que permitan: (1) esclarecer la importancia y función de WASP durante la hematopoyesis temprana y la megacariopoyesis y (2) comparar la eficacia y eficiencia de diferentes herramientas para la mejora/desarrollo de nuevas terapias.

#### **1.4.1. Diseño de modelos celulares mediante herramientas de edición génica**

La aparición y mejora de herramientas para editar el genoma ha supuesto una gran ventaja a la hora de desarrollar líneas celulares portadoras de mutaciones concretas, responsables de diferentes enfermedades, haciendo posible la comparación de los fenotipos *wild-type* (WT) y mutado, siendo el cambio presente entre ambos, debido única y exclusivamente a la mutación inducida, puesto que el fondo genético es el mismo. La característica común de estas herramientas se basa en la realización de cortes en ambas hebras del DNA (DSBs), y en el uso de la propia maquinaria celular para la reparación de daño en el DNA, mediante las dos rutas principales, reparación dirigida por homología o mediante unión no homóloga. Dado que la edición de genes inducida por DSB se basa en estos mecanismos de reparación endógenos de cualquier célula, es universalmente aplicable a la mayoría de los tipos celulares y organismos. El elemento crítico es dirigir estos cortes a un *locus* del genoma, específicamente. Actualmente las principales herramientas que se basan en el uso de nucleasas específicas/dirigidas son: (1) las *Zinc Finger Nucleasas* (ZFNs), (2) las TALEN (*transcription activator-like effector*), (3) las meganucleasas y (4) el sistema CRISPR/Cas (Maeder & Gersbach 2016).

Las *Zinc Finger* nucleasas (ZFNs) son nucleasas quiméricas diseñadas hacia una secuencia diana específica en el genoma (Durai et al. 2005). Generalmente, las ZFNs están hechas por dos dominios modulares, el dominio de unión al DNA y el dominio de corte del DNA, que trabajan en conjunto para lograr mutagénesis dirigida (Porteus 2008). La tecnología ZFNs ofrece una herramienta versátil para dirigirse, teóricamente, hacia cualquier sitio del genoma. Como resultado de esta tecnología se pueden lograr modificaciones genéticas incluyendo (1) disrupción génica, mediante inducción de pequeñas deleciones o inserciones en el sitio diana; (2) corrección génica, mediante sustitución discreta de bases de DNA, generada por la adición de un DNA donador y (3) adición génica dirigida: transferencia de transgenes enteros al *locus* endógeno.

#### **1.4.2. Líneas celulares humanas inmortalizadas**

Como se ha mencionado a lo largo de la introducción, una de las características prácticamente universales, tanto en pacientes WAS, como en pacientes XLT, es la

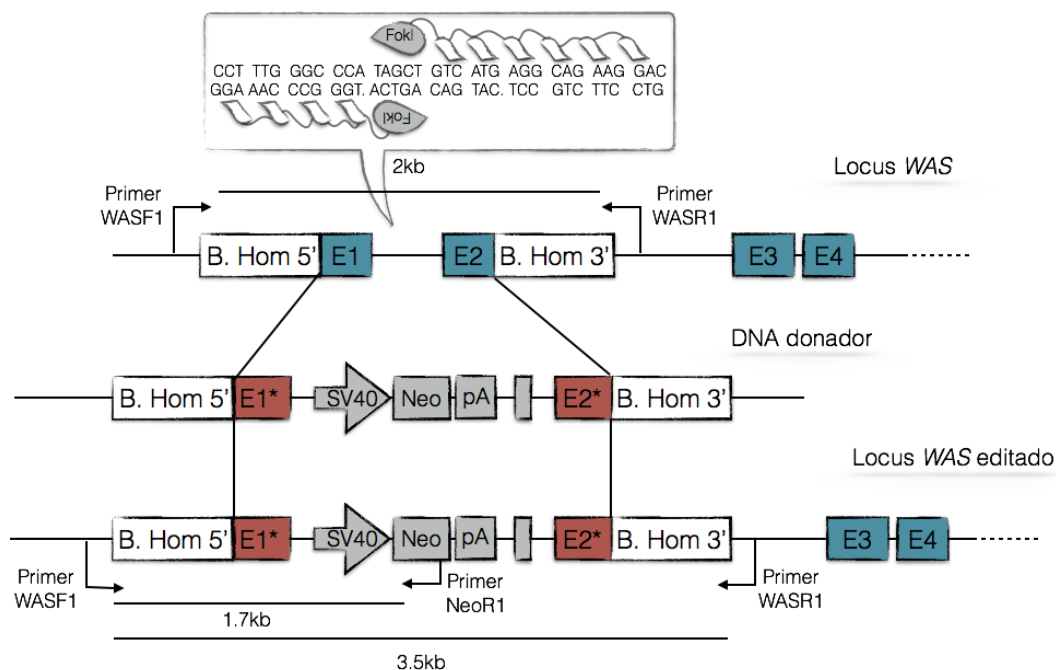


microtrombocitopenia, que además no deja de ser el fenotipo que todavía no ha logrado rescatarse. Esto, sumado a lo recientemente comentado, de la falta de modelos murinos que reproduzcan este fenotipo, crea la necesidad de trabajar con modelos celulares, que sean capaces de reproducir in vitro aquellos procesos que se encuentran afectados en pacientes, como consecuencia de la ausencia de WASP.

### 1.4.2.1. Células K562

La línea celular humana K562 fue establecida en 1975, derivada de una paciente con leucemia mielógena crónica (Lozzio & Lozzio 1975). En 1990, se describió que estas células presentan capacidades eritroides y megacariocíticas, presentando así similitudes con los MEPs (descritos en el apartado 3.1.2. *Hematopoyesis en el adulto*) (Alitalo 1990). La activación de las células K562 con ésteres de forbol, como el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) induce diferenciación megacariocítica, mientras que la hemina o el butirato de sodio inducen diferenciación eritrocítica. Tras la activación con PMA, las células K562 sufren cambios bioquímicos y citológicos similares a los observados durante la diferenciación megacariocítica en la médula ósea. Esos cambios incluyen incremento del tamaño celular, inhibición de la proliferación celular, aparición de gránulos en el citoplasma, endomitosis y expresión de marcadores específicos de superficie como CD41 y CD61, incremento de la capacidad de adhesión y secreción de factores como el factor de crecimiento derivado de PLTs (PDGF) (Whalen et al. 1997; Herrera et al. 1998). La accesibilidad de la comunidad científica a células K562 y la facilidad de cultivo hacen que las células K562 tratadas con PMA se hayan convertido en un importante modelo para el estudio del desarrollo de MKs (Navarro et al. 2009; Chang et al. 2010; Randrianarison-Huetz et al. 2010; Sardina et al. 2010).

En 2013, nuestro grupo desarrolló un modelo celular WASKO en células K562 (K562 WASKO), mediante el uso de ZFNs (**Figura 7**). Las células K562 WASKO mimetizaron varios defectos que ya habían sido descritos en MKs de pacientes con WAS. De hecho, tras la inducción con PMA, la diferenciación megacariocítica mostró alteraciones en la morfología celular y en la reorganización del citoesqueleto. También observaron, en comparación con la línea K562 WT, baja expresión de marcadores específicos de linaje megacariocítico, como CD41 y PDGF, y otros marcadores sobre-expresados, como CD61. Otra de las características que se había observado ya en pacientes fue la baja expresión de CD43 y el incremento, como resultado de ello, de la adhesión celular. Tras la transducción de esas células con VLs, expresando WASP, todas esas alteraciones fueron corregidas, demostrando por tanto que WASP jugaba un papel directo en todas las alteraciones observadas (Toscano et al. 2013).



**Figura 7. Uso de ZFNs para editar el locus WAS.** En el diagrama superior se muestran los primeros 4 exones del locus WAS (E1-E4), las secuencias reconocidas por el par de ZFNs diseñadas (en el cuadrado superior), las secuencias para promover la recombinación homóloga (B.Hom5' y B.Hom3') y las parejas de primers que se usaron para identificar el locus wild-type, que daría lugar a un amplicón de 2kb. El diagrama central muestra el DNA donador. Los E1 y E2 incluyen mutaciones en su secuencia (en rojo), y en el intrón 1 se ha insertado un casete de selección de neomicina, bajo el promotor SV40. En el diagrama inferior se muestra el locus resultante, tras la edición del locus WAS. Las flechas muestran los diferentes amplicones para reconocer los clones modificados por la recombinación homóloga.

#### 1.4.2.2. Células MEG-01

La línea celular MEG-01 fue establecida en 1985, y deriva de un paciente con leucemia megacarioblástica (Ogura et al. 1985). A diferencia de las células K562, éstas están más comprometidas a linaje megacariocítico, expresando en su superficie, sin previo estímulo, niveles discretos de CD41 y CD61, y en su citoplasma CD42. Originalmente, la inducción para la maduración megacariocítica se llevaba a cabo mediante el uso de PMA, al igual que con las K562 (Ogura et al. 1988). Sin embargo, el PMA actúa mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC), que está presente en muchos isoenzimas, que participan no sólo en procesos de diferenciación y expresión génica, sino también en regulación de otras muchas funciones celulares, como la transformación y crecimiento celular, el tráfico de vesículas, así como en procesos de endocitosis y exocitosis (Liu & Heckman 1998). Por ello, los mecanismos por los cuales induce diferenciación sobre células MEG-01 podrían ser bastante inespecíficos.

Recientemente se ha demostrado que el uso de ácido valproico (VPA) induce megacariopoyesis y, además, la liberación de partículas similares a las plaquetas, a partir de células MEG-01 (Schweinfurth et al. 2010). En 2014 se describió que el VPA induce megacariopoyesis a través de la modulación de factores de transcripción hematopoyéticos y microRNAs que favorecen la diferenciación mieloide e inhiben la eritropoyesis (Trécul et al. 2014).

Al igual que las K562, la facilidad del cultivo celular y la accesibilidad científica hacen que la línea celular MEG-01 sea una buena herramienta para el estudio de la megacariopoyesis. Se pueden realizar estudios preliminares con VLS reporteros, para estudiar el comportamiento de los diferentes vectores durante megacariopoyesis.

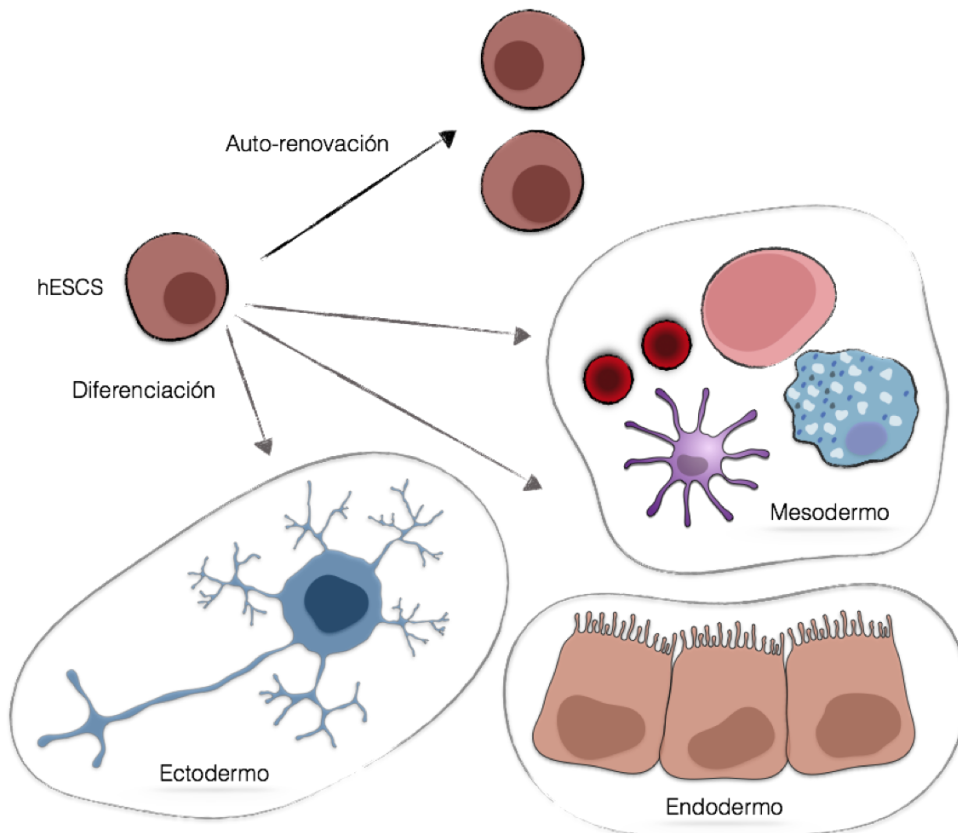
### 1.4.3. Células madre embrionarias humanas (hESCs)

En 1981, Evans, Kaufman y Martin describieron por primera vez el aislamiento y cultivo de células derivadas de la masa interna celular (ICM) de embriones de ratón en estadio de blastocisto, a las cuales denominaron células madre embrionarias de ratón (mESCs) (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981). Sin embargo, no sería hasta casi 20 años después, cuando se obtuvieron por primera vez hESCs, en el laboratorio del Dr. Thomson, a partir de la ICM de blastocistos derivados de fertilización *in vitro* (Thomson et al. 1998).

Las hESCs representaron, por bastante tiempo, la única herramienta para el estudio del desarrollo humano, para terapia celular y para el desarrollo de modelos celulares de enfermedades *in vitro*. Son células con capacidad de auto-renovación y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) (**Figura 8**), proporcionando una fuente ilimitada de células para el estudio del desarrollo humano (Menendez et al. 2006). El desarrollo de células pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) ha permitido la generación de células de tipo hESCs a partir de células adultas, pudiendo generar células de enfermedades relevantes específicas de pacientes de una forma continua (Martín et al. 2016).

El estatus indiferenciado de los cultivos de hESCs está caracterizado en función de su morfología, capacidad proliferativa, inmunofenotipo y pluripotencia. Las hESCs indiferenciadas crecen en colonias compactas, rodeadas de células diferenciadas de soporte o células de tipo fibroblasto, y se caracterizan por alto ratio núcleo/citoplasma. En su superficie expresan marcadores de pluripotencia como Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-3 y SSEA-4 (Andrews et al. 1984). Además, varios factores de transcripción juegan un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia, como Oct-3/4, Nanog y TDGF (Yeom et al. 1996; Mitsui et al. 2003). Sin embargo, el test más definitivo para estudiar el nivel

de pluripotencia se basa en el ensayo de formación de teratomas *in vivo* (Przyborski 2005).



**Figura 8. Propiedades de las hESCs.** Las hESCs son capaces de auto-renovarse y de diferenciarse, dando lugar a células de las tres capas germinales.

#### 1.4.3.1. Diferenciación hematopoyética a partir de hESCs

La diferenciación hematopoyética a partir de hESCs ofrece una herramienta muy importante para el estudio de la hematopoyesis humana temprana. Existen varios métodos para inducir diferenciación hematopoyética, algunos de ellos basados en co-cultivar las hESCs con células de soporte, de modo que se mimetice el microambiente durante el desarrollo hematopoyético en el embrión. Otros métodos implican la formación de aglomeraciones tridimensionales de células, denominadas cuerpos embrioides (EBs, del inglés *Embryoid body*).

En 2001, Kaufman *et al.*, mostraron que el co-cultivo de HSCs con las líneas celulares S17 (derivada de médula ósea de ratón) o C166 (derivadas del endotelio del saco vitelino de ratón) induce diferenciación hacia células sanguíneas. Tras 17 días de co-

cultivo, cerca de un 2% de hESCs se habían diferenciado hacia progenitores hematopoyéticos CD34+. En la cinética de diferenciación observaron que, tras el co-cultivo, aparecieron las primeras células CD34+, que también eran positivas para CD31 (lo cual definiría el estadio de endotelio hemogénico). Posteriormente, las células fueron ganando expresión de CD45+, marcador hematopoyético (Kaufman et al. 2001).

Usando un método similar, las hESCs también han sido co-cultivadas con OP9, que son células estromales de médula ósea de ratón deficientes para el factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) (Ji et al. 2008). Con este método, el rendimiento de diferenciación hematopoyética es mayor que el co-cultivo con S17 o C166, generando alrededor de un 20% de progenitores hematopoyéticos CD34+ tras 7 días de co-cultivo (Vodyanik et al. 2005).

La diferenciación de hESCs mediante el paso de formación de EBs es un método alternativo que se utiliza a menudo para obtener diferentes tipos celulares diferenciados, en medios sin suero y definidos, fácilmente modificables, dependiendo de las citoquinas y/o factores de crecimiento añadidos. Chadwick *et al.* describió que el uso de citoquinas hematopoyéticas SCF, Flt3-ligando (del inglés, *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*), IL-3, IL-6 y G-CSF (del inglés, *granulocyte-colony stimulatory factor*) en combinación con BMP4 (del inglés *bone morphogenetic protein-4*) induce la diferenciación hematopoyética, incrementando de un 20% de progenitores hematopoyéticos CD34+ que co-expresan CD45+, hasta un 90%, tras 22-30 días de cultivo (Chadwick et al. 2003).

Sorprendentemente, la diferenciación hematopoyética a partir de hESCs se asemeja mucho a la hematopoyesis durante el desarrollo del embrión en mamíferos. Como se ha descrito previamente (Apartado 3.1.1 *Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético*). Las primeras HSCs definitivas surgen a partir de una población única de células endoteliales de la pared ventral de la aorta dorsal, que se conoce como endotelio hemogénico. De acuerdo con esto, un interesante trabajo muestra que, tras la inducción con citoquinas, existe una población negativa para CD45, pero positiva para marcadores asociados al endotelio primitivo como PE-CAM-1, VE-Caderina y CD34 (denominados precursores CD45<sup>neg</sup>PFV), que emergen durante el desarrollo embrionario mediante la formación de EBs, a días tempranos (entre día 3 y 10), antes de que las células se comprometan definitivamente hacia linaje hematopoyético. Esa población de precursores CD45<sup>neg</sup>PFV, que representa entre un 2 y un 10% de la celularidad total que forma el EBs, son responsables, exclusivamente, del potencial endotelial-hematopoyético de las células, tras estimulación con citoquinas (Wang et al. 2004; Wang et al. 2005). De hecho, cultivos purificados de estos precursores CD45<sup>neg</sup>PFV, mediante aislamiento celular activado por fluorescencia (FACS, del inglés *Fluorescence activated cell sorting*), han mostrado diferenciarse a células CD45+, con un rendimiento superior al 90%, tras la

estimulación con citoquinas hematopoyéticas. Además co-expresan CD34+ y tienen potencial como unidades formadoras de colonias (CFUs), indicando que tienen función de progenitores hematopoyéticos (Menendez et al. 2004). Por el contrario, cuando estos precursores son cultivados bajo condiciones que favorecen el linaje endotelial, adquieren fenotipo y funciones de endotelio maduro (Wang et al. 2004).

#### **1.4.3.2. Generación de MKs y PLTs a partir de hESCs**

Al igual que se puede inducir hematopoyesis a partir de hESCs, también se pueden obtener MKs y PLTs, derivados de éstas. Sin embargo, la megacariopoyesis *ex vivo* es mucho menos eficiente que el proceso *in vivo*, donde MKs maduros, de hasta 128N, pueden liberar miles de plaquetas. Así pues, la diferenciación de hESCs hacia linaje megacariocítico ha ido evolucionando, así como los protocolos empleados.

En 2006, Gaur *et al.*, describió la obtención de MKs derivados de hESCs mediante un protocolo de co-cultivo con OP9 en presencia de hTPO. Si bien, gracias a este protocolo se logra obtener MK *ex vivo*, falla a la hora de obtener plaquetas (Gaur et al. 2006). Dos años después, el grupo de Takayama, logró la obtención de PLTs *ex vivo*, optimizando el protocolo de Gaur y colaboradores, mediante la generación de pequeños EBs, tras haber cultivado las células previamente en presencia de OP9. Tras la disgregación de estos EBs, en células individuales, y la adición de citoquinas, como TPO, SCF, IL-6 e IL-11, lograron la obtención de MKs y PLTs *in vitro*, en cultivos de hasta 32 días (Takayama et al. 2008). Sin embargo, aunque este es un trabajo pionero, en la obtención de PLTs derivadas de hESCs, tiene un bajo rendimiento de obtención de MKs y utiliza complejas metodologías. Lu *et al.*, en 2011 mejoraron el protocolo y ensayaron la funcionalidad *in vivo*, de las PLTs obtenidas *in vitro* tras transfusión a un ratón vivo. El protocolo descrito por Lu y colaboradores, incluye la obtención de progenitores hemato-endoteliales (que han sido descritos en el apartado anterior) mediante la formación de EBs. Estos progenitores son purificados y cultivados en presencia de TPO, SCF e IL-11, en co-cultivo, con células de soporte, como OP9, o mediante cultivo simple, haciendo uso de medios condicionados definidos. Este estudio fue un gran paso en el desarrollo de PLTs, y el estudio de su funcionalidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, abriendo una puerta al uso clínico de estas PLTs (Lu et al. 2011).

#### **1.4.3.3 Edición génica de hESCs para modelos celulares**

La edición génica de hESCs proporciona una herramienta excelente para el modelaje de enfermedades monogénicas, debido a la posibilidad de obtener líneas isogénicas que difieran únicamente en la presencia de mutaciones deseadas. Esos sistemas permiten establecer la correlación genotipo-fenotipo sin interferencias del

fondo genético, como ocurre cuando se usan células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) directamente de pacientes.

#### 1.4.4. HSCs

Las HSCs son una población muy primitiva, heterogénea y poco común, de células pequeñas que residen en la médula ósea, capaces de dar lugar a todas las células de linaje hematopoyético, como se ha introducido anteriormente.

Para su caracterización fenotípica, el antígeno CD34 es el más utilizado, para identificar tanto HSCs, como progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, se suelen utilizar otros antígenos para definir a una población más primitiva, y por lo tanto, con mayor potencialidad, siendo ésta definida como Lin<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD45RA<sup>-</sup>. Recientemente, se ha descrito la presencia del antígeno de CD133 para caracterizar y aislar con éxito células CD34<sup>-/+</sup> LT-HSCs. Más importante aún, estos hallazgos sugieren que el número de células CD133<sup>+</sup>, en las unidades de sangre de cordón, es un marcador más apropiado para predecir el potencial HSCs de las células trasplantadas, en comparación con el marcador CD34 que se utiliza actualmente (Takahashi et al. 2014).

Las fuentes originales de HSCs CD34<sup>+</sup> originalmente han sido la médula ósea y el cordón umbilical. La disponibilidad de HSCs en el cuerpo humano es escasa, representando menos del 0.1% de todas las células nucleadas de la médula ósea (Pang et al. 2005). Sin embargo, actualmente, las células CD34<sup>+</sup> también pueden aislarse de sangre periférica, por inducción mediante la administración del factor de estimulación de granulocitos (GSF), lo que facilita mucho su obtención.

Aún así, la principal limitación del uso de HSCs, en clínica e investigación, reside en la dificultad para expandir estas células *ex vivo* manteniendo una población homogénea. En cuanto a esto hay estudios que describen que las HSCs CD34<sup>+</sup> derivadas de cordón umbilical tienen mayor capacidad proliferativa, hasta cinco veces más, que las que derivan de sangre periférica y médula ósea (Van Den Oudenrijn et al. 2000). Se ha descrito el papel de varias citoquinas y marcadores de superficie en el mantenimiento de las HSCs *in vitro*. Varias combinaciones de citoquinas tienen efectos diferentes en la inhibición de la apoptosis y estimulación de las HSCs, como Flt3-ligando y c-kit-ligando en sangre periférica movilizada. El *stem cell factor* (SCF) promueve la proliferación y diferenciación de HSCs, la TPO y su receptor, c-Mpl, juegan también un rol importante en la hematopoyesis temprana (Tsuruta 2013). Otras moléculas, como el SR1 (*Stem Regenin 1*) favorecen la expansión *in vitro* de las células CD34<sup>+</sup> (Boitano et al. 2010) así como el derivado de pirimido-indol UM171 (Fares et al. 2014), el cual además conserva la capacidad repobladora de las LT-HSCs de cordón umbilical durante más de 20 semanas.

#### 1.4.4.1 Obtención de MKs y PLTs a partir de HSCs

Como se ha comentado, la megacariopoyesis es un proceso complicado de generación y maduración de MKs a partir de HSCs. La principal función biológica de MKs consiste en la producción de PLTs, las cuales van a desempeñar papeles críticos en la hemostasia y contribuir en la angiogénesis y cicatrización de heridas, así como otros roles inmunológicos, como la liberación de citoquinas.

Inicialmente, las herramientas utilizadas para la generación de PLTs se llevaron a cabo mimetizando la megacariopoyesis *in vitro*. Las primeras PLTs fueron generadas por cultivo de HSCs en presencia de suero canino (Mazur et al. 1990) aunque la TPO había sido identificada dos décadas antes (Kelemen et al. 1958), aunque los intentos por purificarla fueron frustrados. Un estudio posterior presentó evidencias de que las PLTs producidas mediante este sistema funcionaban de manera similar a PLTs humanas aisladas (Choi et al. 1995). Tras eso, y con los avances en la purificación de TPO a partir de suero (Kato et al. 1995) o plasma (Hoffman et al. 1985) o incluso la producción de TPO recombinante han permitido la optimización de la producción de PLTs *in vitro* a partir de HSCs.

Estudios hasta la fecha parecen indicar que la fuente de obtención de las HSCs afecta a la obtención de MKs y PLTs *in vitro*. Las HSCs derivadas de cordón umbilical, aunque como se ha dicho anteriormente, pueden expandirse durante más tiempo *ex vivo*, presentan mayor dificultad para lograr maduración completa, y tras una semana de inducción con TPO, menos del 10% de MKs derivados de HSCs de cordón umbilical presentan poliploidía, sin embargo esta cifra aumenta cuando se diferencian HSCs CD34+ derivadas de sangre periférica, llegando hasta un 20% de poliploidía (Mattia et al. 2002; Van Den Oudenrijn et al. 2000), y un 15% en MKs derivados de HSCs obtenidas de médula ósea (Nurhayati et al. 2016). Se ha descrito que la formación de MKs poliploides está correlacionado directamente con la producción y liberación de PLTs (Tavassoli 1980; Mattia et al. 2002). Por lo tanto, en teoría, las HSCs derivadas de sangre periférica son más prometedoras para producir PLTs *ex vivo*, que las derivadas de médula ósea y de las de cordón.

Debido al bajo rendimiento que conlleva la megacariopoyesis *ex vivo*, se han propuesto varios métodos diferentes, como son la adición de diferentes cócteles de citoquinas (Panuganti et al. 2013; Van Den Oudenrijn et al. 2000), tratamiento químico (Lannutti et al. 2005; Giammona et al. 2006; Avanzi et al. 2012) o estrés oxidativo (Mostafa et al. 2000; Ojima et al. 2013). Esos métodos mejoran la megacariopoyesis *in vitro*, y esto se refleja en la expresión de marcadores de superficie, así como por el aumento de MKs poliploides, representando hasta el 50% de MKs, tras una semana de cultivo.



## *Introducción*

La optimización de los protocolos para la producción de MKs y PLTs a partir de HSCs, y las nuevas fuentes de obtención, como la movilización de HSCs CD34+ a sangre periférica, facilitan su uso en investigación, así como para la realización de ensayos preclínicos, tanto *in vitro*, como *in vivo*, de posibles herramientas terapéuticas, para enfermedades que afecten a células del sistema hematopoyético, como lo es WAS.

**JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO  
E HIPÓTESIS**



## **2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO E HIPÓTESIS**

Como se ha ido exponiendo a lo largo de la introducción, la TG se presenta cada día más como una seria alternativa para el tratamiento del WAS. Los ensayos clínicos actuales de TG en WAS, basados en el uso de VLs, si bien han conseguido reducir la recurrencia de infecciones, las manifestaciones autoinmunes, la incidencia de hemorragia y eczemas, en la mayoría de los pacientes todavía persiste la microtrombocitopenia. A esto cabría añadir que, a diferencia de lo que ocurre con las células linfoides y mieloides, donde las funciones de WASP están bien caracterizadas, la función de esta proteína en hematopoyesis temprana, megacariopoyesis y trombopoyesis no son bien conocidas. Es crucial entender el papel de WASP durante la megacariopoyesis con el fin de desarrollar VLs mejores, que sean capaces de rescatar la trombocitopenia, consiguiendo pacientes con un número de PLTs normales.

La expresión de WAS está regulada por dos promotores diferentes, el promotor proximal y el promotor alternativo (Petrella et al. 1998; Hagemann & Kwan 1999). Sin embargo los VLs utilizados en los ensayos clínicos expresan WAS únicamente a través del promotor proximal. La presencia de sitios de unión para factores de transcripción como c-Myb, Ets-2 y PU.1 en el promotor alternativo sugieren que éste podría tener un papel más relevante en el linaje mielóide, incluyendo MKs y PLTs. En esta dirección, trabajos anteriores de nuestro grupo, demostraron que la presencia del promotor alternativo en VLs-reporteros incrementaba la expresión de eGFP en macrófagos, granulocitos y MKs maduros.

Las células más interesantes para realizar estudios preclínicos de nuevas estrategias para WAS, así como los estudios encaminados a esclarecer la función de WASP son las células HSCs obtenidas de médula de los propios pacientes. Sin embargo, la obtención de estas células es muy complicada debido a la escasez de pacientes no trasplantados, así como a problemas éticos-clínicos. Por otro lado los modelos animales no mimetizan algunos de los principales síntomas como es la microtrombocitopenia. Esto, crea la necesidad del desarrollo de modelos celulares humanos, que puedan tanto arrojar luz sobre las consecuencias de la ausencia de WASP, como servir para el estudio y desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Las herramientas de edición génica permiten generar líneas celulares isogénicas que comparten el mismo fondo genético y que solo se diferencian en la mutación inducida. Esto permite crear modelos celulares donde las diferencias fenotípicas encontradas se deben única y exclusivamente a la mutación introducida mediante edición genómica. Por otro lado, las hESCs son unas células que presentan la posibilidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular. Por lo tanto, la generación de hESCs

conteniendo mutaciones causantes de patología permite estudiar el efecto de dicha mutación, no solo en los diferentes tipos celulares, sino también su efecto en su desarrollo desde las hESCs. En la misma dirección, la edición genética de líneas celulares inmortalizadas que mimeticen determinados aspectos de células primarias presentan otras ventajas diferentes, como son la accesibilidad a la comunidad científica, así como la facilidad de su manipulación y cultivo. Las líneas MEG-01 y K562 mimetizan diferentes aspectos de células del linaje megacariocítico, lo que las hace una herramienta interesante para estudios del WAS.

Por todo lo expuesto nos planteamos las siguientes hipótesis:

1. Los estudios de eficacia terapéutica y bioseguridad de estrategias de TG de WAS han de complementarse con modelos celulares humanos que mimeticen los defectos funcionales de las células de los pacientes.
2. La presencia de ambos promotores endógenos de WAS (proximal y alternativo) en los VLs clínicos, podría mejorar la expresión de WASP en el linaje megacariocítico, restableciendo así los niveles fisiológicos de la proteína en MKs y PLTs.

## **OBJETIVOS**



### 3. OBJETIVOS

Por lo expuesto en la introducción y las hipótesis planteadas, el objetivo principal de esta tesis doctoral es:

**Desarrollar nuevos vectores lentivirales que permitan una expresión más fisiológica de WASP en MKs y PLTs.**

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos secundarios:

1. Establecer un modelo celular WASKO en hESCs, para el estudio de Wiskott-Aldrich.
  - a. Editar el locus *WAS* en hESCs mediante herramientas de edición génica.
  - b. Validar el modelo de hESCs WASKO.
  - c. Rescatar el modelo de hESCs WASKO mediante VL.
2. Desarrollar nuevos VLs para TG de *WAS*.
  - a. VLs reporteros.
  - b. VLs terapéuticos.
3. Analizar si los VLs mimetizan el patrón de expresión de *WAS* en líneas humanas inmortalizadas.
  - a. Analizar la expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica de la línea MEG-01.
  - b. Analizar el comportamiento de WASP ectópica en la línea celular K562\_WASKO.
4. Estudiar el comportamiento de VLs en MKs y PLTs derivados de HSCs.
  - a. Aislar y diferenciar HSCs a MKs y PLTs.
  - b. Analizar el perfil de expresión de WASP, durante la megacariopoyesis.
  - c. Estudiar la expresión de VLs reporteros durante megacariopoyesis y trombopoyesis.
  - d. Comparar el comportamiento de VLs-WAS durante megacariopoyesis y trombopoyesis. Rescate funcional.
    - i. Vectores lentivirales de segunda generación
    - ii. Vectores lentivirales de tercera generación





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Líneas celulares y medios de cultivo

#### **Línea celular HEK-293T.**

(ATCC® CRL-11268™) Línea celular empaquetadora, utilizada para la producción de VLs. Las células HEK-293T fueron cultivadas en medio DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Biowest) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS)(Biowest), a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron pases cada 2-3 días, según su confluencia, usando TrypLE™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) 0.4x, durante 5 min a 37 °C para la disociación celular, tras un lavado previo con PBS.

#### **Línea celular K562.**

(ATCC® CCL-243). Línea celular procedente de leucemia mielógena crónica. Se cultivó en RPMI 1640 (Biowest), suplementado con 10% de (FBS)(Biowest). Los cultivos, en suspensión, se iniciaron con una confluencia de a 1·10<sup>5</sup> células/ml, tal y como recomienda la casa comercial, sin llegar a superar 1·10<sup>6</sup> células/ml. Los cambios de medio se hicieron tres veces por semana, y los subcultivos en un ratio de 1:3 o 1:5.

#### **Línea celular MEG-01.**

(ATCC® CRL-2021) Línea celular procedente de leucemia megacarioblástica, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo se inició con 1-2·10<sup>5</sup> células/ml, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El medio se cambió tres veces por semana y los subcultivos en un ratio de 1:3 ó 1:5, según confluencia.

#### **Cultivo de hESCs.**

La línea celular AND-1 (Cortes et al. 2009) (AND-1; Registro Internacional de Células Madre: Banco Nacional de Células Madre, Granada, España) fue cultivada mediante dos métodos: (1) en frascos T25, con la superficie tratada con Matrigel (BD Biosciences) en medio condicionado por células madre mesenquimales, suplementado con 8 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), obtenido por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía y (2) sobre células madre mesenquimales irradiadas (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía) en medio DM, siendo éste: *Knock out*-DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), con 20% de FBS, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales y 0.2% de β-mercaptoetanol) como se ha descrito previamente (Ramos-Mejía et al. 2012).

### **Aislamiento y cultivo de HSCs.**

Se aislaron HSCs de cordón umbilical y de sangre periférica movilizada, del siguiente modo:

#### Células aisladas a partir de sangre de cordón umbilical:

Las muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvieron, previo consentimiento informado de las pacientes, del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. La sangre se diluyó 1:2 con PBS y se obtuvo la fracción mononuclear a partir de un gradiente de densidad, Ficoll-Paque Plus (StemCell™ Technologies) Se eliminaron los eritrocitos con Quicklysis™ (Cytognos, Salamanca, España) por incubación durante 10 minutos, a temperatura ambiente (RT). La población CD34+ se purificó a través de doble pasaje por columnas magnéticas (AutoMACs, Miltenyi-Biotec), previa incubación con el anticuerpo anti-CD34 unido a esferas magnéticas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Tras cada aislamiento se evaluó el grado de pureza y enriquecimiento, por detección del antígeno CD34 (utilizando un anti-CD34-PE-Cy7 de eBiosciencie) por citometría de flujo, siendo en todos los casos superior al 95%.

#### Células aisladas de sangre periférica movilizada

Las muestras de sangre periférica movilizada se obtuvieron, previo consentimiento informado de los donantes, del Servicio de Hematología del Hospital Reina Sofía (Córdoba). Tras la recepción, la sangre fue centrifugada a 1000rpm a RT, durante 10 minutos, y el *pellet* se resuspendió en medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Media*, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific). Las células se incubaron con anti-CD34 unido a esferas magnéticas (Miltenyi Biotec), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y fueron purificadas por separación magnética (AutoMACS, Miltenyi Biotec) mediante doble pasaje por las columnas magnéticas. Tras cada aislamiento se evaluó el grado de pureza y enriquecimiento por detección del antígeno CD34, como se ha descrito previamente.

Las HSCs CD34+ de pacientes, fueron aisladas de muestras de médula ósea. El aislamiento se llevó a cabo en Londres, en el Institute of Child Health (ICH) del University College of London (Londres, UK).

#### Cultivo y expansión de HSCs

Las HSCs se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando el medio StemSpan SFEM (StemCell™ Technologies) suplementado con citoquinas, para el mantenimiento del estado indiferenciado: IL-6 (20 ng/ml), SCF (100 ng/ml), Flt3-L (100 ng/ml), SR1 (1 µM), TPO (20 ng/ml), UM-729 (0.5 µM). El cambio de medio se hizo dos veces por semana, y

los subcultivo según confluencia, trabajando siempre en concentraciones entre  $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$  células/mililitro.

## 4.2. Producción de vectores y transducción

### Obtención de nuevos vectores lentivirales

El vector lentiviral **WW\_Puro**, expresando WASP bajo un fragmento de 0.5kb del promotor proximal, fue obtenido insertando el cassette pSV40-puro del plásmido pPur dentro del sitio KpnI (New England Biolabs) del plásmido WW (Toscano et al. 2008) usando técnicas estándar de clonaje.

Los vectores lentivirales reporteros **AWE-IS2** y **AWE-HS4-650** se obtuvieron a partir del esqueleto del vector lentiviral AWE (Frecha et al. 2008), insertando los aisladores (SAR2 (Benabdellah et al. 2014) y un fragmento de 650pb del aislador HS4 (Arumugam et al. 2009)) en el LTR 3', mediante técnicas básicas de clonajes.

El vector **cAWW** (Expresión de WASP regulada bajo un fragmento de 0.5kb del promotor proximal y el promotor alternativo completo de 0.6kb) se obtuvo mediante inserción del cDNA de WAS sobre el esqueleto del plásmido cAWE, el cual estaba disponible en el laboratorio. El cDNA de WAS fue escindido del plásmido AWW (Expresión de WASP regulada bajo un fragmento de 0.5kb del promotor proximal y un fragmento de 0.38kb del promotor alternativo) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (New England Biolabs), mediante técnicas estándar de clonaje.

El vector **AW** fue desarrollado por la Dr. Pilar Muñoz, usando el esqueleto del vector lentiviral LV-WW1.6, que cedió Genethon a la misma.

Los plásmidos utilizados para la producción del resto de vectores lentivirales empleados en esta tesis se encontraban ya disponibles en el laboratorio.

### Producción de vectores lentivirales

**Vectores lentivirales de segunda generación:** Fueron producidos mediante un sistema de co-transfección de células HEK 293T con tres plásmidos: 1-Plásmido vector (el requerido para cada ocasión) producidos a gran escala mediante un kit para maxi-producción de plásmidos, libres de endotoxinas (Endo Free Plasmid Maxi Kit; Qiagen); 2-Plásmido de empaquetamiento pCMV $\Delta$ R8.9 y 3-Plásmido de la envuelta pMD.G, en proporción 3:2:1, respectivamente, como se encuentra descrito previamente (Zufferey et al. 1997; Muñoz et al. 2012). Para garantizar un crecimiento exponencial de las células HEK 293T, se tripsinizaron 48 horas antes de la transfección y se plaquearon al día siguiente en placas Petri de 10cm de diámetro, buscando obtener el día de la transfección

un 80-90% de confluencia. Los tres plásmidos con los que se co-transfectaron las HEK 293T se resuspendieron en medio DMEM sin suero y se mezclaron con LipoD293™ (SignaGen® Laboratories). A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes, que contenían las partículas virales y se filtraron. Para concentrar los virus se recurrió a la utilización de filtros concentradores de 100µM (Amicón Ultra, Millipore).

**Vectores lentivirales de tercera generación:** Fueron producidos mediante un sistema de co-transfección de células HEK 293T con cuatro plásmidos, preparados en 2,5ml de medio Optimem por placa: dos plásmidos de empaquetamiento (4xCTE (12µg) y Rev (5µ) (Warlich et al. 2011)), un plásmido de la envuelta (pMD.G2 (1,5µg)) y 5µg del plásmido vector (el requerido para cada ocasión). Se añadieron 0.5µl de PEI 10 mM (Sigma) a 2.5ml de medio Optimem / placa y se filtró. El PEI se mezcló con la mezcla de plásmidos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se cambió el medio de las células 293T por los 5ml de la mezcla PEI-DNA y se incubaron 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación se cambió el medio por DMEM completo. Los virus se recogieron 48 horas post-transfección.

#### Transducción de líneas celulares K562 y MEG-01

Se incubaron 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, con partículas lentivirales, con diferentes multiplicidades de infección (MOI), siempre usando virus sin concentrar, durante 5h. Tras esto, se cambió el medio y se dejaron mínimo 48h, para analizar el título y número de copias integradas.

#### Transducción de hESCs

Para la transducción de hESCs-WASKO, las células fueron incubadas con partículas lentivirales WW\_puro con MOI= 10-20. Las hESCs-WASKO transducidas fueron incubadas en medio con 0.25 µg/ml de puromicina para generar hESCs que expresaran WASP. Dos poblaciones *bulk*, que fueron resistentes a puromicina fueron generadas, en dos experimentos diferentes (AND-1\_WASKO\_WW.1 y AND-1\_WASKO\_WW.2).

#### Transducción de HSCs

Se incubaron de  $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$  células/pocillo, en placas de 48 pocillos, en presencia de partículas lentivirales, con diferentes MOI, durante 5h. A las 5h se les cambió el medio. Se esperó hasta 48h para analizar el número de copias integradas.

#### Titulación de partículas virales

Para titular las partículas virales se emplearon tres métodos. (1) Se realizó una titulación del número de partículas virales de los sobrenadantes recogidos durante la

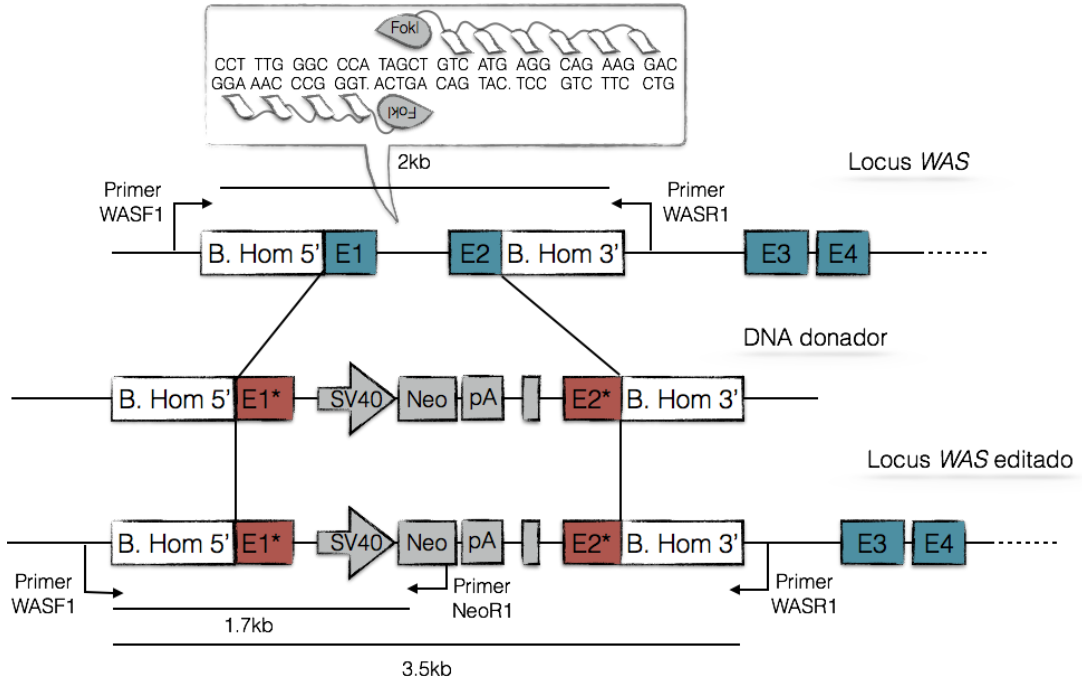
producción, sin concentrar, mediante qPCR, haciendo uso del *qPCR Lentivirus Titration (Titer) Kit* (abm<sup>®</sup>, Canadá) diseñada para reconocer el 5'-UTR del esqueleto lentiviral (con dos controles positivos estándar y un control negativo), siguiendo las recomendaciones del fabricante. (2) Para vectores reporteros, expresando eGFP, se analizó por citometría de flujo el % de células eGFP+; y (3), para todos los vectores, tanto reporteros como terapéuticos, expresando eGFP o WASP, respectivamente, se analizó el número de copias integradas por qPCR. Los vectores reporteros se analizaron con la pareja de *primers* LVbbF (5'-GACGGTACAGGCCAGACAA-3') y LVbbR (5'-TGGTGCAAATGAGTTTTCCA-3'), para detectar el esqueleto del vector lentiviral, con el kit *KAPA SYBR FAST Universal qPCR* (KAPA Biosystems). Las integraciones de los vectores terapéuticos, expresando WASP bajo diferentes promotores, se realizó mediante qPCR también pero con sondas Taqman frente al cDNA de *WAS*, Hs00997437\_m1 (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific), con el *kit KAPA PROBE FAST qPCR* (KAPA Biosystems). En ambos casos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 4.3. Edición génica de hESCs

Los plásmidos codificantes para la pareja de ZFNs dirigidas al locus *WAS* y el plásmido portando el DNA donador (que llevaba un cassette de expresión de resistencia a Neomicina) están previamente descritos (Toscano et al. 2013).

Las hESCs se pre-trataron con 10  $\mu$ M de inhibidor de ROCK (iROCK) (Millipore) durante 1 hora, se levantaron con 1 ml de TrypLE (Invitrogen), que se neutralizó con medio DM, y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución II del *Amaya nucleofector* (Lonza). Los tres plásmidos (dos de las ZFNs y uno del DNA donador), se añadieron a la solución y se aplicó el programa A23. Las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RMPI pre-calentado durante 15 minutos. Tras ese tiempo las células se transfirieron a placas de 10cm, tratadas con matrigel, con medio DM suplementado con iROCK, durante 3-4 días. Durante 15 días se llevó a cabo el proceso de selección, añadiendo, al medio DM, 50  $\mu$ g/ml de G418, refrescando el medio cada 2-3 días. Las colonias editadas se identificaron mediante *screening* visual con el microscopio. Tras permitirles crecer, las colonias AND-1 resistentes a G-418 se picaron y se cultivaron para expansión. Los diferentes clones se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido, y se analizó la edición genómica por PCR usando las combinaciones de primers NeoF1/WASR1 y WASF1/WASR1 (**Figura 10**) Finalmente, para caracterización y análisis, se seleccionaron dos clones (AND-1\_WASKO c1.1 y AND-1\_WASKO c1.2; Registradas en el *International Stem cell registry* y en el Banco Español de Células Madre).





**Figura 9. Uso de ZFNs para editar el locus WAS.** En el diagrama superior se muestran los primeros 4 exones del locus WAS (E1-E4), las secuencias reconocidas por el par de ZFNs diseñadas (en el bocadillo superior), las secuencias para promover la recombinación homóloga (B.Hom5' y B.Hom3') y las parejas de primers que se usaron para identificar el locus wild-type, que daría lugar a un amplicón de 2kb. El diagrama central muestra el DNA donador. Los E1 y E2 incluyen mutaciones en su secuencia, y en el intrón 1 se ha insertado un casete de selección de neomicina, bajo el promotor SV40. En el diagrama inferior se muestra el locus resultante, tras la edición del locus WAS. Las flechas muestran los diferentes amplicones para reconocer los clones modificados por la recombinación homóloga.

#### 4.4. Preparación de DNA y de RNA y PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR)

El DNA genómico se aisló haciendo uso del kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA total se aisló usando TRIzol (Invitrogen), mediante un paso de separación por fases con cloroformo y posterior precipitación con isopropanol, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la preparación del cDNA se utilizó el kit *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), que incorpora un paso de eliminación de DNA genómico, que se pudiese haber arrastrado durante la purificación del RNA. La RTqPCR se llevó a cabo en el Mx3005P *Stratagene thermal cycler* (Agilent Technologies) usando el kit *KAPA SYBR FAST Universal qPCR* para primers diseñados y el kit *KAPA PROBE FAST qPCR* para sondas Taqman (ambos de KAPA Biosystems).

#### 4.5. Diferenciación megacariocítica de las líneas inmortalizadas

##### Diferenciación de la línea K562 hacia células de tipo megacariocito

Se cultivaron 100.000 células/ml, en placas de 6 pocillos, en presencia de 30 nM de PMA durante 96 horas, en el incubador a 37°C sin cambio de medio. El control de la diferenciación se hizo cultivando células en presencia de DMSO (vehículo donde está disuelto el PMA), en las mismas condiciones. Tras las 96 horas se analizaron, por citometría de flujo, los marcadores megacariocíticos CD41 y CD42.

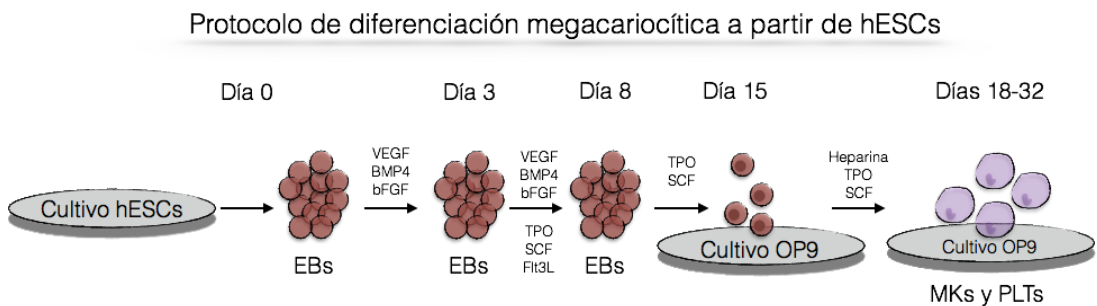
##### Diferenciación megacariocítica de la línea MEG-01

Se cultivaron 100.000 células/ml, en placas de 6 pocillos, en presencia de 2mM de VPA (Sigma-Aldrich) durante 21 días. Cada dos días se cambió el medio, por medio nuevo, con VPA fresco. Los días de análisis, las células se despegaron con TrypLE™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific), durante 5 minutos a 37°C. Se analizó la presencia de marcadores megacariocíticos a día 0, 7, 14 y 21.

#### 4.6. Diferenciación megacariocítica de hESCs

Se usó un protocolo adaptado a partir del protocolo de Lu *et al.* (Lu *et al.* 2011), como se muestra en la **Figura 10**. Partimos de un frasco T25 confluyente de hESCs, que fue tratado con colagenasa IV, levantadas con rasqueta, e incubadas en medio DM en placas de baja adhesión, para formar los EBs (día 0). 24 horas después, se complementó el medio DM con el cóctel de citoquinas 1 (CC1: BMP4 (50ng/ml), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, 50 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml) durante 2 días (hasta día 3). Desde día 3 hasta día 8, se añadió el cóctel de citoquinas 2 (CC2: SCF, TPO y FLT3-ligando (20ng/ml cada una) al CC1. Finalmente, desde día 8 hasta día 15, el medio de EBs se completó sólo con el cóctel de citoquinas 3 (CC3: TPO (350 ng/ml) y 20 ng/ml de SCF) (todas las citoquinas de PeproTech-Londres, UK). A día 10 de la diferenciación, mediante la formación de EBs, se sembraron  $3 \cdot 10^4$  células OP9/pocillo, en placas de 6 pocillos tratadas con 0.1% de gelatina, para formar el estroma. A día 15, los EBs fueron disociados con 1ml de colagenasa B (Roche) diluida 1:10 en medio de EBs y se centrifugaron a 1100 rpm, durante 2 minutos. Las muestras fueron incubadas con 1 ml de *buffer* de disociación (Gibco®, Thermo Fisher Scientific), sin pipetear, durante 10 minutos a 37°C, lavadas con PBS, y centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos, y resuspendidas en 1ml de medio de diferenciación de OP9 (medio basal  $\alpha$ -mem ( *$\alpha$  minimun essential médium*) 10% FBS, 100 $\mu$ M de monioglicerol y 50 $\mu$ g/ml de ácido ascórbico) suplementado con TPO (100 ng/ml), SCF (50ng/ml) y heparina (25U/ml), muy cuidadosamente, hasta no ver grumos. Las células fueron luego añadidas en el estroma de OP9 y mantenidas en este medio durante el resto del protocolo de diferenciación (otros 10-15 días).

Para evaluar la diferenciación megacariocítica, a día 15, los EBs de un pocillo de una placa de seis pocillos se disociaron. Los progenitores megacariocíticos se analizaron en 1/5 de la muestra total y el resto se plaqueó sobre las OP9, tal y como se ha descrito arriba. Para analizar los progenitores las células fueron teñidas con 7AAD, anti-CD34-PECy7 (eBiosciences) y anti-CD41-PE (eBiosciences). Posteriormente, en los días indicados del protocolo de diferenciación, se retiró la mitad de la muestra, para analizar MKs y PLTs emergentes, y se añadió medio fresco, al resto. Los marcadores para analizar MKs y PLTs fueron: marcador de viabilidad, 7AAD; anti-CD41-PE (eBiosciences) y anti-CD42-APC (eBiosciences).



**Figura 10. Protocolo de diferenciación megacariocítica a partir de hESCs mediante formación de EBs.** Este protocolo está basado en el protocolo de Lu *et al.* y se divide en dos estados: estado de diferenciación mediante la formación de EBs (desde día 0 hasta día 15) en presencia de citoquinas humanas y estado de diferenciación mediante co-cultivo con OP9 (desde día 15 hasta 32) donde las células de los EBs disociadas se co-cultivan sobre las células estromales OP9 en presencia de heparina, TPO humana y SCF humano.

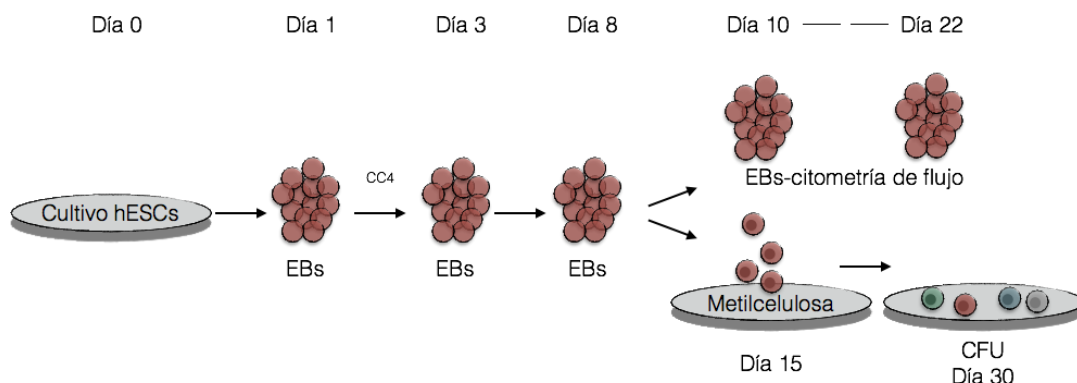
## 4.7. Diferenciación hematopoyética a partir de hESCs

### Diferenciación hematopoyética mediante la formación de EBs

Se trató el cultivo de hESCs, cerca del 100% de confluencia (Día 0), con colagenasa IV, durante 1 minuto, se levantaron con rasqueta, se transfirieron a placas de baja adhesión (Corning Life Sciences) y se incubaron durante la noche en medio DM. El día siguiente, los EBs se centrifugaron y se resuspendieron en medio DM suplementado con el cóctel de citoquinas 4 (CC4): BMP-4 (25 ng/ml), Flt3-L (300 ng/ml), SCF (300 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) y G-CSF (50 ng/ml) con cambios de medio cada 4 días. Los EBs se disociaron con 1ml de colagenasa B (Roche) diluida 1:10 en medio de EBs y se centrifugaron a 1100 rpm, durante 2 minutos, luego las muestras fueron incubadas con 1 ml de *buffer* de disociación (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) para análisis de citometría y ensayos de formación de colonias (CFUs) (**Figura 11**). Para evaluar la diferenciación hematopoyética, las células disociadas se tiñeron con 7AAD (Life technologies), anti

CD31-PE humano, anti CD34-PE-Cy7 humano y anti CD45-APC humano (todos de eBiosciences).

#### Protocolo de diferenciación hematopoyética a partir de hESCs



**Figura 11. Protocolo de diferenciación hematopoyética a partir de hESCs.** Esquema del protocolo usado para la diferenciación hematopoyética mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs). CC4: coctel de citoquinas 4; (BMP-4 (25 ng/ml), Flt-3L (300 ng/ml), SCF (300 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), and G-CSF (50 ng/ml)). CFU, unidades formadoras de colonias.

#### Diferenciación hematopoyética mediante co-cultivo con OP9

La diferenciación hematopoyética se indujo transfiriendo las células hESCs sobre estromas de OP9, al menos durante 15 días. Para evaluar la diferenciación hematopoyética a diferentes días, las células se trataron con colagenasa IV durante 1 hora, 10 minutos con TrypLE™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific), y se resuspendieron para proceder a la tinción para citometría. Las células se tiñeron con anti CD29-FITC ratón (AbD Serotec), anti CD31-PE humano, anti CD34-PECy7 humano y anti CD45-APC humano (todos de eBioscience).

#### 4.8. Diferenciación megacariocítica a partir de HSCs

En placas de 24 pocillos, se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen final de 1 ml de medio de StemSpan SFEM (StemCell™ Technologies) suplementado con TPO (50 ng/ml) y SCF (5ng/ml), preparado fresco en el momento de uso, y añadido en los días 0, 4, 8, 11 y 16. La confluencia de las células siempre se mantuvo por debajo de  $1 \cdot 10^6$  células/ml, que se contó cada día de análisis. A partir de día 8 de diferenciación, se añadió, al medio anterior inhibidor de la quinasa ROCK (iROCK) a una concentración final de  $10 \mu\text{M}$ , que promueve la endomitosis. Los días de análisis, las células se recogieron y centrifugaron a 900g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Para evaluar la

diferenciación se tiñeron las células con anti CD34-PECy7 humano, anti CD41-PE humano y anti CD42-APC humano (todos de eBioscience) y se analizaron por citometría.

#### **4.9. Aislamiento de PLTs de sangre periférica**

Las PLTs de sangre periférica se aislaron a partir de sangre de pacientes con WAS y de donantes sanos. Tanto donantes sanos como el paciente WAS (L101P en el exón 3) firmaron el consentimiento informado y el uso de las muestras para investigación fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla). Para la extracción de las PLTs, 5 ml de sangre se diluyeron 1:2 en PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 20 minutos, a temperatura ambiente, sin freno ni aceleración. Se recogió el sobrenadante, que contenía las PLTs, y éstas se contaron.

#### **4.10. Ensayo de formación de colonias**

Para el ensayo de CFUs se filtraron 20.000-35.000 células a través de filtros de 40- $\mu\text{m}$  (BD Biosciences) y directamente se sembraron en metilcelulosa H4034 (StemCell™ Technologies). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en atmósfera humidificada. Las colonias se contaron en base a sus características morfológicas después de 10-14 días.

#### **4.11. Ensayo de activación: Unión de PAC-1**

Se recogieron los MKs y las PLTs del sobrenadante en cultivos derivados de hESCs, y parte del cultivo completo en aquellos derivados de HSCs, y se centrifugaron a 900g durante 5 minutos, se lavaron con Tyrode's *buffer* (TB) con calcio y magnesio (150mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% glucosa, 0.1% BSA, 5mM HEPES, 1mM CaCl<sub>2</sub> y 1mM MgCl<sub>2</sub>) y se resuspendieron en el mismo *buffer*. Las células se activaron con trombina (2 unidades/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron con los anticuerpos anti CD42-APC y PAC-1-FITC (ambos de eBiosciences) y se incubaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular se lavó luego con TB y se fijaron con 0.25% de paraformaldehído (PFA) en TB.

#### **4.12. Ensayo de activación: Flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

##### *Células hematopoyéticas CD34+CD45+derivadas de hESCs*

A día 5 (protocolo de diferenciación mediante EBs) o día 8 (protocolo de cocultivo con OP9) de diferenciación, se recogieron las células y se centrifugaron a 400g durante 7 minutos. La suspensión celular se tiñó con el anticuerpo anti-CD34-PECy7 (eBioscience) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con TB. Tras esto, las células se diluyeron en TB con *dye* para marcar calcio eFluor 514 (eBioscience) a una

concentración final de 5 $\mu$ M. Las células se incubaron 40 minutos a 37 $^{\circ}$ C, para que el *dye* se uniera a todo el Ca<sup>2+</sup> presente, para establecer el fondo, luego se lavaron y resuspendieron en TB sin el *dye*. Las células luego se analizaron por citometría de flujo, con adquisición durante 30 minutos, para medir el fondo (T=0). La adquisición se detuvo, se añadió SCF (100 ng/ml) e inmediatamente se retomó la adquisición durante 4-6 minutos.

#### MKs y PLTs

En los días requeridos de la diferenciación, se recogieron los MKs y PLTs, por centrifugación a 900g durante 7 minutos, y se tiñeron con anti CD42b-APC durante 30 minutos a temperatura ambiente. El resto del protocolo es el mismo, salvo que se utilizaron 2 unidades/ml de trombina como estímulo.

### **4.13. Citometría de flujo**

Para evaluar la aparición de progenitores megacariocíticos y la diferenciación megacariocítica se analizó la presencia de antígenos de superficie. A partir de los cultivos derivados de hESCs, a día 15, se cogieron 200  $\mu$ l de los EBs disociados, que iban a sembrarse sobre el estroma de OP9, se resuspendieron en PBS con 2% FCS y 2mM de EDTA (FACS *buffer*) con anticuerpos de ratón anti CD41 $\alpha$ -PE humano (eBiosciences) con una dilución 1/100 y anti CD42b-APC humano (Biolegend) con una dilución 1/50, durante 30 min a temperatura ambiente, y se analizó usando el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

También se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de MKs y PLTs presentes a lo largo de la diferenciación en el cultivo: sobre el estroma de OP9, a días 21, 22, 24 y 25, a partir de cultivos de hESCs; a días 4, 8, 11 y 16 a partir de cultivos de HSCs; a día inicial y final en diferenciaciones de la línea celular K562 y a días 0, 7, 14 y 21, a partir de cultivos de células MEG-01. Para ello se recogieron los MKs y PLTs, se bajaron las células a 900g durante 5 minutos y se tiñeron como se ha descrito previamente, estudiando también, en algunos casos, la presencia de CD61 y CD43 sobre la superficie de las células, tiñendo con anticuerpos de ratón anti-CD61(Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), junto con un anticuerpo secundario marcado con FITC y anti-CD43-APC (eBiosciences, San Diego, CA) humanos, de modo que se estudiaron poblaciones CD61/CD42, CD41/CD42 y CD43/CD41.

Para evaluar la diferenciación hematopoyética se siguió el mismo protocolo que en la diferenciación megacariocítica, pero los marcadores de superficie analizados fueron CD31, CD34 y CD45. Por lo que se tiñeron las células, una vez disociados los EBs, como se

ha comentado previamente, con anticuerpos anti-CD31PE, anti-CD34PE-Cy7 y anti-CD45-APC (todos de eBiosciences).

En ambas diferenciaciones, para identificar las células vivas se utilizó el marcador de viabilidad 7-AAD (eBiosciences).

#### Tinción intracelular de WASP

Para evaluar el perfil de expresión de WASP, durante la diferenciación megacariocítica, las células fueron teñidas, primero, para los marcadores superficiales, durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente, con diferentes combinaciones de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD34-PE-Cy7 (eBioscience), anti-CD41a-PE (eBioscience), anti-CD42b-APC (eBioscience). Tras esto, se lavaron con *FACS Buffer*, a 900 g durante 5 min, a temperatura ambiente. Una vez teñidas extracelularmente, se fijaron con 2% de PFA, en PBS, durante 20 min, también a temperatura ambiente. Se lavaron, con PBS y se permeabilizaron por incubación durante 10 minutos con el *Perm/Wash buffer* (PBS 1x con 3% de BSA y 0.2% de saponina). Tras el lavado, posterior a la incubación, se bloquearon los receptores Fc (*FcR Blocking*, Milteny), incubando las muestras 15 minutos, en hielo. Tras esto, se procedió a teñir con el anticuerpo primario anti-WASP hecho en conejo (Abcam), y control de Isotipo también (Abcam), en presencia de suero de cabra, para mejorar el bloqueo de los receptores Fc. Las muestras se incubaron durante 1 hora, en hielo. Tanto el anticuerpo como el control de Isotipo se utilizaron a una dilución final 1:100 en *Perm/Wash buffer* con 5% de suero normal de cabra. De nuevo se lavaron las muestras y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC (eBioscience), con una dilución final 1:1000 en *Perm/Wash buffer*, durante 30 minutos, en hielo. Las suspensiones celulares se lavaron con PBS 1x, a 900g durante 5 minutos, y se resuspendieron en 200 µl de PBS, para ser adquiridas en el citómetro.

Se utilizaron controles de tinciones simples de cada fluorocromo para el ajuste de los voltajes y compensaciones. Para determinar la viabilidad celular, se usó el colorante vital 7ADD, añadido justo antes de la adquisición.

#### **4.14. Inmunofluorescencia para microscopía confocal**

##### Ensayo de adhesión a fibrinógeno

Los MKs y PLTs derivados de hESCs, se recogieron, se centrifugaron a 900g durante 5 minutos y se resuspendieron en TB. Las células fueron sembradas en porta-objetos con pocillos de cultivo, que bien habían sido pre-tratados con fibrinógeno (1 mg/ml, diluido posteriormente 1:10 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, o porta-objetos sin tratar. Una vez se añadieron las células, éstas se

activaron con 2 unidades/ml de trombina, durante 2h a 37°C. Tras esto, se lavaron, se fijaron con 2% de PFA en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con PBS. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, y permeabilizar las células, éstas se incubaron con PBS con 2% de suero de cabra y 0.05% de Triton-100x (*Blocking Buffer*), incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos (anti CD61 y anti Vinculina) se prepararon en el *blocking buffer* en una dilución 1:50 y se añadió a las células, que se incubaron durante 1 hora a 4°C. Los pocillos se lavaron con PBS con 0.05% de Triton-100x de 3-4 veces, se añadió el anticuerpo secundario (1:100) y la rodamina-faloidina para la tinción de la actina (1:400) en el *blocking buffer* y se incubaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras esto se lavaron con PBS con 0.05% de Triton-100x y una última vez con PBS y se montaron los porta-objetos, añadiendo el DAPI en el medio de montaje.

#### Ensayo de formación de nódulos de actina

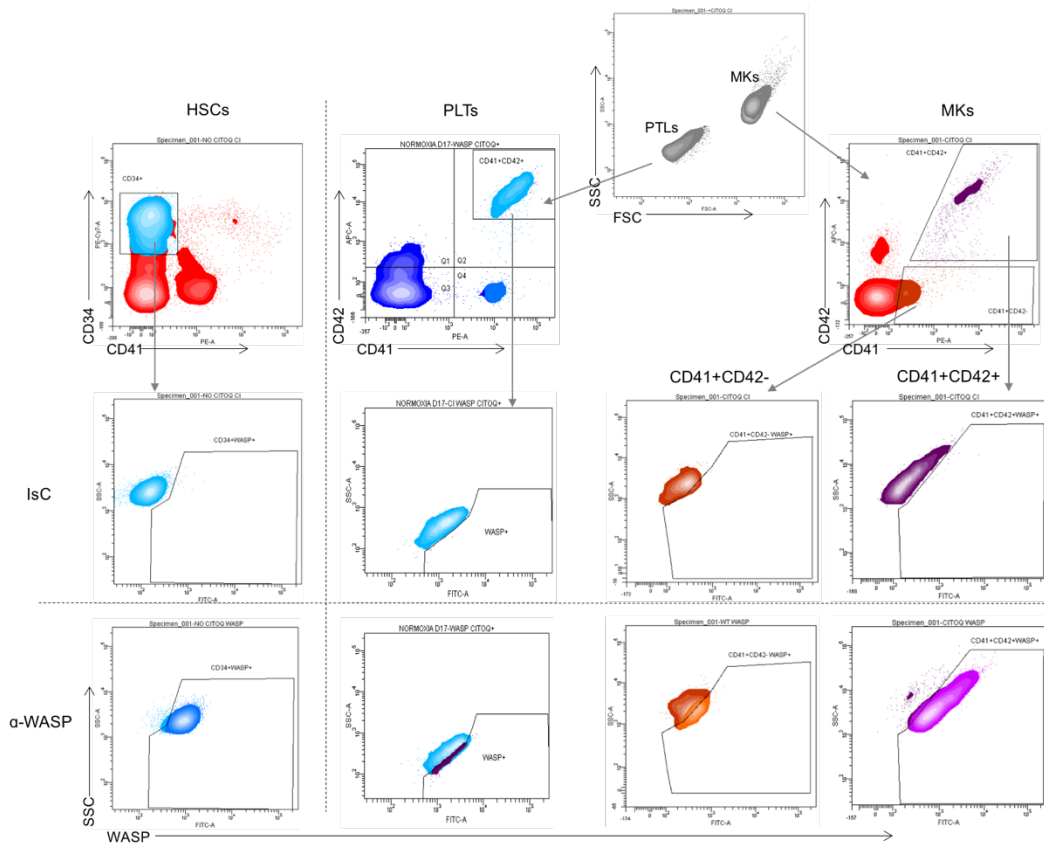
Los MKs y PLTs derivados de HSCs y las PLTs de sangre periférica, se recogieron y se lavaron en TB con presencia de prostaciclina I<sub>2</sub>, para inhibir su activación y aglomeración. Las células se sembraron en porta-objetos con pocillos, pre-tratados con fibrinógeno, como se ha descrito previamente, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C, sin estímulo ninguno. Tras esto, las células se fijaron durante 10 minutos con 10% de formalina. Las muestras fijadas se lavaron 3 veces con PBS y también entre los diferentes pasos del protocolo. Las células se trataron con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl durante 10 minutos, para eliminar la auto-fluorescencia derivada de la formalina, se permeabilizaron con 0.1% de Triton-100x en PBS durante 10 minutos y luego se tiñeron con los anticuerpos requeridos y faloidina.

### 4.15 Análisis

#### Análisis de expresión de WASP mediante citometría de flujo

Los datos de citometría fueron analizados usando el programa BD FACs Diva (Beckton Dickison). Se seleccionaron las diferentes poblaciones en base a CD34, CD41 y CD42, eliminando del análisis la población celular CD34+CD41-CD42+, por ser artefactos y/o posibles células contaminantes como células endoteliales (CD34+CD41-CD42+CD31+) las cuales no expresan WASP, enmascarando nuestros resultados. Los niveles de expresión se estudiaron analizando la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI). El análisis en las diferentes poblaciones se llevó a cabo tal cual se muestra en la **Figura 12**.





**Figura 12. Análisis de los niveles de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica.** Dot-plots ilustrando la estrategia de análisis de WASP en las diferentes poblaciones. MKs y Plts son seleccionados en base a su tamaño y granularidad (plot central superior). Para el análisis de las HSCs, la población CD34+CD41-CD42- se seleccionó y se analizó la expresión de WASP ( $\alpha$ -WASP) comparado con su Isotipo Control (IsC) (plots de la izquierda). Para el análisis de las diferentes poblaciones nucleadas que aparecen durante el proceso de diferenciación, se utilizó una región que abarcaba poblaciones grandes y granulosas y posteriormente, se seleccionaron diferentes regiones en base a la expresión de CD41 y CD42. La expresión de WASP ( $\alpha$ -WASP) se analizó comparándola con su Control de Isotipo (IsC) (plots de la derecha, en naranja y morado). Para analizar la expresión en PLTs se seleccionó la población pequeña y poco granulosa, CD41+CD42+ y se comparó la expresión de WASP con su control de isotipo (plots centrales, en azul).

Análisis de datos y estadística

Para el tratamiento de datos, se utilizó el software GraphPad 1.6, calculando la media, SEM y la prueba estadística T-Student para datos no pareados, dos colas, asumiendo una significación \* cuando  $P < 0.05$ ; \*\*,  $< 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ .

## **RESULTADOS**



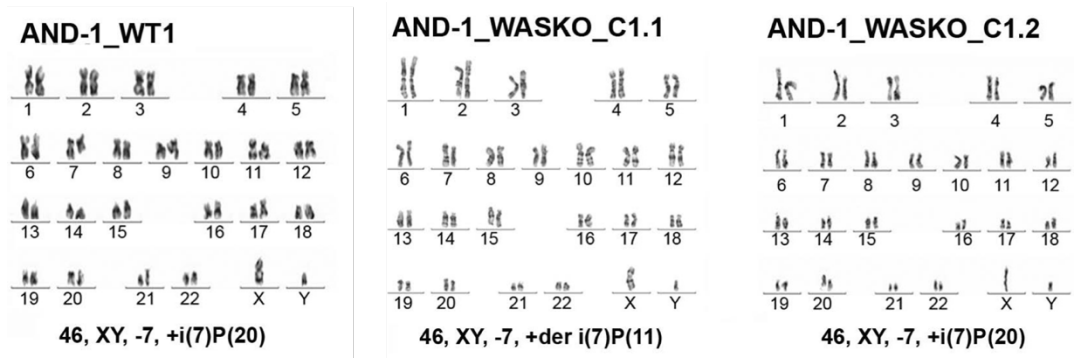
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Objetivo1: Establecer un modelo celular WASKO en hESCs, para el estudio de Wiskott-Aldrich.

#### 5.1.1. Editar el locus *WAS* en hESCs mediante herramientas de edición génica

##### Generación de hESCs WASKO por recombinación homóloga, usando ZFNs.

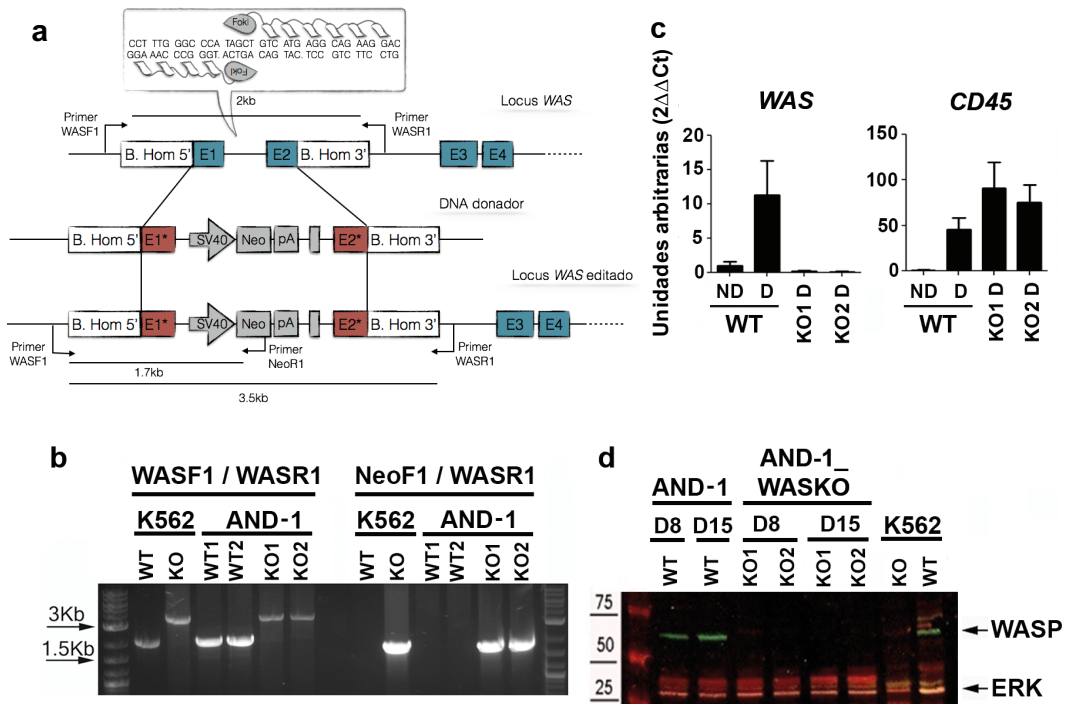
Las hESCs AND-1\_WT1 se nucleofectaron con plásmidos que codificaban ZFNs dirigidas frente al intrón 1 de *WAS* (Figura 14a, arriba) y el DNA donador (Figura 14a, centro). La modificación del locus *WAS*, dirigido por recombinación homóloga se evaluó por PCR. La Figura 14b muestra los análisis por PCR de dos clones AND-1\_WASKO\_c1.1 (KO1) y AND-1\_WASKO\_c1.2 (KO2) (Depositadas en el Registro Internación de Células Madre y en el Banco Español de células madre) usando los *primers* descritos en la Figura 1a. El gel muestra las bandas esperadas tras haber ocurrido recombinación homóloga con el DNA donador (Figura 14b). Ambos clones, AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2 mantuvieron el mismo fenotipo y pluripotencia que la línea original AND-1\_WT1, y que la línea AND-1\_WT2 (clon obtenido a partir de la línea AND-1\_WT1, explicado con detalles en “Material y métodos”). El cariotipo de ambas líneas celulares WASKO fue idéntico al de la línea original AND-1\_WT1 (Figura 13).



**Figura 13. Cariotipo de las hESCs usadas.** La línea de hESCs usada para obtener las líneas hESCs WASKO fueron AND-1\_WT (Cortes et al. 2009) (AND-1; Banco Español de células madre. [www.isciii.es](http://www.isciii.es)). La línea AND-1\_WT2 se obtuvo mediante dilución de AND-1\_WT1 y cultivo de una colonia individual, sin más manipulaciones. Las líneas AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2 se generaron como se ha descrito en Material y Métodos. Se realizó un análisis representativo de bandas G de dispersiones de 20-30 metafases por línea hESC en el Biobanco de Andalucía. El resultado del estudio mostró que no había alteraciones adicionales en comparación con la línea original AND-1\_WT, de pase 10. Esta línea hESC presenta un cariotipo anormal con pérdida en el cromosoma 7 y la ganancia de un isocromosoma correspondiendo al brazo p de este cromosoma.

## Resultados

Tras la edición del locus *WAS*, células hematopoyéticas derivadas de hESCs AND-1\_WASKO mostraron ausencia de expresión de WASP. De hecho, mientras que en AND1 WT la expresión de WASP fue claramente detectada tras diferenciación hematopoyética, tanto en mRNA (Figura 14c, gráfico de la izquierda) como en proteína (Figura 14d; AND-1, D8 y D15, carriles WT), en las células AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2 no se detectó ni mRNA de *WAS* (Figura 14c, gráfico de la izquierda) ni proteína WASP (Figura 14d; AND-1\_WASKO, D8 y D15; carriles KO1 y KO2). Como era de esperar, las hESCs AND-1\_WT indiferenciadas no expresaron WASP (Figura 14c, gráfico de la izquierda).



**Figura 14. Generación de líneas celulares hESCs WASKO utilizando ZFNs.**(a) *Esquema explicativo de la estrategia seguida para mutar el gen WAS.* El diagrama superior ilustra los primeros cinco exones del locus *WAS* (E1-E5), las secuencias reconocidas por la pareja de ZFNs (ZFN izquierda y derecha, representadas en la caja gris), las secuencias de homología usadas para promover la recombinación homóloga (B.Hom5' y B.Hom3') y la pareja de *primers* usada para identificar el locus *wild-type* (sano) (que comprende un fragmento de 2kb). El diagrama central muestra el DNA donador, usado para bloquear la expresión de *WAS*. El exón 1 incluye una delección en el codón ATG para bloquear la traducción (E1\*). El exón 2 incluye mutaciones en el sitio de *aceptor de splicing* (E2\*). Se ha introducido un casete de expresión neo (SV40-neo-pA) para permitir la selección por resistencia a antibiótico. El diagrama inferior muestra el locus *WAS* "editado" tras la recombinación homóloga con el DNA donador. Las flechas indican los *primers* usados para identificar los clones modificados por recombinación homóloga dirigida (HDR). (b) *Edición génica de células AND-1\_WT.* Las células k562 *wild type* (WT) y k562 WASKO (KO) se usaron como controles negativo y positivo de la edición génica, respectivamente. Los geles de agarosa muestran los análisis para detectar la HDR en dos clones

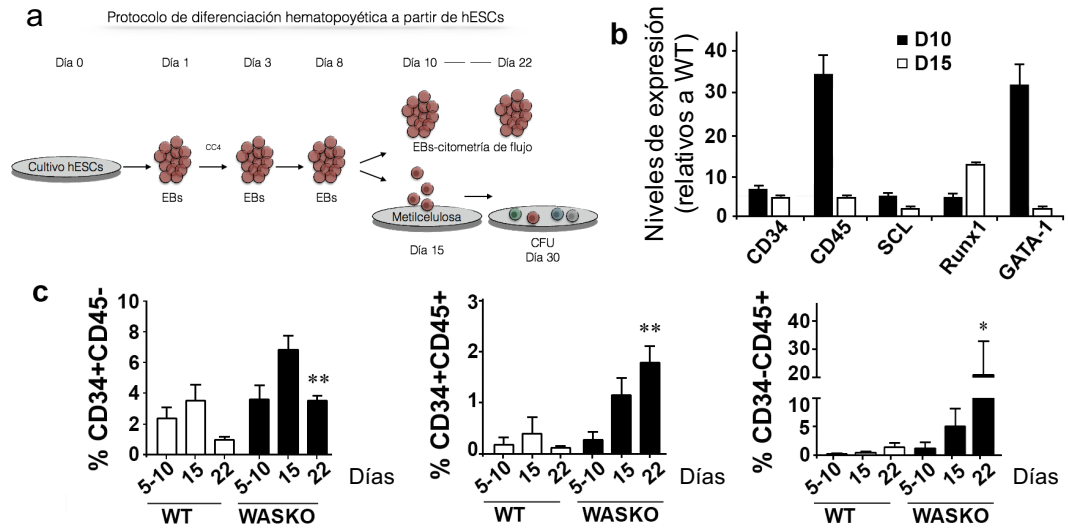
resistentes al antibiótico G418 de la línea celular AND-1\_WT. La banda de 3,5kb, presente tanto en los clones resistentes a G418, así como en las células K562 WASKO controles indica que ha ocurrido HDR con éxito. También la presencia de la banda de 1,9kb en las células AND-1\_WASKO y en el control positivo indica que la HDR ocurrió en la dirección correcta. (c) **La expresión de WAS es indetectable en células AND-1\_WASKO diferenciadas al linaje hematopoyético.** Se analizó la expresión de WAS y de CD45, por RT-qPCR, en células AND-1\_WT (WT) y clones AND-1\_WASKO (KO1 y KO2) antes (ND) y después (D) de 15 días de diferenciación hematopoyética. La expresión de CD45 indica la diferenciación hematopoyética. Como era de esperar, no se detectó expresión de WAS en los clones AND-1\_WASKO. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  el error estándar de la media. (d) **Ausencia de la proteína WASP en células hematopoyéticas derivadas de células AND-1\_WASKO.** Western blot realizado con extractos de proteína de células AND-1\_WT y AND-1\_WASKO, obtenidos a días 8 (D8) y 15 (D15) de la diferenciación hematopoyética. Se usaron anticuerpos D1 (específico para WASP) y ERK (como control de carga). La proteína WASP no se detectó en ninguno de los clones AND-1\_WASKO. Se usaron células K562 WT (WT) y k562 WASKO (KO) como controles, positivo y negativo, de la expresión de WASP.

### 5.1.2. Validar el modelo de hESCs WASKO

#### Las hESCs WASKO generan mayor número de progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> maduras.

Primero estudiamos la capacidad de las hESCs WASKO para generar células hematopoyéticas. Las diferentes líneas de hESCs se diferenciaron usando el sistema de formación de EBs (**Figura 15a**), como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. El mRNA se aisló a días 10 y 15 de la diferenciación y los niveles de expresión de varios genes relacionados con hematopoyesis se analizaron por RT-qPCR (**Figura 15b**). Comparado con AND-1\_WT, las células AND-1\_WASKO mostraron incremento en la expresión de factores de transcripción hematopoyéticos, como SCL, RUNX1 y GATA-1 a días 10 y 15 de la diferenciación hematopoyética. También observamos un incremento en la expresión de CD34 y CD45, indicando un posible aumento de la diferenciación hematopoyética. Con el fin de dilucidar mejor este aspecto, medimos los porcentajes de progenitores hemato-endoteliales (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>), células progenitoras hematopoyéticas (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) y células hematopoyéticas maduras (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), a diferentes días durante la diferenciación hematopoyética, mediante la formación de EBs (**Figura 15c**). Curiosamente, las células AND-1\_WASKO mostraron un incremento en todas esas poblaciones, siendo significativo a día 22. Estos resultados, además, coincidieron con los obtenidos mediante diferenciación hematopoyética por co-cultivo con células OP9. Esos datos indican que la ausencia de WASP altera la diferenciación hematopoyética, generando mayor número de células progenitoras y células CD45<sup>+</sup> maduras. Aunque controvertido, estos datos están en línea con la observación en ratones WASKO, que tienen mayor número de progenitores y granulocitos en sangre periférica y bazo (Charrier et al. 2013).

## Resultados

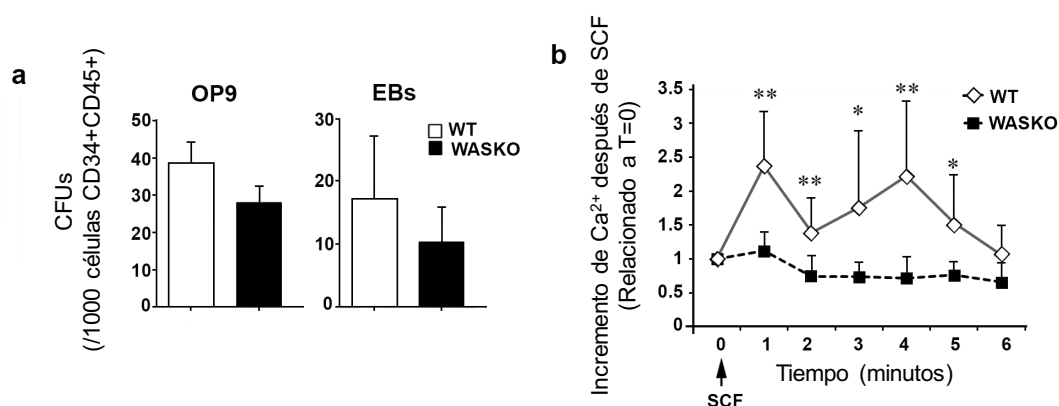


**Figura 15. Incremento de hematopoyesis en células hESCs-WASKO.** (a) *Esquema explicativo del protocolo seguido para la diferenciación hematopoyética mediante la formación cuerpos embrioides (EBs).* CC1: cóctel de citoquinas 1; (BMP-4 (25ng/ml), Flt-3L (300ng/ml), SCF (300ng/ml), IL-3 (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml) y G-CSF (50ng/ml)). CFU, Unidades formadoras de colonias; FC, citometría de flujo; MC, metil-celulosa. (b) *Gráfica mostrando los niveles de expresión relativos en AND-1\_WASKO de diferentes genes hematopoyéticos.* Se analizaron marcadores de diferenciación hematopoyética (CD34 y CD45) y factores de transcripción SCL, RUNX1 y GATA-1 a días 10 (barras blancas) y 15 (barras negras) de la diferenciación. Los niveles de expresión que se muestran están relativizados a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$   $AND-1\_WASKO / 2^{-\Delta\Delta C_t} AND-1\_WT$ . (c) *Gráfica mostrando los porcentajes de diferentes progenitores hematopoyéticos.* Se analizó el porcentaje de células  $CD34^+CD34^+CD45^-$  (células precursoras hemato-endoteliales; gráfica de la izquierda), células  $CD34^+CD45^+$  (precursores hematopoyéticos; gráfico central) y células  $CD34^-CD45^+$  (células hematopoyéticas maduras; gráfico de la derecha) procedentes de células  $AND-1\_WT$  y células  $AND-1\_WASKO$  a diferentes días de la diferenciación hematopoyética. Los datos fueron obtenidos de células seleccionadas en base a su tamaño (FSC) y granulosidad (SSC) y negativas para el marcador de viabilidad 7AAD. Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes, usando dos líneas celulares  $AND-1\_WT$  ( $AND-1\_WT1$  y  $AND-1\_WT2$ ) y dos líneas  $AND-1\_WASKO$  ( $AND-1\_WASKO\_c1.1$  y  $AND-1\_WASKO\_c1.2$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

### Las células $CD34^+CD45^+$ , derivadas de hESCs WASKO, tienen alteradas las respuestas a stem cell factor.

Mani *et al.* mostró que WASP está involucrada en la transducción de señales mediadas por *kit* (receptor del *stem cell factor* (SCF)) y que es requerida para la señalización de  $Ca^{2+}$  intracelular inducida por *kit* (Mani *et al.* 2009). Por lo tanto, nosotros estudiamos si las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs) WASKO  $CD34^+CD45^+$  presentaban alteraciones en respuesta a SCF o si presentaban potencial clonogénico reducido, en metilcelulosa, como se había descrito previamente por algunos autores (Kajiwarra *et al.* 1999). Aunque observamos que las HPCs derivadas de hESCs  $AND-1\_WASKO$  (HPCs-WASKO) mostraban una ligera reducción en el potencial clonogénico

(CFUs/células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) comparadas con las HPCs derivadas de hESCs AND-1\_WT1 (HPCs-WT), tras ambos protocolos de diferenciación, EBs y co-cultivo con células OP9, (**Figura 16a**), los datos no fueron significativos. Esos datos están en concordancia con el trabajo de Ingrungruanglert *et al.* que mostraba potencial clonogénico normal de células CD34<sup>+</sup> derivadas de iPSCs de pacientes WAS (Ingrungruanglert *et al.* 2015). Curiosamente, el flujo de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a SCF fue significativamente menor en HPCs-WASKO, confirmando el rol de WASP en las señales celulares mediadas por kit, en progenitores hematopoyéticos (Mani *et al.* 2009) (**Figura 16b**).



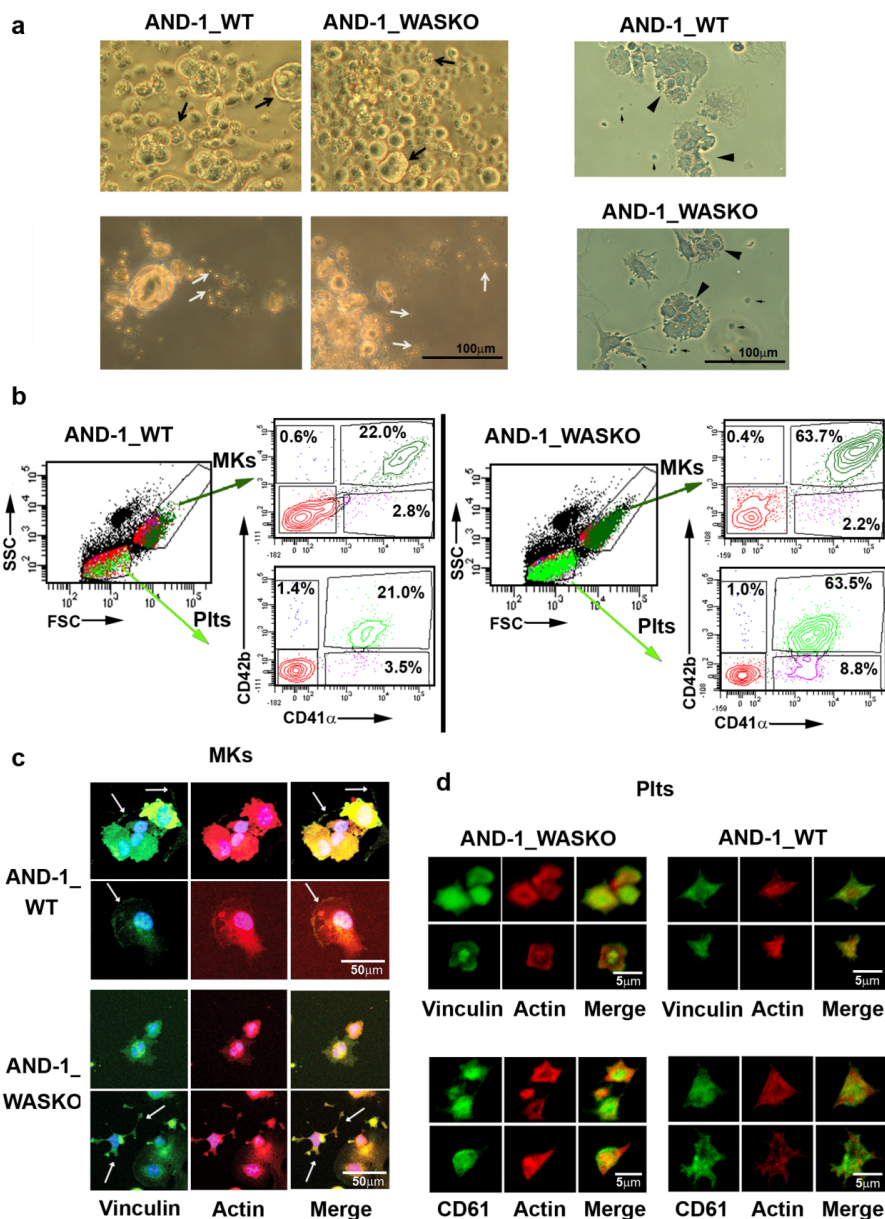
**Figura 16. Análisis funcional de células CD34+CD45+ derivadas de hESCs-WASKO. (a) La ausencia de WASP no tiene un efecto significativo en la generación de CFUs.** Gráfica mostrando el número de colonias (CFUs) generadas de cada 1000 células CD34+CD45+ obtenidas a partir de células AND-1\_WASKO\_c1.1 (barras negras) y AND-1\_WT (barras blancas) tras diferenciación hematopoyética, mediante co-cultivo con células OP9 (gráfica de la izquierda) y mediante formación de EBs (gráfica de la derecha). A día 15 (EBs) o día 10 (OP9) se recogieron las células, se analizó la expresión de CD34 y CD45, y se sembraron 1000 células CD34+CD45+ en metil-celulosa (ver Material y Métodos para más detalles). **(b) La ausencia de WASP afecta la activación de las HSCs por SCF.** Gráfico representando la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular de células CD34+CD45+ WASKO (cuadrados negros) y CD34+CD45+ WT (rombos blancos) en respuesta a SCF. A día 15 de la diferenciación, mediante la formación de EBs, se recogieron las células, se lavaron y se prepararon para estudiar la movilización de Ca<sup>2+</sup> (ver Material y Métodos para más detalles). Las células se analizaron por citometría de flujo, con adquisición continua durante 30 segundos para medir los niveles basales (T=0). La adquisición se paró, para añadir el estímulo de SCF (100ng/ml); flecha e inmediatamente se reinició la adquisición durante 6 minutos. El flujo de Ca<sup>2+</sup> se muestra como el incremento en MFI de las células estimuladas con SCF a diferentes tiempos, en relación con las células no estimuladas (T=0). Los datos representan la media de, al menos, tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media. \*p<0.05; \*\*p<0.01.



Las hESCs WASKO se diferencian hacia linaje megacariocítico, generando MKs-WASKO y PLTs-WASKO.

Se sabe que, en ocasiones, el bajo recuento de PLTs en sangre (trombocitopenia) observada en los pacientes WAS puede ser corregida tras una esplenectomía (Litzman et al. 1996), sugiriendo que los pacientes de WAS no tienen problemas intrínsecos para la producción de las PLTs. Aunque, hay mucha controversia en este asunto, como se ha expuesto en la introducción. Nosotros usamos las células AND-1\_WASKO para estudiar el rol de WAS en la diferenciación megacariocítica. Las diferentes líneas de hESCs se diferenciaron hacia linaje megacariocítico siguiendo el protocolo esquematizado en la **Figura 11**. Lu *et al.* demostraron que las PLTs derivadas de hESCs siguiendo este protocolo respondían a estímulos, como trombina, que formaban micro-agregados y que contribuían al desarrollo del trombo en sitios de daño vascular, en ratones (Lu et al. 2011). Tras la diferenciación de las líneas celulares AND-1\_WT y AND-1\_WASKO siguiendo este protocolo se pudo observar células de tipo MK y partículas tipo PLTs, tanto por microscopía (**Figura 17a**) como por citometría de flujo (**Figura 17b**). La caracterización fenotípica de las células presentes en nuestros cultivos megacariocíticos corroboraron la presencia de MKs y PLTs (**Figura 17b**). De hecho, ambas líneas, AND-1\_WT y AND-1\_WASKO, generaron MKs grandes y granulares CD41+CD42+ (**Figura 17b; plots superiores, verde oscuro**) y PLTs pequeñas CD41+CD42+ (Figura 4b; plots inferiores, verde claro). Curiosamente, las líneas celulares AND-1\_WASKO mostraron mayores porcentajes de ambos, PLTs y MKs (**Figura 17b, paneles de la izquierda frente a los de la derecha**).

Se hizo, además, ensayos de adhesión a superficies tratadas con fibrinógeno y activadas, de MKs y PLTs derivadas de ambas líneas, WT y WASKO y activadas con trombina. Tras la adhesión tanto MKs WT como MKs WASKO mostraron expresión de CD61 y formaron proplaquetas y lamelipodios, positivos para actina y vinculina (**Figura 17c**). Curiosamente, los MKs WASKO presentaron una morfología y distribución de la actina más irregular, en comparación con los MKs WT (**Figura 17c**). Las PLTs derivadas de ambas líneas celulares también fueron positivas para CD61 (**Figura 17d, imágenes inferiores**), presentando estructura trapezoidal, al igual que las PLTs de sangre periféricas, y una clara co-localización de actina y vinculina (**Figura 17d, imágenes superiores**). Como está descrito en pacientes con WAS, las PLTs WASKO aparecen con menor número de protrusiones, en comparación con las PLTs WT (**Figura 17d**). En resumen, esos datos mostraron que las células AND-1\_WASKO pueden diferenciarse, eficazmente, generar MKs y producir PLTs.



**Figura 17.** La diferenciación megacariocítica y producción de PLTs no está disminuida en células hESCs-WASKO. (a) *Análisis morfológico de cultivos durante la diferenciación megacariocítica de células AND-1\_WT y AND-1\_WASKO\_c1.1.* A día 20 de la diferenciación los cultivos megacariocíticos fueron fotografiados con el microscopio Primo Vert (Carl Zeiss) en las propias placas de cultivo (imágenes superiores de la izquierda), tras ser recogidas (imágenes inferiores de la izquierda) o tras adhesión a placas tratadas con fibrinógeno y teñidas con Papanicolau (imágenes de la derecha). Los MKs y las estructuras de tipo PLTs están señaladas con las flechas. (b) *Caracterización fenotípica de las células presentes en los cultivos megacariocíticos.* Las células fueron seleccionadas en base a su tamaño (FSC) y granulosidad (SSC) en dos regiones, MKs y PLTs (plots SSC/FSC). Cada población, a su vez, fue analizada en base a su expresión de CD41 y CD42 (plots CD42/CD41, a la derecha del plot SSC/FSC). La población grande y granulosa, CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> fue identificada como MKs

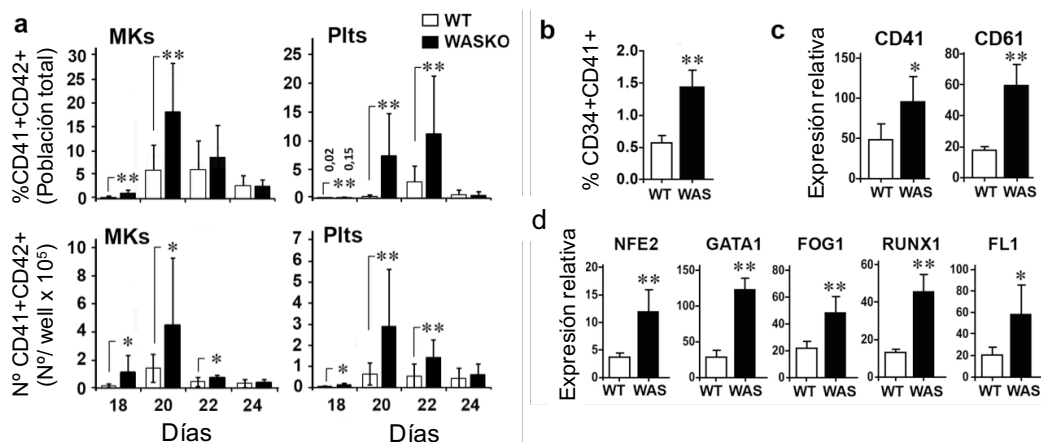
## Resultados

(SSC<sup>high</sup>FSC<sup>high</sup>CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>; plots superiores, verde oscuro). Los fragmentos celulares pequeños CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> fueron identificados como plaquetas (SSC<sup>low</sup>FSC<sup>low</sup>CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>; plots inferiores, verde claro). (c) **Los MKs derivados tanto de AND-1\_WT como de AND-1\_WASKO se unen a fibrinógeno.** Se recogieron las células derivadas de AND-1\_WT (imágenes superiores) y AND-1\_WASKO\_c1.1 (imágenes inferiores) a día 20 de diferenciación megacariocítica, derivadas de AND-1\_WT (imágenes superiores) y AND-1\_WASKO\_c1.1 (imágenes inferiores), y se adhirieron a placas tratadas con fibrinógeno, se activaron con trombina y se hizo inmuno-tinción con Faloidina (rojo, actina), anti-vinculina (verde) y DAPI (azul). (d) **Las PLTs derivadas de AND-1\_WT y AND-1\_WASKO se unen a fibrinógeno y expresan CD61 y vinculina.** Se recogieron las PLTs derivadas de AND-1\_WT (Imágenes de la derecha) y de AND\_1\_WASKO\_c1.1 (imágenes de la izquierda) a día 20 de la diferenciación. Las muestras se inmuno-tiñeron con DAPI (azul), Faloidina (actina, rojo) y con anti-vinculina (verde) (imágenes superiores) o con anti-CD61 (imágenes inferiores). Las imágenes fueron realizadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 880.

### Las hESCs WASKO presentan mayor diferenciación megacariocítica en comparación con las hESCs WT.

A continuación, evaluamos la cinética de aparición de MKs y PLTs, tanto de células AND-1\_WT como de AND-1\_WASKO. Encontramos que MKs y PLTs WASKO aparecían más temprano (**Figura 18a, gráficas superiores**) y en mayor cantidad (**Figura 18a, gráficas inferiores**), en comparación con MKs y PLTs derivadas de AND-1\_WT. De hecho, el porcentaje total de MKs y PLTs, a días 18 y 20 de la diferenciación fueron significativamente superiores, para células AND-1\_WASKO, pero no se detectaron diferencias después de día 22. Además, el número total de MKs y PLTs derivados de hESCs AND-1\_WASKO a lo largo de los cultivos megacariocíticos fue hasta cuatro veces mayor que el número total producido por células AND-1\_WT (**Figura 18a**). Estos datos están en línea con la diferenciación prematura de los MKs, observada por Sabri *et al.* en ratones WASKO, e indica que este fenómeno puede ocurrir también en humanos.

Con el objetivo de evaluar si este fenómeno era en parte debido a la aparición temprana de progenitores megacariocíticos, analizamos la presencia de células CD34+CD41+ en los EBs, previo al momento de disociación y co-cultivo sobre OP9 (día 15 de la diferenciación). Detectamos niveles incrementados de células CD34+CD41+ en EBs-WASKO (**Figura 18b**). Para corroborar este resultado, analizamos los niveles de expresión de dos marcadores de superficie específicos de MKs (CD41 y CD61) y cinco factores de transcripción asociados a diferenciación megacariocítica (NF-E2, GATA-1, FOG-1, RUNX-1 y FLI-1) confirmando el aumento de diferenciación megacariocítica de los EBs-WASKO, comparados con los EBs-WT (**Figura 18c, d; barras negras versus barras blancas**). Todos esos datos, en conjunto, indican que WASP juega un papel en el control de la diferenciación megacariocítica, lo cual está en concordancia con los datos que muestra maduración prematura de MKs en modelos murinos WASKO y la acumulación de MKs en médula ósea (Sabri *et al.* 2006).



**Figura 18. La diferenciación megacariocítica y la producción de PLTs está incrementada en células hESCs-WASKO. (a) Incremento de MKs y producción de PLTs derivados de células AND-1\_WASKO, en comparación con AND-1\_WT.** Los gráficos muestran los porcentajes (arriba) y el número total (abajo) de MKs (izquierda) y PLTs (derecha) derivados de células AND-1\_WT (barras blancas) y células AND-1\_WASKO (barras negras) a diferentes días de la diferenciación megacariocítica. El sobrenadante de los co-cultivos sobre células OP9 se recogieron cada 2 días, empezando el día 18 de la diferenciación, hasta día 24. Las células se tiñeron usando anticuerpos monoclonales anti-CD41 y anti-CD42 y las células dobles positivas se consideraron MKs y PLTs, como se ha descrito en la figura 4. **(b) Incremento en el porcentaje de progenitores megacariocíticos en EBs WASKO.** Los EBs formados a partir de células AND-1\_WT y AND-1\_WASKO se disociaron a día 15, se tiñeron con anti-CD34 y anti-CD41 y se analizó por citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de células CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>, identificadas como progenitores megacariocíticos. \*\*p<0.01. (c) y (d) **Los factores de diferenciación megacariocítica se encuentran sobre-expresados en AND-1\_WASKO EBs.** Se realizó el análisis de expresión génica de células AND-1\_WT (barras blancas) y AND-1\_WASKO (barras negras) en EBs, a día 15 de la diferenciación. Se analizó la expresión de marcadores de superficie específicos de MKs (CD41 y CD61) (c) y cinco factores de transcripción asociados a la diferenciación megacariocítica (NF-E2, GATA-1, FOG-1, RUNX1 y FL1-1) (d). Las gráficas representan los niveles de expresión relativos a las células AND-1\_WT indiferenciadas. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes, usando dos líneas celulares AND-1\_WT (AND-1\_WT1 y AND-1\_WT2) y dos AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2). \*p<0.05; \*\*p<0.01.

### MKs y PLTs derivadas de células hESCs WASKO mimetizan los defectos encontrados en MKs y PLTs de pacientes WAS.

Las PLTs de pacientes WAS son más pequeñas y presentan algunas alteraciones fenotípicas, como niveles reducidos de CD43 en su superficie (Higgins et al. 1991; Shcherbina, Bretscher, et al. 1999; Haddad et al. 1999; Rengan et al. 2000). Sin embargo, no se conoce si esas anomalías están presentes ya en el momento de producción de las PLTs, a partir de los MKs, o si esas alteraciones son adquiridas en el flujo sanguíneo. Comparando el fenotipo de MKs y PLTs derivados de hESCs WASKO con MKs y PLTs derivados de hESCs WT nuestro modelo permite contestar a esta pregunta. Los análisis de citometría de flujo mostraron que las PLTs WASKO eran, generalmente, de menor tamaño

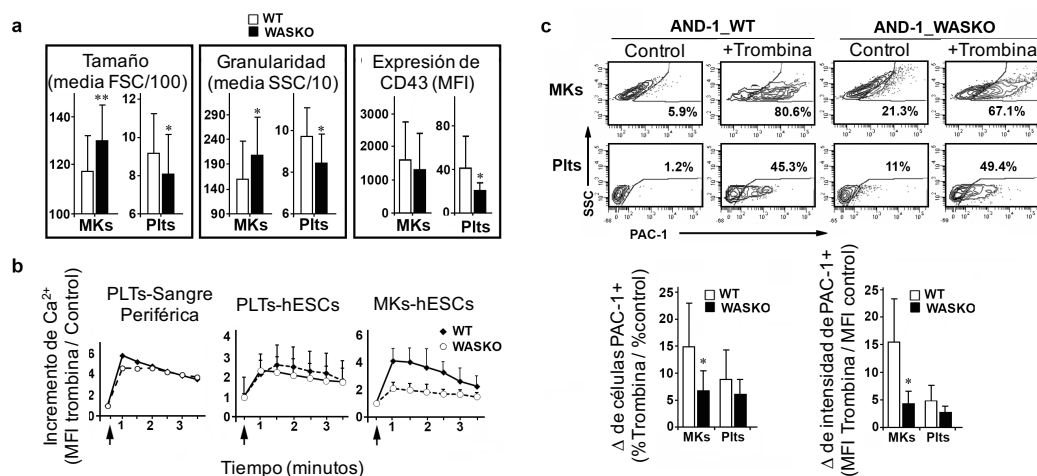
(menor FSC) y menos granulares (menor SSC) que las PLTs-WT (**Figura 19a; gráficos de PLTs de la izquierda y el centro**). Esos datos están en línea con el menor tamaño de PLTs, tanto en pacientes WAS como en PLTs derivadas de iPSCs de pacientes WAS (Ingrungruangelert et al. 2015). Por el contrario, los MKs-WASKO fueron de mayor tamaño y más irregulares que los MKs-WT (**Figura 19a; Gráficos MKs de la izquierda y el centro**). Sin embargo, estos datos pueden reflejar un fenotipo megacariocítico más maduro de los MKs-WASKO debido a su aparición temprana durante el proceso de diferenciación.

Otra característica de las PLTs de pacientes con WAS es la presencia de niveles reducidos de CD43 (Higgins et al. 1991). En la misma dirección, observamos que las PLTs-WASKO, derivadas de hESCs WASKO, presentaban menor expresión de CD43 que las PLTs derivadas de hESCs WT (**Figura 19a; Gráfico de PLTs de la derecha**). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre MKs WASKO y MKs WT.

Una manera de estudiar si los MKs WASKO y las PLTs WASKO tenían alterada su funcionalidad es estudiar su flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (un importante regulador de la función de las plaquetas) tras la estimulación con un agonista. Como controles se usaron PLTs de individuos sanos y de pacientes WAS (L101O en el exón 3) (**Figura 19b; gráfica de la izquierda**). Nuestros datos mostraron que las PLTs derivadas de hESCs WASKO presentaban una movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular similar a la movilización en PLTs derivadas de hESC WT, tras la activación con trombina (**Figura 19b; gráfico central**). Se obtuvieron resultados similares al comparar las PLTs de sangre periférica de individuos sanos con las derivadas de sangre de paciente WAS (**Figura 19b, Gráficos de la izquierda y central, círculos vacíos**). Esas observaciones están en línea con los datos previos mostrando un incremento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  normal, así como la prolongación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por agonista en pacientes WAS (Shcherbina, Rosen, et al. 1999). Sin embargo, a diferencia de las PLTs WASKO, los MKs WASKO mostraron un defecto en la respuesta a trombina (**Figura 19b; gráfico derecho**), indicando que WASP podría jugar un papel importante en la función de MKs.

Lo siguiente que medimos fue si la ausencia de WASP afectaba a la activación del receptor del fibrinógeno. Se procedió por tanto a determinar el grado de activación de dicho receptor (medido por la unión del anticuerpo PAC-1) en MKs y PLTs derivados de células WASKO. Nuestros datos indicaron que el receptor de fibrinógeno de PLTs WASKO se activaban eficientemente tras la estimulación con trombina (**Figura 19c**), mientras que los MKs WASKO presentaban la respuesta a la trombina ligeramente comprometida en comparación con los MKs WT (**Figura 19c**). Curiosamente, tanto PLTs como MKs derivados de células WASKO mostraron una unión de PAC-1 incrementada en condiciones basales (sin estimular) comparados con MKs y PLTs derivados de hESCs WT (**Figura 19c**). Esos datos están en sintonía con Gross *et al.* que mostraba un ratio de agregación y

segregación de gránulos densos ligeramente superior, en respuesta a un agonista, en PLTs de pacientes WAS (Gross et al. 1999). En conjunto, todos estos datos indican que existe una desregulación en los mecanismos de activación del receptor de fibrinógeno en MKs y PLTs WASKO.



**Figura 19. Los MKs y PLTs derivados de líneas celulares hESCs-WASKO mimetizan alteraciones fenotípicas y funcionales presentes en pacientes WAS.** (a) *El fenotipo de los MKs y PLTs derivados de AND-1\_WASKO mimetizan los defectos fenotípicos encontrados en MKs y PLTs de pacientes WAS.* Las gráficas muestran el tamaño (FSC; gráficas de la izquierda), granularidad (SSC; gráficas centrales) y la expresión de CD43 (intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*; gráficas de la derecha) de MKs y PLTs derivados de células AND-1\_WT (barras blancas) y de células AND-1\_WASKO (barras negras). Los datos se recogieron de la población CD41+CD42+. Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, 6 experimentos independientes usando dos líneas celulares AND-1\_WT (AND-1\_WT1 y AND-1\_WT2) y dos líneas AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_C1.2). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . (b) *La respuesta de calcio de MKs AND-1\_WASKO está afectada.* Se evaluaron los niveles de calcio intracelular en PLTs WASKO (círculos blancos) y WT (círculos negros) obtenidos de sangre periférica (gráfica de la derecha) y de PLTs derivadas de cultivos de hESCs (gráfica central), así como en MKs derivados de hESCs (gráfica de la derecha). La sangre periférica de paciente WAS (L101P en el exón 3) se obtuvo del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla). La sangre periférica del donante sano se obtuvo como se ha descrito en Material y Métodos. El flujo de  $Ca^{2+}$  se midió por citometría de flujo, usando *Calcium Sensor Dye eFluor 514* a una concentración final de  $5 \mu\text{mol/l}$ . Los datos representan el incremento de los niveles de calcio después de la estimulación con trombina sobre los niveles de calcio basal, medidos por la intensidad de fluorescencia del sensor de calcio. La adición de la trombina ( $2 \text{U/ml}$ ) se indica con la flecha. (c) *Los MKs-WASKO presentan alteraciones en la activación del receptor del fibrinógeno, pero las PLTs-WASKO presentan una respuesta menos alterada.* Se activaron células AND-1\_WT (gráficas de la izquierda) y células AND-1\_WASKO (gráficas de la derecha) con trombina, y se tiñeron con CD42 (marcador específico de MKs) y PAC-1 (que reconoce la forma dimerizada del receptor del fibrinógeno). Los plots representan la intensidad de PAC-1 en MKs CD42<sup>+</sup> (arriba) y PLTs CD42<sup>+</sup> (abajo). Las gráficas muestran el incremento en % (gráfica de la izquierda) e intensidad de fluorescencia (gráfica de la derecha) de MKs y PLTs PAC-1<sup>+</sup> derivadas de células AND-1\_WT (barras blancas) y AND-1\_WASKO (barras negras). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al

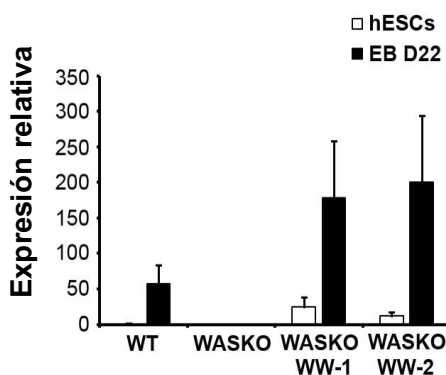
## Resultados

menos, tres experimentos independientes usando dos líneas celulares AND-1\_WT (AND-1\_WT1 y AND-1\_WT2) y dos líneas AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

### 5.1.3. Rescate de los defectos funcionales mediante VL.

#### La expresión ectópica de WAS en las células AND-1\_WASKO restaura el desarrollo normal de MKs y PLTs y la función de MKs.

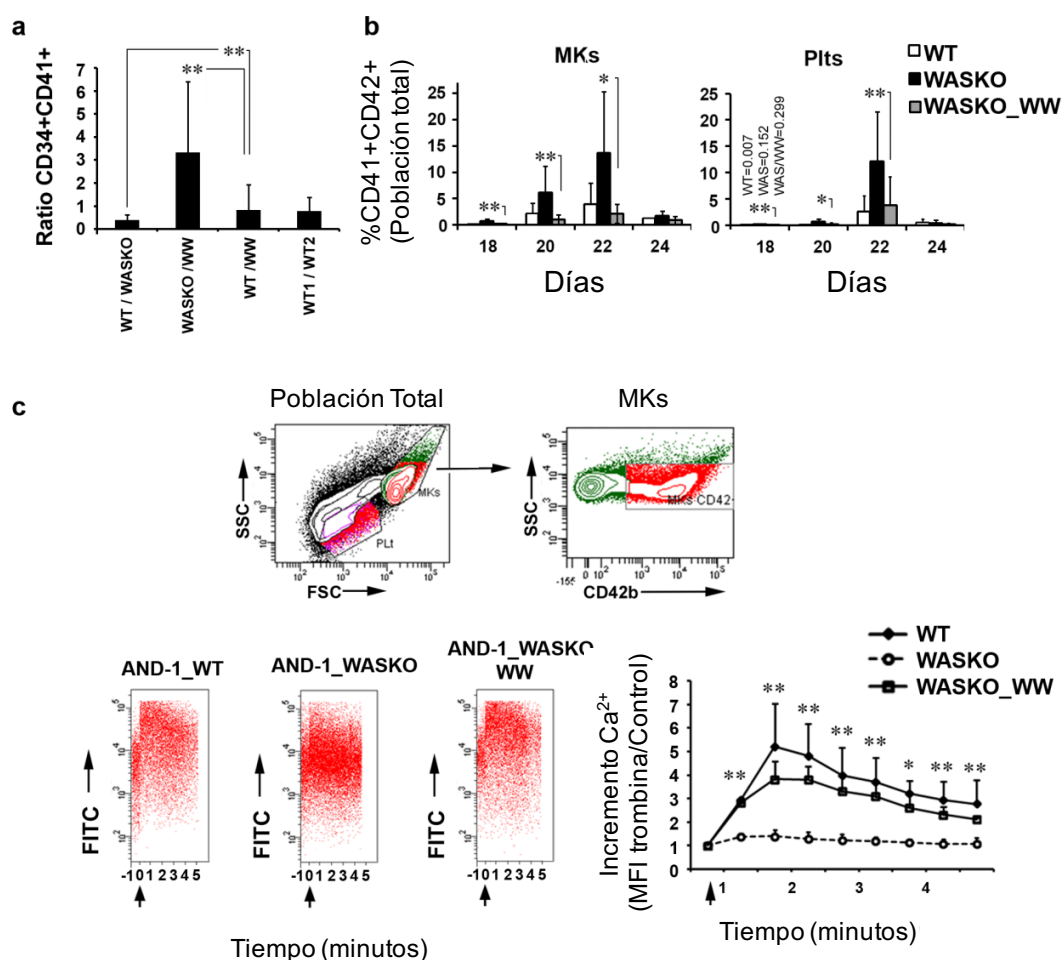
Por último investigamos si la expresión ectópica de WAS, a partir de modificación genética estable mediante el uso de un VL, podía restaurar los fenotipos alterados, previamente descritos. Generamos dos poblaciones *bulk* (AND-1\_WASKO\_WW.1 y AND-1\_WASKO\_WW.2) por transducción con el vector WW-puro (descrito en Material y Métodos) y posterior selección en base a su resistencia a puromicina. En ambas líneas celulares observamos bajos niveles de expresión de WAS en hESCs indiferenciadas, que incrementó tras diferenciación hematopoyética (**Figura 20**).



**Figura 20.** Las AND-1\_WASKO transducidas con el VL WW-puro expresan WAS. Las células AND-1\_WASKO se transdujeron con el vector WW-puro y se seleccionaron con puromicina para generar las líneas celulares WASKO\_WW-1 y WASKO\_WW-2. Se aisló mRNA de células indiferenciadas (barras blancas) y de EBs a día 22 de la diferenciación de las líneas AND-1\_WT, AND-1\_WASKO y AND-1\_WASKO\_WW y se analizó por RT-qPCR. La gráfica muestra la expresión relativa de mRNA de WAS usando las células AND-1 sin diferenciar como calibrador y GAPDH para normalizar las muestras.

Tras esto estudiamos si la expresión ectópica de WAS en las hESCs WASKO podía restaurar la diferenciación megacariocítica normal, dado que es uno de los fenotipos afectados más claros, pero a su vez de los más inesperados. Por lo tanto, llevamos a cabo una diferenciación de las líneas celulares AND-1\_WT, AND-1\_WASKO y AND-1\_WASKO\_WW y estudiamos la aparición de progenitores megacariocíticos CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>, MKs y PLTs. Nuestros datos mostraron que el porcentaje de células CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> derivadas de células AND-1\_WASKO\_WW, a día 15, era similar al derivado de las células AND-1\_WT (**ratio WT/WW = 1; Figura 21a**) pero mucho menor que el obtenido de las células AND-1\_WASKO (**ratio WASKO/WW = 3; Figura 21a**). En la misma línea, las células

AND-1\_WASKO\_WW también produjeron niveles similares de MKs (**Figura 21b, izquierda**) y PLTs (**Figura 21b, derecha**) en comparación con las células AND-1\_WT (barras blancas frente a barras grises) y niveles menores en comparación a las hESCs WASKO (barras grises frente a barras negras). En resumen, nuestros datos mostraron que la expresión ectópica de WAS en líneas celulares AND-1\_WASKO restauró el desarrollo megacariocítico normal.



**Figura 21.** La expresión ectópica de WAS en células AND-1\_WASKO restaura el desarrollo normal de MKs y PLTs y su función. (a) **La expresión ectópica de WAS restaura los niveles normales de progenitores CD34+CD41+ derivados de hESCs-WASKO.** Los porcentajes de los progenitores CD34+CD41+ se determinaron a día 15 de la diferenciación megacariocítica. La gráfica muestra el ratio entre los porcentajes de células CD34+CD41+ derivadas de las diferentes líneas celulares, como se indica debajo de cada barra. Un ratio de 1 indica que no existen diferencias, como se observa en el ratio WT/WW (ratio entre WT y AND-1\_WASKO\_WW) y en el ratio WT1/WT2 (ratio entre WT1 y WT2). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cinco experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ . (b) **La expresión ectópica de WAS restaura los niveles normales de MKs y PLTs generados a partir de hESCs-WASKO.** Se recogió el sobrenadante de los co-cultivos sobre OP9 de células AND-1\_WT, AND-1\_WASKO y AND-1\_WASKO\_WW cada



## Resultados

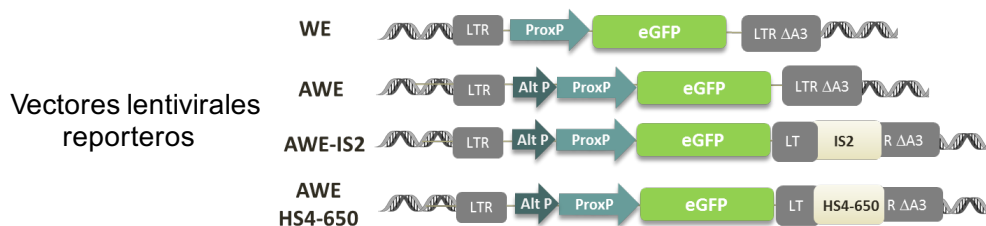
dos días, desde día 18, hasta día 24, y el porcentaje de MKs (gráfica de la izquierda) y PLTs (gráfica de la derecha) se determinó como se ha explicado en la Figura 4. (c) **La expresión ectópica de WAS restaura la respuesta normal de calcio de MKs derivados de células AND-1\_WASKO\_WW.** La respuesta de calcio a trombina (flecha) se evaluó en MKs derivados de células AND-1\_WT, AND-1\_WASKO y AND-1\_WASKO\_WW. Los plots superiores muestran la población considerada como MKs. En los plots de abajo a la izquierda se muestra un ejemplo de los datos generados para cada línea celular. La gráfica inferior derecha muestra la respuesta de  $Ca^{2+}$  de MKs WASKO (círculos blancos), WT (rombos negros) y WASKO\_WW (cuadrados) durante el tiempo. Los datos representan el incremento de los niveles de calcio tras la estimulación con trombina, sobre los niveles de calcio basal, medidos por la intensidad de fluorescencia del sensor de calcio. La adición de la trombina (2U/ml) está indicada por una flecha. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes, usando dos líneas celulares AND-1\_WT (AND-1\_WT1 y AND-1\_WT2), dos líneas AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2) y dos líneas AND-1\_WASKO\_WW (AND-1\_WASKO\_WW1 y AND-1\_WASKO\_WW2). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Tras esto, estudiamos si la expresión de WASP en las células AND-1\_WASKO también podía restaurar los niveles de flujo de calcio intracelular, en respuesta a trombina, en MKs. Por lo tanto, evaluamos la respuesta de calcio intracelular en MKs derivados de las líneas AND-1\_WT, AND-1\_WASKO y AND-1\_WASKO\_WW. Nuestros datos indicaron que la expresión ectópica de WASP en las células AND-1\_WASKO restauró la habilidad de los MKs para responder a trombina (**Figura 21c; AND-1\_WASKO vs. AND-1\_WASKO\_WW;  $p < 0.01$** ).

## 5.2. Objetivo 2: Desarrollar nuevos VLs para TG de WAS

### 5.2.1. Desarrollo de VLs reporteros

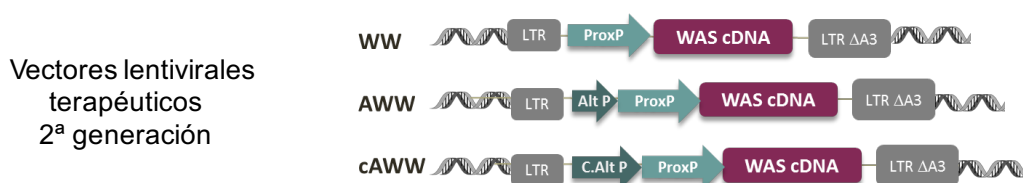
Con el objetivo de mejorar los VLs para TG desarrollamos nuevos vectores reporteros. Los VLs reporteros suponen una herramienta muy atractiva para estudios más preliminares en células WT, tanto en líneas inmortalizadas como en HSCs. Además, el uso de VLs reporteros permite estudiar tanto la expresión endógena de WASP como la expresión del transgén, en las mismas células. Los VLs son sistemas integrativos seguros (Wiznerowicz & Trono 2005), sin embargo, el sitio de integración de los mismos puede condicionar su expresión, así como la presencia del propio vector podría alterar la expresión de los genes que lo rodean. Por ello decidimos incluir en los VLs reporteros secuencias aisladoras, que trabajan en ambos sentidos. Las secuencias aisladoras bloquean la posible activación de genes, como consecuencia de la presencia del VL y aísla al propio VL del contexto genómico. Contábamos en el laboratorio con los VLs WE y AWE (Frecha et al. 2008) (**Figura 21**). Mediante técnicas básicas de clonaje, construimos el VL AWE-IS2, insertando el aislador IS2 (Benabdellah et al. 2014) en el LTR 3' del vector original, AWE. Del mismo modo, clonamos el VL AWE-HS4-650 insertando un fragmento de 650pb del aislador HS4 (Arumugam et al. 2009) en el LTR 3' del VL AWE (**Figura 22**).



**Figura 22. Esquema representativo de los VLs reporteros.** WE: Expresión de eGFP regulada por un fragmento de 0.5kb del promotor proximal endógeno de WAS (ProxP); AWE: Combinación de un fragmento de 0.5kb del promotor proximal endógeno de WAS (ProxP) y un fragmento de 0,38kb del promotor alternativo endógeno de WAS (Alt P); AWE-IS2: VL AWE al que se añadió el aislador IS2 en el LTR 3'; AWE-HS4-650: VL AWE al que se añadió un fragmento de 0.65kb del aislador HS4 (HS4-650) en el LTR 3'.

### 5.2.2. Desarrollo de nuevos VLs terapéuticos

En base a los resultados obtenidos con los vectores reporteros (detallado en los siguientes apartados de resultados) decidimos diseñar nuevos vectores terapéuticos, de segunda generación, expresando WASP bajo diferentes promotores endógenos de WAS. El actual VL clínico, WW1.6, regula la expresión de WAS bajo el promotor proximal completo. Inicialmente contábamos en el laboratorio con el VL-WAS WW, el cual regula la expresión de WAS bajo un fragmento de 500-pb del promotor proximal (Martín, M. Toscano, et al. 2005). Haciendo uso de técnicas básicas de clonaje (consultar Material y Métodos para ver en detalle) clonamos el vector AWW que incorpora al fragmento de 500-pb del promotor proximal un fragmento de 387-pb del promotor alternativo. Sin embargo, el estudio de Hagemann *et al*, en 2000, demostró que la pérdida del sitio de C/EBP en el promotor alternativo, que no está presente en el promotor alternativo truncado, conllevaba una disminución en los niveles de expresión del transgén, en células K562 (Hagemann et al. 2000). En base a esto, pensamos que la incorporación del promotor alternativo completo en los VLs-WAS, mejoraría los niveles de expresión de WASP. Por ello clonamos el promotor alternativo completo en el esqueleto del VL AWW obteniendo así el VL cAWW (Figura 23).

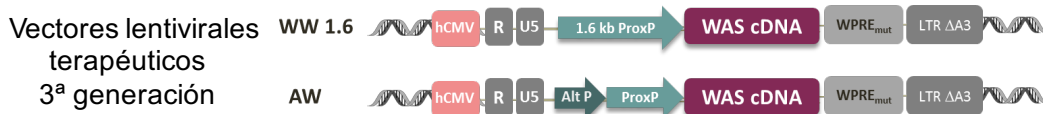


**Figura 23. Esquema representativo de los VLs-WAS.** Diagrama de los VLs-WAS utilizados para rescatar la expresión fisiológica de WAS. WW: Expresión de WASP regulada bajo un fragmento de 0.5kb del promotor proximal endógeno de WAS (ProxP); AWW: Expresión de WASP regulada bajo la combinación de un fragmento de 0.5kb del promotor proximal endógeno de WAS (ProxP) y un fragmento de 0,38kb del promotor

## Resultados

alternativo endógeno de WAS (Alt P); cAWW: Expresión de WASP regulada bajo la combinación de un fragmento de 0,5kb del promotor proximal endógeno de WAS (ProxP) y el promotor alternativo endógeno de WAS completo (c.Alt P).

Sin embargo, el actual VL clínico WW1.6 presenta un esqueleto lentiviral diferente. Éste incorpora el promotor hCMV en el LTR5' y el WPRE mutado. Para llevar a cabo una comparación correcta entre VLs decidimos desarrollar un nuevo VL clínico, de tercera generación, que incluyera el promotor alternativo sobre el esqueleto lentiviral del VL clínico WW1.6. Para llevar a cabo la comparativa, Genethon cedió una muestra del actual VL WW1.6 a la Dr. Pilar Muñoz, que mediante técnicas de clonaje, cambió el promotor del VL WW1.6 (promotor proximal endógeno completo), por la combinación del fragmento de 0.5Kb del promotor proximal y el fragmento de 0.38Kb del promotor alternativo (**Figura 24**).



**Figura 24. Esquema explicativo de los VLs clínicos.** El vector WW 1.6, muestra el diagrama del VL utilizado en los ensayos clínicos actuales. Regula la expresión de WAS bajo el promotor proximal endógeno de WAS completo (1.6 kb ProxP). El vector AW regula la expresión de WAS bajo la combinación de un fragmento de 0.5Kb del promotor proximal (ProxP) y un fragmento de 0,38Kb del promotor alternativo (Alt P). Ambos vectores incluyen WPRE mutado, el LTR3' mutado y el promotor hCMV en el LTR5'.

### 5.3. Objetivo 3: Analizar si los VLs mimetizan el patrón de expresión de WASP en líneas humanas inmortalizadas

#### 5.3.1. VLs reporteros expresando eGFP: Análisis en MEG-01

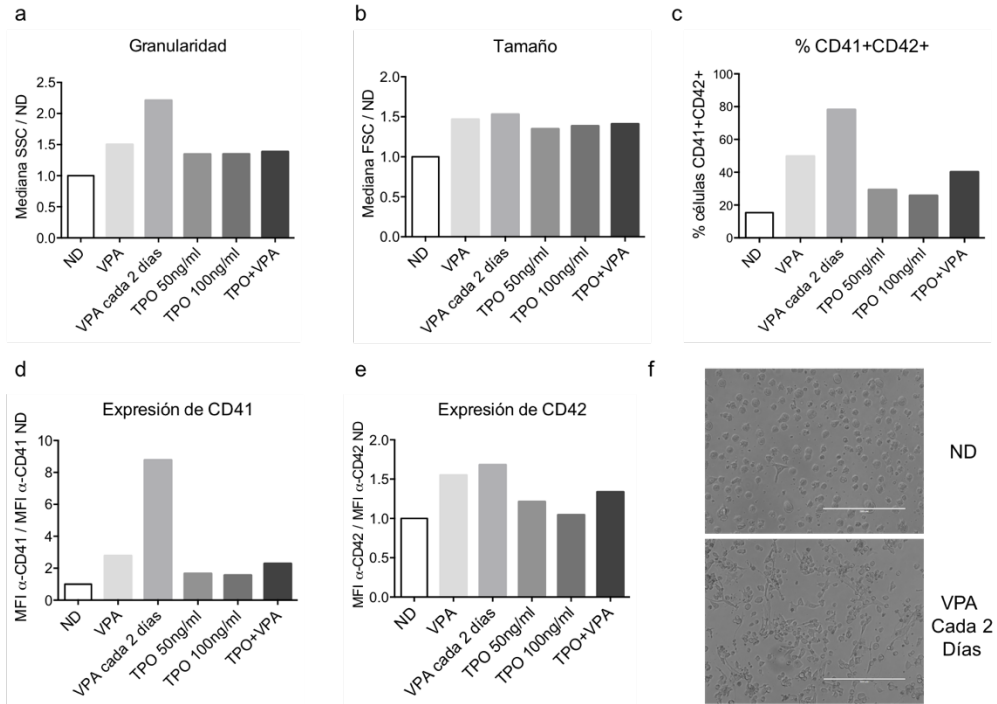
En primer lugar se procedió a analizar el comportamiento de las diferentes construcciones expresando eGFP bajo los diferentes VLs backbones (Ver Figura 22) en líneas inmortalizadas: esto nos permitía comparar el patrón de expresión de WASP endógeno con el patrón de expresión de eGFP expresado por los diferentes VLs. Para ello en primer lugar se procedió a determinar la utilidad de la línea MEG01 para estudiar el proceso de megacariopoyesis:

### **5.3.1.1. Diferenciación de MEG-01 hacia linaje megacariocítico y patrón de expresión de WASP durante este proceso**

#### La estimulación de las MEG-01 con VPA induce la diferenciación y maduración megacariocítica

La línea celular MEG-01 ha sido ampliamente utilizada para estudiar procesos moleculares involucrados en la megacariopoyesis, puesto que son células capaces de diferenciarse hacia megacariocitos y de liberar partículas tipo PLT. Se han establecido diferentes protocolos, para inducir la diferenciación de células MEG-01, basados en el uso de diferentes estímulos, como son el PMA, el ácido retinoico o el ácido valproico (VPA). Por ello, nos dispusimos a testar diferentes condiciones para optimizar la diferenciación. Ensayamos cultivar las células con VPA (30nM), con tan solo un estímulo inicial o cambiando el medio cada dos días. Puesto que se sabe que la TPO es una proteína que tiene un papel crucial durante la megacariopoyesis y la trombopoyesis, estudiamos si la estimulación con TPO (50ng/ml y 100ng/ml) o la combinación de ésta con VPA (VPA 30nM y TPO 50ng/ml) podía mejorar la diferenciación y maduración megacariocítica. La presencia de VPA en el medio indujo mejor la diferenciación de las células MEG-01. Tras la estimulación, las células aumentaron tanto su granularidad (SSC) (**Figura 25a**) como su tamaño (FSC) (**Figura 25b**), con todas las condiciones, siendo mayor el cambio en el cultivo con VPA, de forma continuada. Para evaluar mejor la diferenciación, analizamos la población de células positivas para los marcadores megacariocíticos específicos CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>. Como se observa en la **Figura 25c**, el porcentaje de células dobles positivas fue mayor cuando se mantenía el estímulo de VPA a lo largo del cultivo. De igual modo, analizamos la expresión de ambos marcadores, CD41 (**Figura 25d**) y CD42 (**Figura 25e**). El estímulo continuado de VPA cada 2 días produjo mejores resultados en comparación con el resto de condiciones. Los cambios morfológicos se observaron también mediante microscopía, observando células adherentes, de mayor tamaño, y con elongaciones tipo proplaquetas (**Figura 25f**). Por los resultados obtenidos, decidimos llevar a cabo este protocolo para la diferenciación megacariocítica de células MEG-01, para poder evaluar el comportamiento de VLs reporteros, bajo diferentes promotores endógenos de WAS.

## Resultados

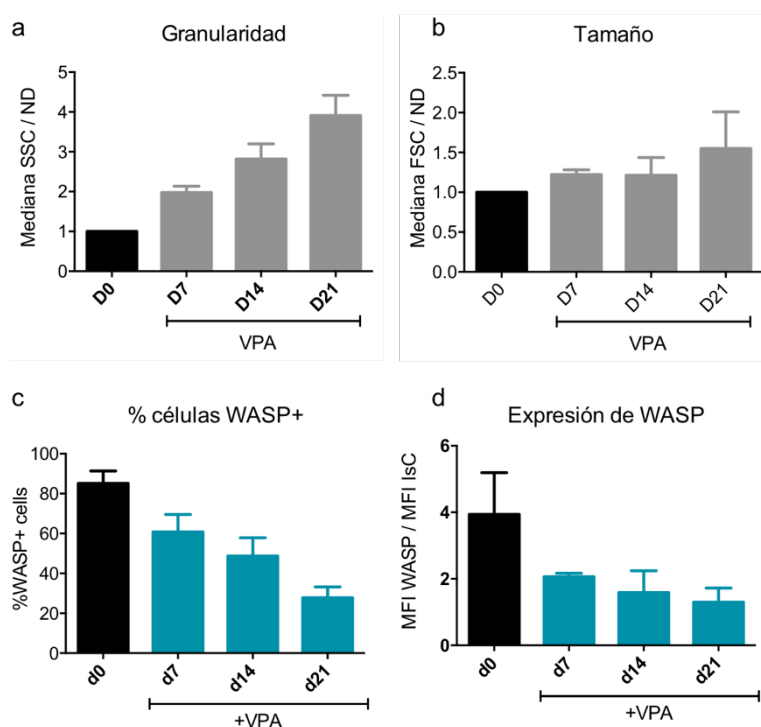


**Figura 25. La estimulación de células MEG-01 con ácido valproico induce maduración megacariocítica.** (a) y (b) La estimulación, durante 21 días, de la línea celular MEG-01 con ácido valproico (VPA), cada dos días (barra VPA cada dos días), incrementa el aumento en granularidad (SSC) (a) y el tamaño (FSC) (b). Los datos representados en ambas gráficas están relativizados frente a las células MEG-01 no diferenciadas (siendo el valor de éste = 1; barra blanca). Los datos se tomaron de la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>. (c) La estimulación continuada con VPA incrementa la aparición de células dobles positivas CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>. La gráfica muestra el porcentaje de células CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, para cada condición de cultivo. (d) y (e) Los niveles de expresión de CD41 y CD42, incrementan al estimular las células MEG-01 con VPA. Las gráficas muestran el incremento en los niveles de expresión de CD41 (d) y CD42 (e), relativizados frente a las células MEG-01 sin diferenciar (ND; barra blanca). Los datos representados muestran el ratio de la MFI de CD41 y CD42 sobre la intensidad de fluorescencia de las células sin diferenciar, en la población de células CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>. (f) La estimulación con VPA, de forma continuada, induce cambios morfológicos en el cultivo de células MEG-01. En las imágenes se muestra un ejemplo del cambio morfológico inducido en las células MEG-01 antes (imagen superior) y tras estimular con VPA (imagen inferior).

### La expresión de WASP endógena disminuye a lo largo del proceso de diferenciación megacariocítica en las células MEG-01

Tras optimizar la diferenciación megacariocítica, nos dispusimos a estudiar el perfil de expresión de WASP durante la misma. Para ello, diferenciamos las células MEG-01, mediante estímulo con VPA, durante 21 días, y analizamos por citometría de flujo la expresión de WASP, a días 0 (indiferenciado) así como en la población doble positiva CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> a días 7, 14 y 21 de la diferenciación. Tal y como se esperaba, a medida que avanzaba la diferenciación, el tamaño celular (FSC) y la granulosidad (SSC) de las células

MEG-01  $CD41^+CD42^+$  aumentaba (**Figura 26a y 26b**), indicativo de maduración megacariocítica. Cuando analizamos la expresión de WASP en las células  $CD41^+CD42^+$  a los diferentes días de estimulación con VPA, observamos que la expresión de WASP va disminuyendo, tanto en porcentaje (**Figura 26c**) como en niveles de expresión (**Figura 26d**), conforme las células MEG-01 progresan hacia megacariocitos maduros ( $CD41^+CD42^+$ , grandes y granulosos).

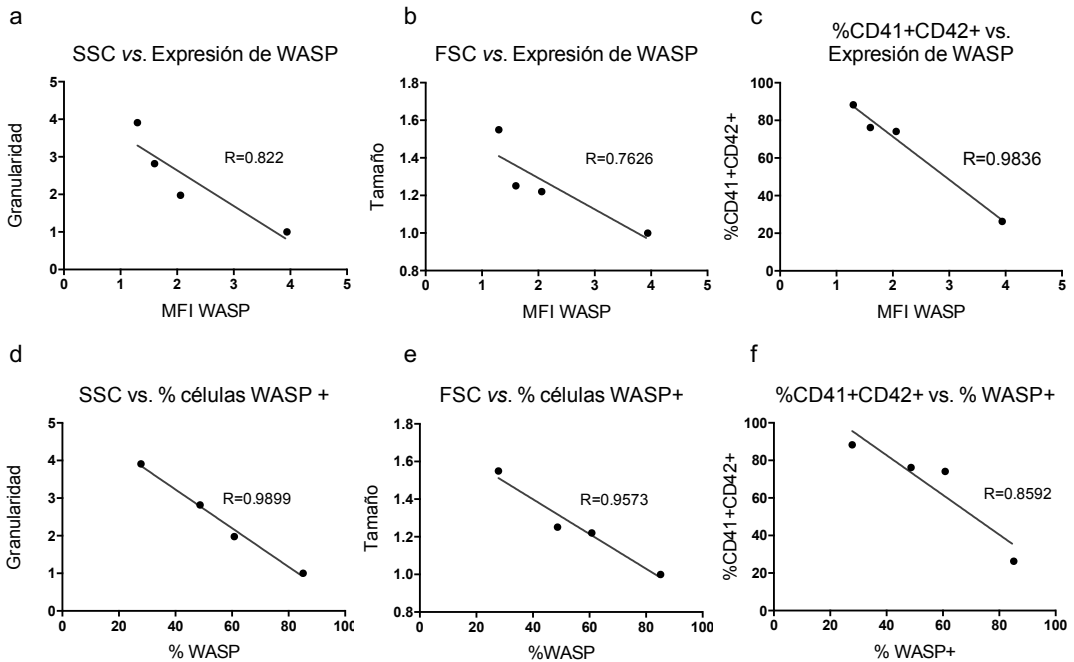


**Figura 26.** La expresión de WASP decrece durante la maduración megacariocítica, en células MEG-01. (a) y (b) El tamaño (FSC) y la granularidad (SSC), de la población  $CD41^+CD42^+$ , incrementa tras el estímulo continuado de células MEG-01 con VPA. Las gráficas muestran el cambio en tamaño (a; gráfica de la izquierda) y la granularidad (b; gráfica de la derecha) durante la maduración megacariocítica de células MEG-01 estimuladas con VPA. Las células se recogieron a diferentes días de la diferenciación (d7, d14 y d21) y se determinó la media de SSC (a) y FSC (b) en la población doble positiva  $CD41^+CD42^+$  mediante citometría de flujo. Los datos se relativizaron frente a las células sin diferenciar (d0). (c) y (d) La expresión endógena de WASP decrece a lo largo de la maduración megacariocítica. MEG-01 estimuladas con VPA fueron recogidas a días d7, d14 y d21 y se analizó el porcentaje (c) y los niveles (d) de expresión de WASP en las células  $CD41^+CD42^+$ . Los datos que se representan en la gráfica (d) muestran la intensidad media de fluorescencia (MFI) de WASP relativizada frente al MFI obtenida con el control de isotipo (IsC, del inglés *Isotype Control*).

Con la finalidad de estudiar si la observación de que la maduración megacariocítica produce una disminución en los niveles de expresión de WAS se procedió a determinar el coeficiente de correlación entre los índices de maduración megacariocítica (tamaño, granularidad, y porcentaje de células  $CD41^+CD42^+$ ) con los

## Resultados

niveles (**Figuras 27a, 27b y 27c**) y porcentajes (**Figuras 27d, 27e y 27f**) de expresión de WASP. En todos los casos se obtuvieron valores de R significativos (entre 0.76 y 0.99), siendo evidente que la expresión de WASP disminuye conforme progresa la diferenciación de las MEG-01 hacia megacariocitos más maduros.

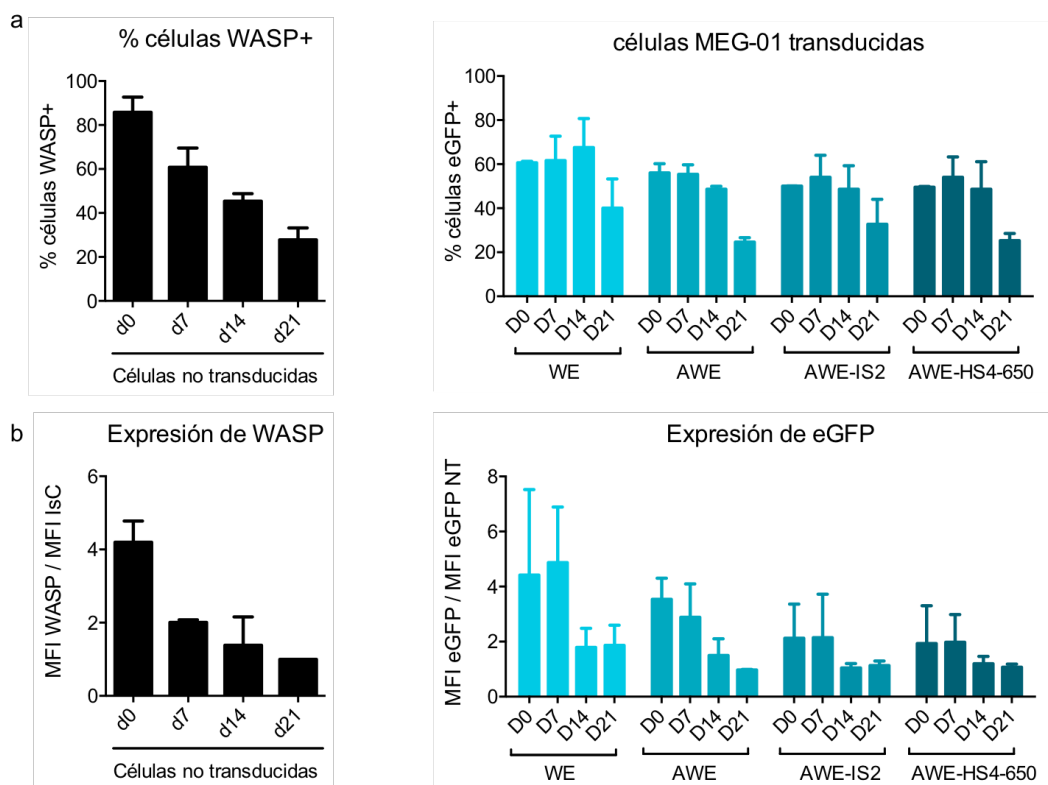


**Figura 27.** La expresión de WASP está inversamente relacionada con la maduración megacariocítica en células MEG-01. Las células MEG-01 se recogieron a días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación megacariocítica y se analizó por citometría de flujo los porcentajes (**a, b, c**) y niveles de expresión (**d, e, f**) de WASP y fueron graficados en función de la granulosidad (**a, d**), tamaño (**b, e**) y porcentaje de dobles positivas CD41/CD42 (**c, f**). Las gráficas muestran que a mayor maduración hacia el linaje megacariocítico hay menores niveles de expresión de WASP.

### 5.3.2.1. Análisis del patrón de expresión de eGFP de los diferentes vectores reporteros durante la diferenciación de MEG-01 hacia linaje megacariocítico.

Una vez conocido el comportamiento de WASP endógeno durante el proceso de diferenciación de la línea MEG01, procedimos a estudiar el comportamiento de los diferentes vectores para mimetizar este patrón de expresión. Para ello se procedió a generar líneas MEG-01 transducidas con los diferentes VLs reporteros (WE, AWE, AWE-IS2 y AWE-HS4-650). Una vez conseguidas las diferentes líneas se procedió a su diferenciación. Seguimos el mismo protocolo, y analizamos la expresión de eGFP por citometría de flujo en las células antes (células CD41<sup>low</sup>CD42<sup>-</sup>) y después de su diferenciación (células CD41<sup>high</sup>CD42<sup>+</sup>). Observamos cómo la expresión de eGFP disminuía conforme avanzaba la diferenciación megacariocítica (**Figuras 28a y 28b**) al igual que

ocurre con la expresión de WASP endógena. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los cuatro VLs (WE; AWE; AWE-IS2; AWE-HS4-650). Estos datos sugieren que el promotor proximal es suficiente para mimetizar la bajada en los niveles de expresión durante la diferenciación megacariocítica, al menos en este modelo celular.



**Figura 28. La expresión de eGFP disminuye durante la diferenciación megacariocítica. (a) El porcentaje de células eGFP+ disminuye conforme aumenta la diferenciación megacariocítica.** La gráfica de la izquierda muestra el porcentaje de células WASP+ durante la maduración megacariocítica, derivada de células MEG-01. Se recogieron las células a días 0, 7, 14 y 21 de la diferenciación y se analizaron por citometría de flujo, mediante tinción combinada; tinción superficial de CD41 y CD42, y tinción intracelular de WASP. La gráfica de la derecha muestra el porcentaje de células eGFP+ dentro de la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> de las diferentes líneas transducidas (WE, AWE, AWE-IS2 y AWE-HS4-650) a días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación con VPA. **(b) La expresión de eGFP disminuye a lo largo de la diferenciación megacariocítica.** La gráfica de la izquierda muestra los niveles de expresión de WASP (MFI) y la MFI se normalizó frente a la MFI resultante de la tinción con control de isotipo (IsC, del inglés *Istotype Control*). La gráfica de la derecha muestra los niveles de expresión de eGFP+ dentro de la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> de las diferentes líneas transducidas (WE, AWE, AWE-IS2 y AWE-HS4-650) a días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación con VPA. Los niveles de expresión de eGFP se normalizaron usando la MFI del canal FITC en la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> de células no transducidas.



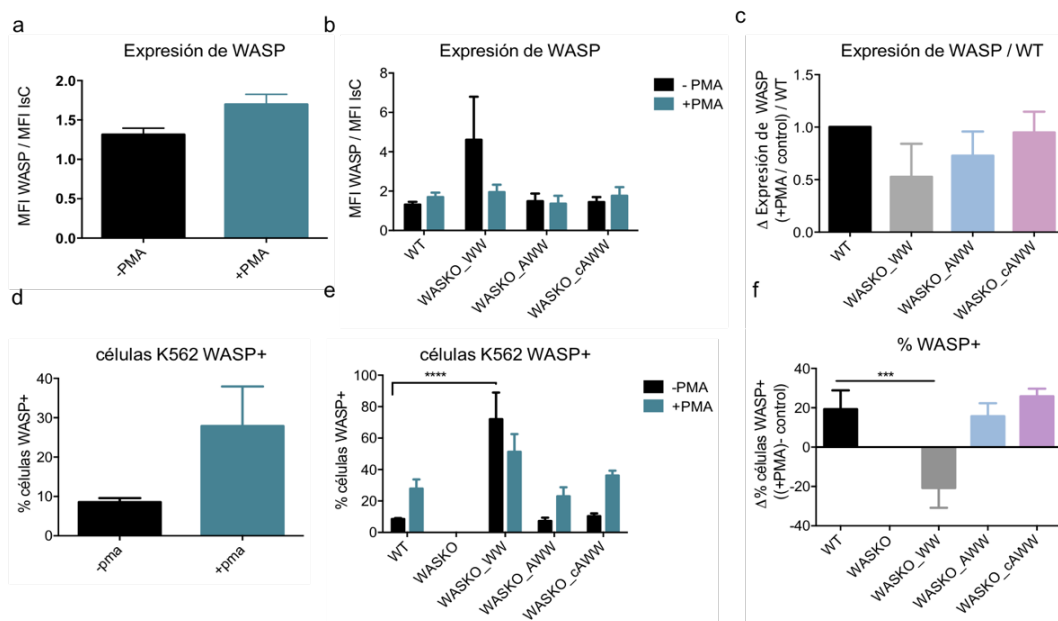
### 5.3.2. VLs terapéuticos expresando WASP: Análisis en K562\_WASKO

Dado que se sabe que el cDNA de WAS regula la expresión de WASP exógena, derivada de VLs (Toscano et al. 2009), decidimos estudiar cómo se comportan los vectores terapéuticos (expresando WASP). Para ello precisamos de una línea celular hematopoyética, con capacidad de diferenciarse al linaje megacariocítico y con el gen WAS eliminado. La línea K562\_WASKO generada en nuestro laboratorio previamente (Toscano et al. 2013) cumple todas estas condiciones y puede ser utilizada por tanto para estudiar el patrón de expresión de VLs terapéuticos durante la megacariopoyesis. De esta manera podemos comparar el patrón de expresión de WASP endógeno en la línea K562 original (K562WT) con el patrón de expresión de WASP conseguido por los diferentes VLs.

*VLs-WAS, regulados por el promotor alternativo endógeno, exhiben un patrón de expresión de WASP más fisiológico durante la diferenciación megacariocítica en el modelo celular K562\_WASKO.*

Para ello, transdujimos las células K562\_WASKO con los VLs esquematizados en la **Figura 23**, generando diferentes líneas celulares que contenían un número similar de integraciones (2.5 copias/célula) de los diferentes vectores terapéuticos (K562\_WASKO-WW, K562\_WASKO-AWW y K562\_WASKO-cAWW). Las diferentes líneas transducidas, así como la línea control K562 WT fueron estimuladas con PMA para inducir su diferenciación megacariocítica. Tras la estimulación, analizamos por citometría de flujo la expresión de marcadores megacariocíticos, CD41 y CD42 y la expresión de WASP. Observamos que, en las células K562 WT, los niveles de expresión endógenos de WASP aumentaban en las primeras fases de la diferenciación (**Figuras 29b y 29e**, carril WT; barra negra (-PMA) vs. barra verde (+PMA). Interesantemente, se pudo observar un incremento similar en las líneas K562\_WASKO-AWW y K562\_WASKO-cAWW, aunque no en la línea K562\_WASKO-WW (**Figura 29g**). En la misma dirección, las líneas K562\_WASKO-AWW y K562\_WASKO-cAWW exhiben una expresión basal (en ausencia de estímulo) más cercana a la fisiológica (**Figuras 29c y 29f ; barras negras WASKO\_AWW; WASKO\_cAWW**) que la línea K562\_WASKO-WW (**Figura 29c; barra negra WASKO\_WW**). Estos datos indican que el promotor alternativo juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de WASP en las primeras fases de la diferenciación megacariocítica. En esta dirección los vectores que contienen solo el proximal de WASP tienen un patrón de expresión contrario al fisiológico en esta estadio.

Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas entre los vectores AWW y cAWW, indicando que el fragmento de 0.38pb era suficiente para revertir la regulación de la expresión de WASP, derivada de los VLs.



**Figura 29. WASP incrementa tras la diferenciación megacariocítica en células K562 y la presencia del promotor alternativo en VLS-WAS mimetiza el patrón. (a, d) La expresión de WASP endógena incrementa tras la diferenciación megacariocítica de células K562.** Las gráficas muestran los niveles de WASP en MFI (a) y porcentaje (d) antes de la diferenciación (barras negras; -PMA) y tras la estimulación con PMA (Barras verdes; +PMA). Los niveles de expresión de WASP se analizaron en la población total (-PMA) y en la población CD41+CD42+ (+PMA) y se normalizaron usando la MFI tras la tinción con el control de isotipo (a) o usando el porcentaje de las células K562WSKO (d). **(b, e) La ausencia del promotor alternativo en VLS-WAS desregula la expresión ectópica de WASP durante la diferenciación megacariocítica en células K562.** Las gráficas muestran los niveles de expresión de WASP endógenos (barra WT) y WASP ectópico (barras WASKO\_WW; WASKO\_AWW; WASKO\_cAWW) antes (barras negras) y después (barras verdes) de la diferenciación megacariocítica medidos como MFI (b) o porcentaje (e). **(c, f) Comparativa del patrón de expresión de WASP de los diferentes vectores en comparación con WASP endógeno tras diferenciación megacariocítica.** Las gráficas muestran el cambio en la expresión de WASP tras la estimulación con PMA y relativizado frente a WT medido en MFI (c) y porcentaje (f). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Las diferencias en el patrón de expresión encontrada en la diferenciación megacariocítica de células K562, donde WASP incrementa y de células MEG-01, donde WASP disminuye, podría ser debido a diferencias en el estado de diferenciación y maduración de los dos tipos celulares. Las células MEG-01 derivan de una leucemia megacarioblástica, donde las células están más comprometidas a linaje megacariocítico, mientras que las células K562, que derivan de una leucemia mielógena aguda, se asemejan más a los precursores megacariocíticos-eritroides. Es posible que la necesidad de WASP sea mayor para la diferenciación *per se* de progenitores megacariocíticos inmaduros (CD42<sup>-</sup>) a poblaciones megacariocíticas más maduras (CD42<sup>+</sup>), que durante la maduración y terminación de la megacariopoyesis.

## 5.4. Objetivo 4: Estudiar el comportamiento de VLs en MKs y PLTs derivados de HSCs.

### 5.4.1. Aislar y diferenciar HSCs a MKs y PLTs.

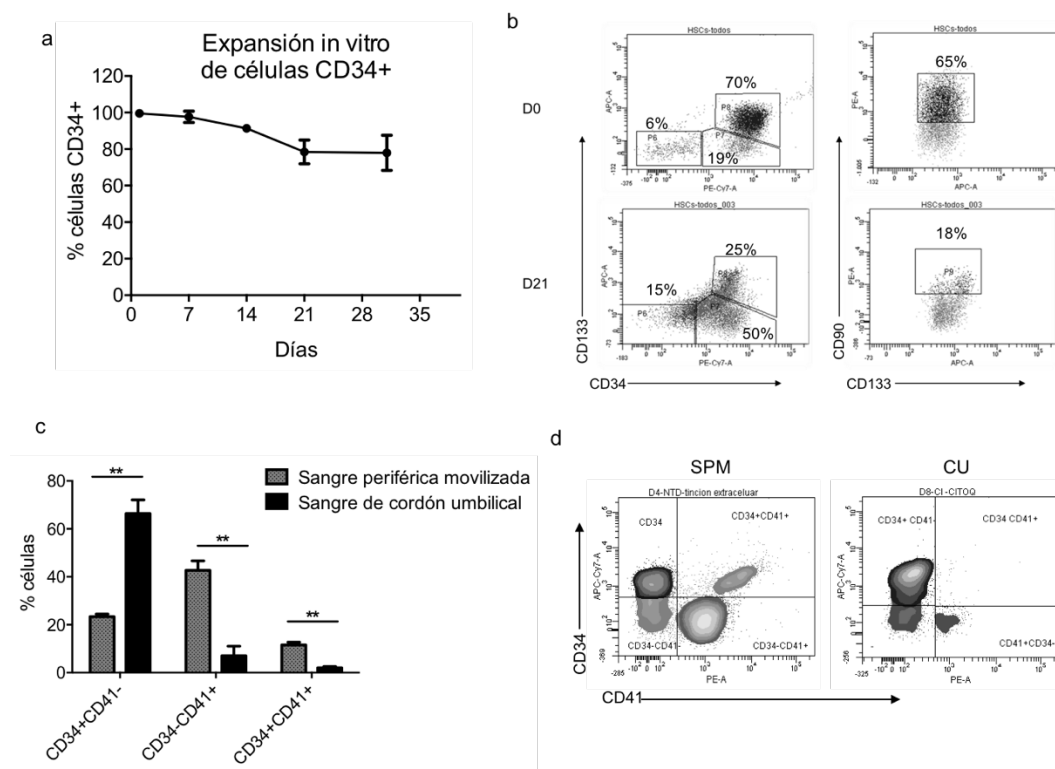
El fenotipo, la pluripotencia y la expansión in vitro de HSCs dependen del origen de las mismas.

Para el aislamiento y cultivo de HSCs se obtuvieron muestras de sangre periférica movilizada (PB) y de sangre de cordón umbilical (CB). Las muestras de sangre periférica fueron proporcionadas por donantes sanos del Servicio de Hematología del Hospital Reina Sofía, Córdoba bajo consentimiento informado y con la autorización del comité ético del Hospital. Por su parte, las muestras de sangre de cordón umbilical provinieron del Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz, previo consentimiento informado de los donantes. El aislamiento se llevó a cabo utilizando bolas magnéticas unidas a anti-CD34, haciendo uso del AutoMacs (Milteny). Tras cada aislamiento se procedió a evaluar la pureza de la muestra (**Figura 30**; D1), superior siempre al 95% de células CD34<sup>+</sup>. Las HSCs CD34<sup>+</sup> se cultivaron utilizando el medio StemSpan (StemCell Technologies) suplementado con SCF, Flt3-L, SR1, UM171, TPO e IL-6 (Fares et al. 2014), consiguiendo expandir y mantener las HSCs CD34<sup>+</sup> durante más de tres semanas, con niveles de CD34<sup>+</sup>, cercanos al 80% (**Figura 30a**).

Para determinar la capacidad *Long Term* (capacidad de repoblar toda la médula ósea), analizamos el fenotipo de las HSCs CD34<sup>+</sup>, atendiendo a la expresión de CD90 y CD133 (Takahashi et al. 2014). Los niveles de CD133 y CD90 disminuyeron desde un 65% (día de aislamiento) hasta un 12%, tras 21 días de cultivo (**Figura 30b**).

Durante los primeros días de cultivo *in vitro*, se observó la aparición temprana de diferentes poblaciones, en base a su expresión de CD34 y CD41 (marcador megacariocítico temprano). Así pues, se establecieron tres poblaciones diferentes: CD34<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup> (células pluripotentes); CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> (precursores megacariocíticos inmaduros); CD34<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup> (precursores megacariocíticos más comprometidos). Curiosamente, observamos que dependiendo del origen de las HSCs (PB o CB) existía mayor o menor balance entre las distintas poblaciones (**Figura 30c**). Se observó que la población de HSCs CD34<sup>+</sup> derivada de PB presentaba mayor porcentaje de células CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>CD41<sup>-</sup>, indicando una mayor presencia de progenitores megacariocíticos en sangre periférica movilizada, que en cordón umbilical, donde la población predominante fue la menos indiferenciada, CD34<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup> (**Figura 30d**). Estos resultados están en línea con el trabajo de Notta *et al.* 2015, donde observaron que la hematopoyesis, y más concretamente, la megacariopoyesis, varía en función del origen de las HSCs, así como del estado del desarrollo del individuo, siendo diferente para HSCs

de hígado fetal, HSCs procedentes de cordón umbilical y HSCs de un individuo adulto (Notta et al. 2015).

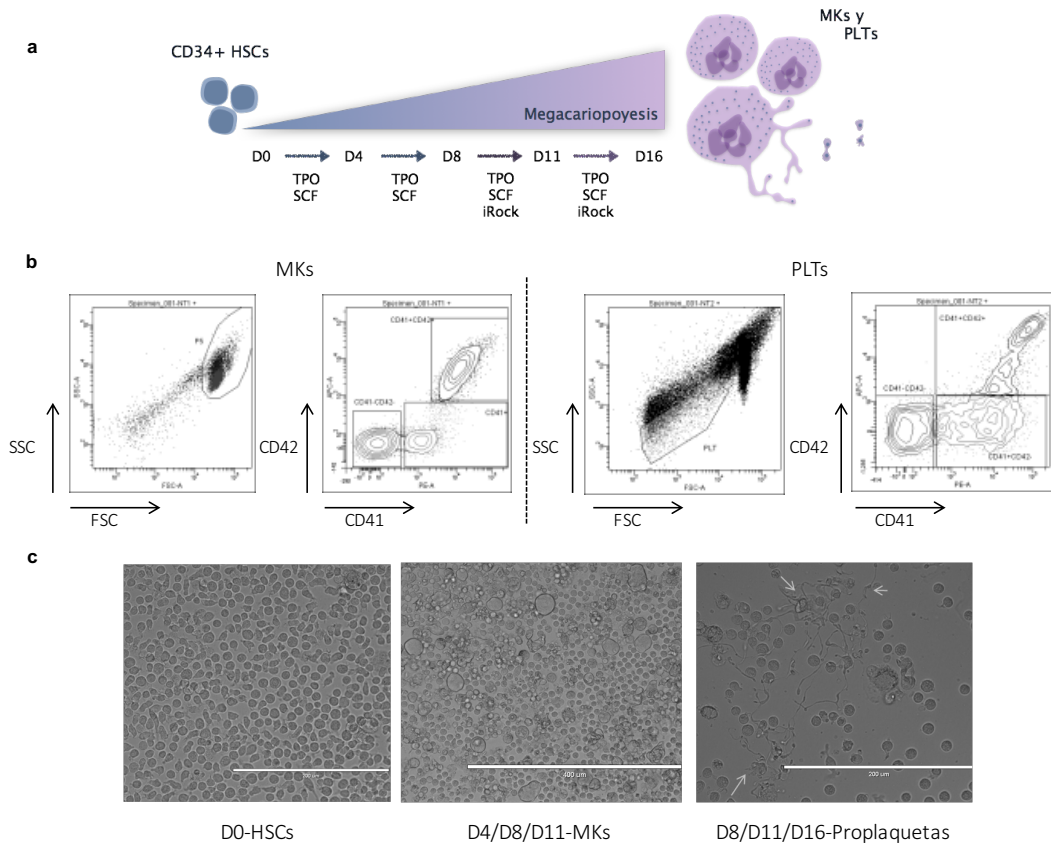


**Figura 30.** Las HSCs mantienen marcadores de pluripotencia tras más de tres semanas en cultivo y la presencia de progenitores megacariocíticos depende del origen de las células CD34<sup>+</sup>. **(a) La expresión de CD34<sup>+</sup> se mantiene durante tres semanas de expansión.** La gráfica muestra el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> tras 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. Las células se aislaron mediante el uso de bolas magnéticas unidas a anti-CD34 y haciendo uso del AutoMacs (Milteny) y se evaluó el porcentaje de expresión de CD34 una vez a la semana, mediante tinción con anti-CD34 y citometría de flujo. **(b) Tras 21 días en cultivo, se mantiene una pequeña población de HSCs con características Long-term (positivas para CD34, CD133 y CD90).** Los plots muestran un ejemplo de estudio de los diferentes marcadores de presentes en las HSCs en cultivo a día 0 (post aislamiento, plots superiores) y tras 21 días de expansión *in vitro* (plots inferiores). **(c) La presencia de precursores megacariocíticos depende de la fuente de aislamiento de las HSCs CD34<sup>+</sup>.** La gráfica muestra el porcentaje de células HSCs CD34<sup>+</sup> más indiferenciadas (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup>), precursores megacariocíticos inmaduros (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>) y células megacariocíticas más comprometidas (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>++</sup>) en células aisladas de sangre de cordón umbilical (barras negras) y en células aisladas de sangre periférica movilizada (barras grises). **(d) Análisis de citometría de la presencia de precursores megacariocíticos.** Se analizó la presencia de células dobles positivas para CD34 y CD41 en poblaciones aisladas de sangre periférica movilizada (PB) y de sangre de cordón umbilical (CB). Los plots de citometría muestran la presencia de las diferentes poblaciones obtenidas atendiendo a la expresión en su superficie de estos dos marcadores (CD34<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>). Los datos que se muestran en las gráficas corresponden a la media ± el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes. \*\*p<0.01.

Las HSCs se diferencian hacia linaje megacariocítico generando MKs y PLTs

## Resultados

Las HSCs  $CD34^+$ , aisladas de PB, CB y BM, se cultivaron en presencia de TPO (50ng/ml) y SCF (5ng/ml) durante 8 días, cambiando el medio cada 4 días. A partir de día 8, al cóctel de citoquinas se añadió iRock, que incrementa la poliploidización de MKs derivados de HSCs y la formación de proplaquetas (Avanzi et al. 2014). Las células se mantuvieron en diferenciación durante 16 días (**Figura 31a**). Las células se recogieron y analizaron a días 0, 4, 8, 11 y 16 de la diferenciación por citometría de flujo, atendiendo a su expresión de marcadores, CD41 (marcador megacariocítico temprano) y CD42 (marcador megacariocítico tardío).



**implica cambios en el tamaño celular y el desarrollo de proplaquetas.** Las imágenes muestran el cambio en la morfología y tamaño de las células presentes en el cultivo, durante la diferenciación megacariocítica.

Tal y como se muestra en la **Figura 31b**, se analizaron las poblaciones celulares en base a su tamaño (FSC) y granularidad (SSC), y por la expresión de los marcadores de superficie. De este modo, se definieron como MKs aquellas células  $SSC^{\text{alto}}FSC^{\text{alto}}CD41^+CD42^+$  y como PLTs  $SSC^{\text{bajo}}FSC^{\text{bajo}}CD41^+CD42^+$ . Durante la diferenciación las células comenzaron a sufrir cambios morfológicos, viéndose el cambio entre los cultivos de HSCs (**Figura 31c; imagen izquierda**) homogéneos, con células pequeñas, redondas y poco granulosas; y los cultivos de MKs (**Figura 31c; imagen central**) donde, desde día 4, comenzaron a observarse células de mayor tamaño, más irregulares y granulares. A partir de día 8, los MKs presentes en el cultivo, comenzaron a desarrollar extensiones de su membrana plasmática, proplaquetas, y a liberar PLTs al medio (**Figura 31c; imagen derecha**).

#### Los MKs y PLTs derivados de HSCs son funcionales y responden a trombina

Para comprobar que los MKs y las PLTs obtenidos *in vitro* a partir de HSCs eran funcionales, analizamos la respuesta de los mismos al estímulo con trombina, analizando diferentes tipos de respuesta. Primero, analizamos si los MKs y PLTs derivados de HSCs eran capaces de activar el receptor de fibrinógeno (heterodímero de las integrinas GP IIb/IIIa). Para ello, teñimos las células con anti-CD42 (para seleccionar MKs y PLTs) y con PAC-1, anticuerpo que reconoce únicamente la forma heterodimerizada del receptor del fibrinógeno. Para confirmar que las células activaban el receptor en respuesta a una señal realizamos estas tinciones en células sin activación y en células estimuladas con trombina (**Figura 32a**). Pudimos observar cómo, tanto en porcentaje de células  $CD42^+PAC-1^+$  (**Figura 32a; gráficas MKs y PLTs de la izquierda**) como en intensidad de fluorescencia de PAC-1 (**Figura 32a; gráficas MKs y PLTs de la derecha**) había un incremento tras la estimulación con trombina. Los datos indican que los MKs y las PLTs generados *in vitro* son capaces de responder a trombina y de activar el receptor de fibrinógeno como respuesta.

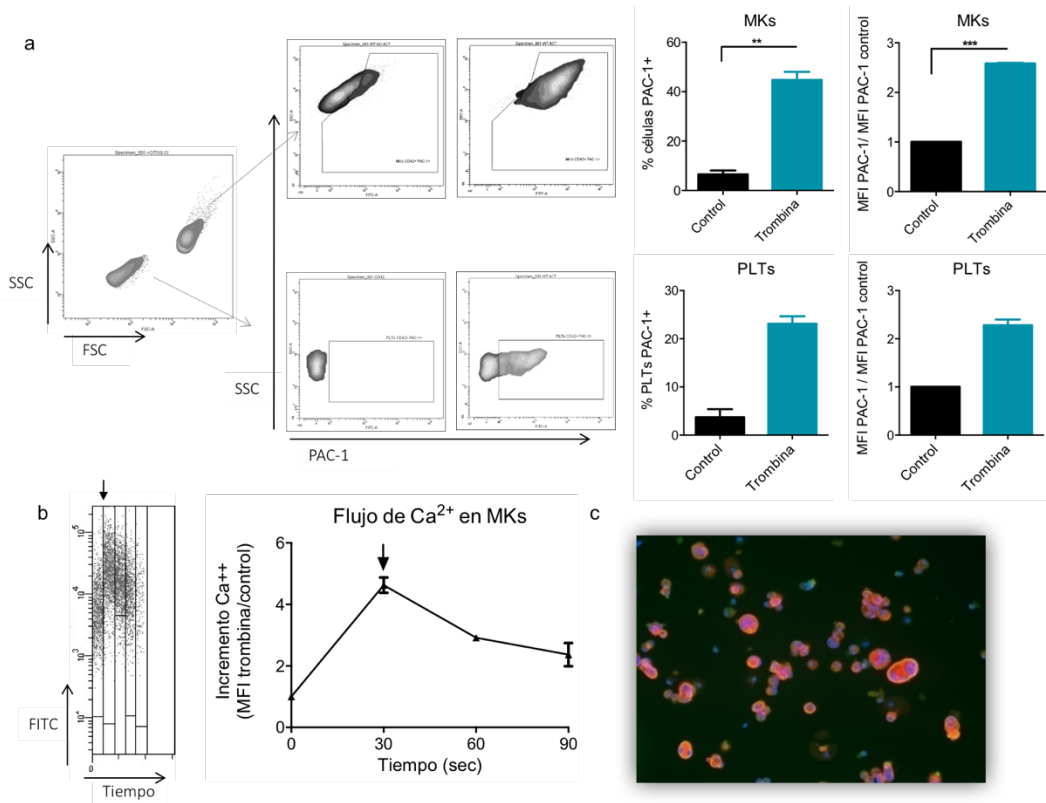
Una manera de estudiar si los MKs generados *in vitro* eran funcionales, fue estudiar su flujo de  $Ca^{2+}$  intracelular tras la estimulación con un agonista, como es la trombina. Nuestros datos demostraron que los MKs derivados de HSCs eran capaces de movilizar  $Ca^{2+}$  intracelular, incrementando sus niveles en respuesta a la trombina (**Figura 32b**).

Lo siguiente que medimos, en relación a la funcionalidad, fue la capacidad de MKs y PLTs derivados de HSCs de adherirse a fibrinógeno. Recogimos las células a D12-D15 de la diferenciación megacariocítica y se sembraron en placas tratadas con fibrinógeno. Las

## Resultados

células fueron estimuladas con trombina e inmunoteñidas con faloidina (rojo; actina), anti-vinculina (verde) y DAPI (azul; núcleos) (**Figura 32c**).

En conjunto, los datos muestran que los MKs y las PLTs obtenidos *in vitro*, tras el cultivo de HSCs con TPO, SCF, e iRock, son MKs y PLTs funcionales, capaces de responder a agonistas, como la trombina, activando el receptor de fibrinógeno, movilizándolo el calcio intracelular y adhiriéndose a fibrinógeno.



**Figura 32. Los MKs y las PLTs derivadas de HSCs *in vitro* son funcionales. (a) Los MKs y las PLTs derivados de HSCs son capaces de activar el receptor del fibrinógeno.** Durante la diferenciación megacariocítica, entre los días 11-16, se recogieron células y se realizó el ensayo de unión a PAC-1 (para más detalles consultar Material y Métodos). Los MKs y las PLTs se seleccionaron en base a su tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (plot de la izquierda). De ambas poblaciones se seleccionaron las células CD42<sup>+</sup> (son las que se muestran en los plots de la derecha) y en ésta se analizó la intensidad de fluorescencia de PAC-1 y el porcentaje de las células PAC-1<sup>+</sup> sin estimulación (plots de la izquierda, arriba MKs y abajo PLTs) y tras estimulación con trombina (plots de la derecha, arriba MKs y abajo PLTs). Las gráficas muestran el porcentaje de MKs PAC-1<sup>+</sup> basales, sin estimulación (gráfica superior izquierda, barra negra) y tras estimular con trombina (gráfica superior izquierda, barra azul). La gráfica superior derecha muestra los niveles de intensidad de PAC-1 en MKs sin estimular (barra negra) y tras la estimulación con trombina (barra azul). Los datos de intensidad de fluorescencia se normalizaron usando la intensidad de fluorescencia derivada de la población CD42<sup>+</sup> sin tinción para PAC-1. Las gráficas inferiores muestran la respuesta de las PLTs a la estimulación con trombina, atendiendo al porcentaje de PLTs CD42<sup>+</sup>PAC-1<sup>+</sup> antes (barra negra) y después (barra azul) de la estimulación

con trombina (gráfica inferior izquierda) y a la intensidad de fluorescencia de PAC-1, en la población CD42+, en situación basal, sin estimular (barra negra) y tras la estimulación con trombina (barra azul) (gráfica inferior derecha). **(b) Los MKs derivados de HSCs movilizan el  $Ca^{2+}$  intracelular tras la estimulación con trombina.** El flujo de  $Ca^{2+}$  se midió por citometría de flujo, usando *Calcium Sensor Dye Fluor 514* a una concentración final de  $5\mu\text{mol/l}$ . Los datos representan el incremento de los niveles de calcio después de la estimulación con trombina sobre los niveles de calcio basal, medidos por la intensidad de fluorescencia del sensor de calcio. La adición de la trombina (2U/ml) se indica con la flecha. El plot de la derecha muestra un ejemplo de análisis por citometría de la medida de calcio intracelular, tras estimulación con trombina. Las células se tiñeron con CD41 y CD42, y escogiendo la población de MKs, tal y como se ha descrito en la Figura 14, se analizaron los niveles de calcio basales, durante adquisición continuada durante 30 segundos. Tras esto se detuvo la adquisición y se estimularon los MKs con trombina y se retomó la adquisición durante 2-3 minutos. En la gráfica de la derecha se muestra la respuesta del calcio intracelular tras la estimulación con trombina. **(c) MKs y PLTs derivados de HSCs se adhieren a fibrinógeno y expresan vinculina.** La imagen muestra una Inmunofluorescencia realizada de MKs y PLTs, a día 12 de la diferenciación. Las células se recogieron y se sembraron en placas tratadas con fibrinógeno y se estimularon con trombina. Tras esto se procedió a la inmunotinción con Faloidina (rojo; actina), DAPI (azul; núcleos) y anti-vinculina (verde). Las imágenes fueron realizadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 880.

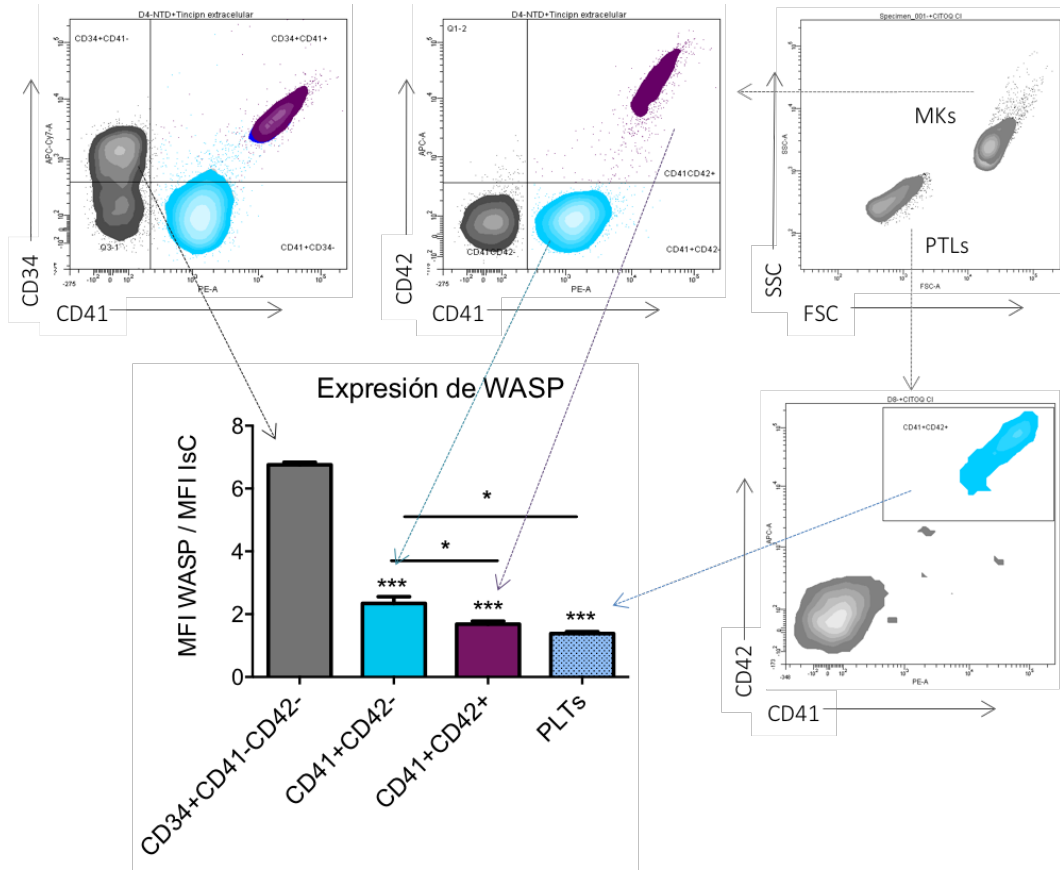
#### 5.4.2. Analizar el perfil de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica y producción de las PLTs.

*La expresión de WASP disminuye durante la megacariopoyesis y la producción de las PLTs.*

Tras ser capaces de diferenciar las células HSCs a MKs y producir PLTs funcionales, nos dispusimos a analizar el perfil de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica. Para ello recogimos las células a días D0, D4, D8, D11 y D16 y las teñimos con anticuerpos anti-CD34, anti-CD41, anti-CD42 y anti-WASP. Analizamos las células en base a su tamaño (FSC), granularidad(SSC) y expresión de los marcadores de superficie, estableciendo de este modo tres poblaciones de análisis:  $\text{SSC}^{\text{medio}}\text{FSC}^{\text{medio}}\text{CD34}^+\text{CD41}^-\text{CD42}^-$  para definir la población de HSCs indiferenciadas;  $\text{SSC}^{\text{alto}}\text{FSC}^{\text{alto}}\text{CD34}^-\text{CD41}^+\text{CD42}^-$  que correspondía a precursores megacariocíticos;  $\text{SSC}^{\text{alto}}\text{FSC}^{\text{alto}}\text{CD41}^+\text{CD42}^+$  para definir la población de MKs maduros  $\text{SSC}^{\text{bajo}}\text{FSC}^{\text{bajo}}\text{CD41}^+\text{CD42}^+$  representando las PLTs (**Figura 33; plots explicativos**). Tras establecer todas las poblaciones de análisis, estudiamos en las mismas la expresión de WASP, normalizando la intensidad media de fluorescencia (MFI) de WASP con la intensidad media de fluorescencia resultada de la tinción con el control de isotipo, para cada una de las poblaciones (para más detalles ver Material y Métodos). Los datos obtenidos mostraron que la expresión de WASP decrece durante la diferenciación megacariocítica, siendo menor conforme mayor es la diferenciación y maduración en linaje megacariocítico, de forma significativa (**Figura 33; gráfica**).



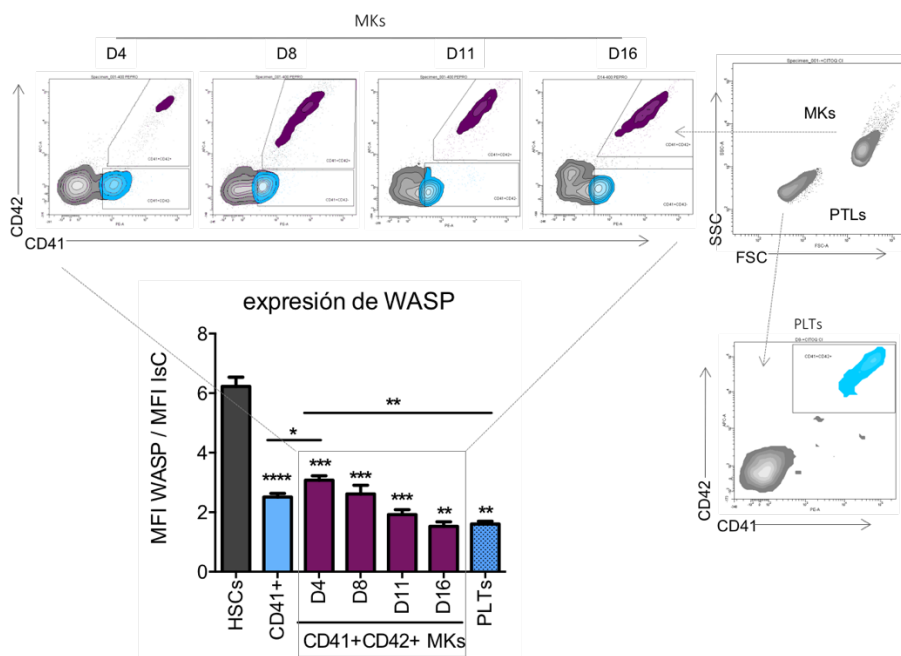
## Resultados



**Figura 33. La expresión de WASP disminuye durante la diferenciación megacariocítica y la producción de PTLs.** Analizamos por citometría de flujo los niveles de expresión de WASP, en las diferentes poblaciones presentes durante la diferenciación megacariocítica, atendiendo a su expresión en superficie del marcador de pluripotencia CD34 y de los marcadores megacariocíticos específicos CD41 y CD42: células HSCs pluripotentes ( $CD34^+CD41^-CD42^-$ ), células precursoras megacariocíticas ( $CD41^+CD42^-$ ), MKs ( $CD41^+CD42^+$ ) y PTLs ( $CD41^+CD42^+$ ). El análisis de los niveles de expresión se llevó a cabo tal y como se ha detallado en Material y Métodos. Se escogieron las poblaciones celulares en función de su tamaño (FSC) y granularidad (SSC), tal y como se ha descrito en la Figura 14, y analizó la expresión de WASP en las poblaciones descritas. Los plots muestran las poblaciones seleccionadas y analizadas, en función de su expresión de los marcadores CD34, CD41 y CD42. La gráfica muestra los niveles de expresión de WASP en HSCs  $CD34^+$  (barra gris oscura), precursores megacariocíticos  $CD41^+CD42^-$  (barra azul claro), MKs  $CD41^+CD42^+$  (barra burdeos) y las PTLs (barra azul punteada). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cinco experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Los datos representados en la **Figura 33** incluía como población de MKs las células  $CD41^+CD42^+$  presentes en todos los días de análisis (D4, D8, D11 y D16). Dado que los MKs presentes en el cultivo a D4, morfológicamente eran más pequeños e inmaduros que a día 11 y 16, donde los MKs comenzaron a extender proplaquetas y liberar PTLs en el medio, decidimos estudiar el patrón de expresión de WASP a lo largo de la diferenciación y maduración de los MKs (**Figura 34**). Los datos obtenidos mostraron que, durante la

maduración megacariocítica, la expresión de WASP decrecía, siendo la expresión de WASP de los MKs a día 16 muy similares a los niveles de WASP encontrados en las PLTs (**Figura 34, gráfica**), lo cual tiene sentido, puesto que las PLTs son el producto final de los MKs. Curiosamente estos datos están en línea con los encontrados en la maduración megacariocítica de la línea celular MEG-01, tras estimular las células con VPA (**Figura 26**). Habíamos observado también que la expresión de WASP iba en aumento tras la diferenciación megacariocítica en células K562, tras la estimulación con PMA. Nuestra hipótesis fue que la diferencia del estado de compromiso y maduración de las células podía influir en la expresión de WASP y en su patrón de expresión. Tal y como se observa en la **Figura 33**, existe un pequeño incremento, significativo, en la expresión de WASP entre la población de progenitores megacariocíticos (CD41+CD42-; **Figura 34; barra azul CD41**) y los MKs CD41+CD42+ más inmaduros de día 4 (**Figura 34; primera barra morada; D4**). Estos datos sugieren que, en efecto, el patrón de expresión de WASP depende del estado de maduración de las células en linaje megacariocítico. Además, el hecho de que los patrones de expresión encontrados en las líneas celulares inmortalizadas K562 y MEG-01 mimeticen el perfil de expresión de células de linaje megacariocítico derivadas de HSCs, indica que las líneas humanas inmortalizadas utilizadas reflejan el patrón fisiológico de WASP, siendo un buen modelo para el estudio del comportamiento de los diferentes VLs.

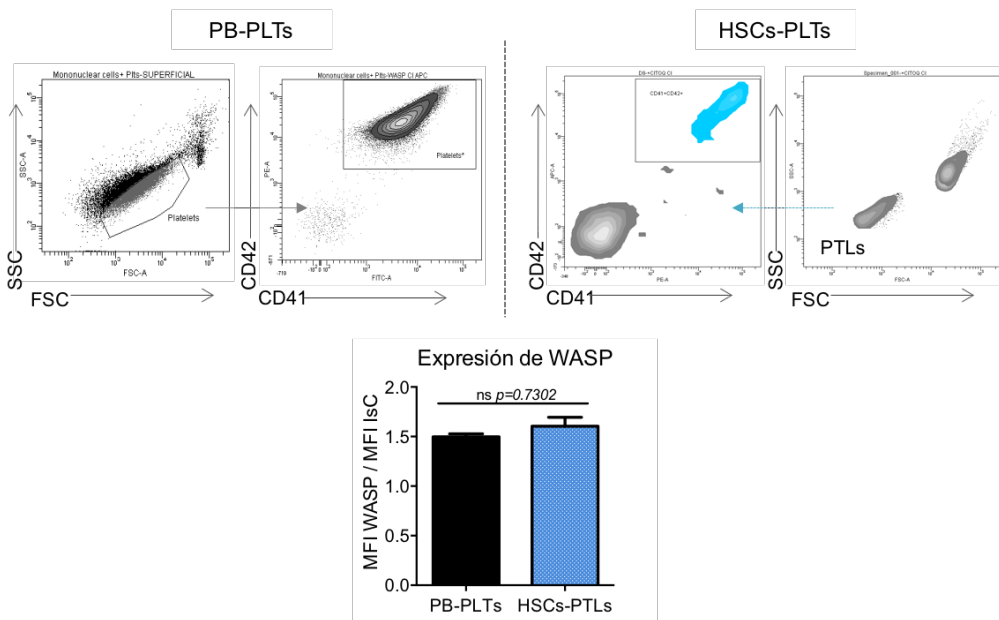


**Figura 34. La expresión de WASP disminuye durante la maduración megacariocítica.** Las células se recogieron durante la diferenciación megacariocítica, a partir de HSCs CD34<sup>+</sup>, a días 4, 8, 11 y 16 de la diferenciación y se analizaron por citometría de flujo, atendiendo a su expresión, en superficie, de

## Resultados

marcadores megacariocíticos específicos, CD41 y CD42, y los niveles intracelulares WASP. Se establecieron las mismas poblaciones que en la Figura 16, pero las poblaciones de MKs CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> se analizaron por separado, en función del día de la diferenciación. El plot superior derecha muestra la selección de las poblaciones de MKs y PLTs, en base a su tamaño y granularidad (como se ha descrito en la Figura 14). Los cuatro plots superiores muestran la evolución de la población de MKs CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, a lo largo de la diferenciación. El plot inferior de la derecha muestra la población de PLTs CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, donde se analizó la expresión de WASP. En la gráfica se muestran los niveles de expresión de WASP en las diferentes poblaciones establecidas. Los datos de los niveles de expresión fueron analizados como se ha descrito en Material y métodos. Las MFI de WASP en las diferentes poblaciones fueron normalizadas usando la MFI, en las mismas poblaciones, resultadas de la tinción con el control de Isotipo (IsC). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cinco experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Para analizar si la expresión de WASP encontrada en las PLTs derivadas de HSCs mimetizaba la expresión fisiológica de WASP en PLTs de sangre periférica, aislamos PLTs de sangre y estudiamos la expresión de WASP por citometría de flujo. Los datos obtenidos demostraron que no había diferencias significativas entre la expresión de WASP en PLTs de sangre periférica y la expresión de WASP en PLTs producidas *in vitro* a partir de HSCs (Figura 35). Estos datos indica que las PLTs derivadas de HSCs mimetizan la expresión fisiológica de WASP y hace de las HSCs y del protocolo de diferenciación megacariocítico herramientas aptas para el estudio del comportamiento de VLs durante la megacariopoyesis y trombopoyesis.



**Figura 35. Las PLTs producidas *in vitro* tienen los mismos niveles de expresión de WASP que las PLTs de sangre periférica.** Se aislaron PLTs y células blancas, de sangre periférica, para imitar las condiciones de tinción intracelular de WASP, llevadas a cabo con las PLTs derivadas de HSCs. Las células se tiñeron con CD41 y CD42 y se analizaron por citometría de flujo. Se seleccionaron las PLTs por tamaño (FSC) y granularidad

(SSC), y por su expresión de CD41 y CD42, siendo éstas pequeñas y poco granulosas, y dobles positivas CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>. Se analizó la intensidad de fluorescencia de WASP en la población doble positiva, y se normalizaron los datos frente a la intensidad de fluorescencia derivada de la tinción con el control de isotipo (IsC). La gráfica muestra los niveles de expresión de las PLTs aisladas de sangre periférica (barra negra; PB-PLTs) y las producidas *in vitro* a partir de HSCs (barra azul moteada; HSCs-PLTs). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cuatro experimentos independientes.

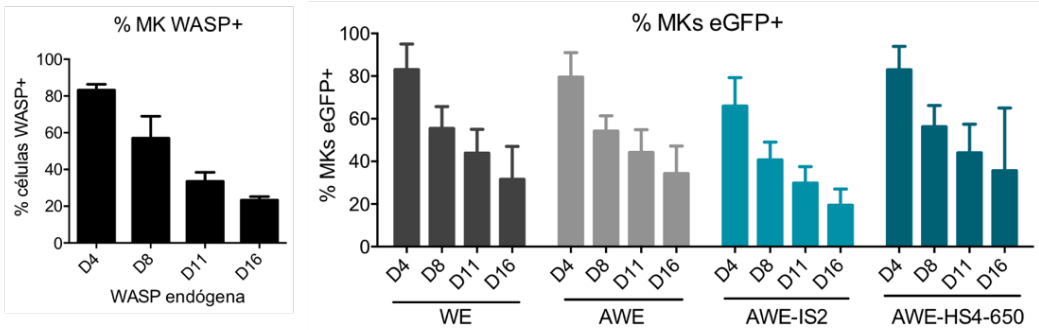
### 5.4.3. Estudiar el comportamiento de VLs reporteros, durante megacariopoyesis y trombopoyesis

#### Los VLs reporteros mimetizan el perfil de expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica

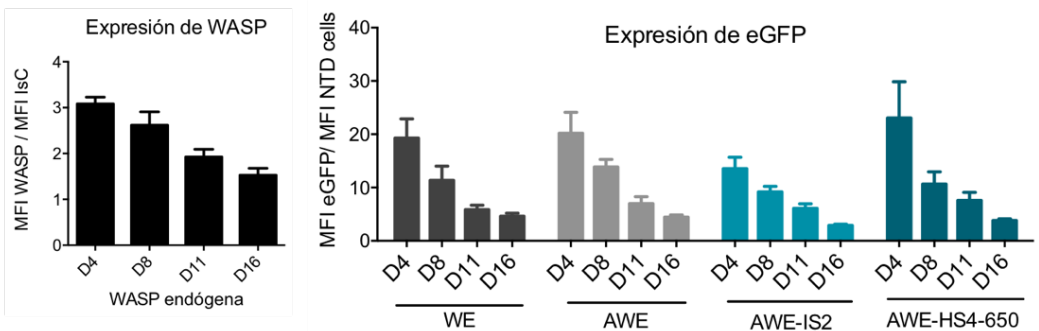
Como primera aproximación para el estudio de los VLs, transdujimos las HSCs con VLs reporteros, regulando la expresión de eGFP bajo diferentes promotores endógenos de WAS (Figura 22). Tras la transducción de las HSCs se inició el protocolo de diferenciación megacariocítica, tal y como se ha descrito en Material y Métodos y en la Figura 31, analizando los MKs a días D0, D4, D8, D11 y D16 de la diferenciación. Los datos obtenidos mostraron que la expresión de eGFP derivada de los diferentes VLs mimetizaba el perfil de expresión de WASP tanto en porcentaje de MKs WASP+ (Figura 36a) como en niveles de expresión (Figura 36b). Efectivamente se puede observar como la expresión de eGFP de los diferentes VLs a lo largo de la diferenciación megacariocítica (Figura 36a y 36b; gráficas de la derecha) sigue el mismo patrón que la expresión de WASP endógeno (Figura 36a y 36b; gráficas de la izquierda). No se observaron diferencias significativas entre los diferentes VLs reporteros (WE; AWE; AWE-IS2; AWE-HS4-650). Atribuimos esta ausencia de diferencias a la expresión del gen reportero, y no por los diferentes promotores endógenos de WAS, dado que se sabe que el propio cDNA de WAS contiene secuencias reguladoras, participando en el control y modulación de su expresión, derivada de VLs (Toscano et al. 2009).

## Resultados

a



b



**Figura 36. La expresión de eGFP derivada de VLs reporteros mimetiza el patrón de expresión de WASP, durante la diferenciación megacariocítica. (a) Los VLs-eGFP mimetizan el comportamiento de WASP endógeno.** Las gráficas muestran el porcentaje de MKs  $CD41^+CD42^+WASP^+$  (gráfica izquierda) y el porcentaje de MKs  $CD41^+CD42^+eGFP^+$  (gráfica derecha) a diferentes días de la diferenciación megacariocítica (días D4, D8, D11 y D16). **(b) Los niveles de expresión de eGFP, derivados de los VLs reporteros, disminuyen durante la maduración megacariocítica, al igual que lo hace WASP endógena.** Las gráficas muestran los niveles de expresión de WASP endógena durante la maduración megacariocítica (gráfica izquierda) y los niveles de expresión de eGFP en células transducidas con los VLs reporteros (gráfica derecha). Las células se recogieron a días D4, D8, D11 y D16 de la diferenciación y se analizaron por citometría de flujo. Los datos de expresión de WASP se analizaron en la población  $CD41^+CD42^+$ , y se normalizaron frente a la intensidad de fluorescencia derivada de la tinción con el control de isotipo. Los datos de expresión de eGFP se analizaron en la población  $CD41^+CD42^+eGFP^+$ , y se normalizaron frente a la intensidad de fluorescencia en la población  $CD41^+CD42^+$  de células no transducidas. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cuatro experimentos independientes.

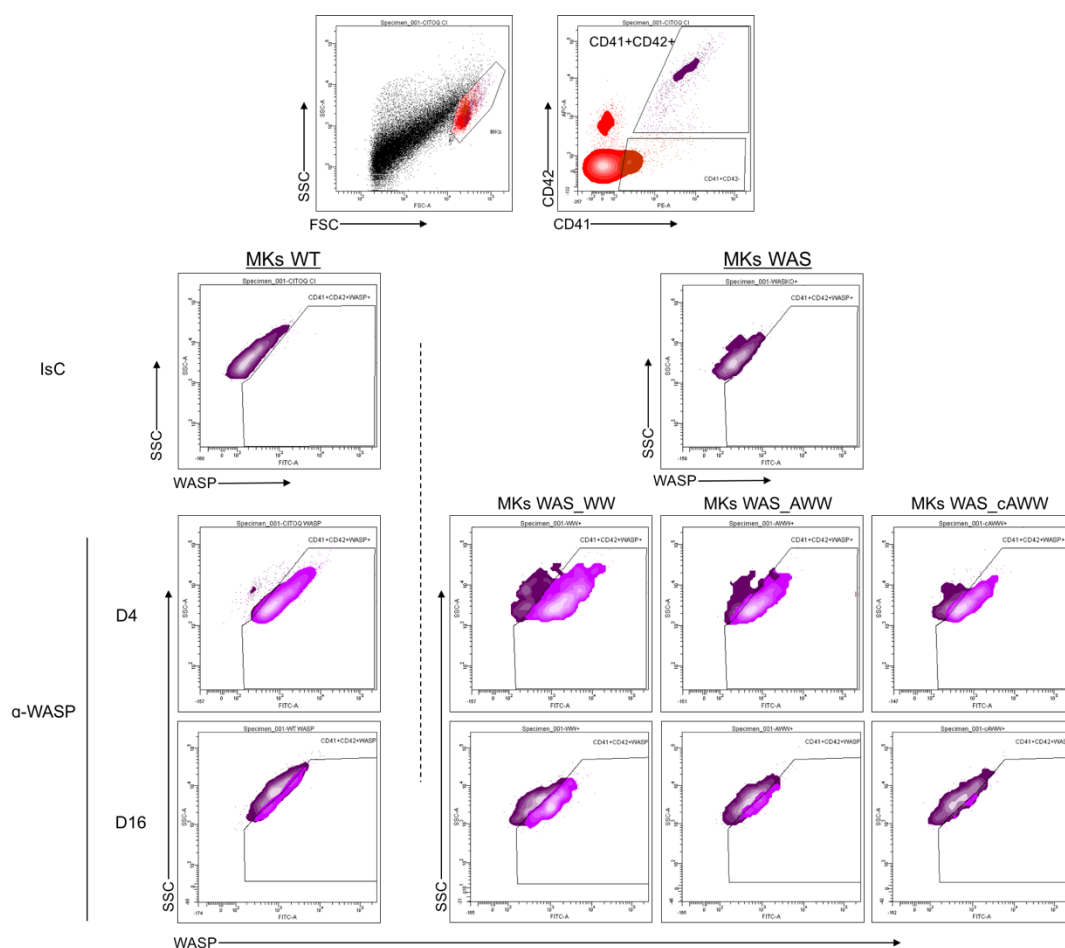
### 5.4.4. Comparar el comportamiento de VLs-WAS durante megacariopoyesis y trombopoyesis. Rescate funcional

#### 5.4.4.1. Vectores lentivirales de segunda generación.

Existen numerosas dificultades para la obtención de muestras de HSCs de pacientes WAS. De ahí la necesidad de trabajar con modelos celulares, para llevar a cabo los estudios preliminares. Sin embargo, los estudios para comparar el mejor vector

terapéutico para conseguir mejores niveles fisiológicos de expresión deberían hacerse en HSCs. Afortunadamente, pudimos contar con una muestra de HSCs, de médula ósea, de paciente WAS con fenotipo severo debido a la ausencia completa de WASP como resultado de la mutación c.58C>T, en el DNA, que resulta en una mutación sin sentido en la proteína (p.Q20X), que introduce un codón de stop prematuro, generando una proteína más corta, no funcional. Esta mutación había sido descrita previamente en dos hermanos ucranianos, con fenotipo WAS severo (Boztug et al. 2008)

Se transdujeron las HSCs de paciente con los tres VLs WW; AWW; cAWW (**Figura 23**) y se analizó el número de integraciones de VLs por célula mediante RT-qPCR (**Figura 38a**), obteniendo 4 copias/célula en las células WAS\_WW, 6 copias/células en células WAS\_AWW y 6 copias/célula en HSCs WAS\_cAWW.



**Figura 37. Detección de WASP mediante citometría de flujo en MKs.** La figura muestra el análisis de expresión de WASP (endógena y ectópica) mediante citometría de flujo, en la población de MKs (CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, grandes y granulosa). Como controles de la tinción se usaron el control de isotipo (IsC) y MKs de paciente WAS. En la figura se muestran, como ejemplo, las poblaciones de MKs el primer día de aparición (D4) y el último día de análisis (D16).

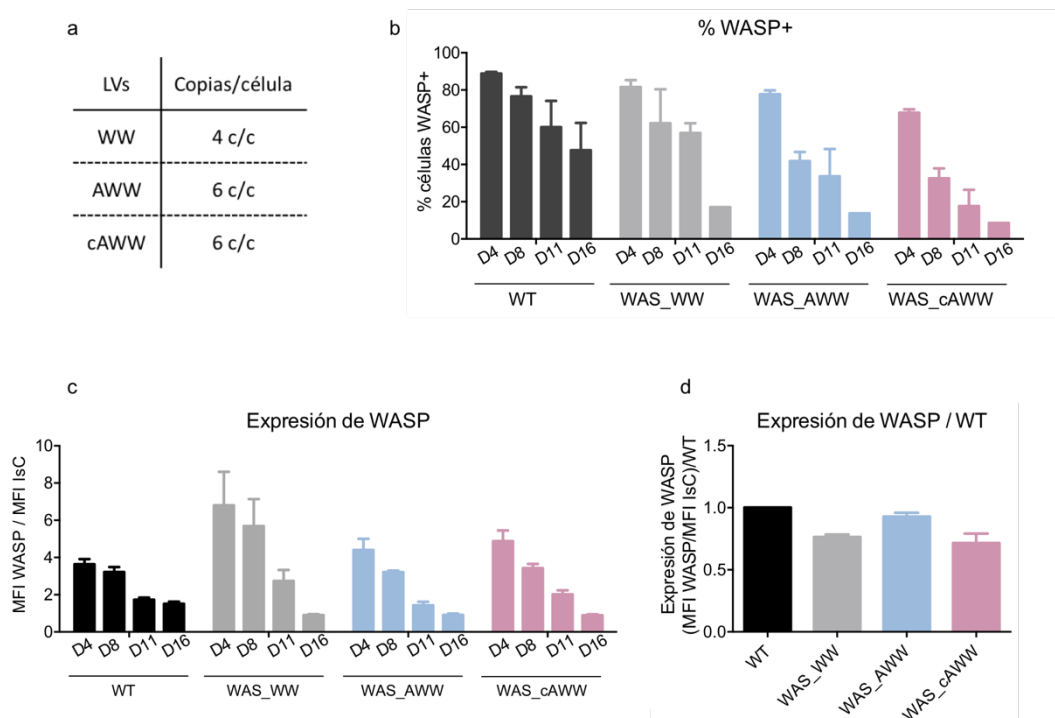
## Resultados

El estudio de la expresión de WASP mediante citometría de flujo no permite separar por completo las poblaciones WASP<sup>+</sup> de las WASP<sup>-</sup> (**Figura 37**) y una reducción en los niveles de expresión de las WASP<sup>+</sup> hace que estas células expresoras pasen a la población WASP<sup>-</sup>, reduciéndose el porcentaje de WASP<sup>+</sup>. En definitiva, al medir el porcentaje de WASP<sup>+</sup> realmente lo que estamos viendo son cambios en los niveles de expresión de las células transducidas así como posibles células que hayan silenciado por completo la expresión del VL. Sin embargo, cuando analizamos los niveles de expresión de WASP en base a la intensidad media de fluorescencia de las células transducidas CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>WASP<sup>+</sup> (**Figura 38c**) hay que tener en cuenta dos limitaciones importantes: 1- no se tienen en cuenta las células donde ocurra un silenciamiento completo (puesto que la célula pasa a la región WASP<sup>-</sup>, será considerada como célula no transducida y por tanto no será considerada para el MFI). 2- Tampoco contaremos las células donde, al disminuir la expresión de WASP debido a la diferenciación megacariocítica, caigan en la región WASP<sup>-</sup>. Por tanto, en nuestro modelo hemos tenido en cuenta tanto el porcentaje como el MFI para poder detectar cambios en la expresión de las células transducidas siendo el porcentaje el modo más sensible de detectar dichos cambios.

### La presencia del promotor alternativo en VLs-WAS mejora la expresión de WASP en PLTs

Tras la transducción se procedió a la diferenciación megacariocítica y se analizó la expresión de WASP, CD41 y CD42 a días D4, D8, D11 y D16 de la diferenciación, tanto en MKs como en PLTs. Los datos revelaron que el comportamiento de todos los VLs-WAS, regulados por los diferentes promotores de WAS mimetizaban el comportamiento fisiológico de WASP, observándose un descenso tanto en el porcentaje (**Figura 38b**) como en los niveles de expresión (**Figura 38c**) de WASP a lo largo de la diferenciación.

Finalmente, analizamos la expresión de WASP en las PLTs derivadas de HSCs WT (**Figura 38d; barra negra**), HSCs WAS\_WW (**Figura 37d; barra gris**), HSCs WAS\_AWW (**Figura 37e; barra azul**) y HSCs WAS\_cAWW (**Figura 38e; barra rosa**). Los datos de expresión de WASP en plaquetas se relativizaron frente a la expresión de WASP en PLTs WT. Un ratio = 1 indicó ausencia de diferencias. Los datos mostraron que la expresión de WASP en PLTs WAS\_AWW se asemejaba más a la expresión fisiológica de WASP (ratio = 0.92), que en PLTs WAS\_WW y WAS\_cAWW (ratios = 0.76 y 0.72, respectivamente). Estos datos sugieren que la presencia del promotor alternativo truncado mimetiza mejor la expresión fisiológica de WASP en PLTs. La disminución observada en la expresión de WASP en células HSCs WAS\_cAWW sugiere que la presencia de dos sitios de unión para el represor de la transcripción GCF en el promotor alternativo completo (Hagemann & Kwan 1999) podría influir negativamente en la expresión de WASP en PLTs.



**Figura 38.** La presencia del promotor alternativo en VLs-WAS conlleva una expresión más fisiológica de WASP en PLTs. (a) **Número de integraciones de los VLs en las células de paciente WAS transducidas.** Se transdujeron las células con el mismo volumen de partículas virales y se analizó en número de integraciones mediante RT-qPCR. (b) **Las células WAS transducidas con los VLs-WAS rescatan la expresión de WASP y mimetizan el comportamiento de la proteína WASP endógena.** La gráfica muestra el porcentaje de MKs WASP+, por expresión endógena en células WT (grupo WT, barras negras), como por transducción de células HSCs de pacientes WAS (grupos WAS\_WW; WAS\_AWW; WAS\_cAww). Las células del paciente WAS (c.58C>T p.(Gln20\*)) se purificaron de médula ósea, en Londres, en el *Institute of Child Health (ICH)*, se transdujeron con los tres VLs y se diferenciaron a MKs. (c) **La expresión de WASP ectópica decrece durante la maduración megacariocítica, al igual que lo hace la proteína endógena.** La gráfica muestra los niveles de expresión de WASP endógena (grupo WT, barras negras) y los niveles de expresión de la proteína WASP ectópica, derivada de la transducción de células HSCs de pacientes WAS con los VLs (grupo WAS\_WW; WAS\_AWW; WAS\_cAww). Los datos de niveles de expresión de WASP se analizaron en la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> en células WT, y en la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>WASP<sup>+</sup> en células WAS transducidas con los VLs. En todos los casos los niveles de expresión se normalizaron con la intensidad de fluorescencia resultado de la tinción con el control de isotipo (IsC). (d) **La expresión de WASP, derivada del VL AWW, se asemeja más a la expresión fisiológica de WASP, en PLTs.** La gráfica muestra los niveles de expresión de WASP en PLTs, normalizados frente a la intensidad de fluorescencia derivada de la tinción con el control de isotipo (en células WT, barra negra) y frente a la intensidad de fluorescencia de WASP en PLTs derivadas de las células de los pacientes WAS (en células WAS transducidas; WAS\_WW; WAS\_AWW; WAS\_cAww). Los datos, a su vez, están relativizados frente a los niveles de expresión de WASP en las PLTs WT. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos independientes.

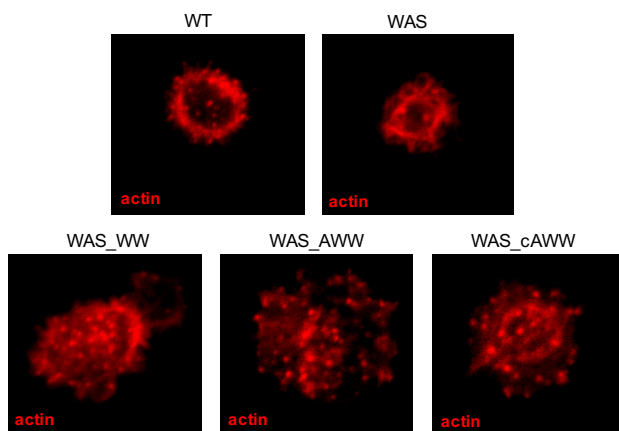
Curiosamente, a pesar de que se observa una expresión de WASP mayor en MKs WAS\_WW que en MKs WAS\_AWW (Figura 38c, barras grises versus azules, D4), la expresión en PLTs con el vector WW fue menor que la fisiológica y que la derivada del



vector AWW (Figura 38d). Se observa, por tanto, una tendencia en cuanto a la mejoría de la expresión ectópica de WASP derivada del VL AWW, lo cual implicaría que la presencia del fragmento de 0,38kb del promotor alternativo en los VLs-WAS regula de forma más fisiológica la expresión de WASP.

La expresión ectópica de WASP en HSCs WAS rescata la formación de nódulos de actina en PLTs.

Dado que se ha descrito que la ausencia de WASP en PLTs, tanto en pacientes WAS como en PLTs de modelos animales WASKO, impide por completo la formación de nódulos de actina (Poulter et al. 2015) nos dispusimos a analizar si la transducción con los VLs-WAS de células HSCs WAS rescataba la capacidad de la formación de los mismos. Estos nódulos de actina son las estructuras que se forman tras el primer contacto entre PLT-sustrato y PLT-PLT, y su ausencia afecta a la agregación plaquetaria, sobre todo en situaciones fisiológicas donde existe un fuerte flujo sanguíneo. Recogimos las PLTs a días D12-D15 de la diferenciación y las sembramos en placas tratadas con fibrinógeno, y las cultivamos 30 minutos, en ausencia de estímulo, para permitir la formación de estas estructuras ricas en actina, evitando la adhesión completa de las PLTs al sustrato, resultado de activar las PLTs con un agonista. Las PLTs se tiñeron con faloidina (rojo; actina) y se analizaron con microscopía confocal. Como se observa en la **Figura 39**, la expresión ectópica de WASP permitió el rescate de la capacidad de las PLTs para formar nódulos de actina.



**Figura 39. La expresión ectópica de WASP en células HSCs de paciente WAS rescata la formación de nódulos de actina en PLTs.** Se recogieron PLTs a días 11-15 de la diferenciación megacariocítica y se realizó en el ensayo de formación de nódulos de actina (para más detalles consultar Material y Métodos). Las PLTs se tiñeron con faloidina (rojo; actina). La presencia de nódulos de actina (acumulaciones discretas de actina) está restringido a PLTs WT (imagen superior izquierda), mientras que las PLTs WAS son incapaces de formarlos (imagen superior derecha). Tras la transducción de las HSCs de paciente WAS, las PLTs rescataron la capacidad para formar los nódulos, con los tres VLs (imágenes inferiores; WAS\_WW; WAS\_AWW;

WAS\_cAWW). Se hizo un primer estudio cualitativo de presencia/ausencia de nódulos, estando éstos siempre ausentes en las PLTs WAS.

#### **5.4.4.2. Vectores lentivirales de tercera generación**

##### La presencia del promotor alternativo de 0.38kb en el VL clínico (tercera generación) mimetiza el perfil de expresión fisiológico de WASP

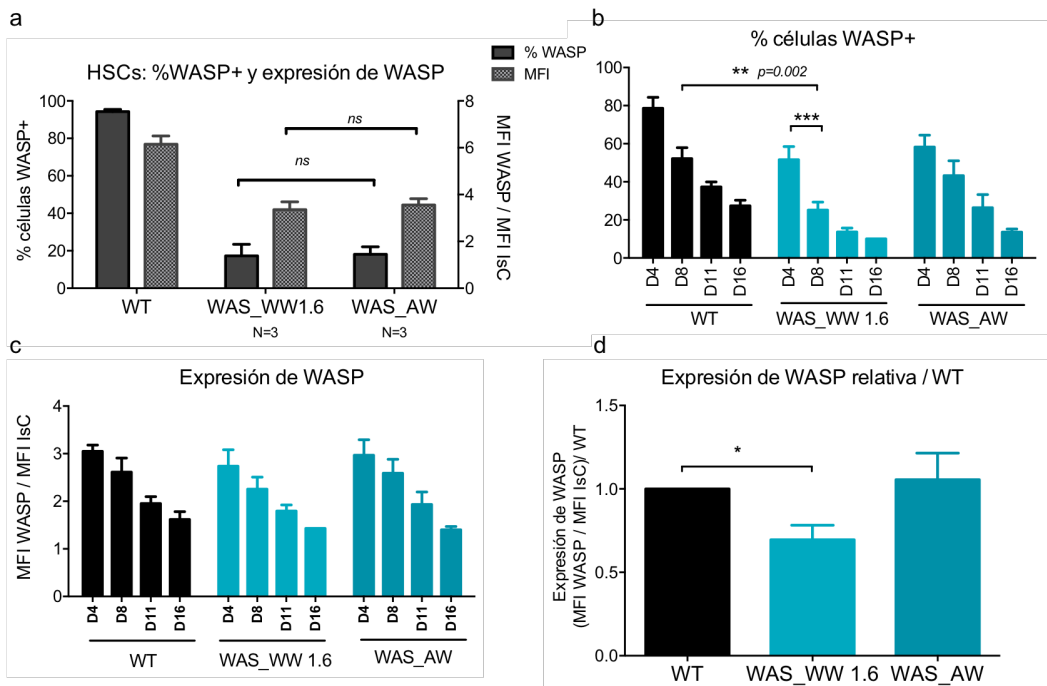
Dado que la presencia del promotor alternativo completo moduló negativamente la expresión de WASP en PLTs, debido, probablemente, a la presencia de sitios de unión para el represor de la transcripción GCF (Hagemann & Kwan 1999), decidimos centrarnos en el promotor alternativo de 0.38kb, que carece de estos sitios. Se procedió por tanto a comparar el actual VL clínico WW1.6 (el cual regula la expresión de WAS bajo el promotor proximal endógeno de WAS completo), con el VL clínico AW (que controla la expresión de WAS bajo la combinación de un fragmento de 0,5kb del promotor proximal y un fragmento de 0,38kb del promotor alternativo). Para ello transdujimos las HSCs de paciente WAS con ambos VLs clínicos, esquematizados en la **Figura 24**. Para confirmar que las células transducidas con ambos VLs (WAS\_WW1.6 y WAS\_AW) eran comparables entre sí, analizamos el porcentaje de células HSCs WASP<sup>+</sup>, así como los niveles de expresión de WASP (**Figura 40a**). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células WASP<sup>+</sup>, en las células WAS\_WW1.6 y WAS\_AW, indicativo de niveles de transducción similares, por lo que procedimos a seguir con los estudios comparativos del comportamiento de los dos vectores en estas células.

En primer lugar se procedió a analizar el patrón de expresión de WASP de los vectores AW y WW1.6 durante la megacariopoyesis. Para ello se procedió a diferenciar las células WAS\_WW1.6 y WAS\_AW hacia el linaje megacariocítico y se analizó el porcentaje y los niveles de expresión de WASP en MKs a días D4, D8, D11 y D16. Los datos mostraron una disminución del porcentaje de MKs WASP<sup>+</sup> en las células de paciente transducidas con los vectores WW1.6 (**Figura 40b, WAS\_WW1.6, D8**) que no se observó ni en las células WT ni en las células de paciente transducidas con los vectores AW (**Figura 40b, WT y WAS\_AW, D8**) indicando un comportamiento más fisiológico de este último. Sin embargo, cuando analizamos los niveles de expresión de WASP (medida a partir del MFI de la región WAS+) en los MKs observamos el mismo patrón en los MKs derivados de HSCs WAS\_WW1.6 como los derivados de HSCs WAS\_AW (**Figura 40c**). El hecho de que observemos diferencias significativas en cuanto al comportamiento de los dos VLs cuando medimos el porcentaje de células WASP<sup>+</sup> pero no cuando medimos los niveles de expresión de WASP, puede ser debido al tipo de análisis realizado y a la sensibilidad de ambas formas de medir. Efectivamente, como se ha comentado anteriormente, los análisis no permiten separar por completo las poblaciones WASP<sup>+</sup> de las WASP<sup>-</sup>, (**Figura 37**). Por lo que en nuestro modelo hemos tenido en cuenta tanto el porcentaje como el

## Resultados

MFI para poder detectar cambios en la expresión de las células transducidas, siendo el porcentaje el modo más sensible de detectar dichos cambios. Teniendo en cuenta todos estos factores podemos decir que el vector de tercera generación AW regula mejor la expresión de WASP en los días tempranos de la maduración megacariocítica.

Uno de los aspectos más importantes de este trabajo es mejorar el perfil de expresión de los VLs terapéuticos en plaquetas de pacientes con WAS. Para estudiar este aspecto se procedió a analizar la expresión de WASP en PLTs derivadas de las células HSCs WT, WAS\_WW1.6 y WAS\_AW los días D8, D11 y D16 de la diferenciación megacariocítica. Los niveles de expresión de WASP en las PLTs derivadas de las células WAS\_WW1.6 y WAS\_AW fueron relativizados frente a los niveles en las PLTs derivadas de HSCs WT. Un ratio = 1 indica que no existen diferencias. Los datos mostraron que los niveles de expresión de WASP en PLTs WAS\_AW eran más similares a los niveles encontrados en PLTs WT (ratio=1.05) mientras que los niveles de expresión de WASP en PLTs WAS\_WW1.6 fueron significativamente inferiores que los niveles de WASP en PLTs WT (ratio=0.69) (**Figura 40d**). Los datos obtenidos indican que la presencia del promotor alternativo truncado, en el VL clínico, en combinación con el fragmento de 0,5kb del promotor proximal, mejora significativamente la expresión de WASP en PLTs.



**Figura 40.** La presencia del promotor alternativo, en los VLs clínicos, genera un patrón de expresión de WASP más fisiológico, durante la megacariopoyesis y en PLTs. (a) *Los niveles de expresión de ambos vectores son similares en HSCs de pacientes.* La gráfica muestra los porcentajes de HSCs WASP+ (eje de la izquierda) de células WT (carril WT; barra de la izquierda, gris oscuro) y de HSCs WAS transducidas con los VLs

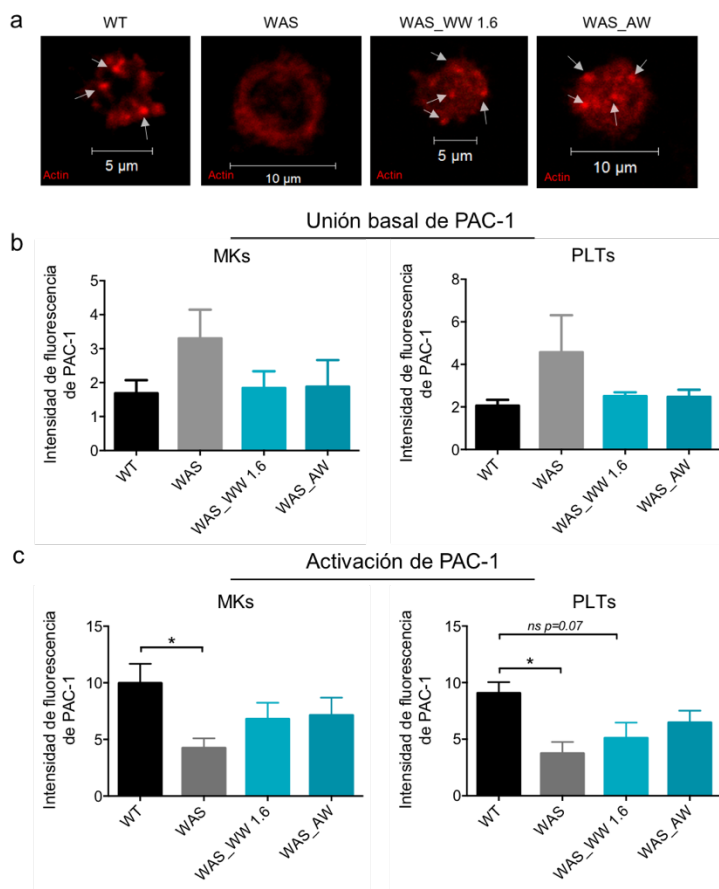
clínicos (carriles WAS\_WW1.6; WAS\_AW; barra de la izquierda, gris oscuro) y los niveles de expresión de WASP (eje de la derecha) en HSCs WT (carril WT; barra de la derecha, gris moteado) y en HSCs de pacientes WAS transducidas (carriles WAS\_WW1.6; WAS\_AW; barras de la derecha, gris moteado). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes. **(b) Las células WAS transducidas con los VLs clínicos rescatan la expresión de WASP y mimetizan el comportamiento de la proteína WASP endógena.** La gráfica muestra el porcentaje de MKs WASP<sup>+</sup>, por expresión endógena en células WT (grupo WT, barras negras), como por transducción de células HSCs de pacientes WAS (grupos WAS\_WW1.6; WAS\_AW). Las células del paciente WAS (c.58C>T p.(Gln20\*)) se purificaron de médula ósea, en Londres, en el *Institute of Child Health (ICH)*, se transdujeron con los dos VLs clínicos y se diferenciaron a MKs. El porcentaje de MKs WASP<sup>+</sup> en células WAS transducidas con el VL WW1.6 exhibieron una disminución significativamente más pronunciada, que en los MKs WT, a día D8 de la diferenciación. **(c) La expresión de WASP ectópica decrece durante la maduración megacariocítica, al igual que lo hace la proteína endógena.** La gráfica muestra los niveles de expresión de WASP endógena (grupo WT, barras negras) y los niveles de expresión de la proteína WASP ectópica, derivada de la transducción de células HSCs de pacientes WAS con los VLs clínicos (grupo WAS\_WW1.6; WAS\_AW). Los datos de niveles de expresión de WASP se analizaron en la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> en células WT, y en la población CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>WASP<sup>+</sup> en células WAS transducidas con los VLs. En todos los casos los niveles de expresión se normalizaron con la intensidad de fluorescencia resultado de la tinción con el control de isotipo (IsC). **(d) La expresión de WASP, derivada del VL clínico AW, se asemeja más a la expresión fisiológica de WASP, en PLTs.** La gráfica muestra los niveles de expresión de WASP en PLTs, normalizados frente a la intensidad de fluorescencia derivada de la tinción con el control de isotipo (en células WT, barra negra) y frente a la intensidad de fluorescencia de WASP en PLTs derivadas de las células del paciente WAS (en células WAS transducidas; WAS\_WW1.6; WAS\_AW). Los datos, a su vez, están relativizados frente a los niveles de expresión de WASP en las PLTs WT. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, cuatro experimentos independientes. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

#### La expresión ectópica de WASP, derivada de VLs clínicos, en HSCs WAS rescata la funcionalidad de MKs y PLTs

Rescatar las funciones afectadas, debido a la ausencia de WASP es tan importante como lograr una expresión fisiológica de WASP, derivada de VLs. Por ello, tras la transducción y diferenciación de las HSCs, analizamos la capacidad de las PLTs derivadas de HSCs WT, HSCs WAS, HSCs WAS\_WW1.6 y HSCs WAS\_AW para formar nódulos de actina. Como se ha comentado, la presencia de estos nódulos, estructuras discretas, ricas en actina, está impedida por completo debido a la ausencia de WASP, y PLTs derivadas de sangre periférica de pacientes, así como de modelos murinos WASKO no forman estos nódulos, afectando la capacidad de las PLTs a unirse a sustrato, principalmente fibrinógeno, así como afectando la agregación plaquetaria (Poulter et al. 2015). Recogimos las PLTs a días D12-D15 de la diferenciación megacariocítica y las sembramos sin ningún tipo de activación en placas tratadas con fibrinógeno durante un corto periodo de tiempo antes de la fijación (ver M&M). Este protocolo permite observar la formación de los nódulos de actina, estructuras que aparecen en los primeros estadios de adhesión pero que desaparecen para dar lugar a estructuras más estables tras la activación. Tras la inmunotinción con faloidina (rojo; actina), analizamos las PLTs con microscopía confocal y

analizamos la presencia o ausencia de nódulos de actina. Como puede observarse en la **Figura 41a**, la expresión ectópica de WASP derivada de los dos VLs clínicos restauró la capacidad de las PLTs para formar los nódulos de actina (**Figura 41a; imágenes WAS\_WW1.6; WAS\_AW**) que no se observaron en PLTs derivadas de HSCs WAS (**Figura 41a; imagen WAS**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos VLs WW1.6 y el AW.

Lo siguiente que medimos, en relación a la funcionalidad, fue la activación del receptor del fibrinógeno (medido por unión del anticuerpo PAC-1) de MKs y PLTs derivados de HSCs WT, HSCs WAS, HSCs WAS\_WW1.6 y HSCs WAS\_AW. Tal y como había sido descrito previamente, nuestros datos indicaron que el receptor del fibrinógeno de MKs y PLTs WAS presentaban la respuesta a la trombina comprometida en comparación con los MKs y PLTs WT (**Figura 40c; barras negras versus grises**). Otra observación importante es que la unión de PAC-1 en condiciones basales sin ningún tipo de estimulación fue superior en MKs y PLTs WAS en comparación con los MKs y PLTs WT (**Figura 41b; barras grises versus barras negras**). Estos datos indican que los MKs y las PLTs WAS presentan un estado preactivado, en ausencia de estímulo. Estos datos están en línea con el trabajo de Gross *et al.* que mostraba un ratio de agregación y segregación de gránulos densos ligeramente superior, en respuesta a un agonista, en PLTs de pacientes WAS (Gross et al. 1999). La expresión ectópica de WASP en HSCs de paciente WAS (células HSCs WAS\_WW1.6 y HSCs WAS\_AW) rescató el estado basal de los MKs (**Figura 41b; gráfica izquierda; barras azules**) y PLTs (**Figura 41b; gráfica derecha; barras azules**). Tras estudiar los niveles basales de activación del receptor del fibrinógeno, analizamos el incremento del mismo como respuesta a la activación con un agonista. Se recogieron los MKs y PLTs procedentes de la diferenciación megacariocítica de células HSCs WT, HSCs WAS, HSCs WAS\_WW1.6 y HSCs WAS\_AW a días D12-D15 de la y se analizó la unión de PAC-1 antes y después de la estimulación con trombina. Los datos mostraron como el incremento en unión de PAC-1 fue significativamente superior en MKs y PLTs WT (**Figura 41c; barras negras**), en comparación con los MKs y las PLTs WAS (**Figura 41c; barras grises**). La expresión ectópica de WASP mejoró la respuesta a trombina de MKs y PLTs WAS, incrementándose la activación en MKs y PLTs derivadas de HSCs\_WAS\_WW.16 y HSCs\_WAS\_AW (**Figura 41c; barras azules**), en comparación con MKs y PLTs WAS. Estos datos indican que la expresión ectópica de WASP derivada de los VLs clínicos restaura los defectos encontrados en MKs y PLTs, aunque sin diferencias significativas entre ambos vectores.



**Figura 41. La expresión ectópica de WASP en HSCs de paciente WAS rescata la funcionalidad de MKs y PLTs.**

**(a) La expresión ectópica de WASP rescata la capacidad de formación de nódulos de actina en PLTs.** Se recogieron PLTs a días 11-15 de la diferenciación megacariocítica y se realizó en el ensayo de formación de nódulos de actina (para más detalles consultar Material y Métodos). Las PLTs se tiñeron con faloidina (rojo; actina). La presencia de nódulos se detecta como acumulaciones discretas de actina en la zona de contacto con el sustrato (Flechas)

**(b) Los MKs y PLTs derivados de HSCs WAS están preactivados, presentando mayor unión de PAC-1 en situación basal, sin estimular.** La expresión ectópica de WASP, derivada de los VLs clínicos, rescata el fenotipo WT, disminuyendo la unión de PAC-1 en MKs y PLTs sin activar. Las gráficas muestran los niveles de unión de PAC-1 (que reconoce la forma activa del receptor del fibrinógeno) en MKs (gráfica de la izquierda) y PLTs (gráfica de la derecha) derivados de HSCs WT (barra negra), HSCs WAS (barra gris) y HSCs transducidas con los VLs clínicos WW1.6 (barra azul claro; WAS\_WW1.6) y AW (barra azul oscuro; WAS\_AW).

**(c) La expresión ectópica de WAS, derivada de VLs clínicos, rescata la respuesta a trombina, incrementando la unión de PAC-1.** Las gráficas muestran el incremento de intensidad de fluorescencia de PAC-1 tras la estimulación de MKs (gráfica izquierda) y PLTs (gráfica derecha) frente a la unión en condiciones basales (sin estimular). Los datos de intensidad de fluorescencia de PAC-1 se analizaron en la población CD42+ de MKs y PLTs y se normalizaron con la intensidad de fluorescencia de la población CD42+, sin tinción de PAC-1. Éstos, a su vez, se relativizaron frente a los datos de intensidad de fluorescencia en situación basal (MFI PAC-1 +trombina / MFI PAC-1 control). Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos. \* $p < 0.05$ .



## **DISCUSIÓN**





## 6. DISCUSIÓN

Los ensayos clínicos actuales de terapia génica para el tratamiento de WAS, basados en el uso del VL WW1.6, han logrado un claro beneficio clínico, con reconstitución funcional del sistema inmunológico, disminuyendo las infecciones severas recurrentes, así como el eczema. Sin embargo, los pacientes tratados continúan siendo microtrombocitopénicos y la tendencia a sufrir hemorragias persiste en algunos de ellos (Aiuti et al. 2013; Hacein-Bey Abina et al. 2015). No debe de ser coincidencia que el único fenotipo no rescatado sea la microtrombocitopenia, y que la información que se tiene sobre el papel de WASP durante la megacariopoyesis y la trombopoyesis continúe en debate abierto. A diferencia de las células inmunitarias, donde el papel de WASP, así como los defectos derivados de su ausencia, están bien caracterizados (Thrasher & Burns 2010), el rol que juega WASP durante la megacariopoyesis es prácticamente desconocido, y su papel en MKs y PLTs maduros permanece muy controvertido. Una parte importante de la terapia génica es la de aunar el conocimiento que se obtiene mediante investigación básica con el fin de mejorar las herramientas terapéuticas. Consideramos que es fundamental conocer los defectos asociados a la ausencia de WASP durante la megacariopoyesis y la trombopoyesis, así como su cinética de expresión, con la finalidad de desarrollar VLs que mimeticen el perfil de expresión fisiológico y, por ende, lograr fenotipos funcionales normales.

Por ello nos propusimos dos grandes objetivos en esta tesis: 1.- describir los defectos asociados a la ausencia de WASP durante la megacariopoyesis y trombopoyesis y 2.- desarrollar nuevos vectores lentivirales que permitan una expresión más fisiológica de WASP en MKs y PLTs.

### **Papel de WASP en hematopoyesis, megacariopoyesis y trombopoyesis**

Con el fin de abordar el primer objetivo de la tesis se generaron dos líneas hESCs WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 y AND-1\_WASKO\_c1.2) mediante el uso de ZFNs dirigidas contra el locus *WAS* (Toscano et al. 2013) en la línea celular AND-1 (Cortes et al. 2009). El resultado de la mutación inducida en el locus *WAS* dio lugar a una ausencia total de WASP, mimetizando el fenotipo más severo de la enfermedad. La generación de líneas isogénicas permite asumir que las variaciones fenotípicas encontradas se deben a la ausencia de una proteína en concreto. Nosotros nos hemos centrado en el estudio del papel de WASP durante la megacariopoyesis y trombopoyesis (procesos que naturalmente ocurren en médula ósea) que, como se ha comentado, permanece en debate abierto. Por otro lado, aprovechando las posibilidades que nos ofrecen las líneas

hESCs WASKO decidimos analizar cómo afecta la ausencia de WASP al desarrollo hematopoyético, otro aspecto que no está bien conocido. Éste sólo puede estudiarse en detalle en modelos animales o *in vitro* usando células madre humanas pluripotentes (hESCs e iPSCs). Somos conscientes de las ventajas que presenta el uso, en general, de iPSCs derivadas de paciente. Sin embargo, en términos de modelaje de enfermedades y descripción de defectos asociados a la falta de una única proteína, proponemos que el desarrollo de modelos basados en la constitución de líneas isogénicas suponen modelos más idóneos, puesto que el fondo genético es el mismo, variando tan solo el locus mutado.

**WASP en desarrollo hematopoyético.** La expresión de WASP empieza en los primeros estados de la diferenciación hematopoyética (Parolini et al. 1997; Muñoz et al. 2012), pero poco se sabe sobre su papel en la hematopoyesis temprana. Por lo tanto, investigamos si las hESCs deficientes para WAS mostraban algún tipo de alteración en las primeras fases del desarrollo hematopoyético. Los pacientes WAS y los animales modelo exhiben algunos parámetros hematopoyéticos anormales (Massaad et al. 2013; Charrier et al. 2013). Esas anomalías podrían ser explicadas por defectos en la proliferación, migración y/o apoptosis de los diferentes linajes hematopoyéticos maduros o podrían ser debidos a un desarrollo hematopoyético defectuoso. De hecho, muchos de los datos generados derivados del uso de ratones WASKO indican que WASP no juega un rol esencial durante el desarrollo hematopoyético. Sin embargo, publicaciones recientes muestran que el número de progenitores hematopoyéticos se incrementa tanto en sangre periférica como en bazo de ratones WASKO (Massaad et al. 2013; Charrier et al. 2013). Charrier y colaboradores mostraron que el número total de progenitores en ratones WASKO (presentes en médula, bazo y sangre) doblaba al número total de progenitores encontrados en ratones WT (Charrier et al. 2013). Esto está en línea con nuestros datos, indicando que la ausencia de WASP puede promover la diferenciación hematopoyética, generando un número más elevado de progenitores y por tanto también de diferentes células sanguíneas. Mediante diferenciación hematopoyética de células hESCs-WASKO pudimos detectar que la ausencia de WASP producía un adelantamiento en la generación de precursores hematopoyéticos ( $CD31^+CD34^+CD45^+$ ) y de células hematopoyéticas maduras ( $CD34^+CD45^+$ ), pero no de progenitores hematopoyéticos endoteliales ( $CD31^+CD34^+CD45^-$ ). Estos datos sugieren que en cuanto la célula se compromete hacia linaje hematopoyético comienza a expresar WASP, como regulador en el desarrollo hematopoyético. Dado que la ausencia de WASP se traduce en un incremento de progenitores, proponemos que WASP está actuando como un regulador negativo en ausencia de las señales adecuadas. Recientemente, Ingrungruanglert y col. publicaron las primeras líneas celulares pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de dos pacientes WAS sin encontrar alteraciones en la hematopoyesis cuando las comparaban

con las de iPSCs controles. Sin embargo, aunque sus datos no fueron estadísticamente significativos, se pudo observar una tendencia similar a la que observamos nosotros con las hESCs-WASKO. Efectivamente, las células CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>derivadas de iPSCs-WT representan un 0,56% frente a un 0,9% en el caso de las iPSCs-WAS (Figura 1d de (Ingrungruaglert et al. 2015)). Estos datos corroboran parcialmente nuestros resultados con las hESCs WASKO.

**WASP en desarrollo megacariocítico y formación de plaquetas.** El papel de WASP en el desarrollo y producción de PLTs no se conoce por completo, y los resultados que existen son controvertidos (Massaad et al. 2013; Bosticardo et al. 2006). Algunos autores defienden que el desarrollo megacariocítico es normal (Gröttum et al. 1969; Higgins et al. 1991; Haddad et al. 1999; Shcherbina, Bretscher, et al. 1999) mientras que otros han publicado un desarrollo megacariocítico anormal (Luthi et al. 2003; Sabri et al. 2006). Curiosamente, Sabri *et al.*, publicó evidencias de diferenciación megacariocítica prematura en ratones WASKO (Sabri et al. 2006). Nuestros datos corroboran la idea de adelantamiento durante la diferenciación hacia linaje megacariocítico en ausencia de WASP, favoreciendo la hipótesis de que WASP está regulando negativamente la diferenciación megacariocítica, en ausencia de las señales apropiadas. Ingrungruaglert *et al.* mostraron, en su trabajo, un aumento de la diferenciación megacariocítica en una de sus líneas iPSCs WAS (WASX503R-R#1), aunque este resultado no se repitió en la otra línea iPSCs WAS, que generaron (Ingrungruaglert et al. 2015).

Existe un gran debate abierto sobre si la microtrombocitopenia observada en los pacientes WAS es debida a una producción defectuosa de las PLTs en la médula ósea, o si se debe a la eliminación de las mismas en el bazo y otros órganos. Las células AND-1\_WASKO produjeron mayores niveles de MKs y PLTs, en comparación con las células AND-1\_WT. El incremento en producción de MKs y PLTs era debido a la ausencia de WASP ya que al expresar WASP en las líneas celulares AND-1\_WASKO con VLs se restauraba el desarrollo megacariocítico normal. Estos resultados son contrarios a los que presentó Ingrungruaglert y colaboradores, donde mostraron una producción plaquetaria muy similar (en líneas celulares WASQ19x) o incluso reducida (en líneas celulares WASX503R) en comparación con las iPSCs normales. Estos resultados contradictorios podrían ser explicados por varios factores: (i) Los datos de Ingrungruaglert *et al.* fueron obtenidos a día 24 de la diferenciación y en ese día de producción nosotros tenemos datos similares entre WT y WASKO (Figura 18a, día 24). (ii) En el manuscrito de Ingrungruaglert *et al.* se usaron dos pacientes diferentes para obtener las iPSCs que portaban mutaciones diferentes; Q19X, la cual introduce un codón de stop prematuro y X503R, la cual produce una proteína WASP más larga e inestable. Esas mutaciones pueden dar lugar a diferentes fenotipos. Además, los factores de reprogramación pueden

inducir alteraciones en el proceso de diferenciación. Nuestras dos líneas hESCs WASKO presentan la misma mutación, generada por edición genómica y pueden ser comparadas con la línea de hESCs original, usada para generar las mutaciones (AND-1).

**Defectos funcionales en HPCs, Megacariocitos y Plaquetas.** Un aspecto fundamental de cualquier modelo celular de patología es que sea capaz de mimetizar los defectos encontrados en los pacientes, confirmando por tanto que esa es la mutación causante de esos defectos y validando el modelo. Nuestros estudios en este sentido se centraron en tres tipos celulares: HPCs, Megacariocitos y plaquetas. Procedimos por tanto a evaluar si estos tipos celulares mimetizaban los defectos funcionales encontrados en pacientes WAS y/o modelos animales de WAS.

**WASP en HPCs:** Algunos autores afirman que las HPCs deficientes para WAS, tanto en ratones WASKO como de pacientes WAS, tiene menor potencial de formación de colonias (Kajiwara et al. 1999) mientras que otros han encontrado que presentan capacidad normal para la formación de CFUs, así como para su propio mantenimiento (Martín, M. G. Toscano, et al. 2005; Ingrungruangler et al. 2015). Nosotros hemos encontrado una ligera disminución, aunque no significativa, en el potencial para formar colonias de las HPCs WASKO, en comparación con las derivadas de células AND-1\_WT. Esto parece indicar que la ausencia de WASP no juega un papel relevante en las propiedades de las HPCs, al menos bajo estas condiciones experimentales. Mani *et al.* mostró que la ausencia de WASP está involucrada en la transducción de señales celulares mediadas por Kit (receptor del SCF) y que WASP es requerida para la señalización de  $Ca^{2+}$  inducida por Kit, así como para la supervivencia (Mani et al. 2009). Curiosamente, nosotros encontramos que las HPCs WASKO presentaban una respuesta de  $Ca^{2+}$  al SCF defectuosa. Estos datos corroboran los datos de Mani *et al.* y apoyan la existencia de un papel de WASP en el mantenimiento/supervivencia de HPCs, mediante su función como efector de la señalización mediada por SCF.

**WASP en Plaquetas:** Las alteraciones fenotípicas y funcionales en MKs y PLTs de pacientes WAS son controvertidas. Algunos autores mantienen que las PLTs funcionan correctamente, pero presentan alteraciones fenotípicas (incremento de expresión de fosfatidil-serina en su superficie, baja expresión de CD43) que incrementan el riesgo a ser eliminadas en el bazo (Higgins et al. 1991; Haddad et al. 1999; Shcherbina, Bretscher, et al. 1999; Rengan et al. 2000). Sin embargo, otros grupos apoyan la idea de que los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en estado basal están incrementados, así como que el flujo de  $Ca^{2+}$  inducido por un agonista, tras estimulación, es más prolongado (Shcherbina, Rosen, et al. 1999), así como que presentan una activación de receptor del fibrinógeno reducida (Grøttum et al. 1969; Tsuboi et al. 2006), ambos importantes para la función normal de las PLTs. También existe controversia en cuanto a la importancia de WASP como

nucleador de actina, en las PLTs, puesto que Falet y colaboradores publicaron que el complejo Arp2/3, efector nucleador de actina de la ruta de señalización de WASP, permanece activo en ausencia de WASP, lo que sugiere que WASP no sería esencial, en este aspecto (Falet et al. 2002). Sin embargo, recientemente se ha publicado que las PLTs derivadas de pacientes WAS y de modelos murinos WASKO son incapaces de formar nódulos de actina (Poulter et al. 2015). Estos nódulos de actina son las primeras estructuras que se forman cuando las PLTs establecen contacto con el sustrato, principalmente fibrinógeno, así como en la unión y agregación PLT-PLT. Poulter y colaboradores demostraron que su deficiencia, como resultado de la ausencia de WASP, impide la correcta agregación plaquetaria y la unión PLT-sustrato, sobre todo en experimentos mimetizando el flujo presente en el torrente sanguíneo, lo que implicaría una deficiencia funcional *in vivo* (Poulter et al. 2015). Los datos obtenidos en PLTs WASKO derivadas de hESCs\_WASKO mostraron que las PLTs presentaban mayor activación del receptor del fibrinógeno. Sin embargo la respuesta a la trombina fue muy cercana a la respuesta de PLTs WT, como reflejaron los estudios de movilización de calcio intracelular y la unión de PAC-1. Estos datos están en línea con la hipótesis de que las PLTs de pacientes con WAS tienen una actividad cercana a la normal y que el sangrado recurrente en esos pacientes se debe a la trombocitopenia causada por la eliminación de las PLTs por los macrófagos residentes en el bazo y otros tejidos. Esta hipótesis, además, está apoyada por el hecho de que tras la mayoría de las esplenectomías, el número de PLTs y los ratios de coagulación en los pacientes WAS se rescatan.

Estos datos con PLTs WASKO derivadas de hESCs\_WASKO fueron corroborados y expandidos con PLTs derivadas de HSCs de pacientes WAS. Así, y en línea con el artículo de Poulter (Poulter et al. 2015), observamos que las PLTs WAS derivadas de las HSCs de un paciente WAS fueron incapaces de formar nódulos de actina al entrar en contacto con fibrinógeno. La expresión ectópica de WASP mediante VLs-WAS rescató la capacidad de formar estos nódulos, así como los otros defectos funcionales mencionados anteriormente, reduciéndose los niveles de unión de PAC-1 en condiciones basales e incrementándose la respuesta a trombina.

**WASP en Megacariocitos** Curiosamente, y en contra de la respuesta casi normal de las PLTs WASKO, observamos que los MKs\_WASKO derivados de hESCs\_WASKO presentaban alteraciones significativas tanto en la movilización del calcio intracelular, como en la activación del receptor del fibrinógeno en respuesta a la estimulación con trombina. Resulta muy interesante que en las PLTs, donde el calcio intracelular citoplasmático es un mensajero clave para su activación, las PLTs WASKO mostraron una respuesta muy similar a la normal, y los MKs WASKO mostraron una respuesta defectuosa. Shcherbina y colaboradores publicaron que los niveles de calcio intracelular

en PLTs deficientes para WASP eran superiores en estado basal a los niveles encontrados en PLTs WT (Shcherbina, Rosen, et al. 1999). Es posible que las diferencias puedan ser debidas a que, una vez en circulación, las PLTs de pacientes para WASP podrían estar hiperactivadas, en parte debido a los menores niveles de CD43 en su superficie. Esto ~~que~~ aceleraría su unión inespecífica a diferentes sustratos y por tanto su activación. Esta hiperactividad, a su vez, podría llevarlas a niveles incrementados de  $Ca^{2+}$  intracelular y a un proceso de envejecimiento prematuro, disminución de su tamaño y eliminación en el torrente sanguíneo.

La activación con trombina de MKs y PLTs derivados de HSCs de un paciente WAS confirmaron que en ausencia de WASP, los MKs y las PLTs están preactivados. En ambos casos la unión de PAC-1 en condiciones basales fue significativamente superior en MKs y PLTs WAS, en comparación con la unión en MKs y PLTs WT. Estos datos están en línea con los publicados por Grøttum y col. y Tsuboi y col., donde mostraron que los MKs y las PLTs deficientes para WAS presentaban una respuesta reducida, con menor incremento en la unión de PAC-1 (que reconoce la forma activada del receptor) a su superficie, en comparación con MKs y PLTs WT (Grøttum et al. 1969; Tsuboi et al. 2006).

### **Nuevos vectores lentivirales terapéuticos para WAS: Análisis comparativo**

El objetivo final de esta tesis se centraba en el desarrollo de VLs para mejorar la terapia génica en pacientes WAS. Los pacientes WAS tratados por terapia génica han continuado siendo trombocitopénicos (Aiuti et al. 2013; Hacein-Bey Abina et al. 2015). Un punto importante en terapia génica es conseguir vectores seguros que logren una expresión fisiológica. Nuestro grupo y otros han desarrollado vectores lentivirales auto-inactivados (VLs SIN) con las secuencias promotoras endógenas de WAS, con el fin de eliminar posibles problemas de toxicidad por expresión ectópica desregulada (Dupré et al. 2006; Marangoni et al. 2009; Avedillo Díez et al. 2011; Bosticardo et al. 2011). Como se ha comentado, la expresión de WAS está regulada por dos secuencias con actividad promotora: el promotor proximal, de 1.6Kb y el promotor alternativo, de unas 600pb, ubicada a 6kb aguas arriba del promotor alternativo (Petrella et al. 1998; Hagemann & Kwan 1999). Los ensayos clínicos actuales, que se basan en el uso de VLs para tratar WAS, incluyen en sus VLs la secuencia completa del promotor proximal, de 1.6kb (VL-WW1.6) (Aiuti et al. 2013; Hacein-Bey Abina et al. 2015). Aunque si bien, se sabe que este promotor es más fuerte, en líneas generales, se ha descrito que el promotor alternativo cobra mayor importancia en los progenitores tempranos de la hematopoyesis, así como durante la diferenciación hematopoyética hacia linaje mieloide, debido a la presencia de sitios de unión para factores de transcripción c-Myb, Ets-2 y PU.1 (Hagemann & Kwan 1999; Frecha et al. 2008). En base a esto, nos planteamos la hipótesis de que la

introducción del promotor alternativo en el vector terapéutico mejoraría los niveles de expresión en linaje mielóide, incluyendo MKs y PLTs.

Idealmente, los estudios para comparar el mejor vector terapéutico para conseguir niveles fisiológicos de expresión se deberían de hacer con HSCs de pacientes WAS y con los VLs expresando WASP. Pero dadas las dificultades para la obtención de células HSCs de pacientes WAS y la limitada capacidad de expansión de estas células, quisimos hacer varios estudios preliminares basándonos en el uso de líneas celulares humanas inmortalizadas del linaje megacariocítico o con capacidad para diferenciarse hacia este linaje. Escogimos dos líneas celulares inmortalizadas, la línea celular MEG-01 (Ogura et al. 1985), que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la megacariopoyesis y procesos implicados en la misma (Ogura et al. 1988; Schweinfurth et al. 2010; Trécul et al. 2014) y la línea celular K562 (Lozzio & Lozzio 1975), que tras ser activada con PMA se diferencian hacia células de tipo MKs, lo que la ha convertido también en modelo para el estudio del desarrollo de MKs (Navarro et al. 2009; Chang et al. 2010; Randrianarison-Huetz et al. 2010; Sardina et al. 2010). Además, en nuestro grupo se desarrolló un modelo celular WASKO en células K562 (K562\_WASKO) mediante el uso de ZFN dirigidas frente al locus WAS (Toscano et al. 2013), creando así una gran herramienta para el estudio preliminar de los diferentes VLs.

**Modelos celulares inmortalizados como herramientas para estudios preclínicos de WAS.** En primer lugar comprobamos que los modelos celulares escogidos eran aptos para el estudio del comportamiento de los diferentes VLs durante la diferenciación megacariocítica. Nuestros datos mostraron que la línea MEG-01 mimetiza el proceso de diferenciación megacariocítica tardío obtenido *in vitro* a partir de las HSCs, tanto en marcadores CD41 y CD42, como en cuanto al patrón de expresión de WASP. Efectivamente, en ambos casos se observó que a medida que aumentaba el tamaño y la granularidad de las células, así como la población de células maduras CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, los niveles de expresión de WASP disminuían. Por el contrario, en las primeras fases de la diferenciación de las HSCs hacia el linaje megacariocítico, lo primero que se observa es la inducción de la expresión de CD41 y un incremento de WASP en estas células CD41<sup>+</sup>CD42<sup>-</sup>. En este sentido, la diferenciación al linaje megacariocítico de la línea K562 mimetiza estos procesos de diferenciación tempranos, generando un mayor porcentaje de células CD41<sup>+</sup>CD42<sup>-</sup> y, al contrario que la diferenciación de MEG-01, produciéndose un incremento en la expresión de WASP. Nuestra hipótesis es, por tanto, que ambas líneas celulares representan diferentes estados de diferenciación; las células MEG-01 representan células megacariocíticas inmaduras que tras la estimulación van madurando hasta liberar partículas de tipo PLTs y las K562 representan un estado de diferenciación anterior (precursor eritroide-megacariocítico) y la estimulación con PMA implicaría el



compromiso de dicho precursor para diferenciarse a MKs. De hecho, las K562 pueden dar lugar a células de tipo eritrocitos si son estimuladas con hemina o butirato de sodio (Alitalo 1990). Además los diferentes estados de la diferenciación son reflejados en los patrones de expresión de WASP, en ambas líneas celulares (**Figura 42**). Estos resultados sugieren que ambas líneas son buenas herramientas para el estudio preliminar del comportamiento de VLs a lo largo de la diferenciación megacariocítica.

**Comportamiento de los VLs en modelos celulares inmortalizados.** Como primer análisis, estudiamos el comportamiento de diferentes VLs reporteros que expresan eGFP a través de las diferentes combinaciones de los promotores proximal y alternativo del gen WAS en la línea MEG-01. Nuestros resultados mostraron que la expresión de eGFP disminuía conforme aumentaba la maduración megacariocítica, mimetizando la expresión endógena de WASP, con todos los VLs reporteros. Sin embargo, aunque se observó una ligera tendencia de mejoría en la expresión de eGFP en las células transducidas con el vector AWE (conteniendo la combinación promotor proximal + promotor alternativo) con respecto a las WE (conteniendo solo el promotor proximal), no fue significativa. Tampoco pudo observarse una mejoría en el patrón de expresión al incluir las secuencias aisladoras. La ausencia de diferencias significativas en el comportamiento de los VLs reporteros podría deberse a la ausencia de las secuencias del cDNA de WAS en estos VLs, dado que ha sido descrito que estas secuencias podrían estar involucradas en la regulación de la expresión del gen WAS (Toscano et al. 2009).

Diseñamos por tanto los nuevos VLs terapéuticos, de segunda generación, regulando la expresión de WASP bajo los diferentes promotores endógenos de WAS. Debido al estudio de Hagemann *et al*, en 2000, que demostró que la pérdida del sitio de C/EBP en el promotor alternativo conllevaba una disminución en los niveles de expresión del transgén, en células K562 (Hagemann et al. 2000), decidimos diseñar un nuevo VL que incorporara la secuencia completa del promotor alternativo, el VL cAWW. Los datos obtenidos en células K562\_WASKO (Toscano et al. 2013) reflejaron que la presencia del promotor alternativo en los VLs mejoraba significativamente el comportamiento fisiológico de los VLs. Efectivamente, en ausencia del promotor alternativo, los VLs WW mostraban un comportamiento contrario al fisiológico: Mientras que en células K562\_WT la expresión de WASP incrementa tras la diferenciación megacariocítica, los niveles de WASP ectópicos en células K562\_WASKO transducidos por los VLs WW disminuía. Sin embargo, tal y como ocurre con WASP endógeno, los niveles de WASP ectópico incrementaban tras la diferenciación megacariocítica en K562\_WASKO transducidas con los VLs AWW.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los VLs AWW (promotor alternativo truncado) y cAWW (promotor alternativo completo) sugiriendo

que la presencia de las primeras 387-pb es suficiente para mejorar la regulación de WASP, en la diferenciación megacariocítica de células K562, mimetizando el perfil fisiológico de WASP. Puede parecer que los resultados que presentaron Hagemman y colaboradores y los que aquí presentamos son contradictorios, sin embargo el análisis y el objetivo final de cada trabajo es diferente. Ellos analizaron la fuerza del promotor alternativo completo en comparación con diferentes fragmentos del mismo, en células K562, mientras que nuestro objetivo es mimetizar la regulación que existe en la expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica, y los datos obtenidos indican que el fragmento de 387pb del promotor alternativo es suficiente para mimetizar la regulación fisiológica que existe para la expresión de WASP, en el contexto de un VL-SIN.

**HSCs como herramientas para estudios preclínicos de WAS.** En relación a la terapia celular y al trasplante de progenitores hematopoyéticos, la expansión de células HSCs *in vitro* con capacidad repobladora constituye ciertamente un reto. Conseguir expandir las HSCs es un objetivo perseguido por muchos laboratorios ya que facilitaría enormemente múltiples estrategias terapéuticas basadas en estos tipos celulares. Aunque para la consecución de este proyecto no era imprescindible dicha expansión, sí que nos facilitaría los experimentos. Por lo tanto intentamos reproducir los resultados descritos recientemente para la expansión de las HSCs (Fares *et al.* 2014). Aunque sí que pudimos expandir las HSCs durante más de cuatro semanas, los análisis de los marcadores CD34, CD133 y CD90 (indicativos de pluripotencia) mostraron que la expansión produce una reducción del porcentaje de células CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> de hasta tres veces. A pesar de eso, el número total de células HSCs se veía incrementado hasta 15 veces después de tres semanas en medio de expansión. Estos resultados nos permitieron utilizar células HSCs expandidas a lo largo de dos semanas para la realización de nuestros experimentos.

**Diferenciación megacariocítica de las HSCs.** Para conseguir una situación *in vitro* análoga a la megacariopoyesis, las células HSCs fueron estimuladas con TPO y SCF. La primera citoquina es la principal reguladora de la megacariopoyesis a través de la unión con su receptor c-Mpl, mientras que el SCF contribuye a dicha diferenciación de forma sinérgica. En este proyecto, hemos descrito la aparición de las diferentes poblaciones del linaje megacariocítico, en base a cambios en la morfología y la expresión de los marcadores CD34, CD41 y CD42. Hemos definido así una población CD34<sup>+</sup> CD41-CD42-indiferenciada, que correspondería con la población más primitiva HSCs de nuestro cultivo; una población de MKs inmaduros CD41<sup>+</sup> y una población madura de MKs que co-expresa CD41 y CD42. Esta aparición progresiva de antígenos de superficie de dicho linaje parece correlacionarse con las diferentes poblaciones observadas al microscopio, abarcando desde progenitores megacariocíticos hasta MKs de gran tamaño y

granularidad. A partir del día 8 de diferenciación, pudo detectarse una población de pequeño tamaño CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, correspondiente a una población de PLTs.

Durante estos ensayos de diferenciación, observamos una población CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> en las células HSCs procedentes de sangre periférica movilizada, que no existía inicialmente en las HSCs aisladas de cordón umbilical. Esta observación coincide con lo descrito por Debili y colaboradores, donde reportan diferentes rutas de la diferenciación megacariocítica dependiendo del origen de las HSCs (Debili *et al.* 2001). Este grupo describe la existencia de una población CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> que además co-expresa el marcador CD42. En línea con nuestros resultados, describen que las células HSCs de cordón umbilical (neonato) CD34<sup>+</sup> pierden en primer lugar dicho marcador, para ganar CD41<sup>+</sup>, mientras que carecen de la población CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> anteriormente caracterizada en HSCs adultas, de sangre periférica movilizada. Así pues, las HSCs procedentes de sangre movilizada (HSCs adultas) parecen tener una mayor predisposición a la diferenciación megacariocítica que las procedentes de sangre de cordón, lo cual podría explicar por qué obtenemos mayor eficiencia de diferenciación *in vitro* con las primeras que con las segundas (datos de grupo) tras el estímulo con TPO y SCF. Acorde a esta hipótesis, Gekas *et al.* demostraron que el marcador CD41 se expresaba en células HSCs adultas y se acumulaba con la edad. Además, estos autores lo propusieron como nuevo marcador de células *Long Term*-HSCs comprometidas con la diferenciación mieloide (Gekas *et al.* 2013). Dado que los MKs pueden ser generados a partir de diferentes rutas, sin requerir el tránsito por la población MEP y obteniéndose directamente desde HSCs (Debili *et al.* 2001; Notta *et al.* 2015 Woolthuis & Park, 2016), el uso de HSCs adultas derivadas de sangre periférica movilizada puede suponer una ventaja en los experimentos de megacariopoyesis *in vitro*.

**Comportamiento de los VLs durante diferenciación megacariocítica a partir de HSCs.** Debido a la dificultad que existe para la obtención de HSCs de pacientes WAS, comenzamos los análisis comparando el comportamiento de VLs reporteros, expresando eGFP, bajo diferentes promotores endógenos de WAS, en HSCs WT. Al igual que ocurrió con la línea celular MEG-01, no se observaron diferencias significativas entre el comportamiento de los diferentes VLs WE; AWE; AWE-IS2 y AWE-HS4-650. Pudimos comprobar que todos mimetizan la bajada de expresión observada con WASP endógeno, a medida que avanzaba la diferenciación y maduración de los MKs.

Tras estos estudios con los vectores reporteros nos propusimos ahondar más en la mejora de VLs terapéuticos rescatando la expresión de WASP en células HSCs de paciente WAS. Trabajamos con una muestra de HSCs, de médula ósea, de paciente WAS con fenotipo severo debido a la ausencia completa de WASP como resultado de la mutación c.58C>T, en el DNA, que resulta en una mutación sin sentido en la proteína

(p.Q20X), que introduce un codón de stop prematuro, generando una proteína más corta, no funcional. Esta mutación había sido descrita previamente en dos hermanos ucranianos, con fenotipo WAS severo (Boztug et al. 2008). Los datos obtenidos con las células HSCs de este paciente WAS sugirieron que la presencia del promotor alternativo truncado (vector AWW) mejora la expresión de WASP tanto en estadios tempranos de la diferenciación como en PLTs.

Es importante mencionar que no se observaron mejoras en el patrón de expresión cuando las células de pacientes fueron transducidas con el vector cAWW, donde la expresión de WASP está controlada por la combinación del promotor proximal de WAS y el promotor alternativo completo. La diferencia observada en la expresión de WASP en PLTs WAS\_AWW y WAS\_cAWW podría deberse a la presencia de dos sitios de unión para el represor de la transcripción GCF, presentes en la secuencia promotora alternativa completa (Hagemann & Kwan 1999). Los resultados obtenidos sugieren que las 387-pb del promotor alternativo junto con el fragmento de 0,5kb del promotor proximal (combinación presente en el AWW) presenta una tendencia a mejorar el perfil de expresión de WASP en MKs y PLTs.

**Vectores lentivirales terapéuticos de tercera generación.** En la última parte de esta tesis se procedió a estudiar si el promotor seleccionado en base a los estudios anteriores (la combinación del fragmento de 0.5Kb del promotor proximal y el fragmento de 0.38Kb del promotor alternativo) mejoraba también el comportamiento en un contexto de aplicación clínica, es decir, en un vector de tercera generación. Para ello se construyó un vector, el AW, que era idéntico al vector clínico actual, el WW1.6 (Aiuti et al. 2013) (Hacein-Bey Abina et al. 2015), con la única diferencia que la expresión del gen WAS era dirigida por el nuevo promotor de 0.88kb que contiene parte del promotor proximal y parte del promotor alternativo.

Por tanto el AW es el VL por el que apostamos para la realización de un futuro ensayo clínico y procedimos por tanto a compararlo con los vectores clínicos actuales en cuanto a su comportamiento durante el desarrollo megacariocítico y en cuanto a los niveles de expresión en PLTs. Al igual que con los vectores terapéuticos de segunda generación, los VLs AW tuvieron un mejor comportamiento que los WW1.6 en ambos aspectos, demostrando la superioridad del AW frente al WW1.6 en este linaje. Sin embargo, los experimentos de rescate funcional no mostraron diferencias significativas, probablemente debido a que la diferencia de expresión entre ambos vectores no es suficiente para detectar mejoras en este sentido. Creemos que es necesario realizar ensayos clínicos para determinar si efectivamente las pocas mejoras detectadas en el vector AW son suficientes para mejorar los resultados obtenidos con el WW1.6

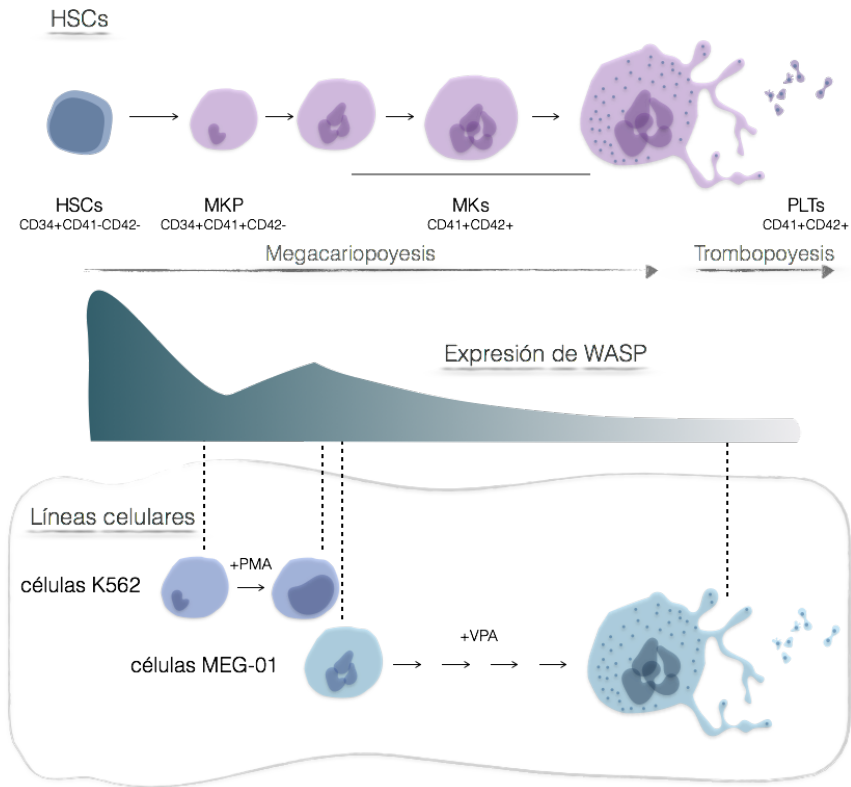
**Consideraciones finales.**

Parte de los resultados de esta tesis describen por primera vez el patrón de expresión que sigue WASP durante la megacariopoyesis y la trombopoyesis. Parece existir una regulación compleja de su expresión puesto que los niveles de WASP disminuyen durante la formación de progenitores megacariocíticos CD41<sup>+</sup>CD42<sup>-</sup>, vuelven a incrementar en los primeros estadios de expresión de CD42 y bajan durante las últimas etapas de maduración hasta la generación de PLTs. Por otro lado, hemos demostrado que la ausencia de WASP produce un incremento de la diferenciación hematopoyética temprana así como de la diferenciación megacariocítica. De hecho, creemos que el rescate de la microtrombocitopenia podría no depender únicamente de la expresión de WASP en las PLTs mismas, sino también, y quizá con mayor repercusión, en su expresión en estados de desarrollo anteriores. Nuestra hipótesis es que WASP funciona como regulador negativo durante la diferenciación, bloqueando su progresión en ausencia de las señales apropiadas. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de lograr VLs que mimeticen el patrón de expresión fisiológico de WASP.

Poco se sabe sobre el papel que recae en WASP durante la megacariopoyesis. Se sabe que la diferenciación megacariocítica y maduración de los MKs es un proceso complejo que implica grandes cambios en el citoesqueleto, tanto de actina, como de tubulina. De hecho, es curioso que el citoesqueleto de actina y su dinamismo son más activos en estados más inmaduros de los MKs, donde comienzan a formar el sistema de invaginación de la membrana, que dará lugar finalmente a las proplaquetas. Sin embargo, la elongación de las proplaquetas, que tiene lugar a días finales de la megacariopoyesis, en MKs ya maduros, depende más de la tubulina, y no tanto del citoesqueleto de actina (Poulter & Thomas 2015). Existen varios trabajos donde se observa que la falta de proteínas implicadas en las rutas de señalización que terminan por remodelar el citoesqueleto de actina derivan en trombocitopenia como resultado de una maduración prematura de los MKs, con formación de proplaquetas defectuosas. Por ejemplo, la falta de Pak2, que juega un papel en la remodelación del citoesqueleto de actina, aunque en una ruta diferente a la de WASP, deriva en premaduración de los MKs en la médula ósea, incremento del número de progenitores megacariocíticos, así como incremento en el número de MKs maduros en médula (Kossoff et al. 2015). Este mismo fenotipo se ha observado como consecuencia de la ausencia de Cdc42 y Rac-1, proteínas que participan aguas arriba, en la misma ruta de señalización de WASP, que termina por activar el complejo Arp2/3, nucleador de actina (Pleines et al. 2013). En ambos trabajos se muestra que, como consecuencia de la incorrecta regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina, los modelos utilizados son trombocitopénicos, que liberan PLTs anormales a la circulación con menor vida media, y que son eliminadas precozmente.

Otra evidencia de la función de WASP como regulador negativo durante la megacariopoyesis es el estado preactivado de los MKs, como reflejan los resultados obtenidos en esta tesis, evaluando los niveles de Ca intracelular o el estado del receptor del fibrinógeno en condiciones basales, sin estimulación. Bury y colaboradores publicaron que el estado activo, de forma constitutiva, del receptor del fibrinógeno induce cambios continuos en el citoesqueleto de actina, lo que afecta a la formación del sistema de invaginación de la membrana, y por lo tanto a la formación de proplaquetas (Bury et al. 2012). Todos estos trabajos, en conjunto, sugieren que WASP podría ser esencial para la maduración correcta de los MKs, y para la formación de las proplaquetas, a través de la regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina.

Tras los antecedentes presentados, y con los resultados obtenidos, podemos confirmar que hemos desarrollado y validado el primer modelo humano de células madre embrionarias que mimetiza pacientes con WAS con fenotipo severo. Usando esas células, hemos demostrado que WASP regula el desarrollo hematopoyético temprano y la diferenciación megacariocítica. También hemos demostrado que WASP juega un papel importante en la función de HPCs y MKs, observando respuestas de Ca<sup>2+</sup> defectuosas, en su ausencia. Por último, hemos demostrado que restaurando la expresión de WASP, mediante la transducción con VLs terapéuticos somos capaces de restaurar los defectos fenotípicos y funcionales. El adelanto en la diferenciación megacariocítica, la regulación de la expresión de WASP durante la megacariopoyesis y trombopoyesis y la incapacidad del VL-WW1.6 para revertir el estado microtrombocitopénico pone de manifiesto la relevancia que existe en lograr mimetizar la expresión fisiológica de WASP a lo largo de la diferenciación megacariocítica. Hemos podido observar que la presencia del promotor alternativo en VLs-WAS, mejora la expresión de WASP en estadios más indiferenciados de la megacariopoyesis, lo que parece ser clave para la correcta formación del sistema de invaginación de la membrana y la consecuente formación de proplaquetas. Además hemos podido observar que la expresión de WASP en PLTs derivadas de células HSCs WAS\_AW se acerca más a la expresión fisiológica de WASP, en PLTs WT, que los niveles de expresión en PLTs derivadas de HSCs WAS\_WW1.6. Creemos que la incorporación del promotor alternativo en el VL clínico supone una mejora, en cuanto a lograr un comportamiento más fisiológico de estos vectores.



**Figura 42. Modelo propuesto de la expresión de WASP durante la megacariopoyesis y trombopoyesis.** La expresión de WASP durante la diferenciación megacariocítica está altamente regulada, y en global, disminuye durante la misma. Existe una modulación de su expresión de WASP, en función del estado de diferenciación de las células, observándose un descenso de WASP desde los progenitores hematopoyéticos hasta los progenitores megacariocíticos, un posterior incremento de WASP en el desarrollo de megacariocitos inmaduros y finalmente un nuevo descenso de WASP, que se mantiene en las PLTs. Los modelos celulares MEG-01 y K562 mimetizan diferentes estados de diferenciación megacariocítica reflejándose en sus niveles de expresión de WASP.

## ***CONCLUSIONES***





## 7. CONCLUSIONES

1. El modelo celular hESCs WASKO, generado mediante el uso de ZFNs, mimetiza los defectos encontrados en pacientes WAS y modelos animales, en MKs y PLTs.
2. La ausencia de WASP produce un adelantamiento de la hematopoyesis temprana y la megacariopoyesis, indicando que WASP participa en las mismas como regulador negativo.
3. La expresión de WASP disminuye a lo largo de la megacariopoyesis
4. Los modelos celulares MEG-01 y K562 mimetizan diferentes estados de la diferenciación megacariocítica, reflejándose en sus niveles de expresión de WASP.
5. La expresión ectópica de WASP, derivada de VLs-WAS, restaura la funcionalidad de MKs y PLTs derivadas de HSCs de pacientes y del modelo celular hESCs WASKO.
6. El VL clínico AW, que incorpora el promotor alternativo truncado, mejora el patrón de expresión fisiológico de WASP durante la megacariopoyesis, en comparación con el vector clínico actual WW1.6



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, M. et al., 2015. Lost in translation: pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. *EMBO molecular medicine*, 7(11), pp.1388–402.
- Aiuti, A. et al., 2013. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science*, 341(6148), p.1233151.
- Al-Herz, W. et al., 2014. Primary Immunodeficiency Diseases: An Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Alitalo, R., 1990. Induced differentiation of K562 leukemia cells: A model for studies of gene expression in early megakaryoblasts. *Leukemia Research*, 14(6), pp.501–514.
- Andrews, P.W. et al., 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 50(2), pp.147–62.
- Arumugam, P.I. et al., 2009. The 3' Region of the Chicken Hypersensitive Site-4 Insulator Has Properties Similar to Its Core and Is Required for Full Insulator Activity.
- Astrakhan, A. et al., 2012. Ubiquitous high-level gene expression in hematopoietic lineages provides effective lentiviral gene therapy of murine Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 119(19), pp.4395–4407.
- Avanzi, M.P. et al., 2012. Optimizing megakaryocyte polyploidization by targeting multiple pathways of cytokinesis. *Transfusion*, 52(11), pp.2406–2413.
- Avanzi, M.P. et al., 2014. Rho kinase inhibition drives megakaryocyte polyploidization and proplatelet formation through MYC and NFE2 downregulation. *British Journal of Haematology*, 164(6), pp.867–876.
- Avedillo Díez, I. et al., 2011. Development of Novel Efficient SIN Vectors with Improved Safety Features for Wiskott–Aldrich Syndrome Stem Cell Based Gene Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 8(5), pp.1525–1537.
- Bastian, L.S. et al., 1999. Regulation of the Megakaryocytic Glycoprotein IX Promoter by the Oncogenic Ets Transcription Factor Fli-1. *Blood*, 93(8), pp.2637–2644.
- Becker-Herman, S. et al., 2011. WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), pp.2033–2042.
- Behnke, O., 1968. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet

- surface coat. *Journal of ultrastructure research*, 24(5), pp.412–33.
- Behnke, O., 1969. An electron microscope study of the rat megacaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *Journal of ultrastructure research*, 26(1), pp.111–29.
- Benabdellah, K. et al., 2014. A Chimeric HS4-SAR Insulator (IS2) That Prevents Silencing and Enhances Expression of Lentiviral Vectors in Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, 9(1).
- Boisset, J.-C. et al., 2010. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 464(7285), pp.116–20.
- Boisset, J.-C. et al., 2015. Progressive maturation toward hematopoietic stem cells in the mouse embryo aorta. *Blood*, 125(3), pp.465–469.
- Boitano, A.E. et al., 2010. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), pp.1345–8.
- Borg, C. et al., 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood*, 104(10), pp.3267–75.
- Bosticardo, M. et al., 2011. Lentiviral-mediated gene therapy leads to improvement of B-cell functionality in a murine model of Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(6), p.1376–84.e5.
- Bosticardo, M. et al., 2006. Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 113(25), pp.6288–6296.
- Bouma, G., Burns, S.O. & Thrasher, A.J., 2009. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology*, 214(9–10), pp.778–790.
- Boztug, K. et al., 2008. Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott-Aldrich syndrome. *Clinical Genetics*, 74(1), pp.68–74.
- Boztug, K. et al., 2010. Stem-Cell Gene Therapy for the Wiskott–Aldrich Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 363(20), pp.1918–1927.
- Braun, C.J. et al., 2014. Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome — Long-Term Efficacy and Genotoxicity. *Sci. Transl. Med.*, 6(227), pp.1–15.
- Buchbinder, D., Nugent, D.J. & Phillipovich, A.H., 2014. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *The application of clinical genetics*, 7, pp.55–66.
- Burns, S. et al., 2001. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, 98(4), pp.1142–9.

- Castiello, M.C. et al., 2015. B-cell reconstitution after lentiviral vector-mediated gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), p.692–702.e2.
- Chadwick, K. et al., 2003. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 102(3), pp.906–15.
- Chandrakasan, S. & Kamat, D., 2013. An Overview of Hemoglobinopathies and the Interpretation of Newborn Screening Results. *Pediatric Annals*, 42(12), pp.502–508.
- Chang, Y.-I. et al., 2010. Protein-arginine Methyltransferase 1 Suppresses Megakaryocytic Differentiation via Modulation of the p38 MAPK Pathway in K562 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), pp.20595–20606.
- Charrier, S. et al., 2005. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. *Gene therapy*, 12(7), pp.597–606.
- Charrier, S. et al., 2007. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Therapy*, 14, pp.415–428.
- Charrier, S. et al., 2013. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient hematopoietic cells can be efficiently mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Haematologica*, 98(8), pp.1300–1308.
- Choi, E.S. et al., 1995. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, 85(2), pp.402–413.
- Choi, K.-D. et al., 2012. Identification of the Hemogenic Endothelial Progenitor and Its Direct Precursor in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures. *Cell Reports*, 2(3), pp.553–567.
- Chung, J.H., Bell, A.C. & Felsenfeld, G., 1997. Characterization of the chicken  $\epsilon$ -globin insulator. *Genetics*, 94, pp.575–580.
- Cortes, J.L. et al., 2009. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Human Reproduction*, 24(8), pp.1844–1851.
- Cotta-de-Almeida, V. et al., 2007. Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), pp.15424–15429.
- Dang, Q., Auten, J. & Plavec, I., 2000. Human Beta Interferon Scaffold Attachment Region Inhibits De Novo Methylation and Confers Long-Term, Copy Number-Dependent Expression to a Retroviral Vector. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 74(6), pp.2671–2678.



## Bibliografía

- Debili, N. et al., 2001. Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates. *Blood*, 97(7), pp.2023–2030.
- Derry, J.M., Ochs, H.D. & Francke, U., 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 78(4), pp.635–644.
- Dupré, L. et al., 2006. Efficacy of Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome Using a WAS Promoter/cDNA-Containing Lentiviral Vector and Nonlethal Irradiation. *Human Gene Therapy*, 17(3), pp.303–313.
- Dupuis-Girod, S. et al., 2003. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*, 111(5 Pt 1), pp.e622-7.
- Durai, S. et al., 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic acids research*, 33(18), pp.5978–90.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154–156.
- Falet, H. et al., 2002. Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp. *Blood*, 100(6), pp.2113–2122.
- Fares, I. et al., 2014. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6203), pp.1509–12.
- Frecha, C. et al., 2008. Improved lentiviral vectors for Wiskott–Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis. *Gene Therapy*, 15(20), pp.930–941.
- Gaur, M. et al., 2006. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: A genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(2), pp.436–442.
- Geddis, A.E. & Kaushansky, K., 2006. Endomitotic Megakaryocytes form a Midzone in Anaphase but Have a Deficiency in Cleavage Furrow Formation. *Cell Cycle*, 5(5), pp.538–545.
- Gekas, C. et al., 2013. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, 121(22), pp.4463–72.
- Giammona, L.M. et al., 2006. Nicotinamide (vitamin B3) increases the polyploidisation and proplatelet formation of cultured primary human megakaryocytes. *British Journal of Haematology*, 135(4), pp.554–566.
- Giannakopoulos, A. et al., 2009. The Functional Role of S/MARs in Episomal Vectors as

- Defined by the Stress-Induced Destabilization Profile of the Vector Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 387(5), pp.1239–1249.
- Gross, B.S. et al., 1999. Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI. *Blood*, 94(12), pp.4166–76.
- Gröttum, K.A. et al., 1969. Wiskott—Aldrich Syndrome: Qualitative Platelet Defects and Short Platelet Survival. *British Journal of Haematology*, 17(4), pp.373–388.
- Hacein-Bey Abina, S. et al., 2015. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA*, 313(15), pp.1550–63.
- Haddad, E. et al., 1999. The Thrombocytopenia of Wiskott Aldrich Syndrome Is Not Related to a Defect in Proplatelet Formation. *Blood*, 94(2), pp.509–518.
- Hagemann, T.L. & Kwan, S.P., 1999. The identification and characterization of two promoters and the complete genomic sequence for the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 256(1), pp.104–109.
- Hagemann, T.L., Mares, D. & Kwan, S.P., 2000. Gene regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and the human homolog of the Drosophila Su(var)3-9: WASP and SUV39H1, two adjacent genes at Xp11.23. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1493(3), pp.368–372.
- Herrera, R. et al., 1998. A Role for the MEK/MAPK Pathway in PMA-Induced Cell Cycle Arrest: Modulation of Megakaryocytic Differentiation of K562 Cells. *Experimental Cell Research*, 238(2), pp.407–414.
- Higgins, E.A. et al., 1991. Aberrant O-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of biological chemistry*, 266(10), pp.6280–90.
- Higgs, H.N. & Pollard, T.D., 2000. Activation by Cdc42 and PIP 2 of Wiskott-Aldrich Syndrome protein ( WASp ) Stimulates Actin Nucleation by Arp2 / 3 Complex. *The Journal of cell biology*, 150(6), pp.1311–1320.
- Hoernes, M., Seger, R. & Reichenbach, J., 2011. Modern management of primary B-cell immunodeficiencies. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(8), pp.758–769.
- Hoffman, R. et al., 1985. Purification and Partial Characterization of a Megakaryocyte Colony-stimulating Factor from Human Plasma. *Journal of Clinical Investigation*, 75, pp.1174–1182.
- Ingrungruenglert, P. et al., 2015. Wiskott-Aldrich syndrome iPS cells produce megakaryocytes with defects in cytoskeletal rearrangement and proplatelet formation. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(4), pp.792–805.
- Italiano, J.E. et al., 1999. Blood platelets are assembled principally at the ends of

## Bibliografía

- proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *The Journal of cell biology*, 147(6), pp.1299–312.
- Jaffredo, T. et al., 1998. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, 125(22), pp.4575–4583.
- Ji, J. et al., 2008. OP9 Stroma Augments Survival of Hematopoietic Precursors and Progenitors During Hematopoietic Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 26(10), pp.2485–2495.
- Jones, G.E. et al., 2002. Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(7), pp.806–815.
- Julien, E., El Omar, R. & Tavian, M., 2016. Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Letters*, pp.1–15.
- Kajiwara, M. et al., 1999. WASP is involved in proliferation and differentiation of human haemopoietic progenitors in vitro. *British Journal of Haematology*, 107(2), pp.254–262.
- Kato, T. et al., 1995. Purification and Characterization of thrombopoietin. *Journal of Biochemistry*, 118(1), pp.229–236.
- Kaufman, D.S. et al., 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10716–21.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, 7(1), pp.33–40.
- Kelemen, E., Cserháti, I. & Tanos, B., 1958. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematologica*, 20(6), pp.350–355.
- Kenney, D. et al., 1986. Morphological Abnormalities in the Lymphocytes of Patients with the Wiskott-Aldrich Syndrome. *Blood*, 68(6), pp.1329–1332.
- Kim, H. et al., 2013. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) controls the delivery of platelet transforming growth factor- $\beta$ 1. *The Journal of biological chemistry*, 288(48), pp.34352–63.
- Lannutti, B., Blake, N. & Gandhi, M., 2005. Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood*, 105(10), pp.3875–3879.
- Legrand, N., Weijer, K. & Spits, H., 2006. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *Journal of immunology (Baltimore,*

- Md* : 1950), 176(4), pp.2053–2058.
- Leverrier, Y. et al., 2001. Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(8), pp.4831–4.
- Levine, R.F., 1980. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *British journal of haematology*, 45(3), pp.487–97.
- Leysi-Derilou, Y. et al., 2010. Polyploid megakaryocytes can complete cytokinesis. *Cell Cycle*, 9(13), pp.2589–2599.
- Linder, S. et al., 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17), pp.9648–9653.
- Litzman, J. et al., 1996. Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Archives of disease in childhood*, 75(5), pp.436–9.
- Liu, W.S. & Heckman, C.A., 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signalling*, 10(8), pp.529–542.
- Lordier, L. et al., 2008. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, 112(8), pp.3164–3174.
- Lordier, L. et al., 2012. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. *Cell Cycle*, 11(23), pp.4385–4389.
- Lorenzi, R. et al., 2000. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood*, 95(9), pp.2943–6.
- Lozzio, C. & Lozzio, B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), pp.321–334.
- Lu, S.-J. et al., 2011. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice. *Cell research*, 21(3), pp.530–545.
- Luthi, J.N., Gandhi, M.J. & Drachman, J.G., 2003. X-linked thrombocytopenia caused by a mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene that disrupts interaction with the WAS protein (WASP)-interacting protein (WIP). *Experimental hematology*, 31(2), pp.150–8.
- Machlus, K.R., Thon, J.N. & Italiano, J.E., 2014. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: A review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British Journal of Haematology*, 165(2), pp.227–236.
- Maeder, M.L. & Gersbach, C.A., 2016. Genome-editing Technologies for Gene and Cell

## Bibliografía

- Therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), pp.430–446.
- Mani, M. et al., 2009. Wiskott-Aldrich syndrome protein is an effector of Kit signaling. *Blood*, 114(14), pp.2900–2908.
- Marangoni, F. et al., 2009. Evidence for Long-term Efficacy and Safety of Gene Therapy for Wiskott–Aldrich Syndrome in Preclinical Models. *Molecular Therapy*, 17(6), pp.1073–1082.
- Marathe, B.M. et al., 2009. Antiplatelet antibodies in WASP(-) mice correlate with evidence of increased in vivo platelet consumption. *Experimental hematology*, 37(11), pp.1353–63.
- Martín, F., Toscano, M., et al., 2005. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Therapy*, 12, pp.715–723.
- Martín, F., Toscano, M.G., et al., 2005. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Therapy*, 12(8), pp.715–723.
- Martín, F. et al., 2016. Stem Cells for Modeling Human Disease. In *Pluripotent Stem Cells - From the bench to the clinic*. pp. 257–272.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), pp.7634–8.
- Massaad, M.J. et al., 2011. A peptide derived from the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein-interacting protein (WIP) restores WAS protein level and actin cytoskeleton reorganization in lymphocytes from patients with WAS mutations that disrupt WIP binding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), p.998–1005.e2.
- Massaad, M.J., Ramesh, N. & Geha, R.S., 2013. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1285(1), pp.26–43.
- Mattia, G. et al., 2002. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood*, 99(3), pp.888–897.
- Maximow, A.A., 1924. Relation of bloods cells to conevtive tissues and endothelium. *Physiological reviews*, IV(4), pp.533–563.
- Mazur, E.M. et al., 1990. Isolation of large numbers of enriched human megakaryocytes from liquid cultures of normal peripheral blood progenitor cells. *Blood*, 76(9), pp.1771–82.

- McGrath, K.E., Frame, J.M. & Palis, J., 2015. Early hematopoiesis and macrophage development. *Seminars in Immunology*, 27(6), pp.379–387.
- Medvinsky, A. & Dzierzak, E., 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86(6), pp.897–906.
- Menendez, P. et al., 2004. Retroviral transduction of hematopoietic cells differentiated from human embryonic stem cell-derived CD45(neg)PFV hemogenic precursors. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(6), pp.1109–20.
- Menendez, P., Bueno, C. & Wang, L., 2006. Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy*, 8(6), pp.530–41.
- Mitsui, K. et al., 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), pp.631–42.
- Molina, I.J. et al., 1992. T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of experimental medicine*, 176(3), pp.867–74.
- Morales-tirado, V. et al., 2009. Critical requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in Th2 effector function. *Blood*, 115(17), pp.3498–3507.
- Morales-Tirado, V. et al., 2004. Cutting Edge: Selective Requirement for the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in Cytokine, but Not Chemokine, Secretion by CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 173(2), pp.726–730.
- Moratto, D. et al., 2011. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 Wiskott-Aldrich Syndrome patients treated by hematopoietic cell transplantation between 1980 – 2009 : an international collaborative study. *Transplantation*, 118(6), pp.1675–1685.
- Morrison, S.J. et al., 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 124(10), pp.1929–39.
- Mostafa, S.S., Miller, W.M. & Papoutsakis, E.T., 2000. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *British journal of haematology*, 111(3), pp.879–89.
- Muñoz, P. et al., 2012. Specific marking of hESCs-derived hematopoietic lineage by WAS-promoter driven lentiviral vectors. *PLoS ONE*, 7(6).
- Nakao, K. & Angrist, A.A., 1968. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature*, 217(5132), pp.960–1.
- Naldini, L. et al., 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5259), pp.263–7.

## Bibliografía

- Navarro, F. et al., 2009. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood*, 114(10), pp.2181–2192.
- Notta, F. et al., 2015. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6269), pp.1–16.
- Nurhayati, R.W., Ojima, Y. & Taya, M., 2016. Recent developments in ex vivo platelet production. *Cytotechnology*, pp.1–11.
- Ogura, M. et al., 1985. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive philadelphia chromosome. *Blood*, 66(6), pp.1384–1392.
- Ogura, M. et al., 1988. Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01s) by phorbol diesters. *Blood*, 72(1), pp.49–60.
- Ojima, Y. et al., 2013. Synergistic effect of hydrogen peroxide on polyploidization during the megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells by PMA. *Experimental Cell Research*, 319(14), pp.2205–2215.
- Osawa, M. et al., 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272), pp.242–5.
- Van Den Oudenrijn, S., Von Dem Borne, A.E.G.K. & De Haas, M., 2000. Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34+ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Experimental Hematology*, 28(9), pp.1054–1061.
- Pachlopnik Schmid, J., Güngör, T. & Seger, R., 2014. Modern management of primary T-cell immunodeficiencies. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(4), pp.300–313.
- Pai, S.Y. & Notarangelo, L.D., 2010. Hematopoietic cell transplantation for wiskott-aldrich syndrome: Advances in biology and future directions for treatment. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(2), pp.179–194.
- Pang, L., Weiss, M.J. & Poncz, M., 2005. Megakaryocyte biology and related disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), pp.3332–3338.
- Panuganti, S. et al., 2013. Three-Stage Ex Vivo Expansion of High-Ploidy Megakaryocytic Cells: Toward Large-Scale Platelet Production. *Tissue engineering*, 19(7–8), pp.998–1014.
- Park, J.Y. et al., 2004. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: Possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), pp.104–110.
- Parolini, Oe. of W.-A. syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic

- differentiation. et al., 1997. Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood*, 90(1), pp.70–5.
- Patel, S.R. et al., 2005. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*, 106(13), pp.4076–85.
- Petrella, a et al., 1998. A 5' regulatory sequence containing two Ets motifs controls the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene in human hematopoietic cells. *Blood*, 91(12), pp.4554–60.
- Porteus, M., 2008. Design and testing of zinc finger nucleases for use in mammalian cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 435, pp.47–61.
- Poulter, N.S. et al., 2015. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nature Communications*, 6, p.7254.
- Poulter, N.S. & Thomas, S.G., 2015. Cytoskeletal regulation of platelet formation: Coordination of F-actin and microtubules. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 66, pp.69–74.
- Prislovsky, A. et al., 2008. Rapid platelet turnover in WASP(-) mice correlates with increased ex vivo phagocytosis of opsonized WASP(-) platelets. *Experimental hematology*, 36(5), pp.609–23.
- Przyborski, S.A., 2005. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(9), pp.1242–50.
- Radley, J.M. & Haller, C.J., 1982. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*, 60(1), pp.213–9.
- Ramesh, N. et al., 1997. WIP, a protein associated with Wiskott–Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Immunology*, 94(December), pp.14671–14676.
- Ramos-Mejía, V. et al., 2012. Maintenance of human embryonic stem cells in mesenchymal stem cell-conditioned media augments hematopoietic specification. *Stem cells and development*, 21(9), pp.1549–58.
- Randrianarison-Huetz, V. et al., 2010. Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF- signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage. *Blood*, 115(14), pp.2784–2795.
- Recher, M. et al., 2012. B cell–intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood*, 119(12), pp.2819–2828.



## Bibliografía

- Rengan, R. et al., 2000. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood*, 95(4), pp.1283–1292.
- Richardson, J.L. et al., 2005. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*, 106(13), pp.4066–75.
- Rieger, M.A. & Schroeder, T., 2012. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), p.a008250.
- Ryu, B.Y. et al., 2007. A chromatin insulator blocks interactions between globin regulatory elements and cellular promoters in erythroid cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 39(3), pp.221–228.
- Sabri, S. et al., 2006. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood*, 108(1), pp.134–140.
- Sardina, J.L. et al., 2010. p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 17(12), pp.1842–1854.
- Schulze, H. et al., 2006. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 107(10), pp.3868–3875.
- Schweinfurth, N. et al., 2010. Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets*, 21(8), pp.648–57.
- Shattil, S.J., Kashiwagi, H. & Pampori, N., 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*, 91(8), pp.2645–57.
- Shcherbina, A., Bretscher, A., et al., 1999. The cytoskeletal linker protein moesin: decreased levels in Wiskott-Aldrich syndrome platelets and identification of a cleavage pathway in normal platelets. *British journal of haematology*, 106(1), pp.216–23.
- Shcherbina, A. et al., 2001. WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain. *Blood*, 98(10), pp.2988–91.
- Shcherbina, A. et al., 2010. WASP plays a novel role in regulating platelet responses dependent on  $\alpha\text{IIb}\beta^3$  integrin outside-in signalling. *British Journal of Haematology*, 148(3), pp.416–427.
- Shcherbina, A., Rosen, F.S. & Remold-O'Donnell, E., 1999. Pathological events in platelets of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *British journal of haematology*, 106(4), pp.875–83.
- Shin, C.R. et al., 2012. Outcomes following hematopoietic cell transplantation for Wiskott-

- Aldrich syndrome. *Bone marrow transplantation*, 47(11), pp.1428–35.
- Shultz, L.D., Ishikawa, F. & Greiner, D.L., 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature reviews. Immunology*, 7(2), pp.118–30.
- Simon, H.U. et al., 1992. Evidence for defective transmembrane signaling in B cells from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), pp.1396–1405.
- Snapper, S.B. et al., 1998. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity*, 9(1), pp.81–91.
- Snapper, S.B. & Rosen, F.S., 1999. THE WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN ( WASP ): Roles in Signaling and Cytoskeletal Organization. *Annuals reviews Immunology*.
- Stewart, D.M., Candotti, F. & Nelson, D.L., 2007. The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. *Journal of clinical immunology*, 27(6), pp.634–639.
- Sullivan, K.E. et al., 1994. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 125(6 PART 1), pp.876–885.
- Takahashi, M. et al., 2014. CD133 is a positive marker for a distinct class of primitive human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 28(6), pp.1308–15.
- Takayama, N. et al., 2008. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs , VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*, 111(11), pp.5298–5306.
- Tavassoli, M., 1980. Megakaryocyte-Platelet axis and the proces of platelet formation and release. *Blood*, 55(4), pp.537–545.
- Thomson, J.A. et al., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), pp.1145–7.
- Thon, J.N. et al., 2010. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *The Journal of cell biology*, 191(4), pp.861–74.
- Thrasher, A.J., 2009. New insights into the biology of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS). *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp.132–138.
- Thrasher, A.J. & Burns, S.O., 2010. WASP: a key immunological multitasker. *Nature reviews. Immunology*, 10(3), pp.182–192.

## Bibliografía

- Toscano, M.G. et al., 2004. Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Therapy*, 11(12), pp.956–961.
- Toscano, M.G. et al., 2008. Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Human gene therapy*, 19(2), pp.179–97.
- Toscano, M.G. et al., 2013. Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 6(2), pp.544–554.
- Toscano, M.G. et al., 2009. Was cDNA Sequences Modulate Transgene Expression of Was Promoter-Driven Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy*, 20(11), pp.1279–1290.
- Trécul, A. et al., 2014. Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks. *Biochemical Pharmacology*, 92(2), pp.299–311.
- Trifari, S. et al., 2006. Defective Th1 Cytokine Gene Transcription in CD4+ and CD8+ T Cells from Wiskott-Aldrich Syndrome Patients. *The Journal of Immunology*, 177(10), pp.7451–7461.
- Tsuboi, S. et al., 2006. Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in alphaIIb beta3-mediated cell adhesion. *EMBO reports*, 7(5), pp.506–11.
- Tsuboi, S. & Meerloo, J., 2007. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 282(47), pp.34194–203.
- Tsuruta, T., 2013. Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy.
- Vodyanik, M. et al., 2005. Human embryonic stem cell – derived CD34  $\alpha$  cells : efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 105(2), pp.617–626.
- Wada, T. et al., 2003. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome ( WAS ) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *Journal of clinical investigation*, 111(9), pp.1389–1397.
- Wada, T. et al., 2001. Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp.8697–702.
- Wang, L. et al., 2004. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 21(1), pp.31–41.

- Wang, L. et al., 2005. Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. *Experimental hematology*, 33(9), pp.987–996.
- Warlich, E. et al., 2011. Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming. *Molecular Therapy*, 19(4), pp.782–789.
- Wei, G.H., Liu, D.P. & Liang, C.C., 2005. Chromatin domain boundaries: insulators and beyond. *Cell Research*, 15(4), pp.292–300.
- Wengler, B.G. et al., 1995. Nonrandom Inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Blood*, 85(9), pp.2471–2477.
- Westerberg, L. et al., 2005. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood*, 105(3), pp.1144–1152.
- Westerberg, L.S. et al., 2008. WASP confers selective advantage for specific hematopoietic cell populations and serves a unique role in marginal zone B-cell homeostasis and function. *Blood*, 112(10), pp.4139–4147.
- Westerberg, L.S. et al., 2012. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for peripheral B-cell development and function. *Blood*, 119(17), pp.3966–3974.
- Whalen, A.M. et al., 1997. Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Molecular and cellular biology*, 17(4), pp.1947–58.
- Wiznerowicz, M. & Trono, D., 2005. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(1), pp.42–47.
- Woolthuis, C.M. & Park, C.Y., 2016. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*, 127(10), pp.1242–1248.
- Yang, L. et al., 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 105(7), pp.2717–23.
- Yarar, D. et al., 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current Biology*, 9(10), pp.555–558.
- Yeom, Y.I. et al., 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development (Cambridge, England)*, 122(3), pp.881–94.
- Yoder, M.C., 2014. Inducing definitive hematopoiesis in a dish. *Nature Biotechnology*, 32(6), pp.539–541.

## *Bibliografía*

- Yu, M. & Cantor, A.B., 2012. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 788, pp.291–303.
- Zhang, B., Duan, Z. & Zhao, Y., 2009. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(6), pp.1043–1058.
- Zufferey, R. et al., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology*, 15(9), pp.871–5.

**ANEXO I:**  
**PUBLICACIÓN**



## Absence of WASp Enhances Hematopoietic and Megakaryocytic Differentiation in a Human Embryonic Stem Cell Model

Miguel G Toscano<sup>1,2</sup>, Pilar Muñoz<sup>1,3</sup>, Almudena Sánchez-Gilbert<sup>1</sup>, Marién Cobo<sup>1</sup>, Karim Benabdellah<sup>1</sup>, Per Anderson<sup>1</sup>, Verónica Ramos-Mejía<sup>4</sup>, Pedro J Real<sup>4</sup>, Olaf Neth<sup>5</sup>, Agueda Molinos-Quintana<sup>6</sup>, Philip D Gregory<sup>7</sup>, Michael C Holmes<sup>7</sup> and Francisco Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic Medicine Department, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain; <sup>2</sup>Current address: Amarna Therapeutics S.L., Instituto Cartuja, C/ Leonardo da Vinci 19<sup>o</sup>, Seville, Spain; <sup>3</sup>Current address: University College London-Institute of Child Health, London, UK; <sup>4</sup>Genomic Oncology Department, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain; <sup>5</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas e Inmunopatologías Pediátricas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>6</sup>UGC Hematología y Hemoterapia, Hospital Infantil Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>7</sup>Sangamo BioSciences, Inc., Pt. Richmond Tech Center, Richmond, California, USA

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked primary immunodeficiency caused by mutations in the WAS gene and characterized by severe thrombocytopenia. Although the role of WASp in terminally differentiated lymphocytes and myeloid cells is well characterized, its role in early hematopoietic differentiation and in platelets (Plts) biology is poorly understood. In the present manuscript, we have used zinc finger nucleases targeted to the WAS locus for the development of two isogenic WAS knockout (WASKO) human embryonic stem cell lines (hESCs). Upon hematopoietic differentiation, hESCs-WASKO generated increased ratios of CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> progenitors with altered responses to stem cell factor compared to hESCs-WT. When differentiated toward the megakaryocytic lineage, hESCs-WASKO produced increased numbers of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> progenitors, megakaryocytes (MKs), and Plts. hESCs-WASKO-derived MKs and Plts showed altered phenotype as well as defective responses to agonist, mimicking WAS patients MKs and Plts defects. Interestingly, the defects were more evident in WASp-deficient MKs than in WASp-deficient Plts. Importantly, ectopic WAS expression using lentiviral vectors restored normal Plts development and MKs responses. These data validate the AND-1\_WASKO cell lines as a human cellular model for basic research and for preclinical studies for WAS.

Received 31 July 2015; accepted 14 October 2015; advance online publication 8 December 2015. doi:10.1038/mt.2015.196

### INTRODUCTION

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked primary immunodeficiency characterized by eczema, low Plts counts (microthrombocytopenia), recurrent infections, immunodeficiency, increased incidence of autoimmunity, and leukemia. The WAS gene

is expressed exclusively in hematopoietic cells.<sup>1-3</sup> Mutations that lead to the complete absence of WASp function cause the most severe phenotype with pronounced thrombocytopenia and abnormal lymphoid and myeloid function. However, the mutations that reduce the protein levels (or its function) result in milder variable phenotypes.<sup>4,5</sup>

The roles of WAS mutations in T cells, B cells, macrophages, dendritic cells, and natural killer cells have been extensively studied and are well characterized. Absence of WASp in these cell types alters actin polymerization causing problems on signaling, proliferation, migration, and phagocytosis. WAS-deficient mouse models<sup>6-8</sup> and cell lines<sup>9,10</sup> have been fundamental for the understanding of WASp function in all these cell types. However, WAS knockout (WASKO) mouse models do not mimic the Plts defects found in WAS patients making it difficult to study the function of WASp in MKs and Plts physiology.<sup>11</sup> The role of WASp in Plt development remains largely unknown with contradictory results.<sup>12,13</sup> In an elegant study, Sabri *et al.*<sup>14</sup> identified a critical role of WASp in Plts biogenesis by inhibiting proplatelet formation through the Collagen I receptor. The same authors showed premature MK differentiation in the absence of WASp.<sup>14</sup> Functional defects of WAS patient's Plts is also an open debate. Some authors described normal platelets activation, aggregation,  $\alpha$ -granule secretion, and F-actin increase of WAS patient's Plts<sup>15-18</sup> while other groups have reported mild or severe alteration of these functions.<sup>19-21</sup> Similarly, very little is known about the role of WASp in early hematopoiesis with publications with apparent contradictory results.<sup>6,22,23</sup>

Human embryonic stem cells (hESCs) represent a unique tool to study early human development, for cell therapy and for developing *in vitro* models of human diseases. They can be differentiated into cell types from the three germ layers, providing an unlimited source of cells to study human development.<sup>24,25</sup> Recently, the appearance of specific nucleases has made it possible to efficiently edit the genomes of most cell types.<sup>26</sup> In particular, specific targeting of different loci using Zinc Finger Nucleases

The first four authors contributed equally to this work.

Correspondence: Francisco Martín, Genomic Medicine Department, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Av. de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. E-mail: francisco.martin@genyo.es



(ZFNs) have achieved efficient gene disruption, gene correction, and gene addition in several cell types including pluripotent stem cells.<sup>27-29</sup> Gene editing of hESCs provides an excellent tool for modeling human monogenic diseases due to the possibility to obtain isogenic cell lines differing only in the desired mutations. These systems allow establishing a correlation genotype-phenotype without the interference of different genetic backgrounds as occurs when using induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived directly from patients.

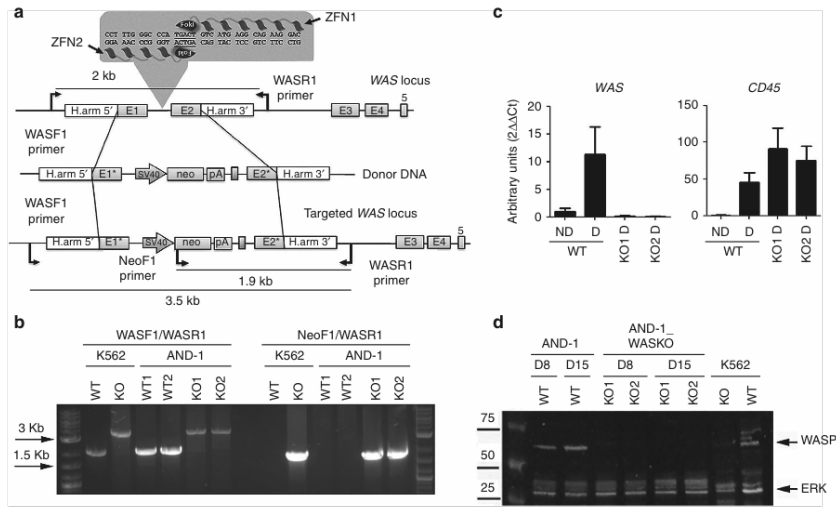
In the present manuscript, we have used ZFNs targeted to the WAS locus for the development of two WAS knock-out (WASKO) hESC cell lines: AND-1\_WASKO C1.1 and AND-1\_WASKO C1.2. We have studied the role of WASp in early human hematopoiesis by comparing the *in vitro* generation of hematopoietic progenitors (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) and mature CD45<sup>+</sup> cells from AND-1\_WASKO versus parental AND-1\_WT. We have also investigated the role of WASp on

megakaryopoiesis by analyzing MK progenitors, MKs, and Plts upon *in vitro* differentiation following a protocol described by Lu *et al.*<sup>30</sup> This protocol allows the generation of functional Plts from hESCs. Finally, we have studied whether the phenotype observed in hESCs due to WAS mutation can be restored by ectopic expression of WAS.

**RESULTS**

**Generation of WASKO hESCs by homologous recombination using ZFNs**

AND-1\_WT1 cells<sup>31</sup> were nucleofected with plasmids encoding ZFN targeted to the WAS intron1 (Figure 1a, top) and the donor DNA (Figure 1a, middle). Homologous-directed recombination (HDR)-driven modification of the WAS locus (Figure 1a, bottom) was evaluated by PCR. Figure 1b shows the PCR analysis of two clones; AND-1\_WASKO\_c1.1 (KO1) and AND-1\_WASKO\_c1.2 (KO2) (International Stem cell Registry, Spanish National Stem



**Figure 1** Generation of hESCs-WASKO cell lines by targeting the WAS locus with ZFNs. **(a)** Scheme depicting the strategy followed to mutate the WAS gene. Upper diagram illustrates the first five exons of the WAS locus (E1–E5), the sequences recognized by the ZFN pair (left ZFN and right ZFN, in the gray box), the homologous sequences used to promote homologous recombination (H.arm5' and H.arm3') and the primer pair used to identify the wild-type locus (rendering a 2-kb fragment). The middle diagram illustrates the donor DNA used to disrupt WAS expression. Exon 1 has a deletion in the ATG codon to block translation (E1\*). Exon 2 includes mutations in the splicing acceptor site (E2\*). A neo expression cassette (SV40-neo-pA) has been introduced to allow antibiotic selection. Lower diagram shows the 'edited' WAS locus after homologous recombination with the donor DNA. Arrows indicate the primers used to identify those clones modified by homologous-directed recombination (HDR). **(b)** Successful gene editing of AND-1\_WT cells. K562 cells wild-type (WT) and K562-WASKO (KO)<sup>41</sup> have been used as negative and positive control of gene editing, respectively. Agarose gel shows the analysis to detect HDR in two G418-resistant clones of the hESC line AND-1\_WT. The band of 3.5 kb, present in both G418-resistant clones as well as in the K562 WASKO cells, indicates successful HDR. Also, the presence of the 1.9 kb band in AND-1\_WASKO as in the positive control indicates that the HDR happened in the right orientation. **(c)** WAS expression was abolished upon hematopoietic differentiation in AND-1\_WASKO cells. WAS and CD45 gene expression analysis performed by RT-qPCR of AND-1\_WT (WT) and AND-1\_WASKO clones (KO1 and KO2) before (ND) and after (D) 15 days of hematopoietic differentiation. CD45 expression indicates the hematopoietic specification. As expected WAS expression was not detected in AND-1\_WASKO clones. Values are mean of three experiments ± standard error of the mean. **(d)** Absence of WASp protein in hematopoietic differentiated AND-1\_WASKO cells. Western blot analysis of protein extracts from AND-1\_WT and AND-1\_WASKO cells, obtained at days 8 (D8) and 15 (D15) of the hematopoietic differentiation. The membrane was hybridized with D1 (specific for WASp) and ERK (as loading control) antibodies. WASp protein was not detected in any of the AND-1\_WASKO clones. K562 cells wild-type (WT) and K562-WASKO (KO) have been used as negative and positive control for WASp expression.

Cell Bank) using the primers depicted in Figure 1a. The gel shows the predicted bands if HDR occurred with the donor DNA (Figure 1b). AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2 cells maintained similar phenotype (Supplementary Figure S1) and pluripotency (Supplementary Figure S2) as compared to the original AND-1\_WT cells and to AND-1\_WT2 cells (a clone obtained from AND-1\_WT1, see Materials and Methods for details). Importantly, the karyotypes of both WASKO cell lines were identical to that of the original AND-1\_WT1 cell line (Supplementary Figure S3).

The proper edition of the WAS locus should deplete WAS expression in AND-1\_WASKO-derived hematopoietic cells. Indeed, while WAS expression could be clearly detected in AND-1\_WT cells upon hematopoietic differentiation both at the mRNA (Figure 1c left) and protein levels (Figure 1d; AND-1, D8 and D15 WT lanes), AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2 cells presented no detectable WAS mRNA (Figure 1c, left graph) or WASp protein (Figure 1d; AND-1\_WASKO, D8 and D15; KO1 and KO2 lines). Of note, as expected, AND-1\_WT cells did not express WASp in undifferentiated conditions (Figure 1c, left graph).

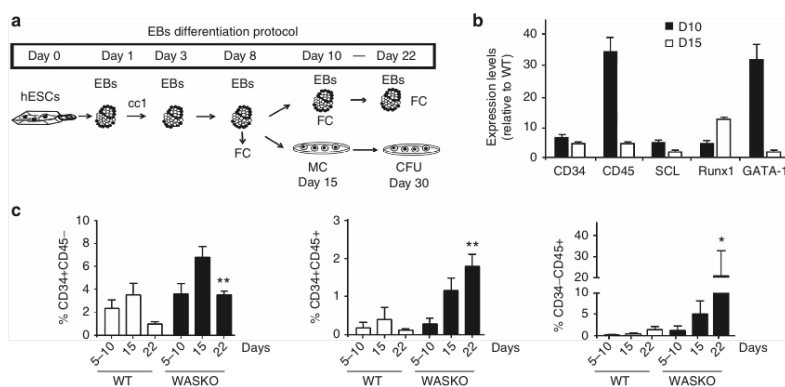
#### WASKO hESCs generate increased number of hematopoietic progenitors and mature CD45<sup>+</sup> cells

We first studied the ability of WAS-deficient hESCs to generate hematopoietic cells. The different hESC lines were differentiated using the embryoid body (EB) system (Figure 2a) as described previously;<sup>32</sup> mRNA was isolated at days 10 and 15 of differentiation and the expression levels of several hematopoietic-related

genes analyzed by RT-qPCR (Figure 2b). Compared with AND-1\_WT, AND-1\_WASKO cells presented enhanced expression of the hematopoietic transcription factors SCL, RUNX1, and GATA-1 at day 10 and 15 of hematopoietic differentiation. We also observed an increase in the expression of CD34 and CD45 indicating a possible enhancement of the hematopoietic differentiation. To further investigate this finding, we measured the percentages of CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> (hemato-endothelial precursors), CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (hematopoietic precursor cells), and mature CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> at different time points during the hematopoietic differentiation using the EB system (Figure 2c). Interestingly, AND-1\_WASKO cells presented an increase in all these populations that reached significance at day 22. Similar results were obtained using the OP9 hematopoietic differentiation protocol (Supplementary Figure S4). These data indicate that the absence of WASp is altering hematopoietic differentiation generating higher numbers of progenitors and mature CD45<sup>+</sup> cells. Although controversial, this data is in line with the observation that WASKO mice have higher numbers of progenitors and granulocytes in spleen and peripheral blood.<sup>23</sup>

#### CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells derived from WASKO hESCs cells had altered responses to stem cell factor

Mani *et al.*<sup>22</sup> showed that WASp is involved in kit (stem cell factor (SCF)-receptor)-mediated signal transduction and required for kit-induced cellular Ca<sup>2+</sup> signaling and survival. We therefore studied whether WASKO CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (HPCs) had altered responses to SCF (*i.e.*, reduced Ca<sup>2+</sup> flux) or reduced clonogenic potential in methylcellulose as previously

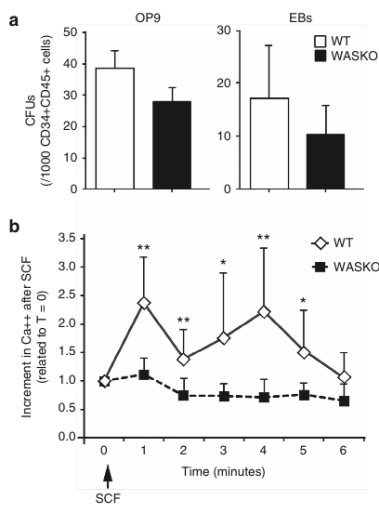


**Figure 2** Enhanced hematopoiesis of hESCs-WASKO cells. **(a)** Scheme depicting the protocol for hematopoietic differentiation using embryoid bodies (EBs) formation. CC1: cytokine cocktail 1; (BMP-4 (25 ng/ml), Flt-3L (300 ng/ml), SCF (300 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), and G-CSF (50 ng/ml)). CFU, colony-forming units; FC, flow cytometry; MC, methylcellulose. **(b)** Graph showing AND-1\_WASKO relative expression levels of hematopoietic markers (CD34 and CD45) and transcription factors SCL, RUNX1 and GATA-1 at day 10 (white bars) and 15 (black bars) of differentiation. Expression levels are shown relative to AND-1\_WT (2 $\Delta\Delta$ CT AND-1\_WASKO/2 $\Delta\Delta$ CT AND-1\_WT). **(c)** Graph showing percentages of CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> (hemato-endothelial precursor cells, left graph), CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (hematopoietic precursors; middle graph) and CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Mature hematopoietic cells; right graph) of AND-1\_WT and AND-1\_WASKO cells at different time points during the hematopoietic differentiation process. Data were obtained from cells gated based on size (FSC), granularity (SSC) and 7-AAD negative (viable) population as shown in Supplementary Figure S12. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean of at least four separate experiments using two AND-1\_WT cell lines (AND-1\_WT1 and AND-1\_WT2) and two AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2). \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01.

showed by some authors.<sup>33</sup> Although we found that HPCs derived from AND-1\_WASKO cells (WASKO-HPCs) had a slight reduction in clonogenic potential (colony-forming units (CFU)/CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells) compared to the HPCs derived from AND-1\_WT cells (WT-HPCs) both in the OP9 and EBs differentiation systems (Figure 3a), the data was not significant. These data is in agreement with Ingrungruangler *et al.*<sup>34</sup> showing a normal clonogenic potential of CD34<sup>+</sup> cells derived from iPSCs from WAS patients. Interestingly, Ca<sup>2+</sup> flux in response to SCF was significantly reduced in WASKO-HPCs, confirming the role of WASp in kit-mediated signals in hematopoietic progenitors (Figure 3b).

**WASKO hESCs cells differentiate into the megakaryocytic lineage generating WASKO-MKs and WASKO-Plts**

The low platelet counts (thrombocytopenia) found in WAS patients' blood can be restored to normal values after spleen



**Figure 3** Functional analysis of hESCs-WASKO derived CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells. **(a)** Graphs showing colony-forming units (CFUs) potential of CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> derived from AND-1\_WASKO<sup>-1.1</sup> (black bars) and AND-1\_WT (white bars) on the OP9 differentiation system (left graph) or in the EBs system (right graphs). Day 15 (EBs) or day 10 (OP9) cells were harvested, analyzed for CD34 and CD45 expression and 1,000 CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells plated onto methylcellulose (see Materials and Methods for detail). **(b)** Graph representing intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization of CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> WASKO (squares) and WT (diamonds) cells in response to SCF. Day 15 cells (EBs) were harvested, washed, and prepared for Ca<sup>2+</sup> mobilization studies (see Materials and Methods for details). Cells were analyzed by flow cytometry with continuous acquisition for 30 seconds to measure background levels (T = 0). Acquisition was then paused to add the SCF (100ng/ml; arrow) and immediately restart the continuous acquisition for 6 minutes. Ca<sup>2+</sup> flux is shown as the increment in MFI of SCF-stimulated cells at the different time points related to unstimulated cells (time = 0). Data are mean of at least three separate experiments ± standard error of the mean. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

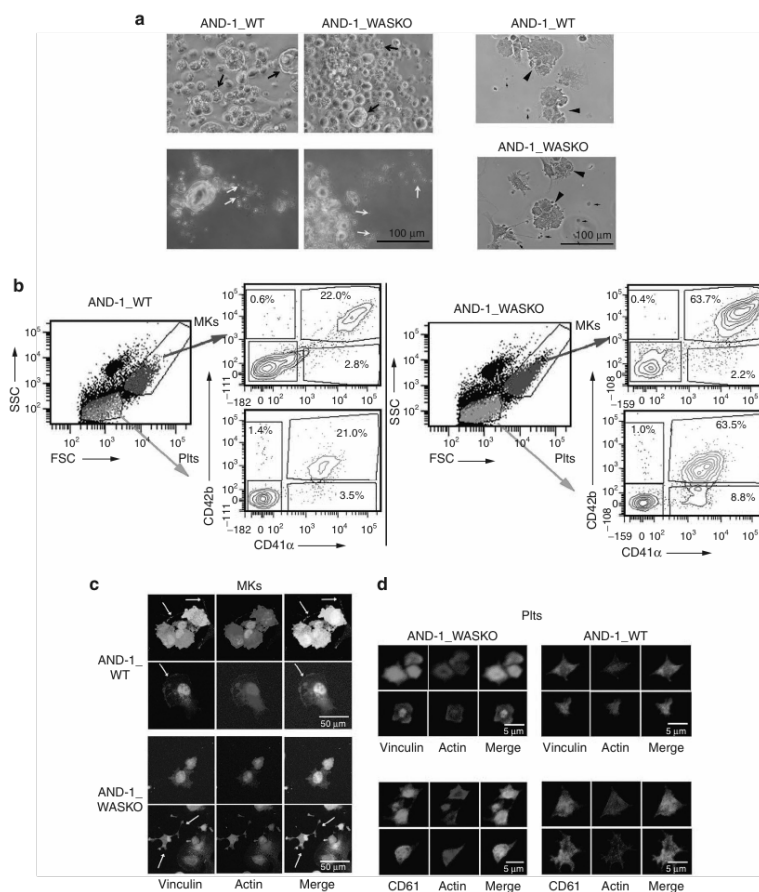
removal<sup>35</sup> suggesting that WAS patients do not have an intrinsic problems for Plt production. However, there are controversy in this matter.<sup>14,33,34,36</sup> We used the AND-1\_WASKO cells to study the role of WASp on megakaryocytic differentiation. The different hESCs lines were differentiated into the megakaryocytic lineage following the protocol pictured in **Supplementary Figure S5**.<sup>40</sup> Lu *et al.* demonstrated that Plts derived from hESCs following this protocol responded to thrombin stimulation, formed microaggregates, and contribute to developing thrombi at sites of vascular injury in mice. Upon differentiation, human MK- and Plt-like structures were observed in the differentiation cultures of both cell lines both by microscopy (Figure 4a, arrows; **Supplementary Figure S6**) and flow cytometry (Figure 4b, arrows). The phenotypic characterization of the cells contained in our megakaryocytic cultures corroborated the presence of MKs and Plts (Figure 4b). Indeed, AND-1\_WT and AND-1\_WASKO cell lines generated large, granular, CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> MKs (Figure 4b, top plots, dark green) and small Plts CD41<sup>+</sup>CD42<sup>-</sup> (Figure 4b, bottom plots, bright green). Interestingly, AND-1\_WASKO cell lines presented increased percentages of both MKs and Plts (Figure 4b, left versus right panels).

Additionally, when adhered to fibrinogen-coated slides and activated with thrombin, MKs from both WT and WASKO cell lines expressed CD61<sup>+</sup> (**Supplementary Figure S7a**) and formed proplatelets and lamellipodia structures that were positive for actin and vinculin (Figure 4c, arrows and **Supplementary Figure S7b**). Interestingly, WASKO-MKs presented more irregular shapes and actin distribution than WT-MKs (Figure 4c and **Supplementary Figure S7b**). Plts derived from both cell lines were also CD61<sup>+</sup> (Figure 4d, bottom panels and **Supplementary Figure S7c**), presented a trapezoidal structure as Plts from peripheral blood (**Supplementary Figure S8**) and had a clear colocalization of actin and vinculin (Figure 4d, top panels and **Supplementary Figure S7d**). As described for WAS patients, WASKO-Plts appeared slightly smaller and presented less protrusions compared with WT-Plts (Figure 4d and **Supplementary Figure S7c,d**). In summary, these data showed that AND-1\_WASKO cells can efficiently generate MKs and produce Plts.

**Enhanced megakaryocytic differentiation of WASKO hESCs cells compared to WT hESCs**

We further evaluated the kinetics of emergence of MKs and Plts from AND-1\_WT and AND-1\_WASKO cells. We found an earlier appearance (Figure 5a, top graphs) and increased amounts (Figure 5a, bottom graphs; **Supplementary Figure S9**) of MKs and Plts from AND-1\_WASKO cells compared to AND-1\_WT. Indeed, the percentages and total counts of MKs and Plts at days 18 and 20 of differentiation were significantly higher for AND-1\_WASKO cells but no differences could be detected after day 22. Moreover, the total numbers of MKs and Plts produced by AND-1\_WASKO cells during the megakaryocytic culture was two to four times higher to those produced by AND-1\_WT cells (**Supplementary Figure S9**). This data is in line with the premature MK differentiation observed by Sabri *et al.* in WASKO mice and indicates that this phenomenon can also occur in humans.

In order to evaluate whether this phenomenon was in part due to an early appearance of MK progenitors, we analyzed the



**Figure 4** Megakaryocytic differentiation and Plts production of hESCs-WASKO cells are not impaired. **(a)** Morphological analysis of megakaryocytic differentiation cultures of AND-1\_WT1 and AND-1\_WASKO\_c1.1 cells (see **Supplementary Figure S5** and Materials and Methods for details). Day 20 megakaryocytic cultures were photographed with a WASKOscope Primo Vert (Carl Zeiss) on tissue culture plates (top-left panels), after collection (bottom-left panels) or after adhesion to fibrinogen coated slides and stained with Papanicolaou (right panels). MKs and Plts-like structures are indicated by arrows. **(b)** Phenotypic characterization of cells contained in the megakaryocytic cultures. Cells were gated based on size (FSC) and granularity (SSC) into MK-region and Plts region (SSC/FSC plots). Each gate was further analyzed for expression of CD41 and CD42 (right plots at the side of the FSC/SSC plot). Large and granular, CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> cells were identified as MKs (SSC<sup>high</sup>FSC<sup>high</sup>CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>; top plots, dark green). Small CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> cell fragments were identified as Plts (SSC<sup>low</sup>FSC<sup>low</sup>CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>; bright green). **(c)** MK derived from AND-1\_WT1 and AND-1\_WASKO bind to fibrinogen and express CD61 and vinculin. Megakaryocytic cultures from AND-1\_WT1 (top panels) and AND-1\_WASKO\_c1.1 (bottom panels) were collected on day 20, adhered to fibrinogen coated slides, activated with thrombin and immune-stained Phalloidin (red, actin), anti-vinculin (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). A Merge image is shown at the right of each set. **(d)** Platelets from AND-1\_WT1 (top panels) and AND-1\_WASKO\_c1.1 (bottom panels) were collected on day 20 and treated as above. Samples were immune-stained with DAPI (Blue), Phalloidin (red) together with anti-vinculin (green) (top panels) or anti-CD61 (green) (bottom panels). A Merge image is shown at the right of each set. Confocal images were captured with a confocal microscope Zeiss LSM 880.

presence of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> cells in the EBs at the moment of being plated onto OP9 cells (day 15 of megakaryocytic differentiation). We detected increased levels of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> cells in WASKO-EBs

(Figure 5b). To further corroborate this result, we analyzed the expression levels of two megakaryocytic-specific surface markers (CD41<sup>+</sup> and CD61<sup>+</sup>) and five transcription factors associated

with megakaryocytic differentiation (NF-E2, GATA-1, FOG-1, RUNX-1, and FLI-1) confirming the enhanced MK differentiation of WASKO-EBs compared to WT-EBs (Figure 5c,d; Black bars versus white bars). All these data together indicate that WASp is controlling megakaryocytic differentiation which is in agreement with data showing premature MK differentiation in mice WASKO models and the accumulation of MKs in bone marrow.<sup>14,37</sup>

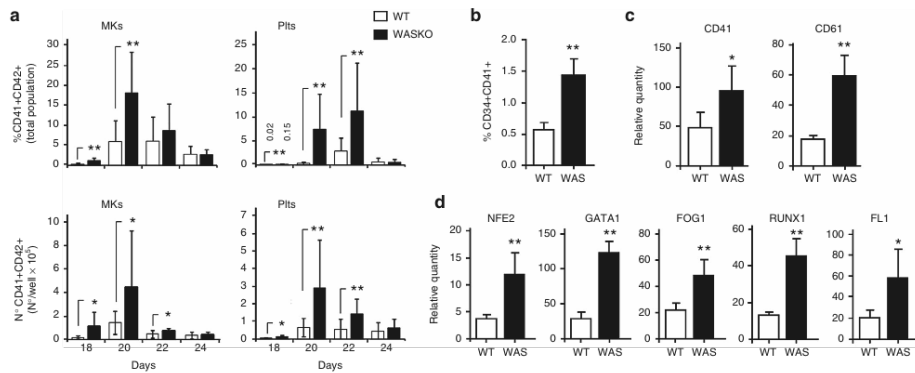
**MKs and Plts derived from WASKO hESCs cells mimic the defects found in MKs and Plts from WAS patients**

Plts from WAS patients are smaller and have some phenotypic alterations like reduced levels of CD43 at their surface.<sup>15-18</sup> However, it is not known whether these abnormalities are already present at the time of Plts emergence from the MKs or if these alterations are acquired in the blood stream. We therefore compared the phenotype of MK and Plts derived from WASKO hESCs with MK and Plts derived from control hESCs. FACS analysis showed that WASKO-Plts were generally smaller (lower FSC) and less granular (lower SSC) than WT-Plts (Figure 6a; left and middle graphs-Plts). These data is in agreement with the smaller Plts size found in Plts from WAS patients and in Plts derived from WAS patients' iPSCs.<sup>34</sup> On the contrary, WASKO-MKs appeared bigger and more irregular than WT-MKs (Figure 6a; left and middle graphs-MKs), although this data can reflect a more mature phenotype of WASKO MKs due to the early appearance during the differentiation process. Plts from WAS patients have also reduced CD43 expression levels.<sup>18,38,39</sup> As observed in WAS patients, WASKO-Plts derived from WASKO hESCs had lower

CD43 expression (Figure 6a; right graphs-Plts). However, no significant differences were detected in WASKO-MKs.

To study whether WASKO-MKs and WASKO-Plts had altered functionality, we first studied their intracellular Ca<sup>++</sup> flux (an important regulator of Plts function) after agonist stimulation. As controls, we used Plts from a healthy individual and from a WAS patient (L101P on exon 3) (Figure 6b; left graph). Our data showed that Plts derived from hESCs WASKO had near normal intracellular Ca<sup>++</sup> mobilization after thrombin signaling compared to Plts derived from hESCs WT (Figure 6b; middle graph). Similar results were obtained when comparing Plts from peripheral blood of the WAS patient with Plts from a healthy individual (Figure 6b; left graph). Interestingly, a tendency to prolong the agonist-induced Ca<sup>++</sup> flux in WASKO-Plts compared to WT-Plts can be observed both in Plts derived from hESCs WASKO and in Plts from the WAS patient (Figure 6b; left and middle graphs, open circles). These observations are in agreement with previous data showing a normal Ca<sup>++</sup> flux increment and prolongation of the agonist-induced Ca<sup>++</sup> flux in WAS patients.<sup>19</sup> However, contrary to WASKO-Plts, WASKO-MKs responded poorly to thrombin (Figure 6b; right graph), indicating that WASp could play an important role in MKs function.

We next measured activation of the fibrinogen receptor (measured as PAC-1 binding) of WASKO-MKs and WASKO-Plts compared to WT-MKs and WT-Plts. Our data indicated that the fibrinogen receptor of WASKO-Plts was efficiently activated by thrombin (Figure 6c, lower plots and graphs) while WASKO-MKs had this response slightly compromised compared to WT-MKs



**Figure 5** Megakaryocytic specification and Plts production is enhanced in hESCs-WASKO cells. **(a)** Enhanced MKs and Plts production in AND-1\_WASKO compared to AND-1\_WT cells. Graphs showing percentages (top) and total counts (bottom) of MKs (left) and Plts (right) derived from AND-1\_WT (white bars) and AND-1\_WASKO (black bars) cells at different days of megakaryocytic differentiation. Supernatant from OP9 cocultures were collected each 2 days, starting from day 18 and continued up to day 24. Cells were stained using CD41 and CD42 monoclonal antibodies and double positive cells considered as MKs and Plts as described in Figure 4. **(b)** Enhanced percentages of megakaryocytic progenitors in WASKO EBs. The EBs from AND-1\_WT and AND-1\_WASKO cells were dissociated on day 15, stained with anti-CD34 and anti-CD41 antibodies and analyzed by flow cytometry. Graph shows the percentage CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> cells identifying the MK progenitors. **(c)** and **(d)** Gene expression analysis of AND-1\_WT (white bars) and AND-1\_WASKO (Black bars) cells on EBs at day 15 of differentiation. Two MK specific surface markers (CD41 and CD61) **(c)** and five transcription factors associated with megakaryocytic differentiation (NF-E2, GATA-1, FOG-1, RUNX-1 and FLI-1) **(d)** are shown. Graphs represent expression levels relative to undifferentiated AND-1\_WT. Data represent mean ± standard error of the mean of at least three separate experiments using two AND-1\_WT cell lines (AND-1\_WT1 and AND-1\_WT2) and two AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

(Figure 6c, upper plots and graphs). Interestingly, both WASKO-Plts and WASKO-MKs had increased PAC-1 binding in basal (unstimulated) conditions compared to WT-Plts and WT-MKs (Figure 6c and Supplementary Figure S10). These data is in agreement with Gross *et al.*<sup>40</sup> showing a slight increase rate of aggregation and dense granules secretion in response to agonist of platelets from WAS patients. All these data together indicate a deregulation of the mechanisms of activation of the fibrinogen receptor in WASKO MKs and Plts.

**Ectopic expression of WAS in AND-1\_WASKO cells restored typical MKs and Plts development and normal MKs function**

We finally investigated whether ectopic expression of WAS in AND-1\_WASKO cells could restored the altered phenotypes observed. We generated two bulk populations (AND-1\_WASKO\_WW.1 and AND-1\_WASKO\_WW.2) by transduction with the WW-puro vector (see Materials and Methods) and puromycin selection. In both cell lines, we observed low levels

of WAS expression in undifferentiated hESCs and above normal levels of WAS expression upon hematopoietic differentiation (Supplementary Figure S11). We then studied whether the ectopic expression of WAS in hESCs-WASKO cells could restored normal megakaryocytic differentiation, as this is one of the most clear but at the same time unexpected phenotype. We therefore performed megakaryocytic differentiation of the AND-1\_WT, AND-1\_WASKO and AND-1\_WASKO\_WW cell lines and studied emergence of CD34+CD41+ progenitors, MKs and Plts. Our data showed that the percentage of CD34+CD41+ cells derived from AND-1\_WASKO\_WW at day 15 was similar to those derived from AND-1\_WT (ratio WT/WW = 1; Figure 7a) but much lower than those obtained from AND-1\_WASKO cells (ratio WASKO/WW = 3 in Figure 7a). In the same direction, the AND-1\_WASKO\_WW cell lines also produced similar levels of MKs (Figure 7b, left) and Plts (Figure 7b, right) compared to AND-1\_WT (white versus gray bars) and lower levels compared to hESCs-WASKO (gray bars versus black bars). In summary, our data showed that the ectopic expression of WAS

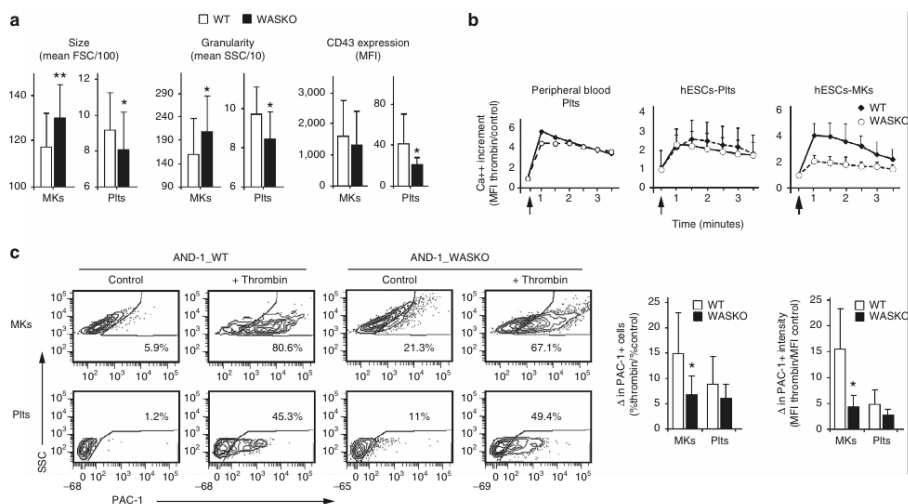
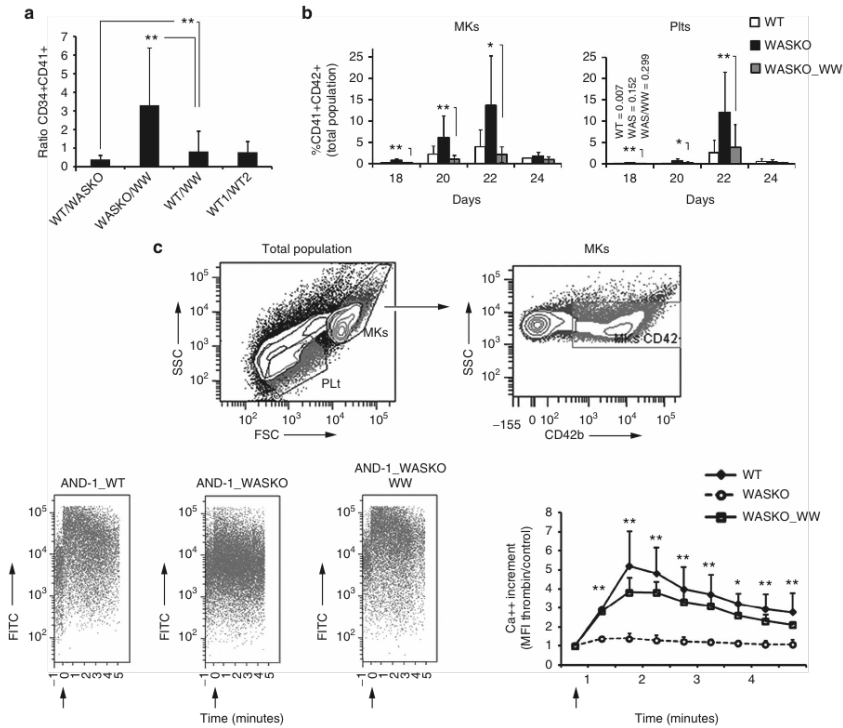


Figure 6 MKs and Plts from the hESCs-WASKO cell lines mimic functional and phenotypic alterations present in WAS patients. (a) Graphs showing size (FSC; left graphs), granularity (SSC; middle graphs) and CD43 expression (mean fluorescence intensity (MFI); right graphs) of MKs and Plts derived from AND-1\_WASKO cells (Black bars) and AND-1\_WT (white bars) cells. Data were collected from the CD41-CD42+ gate. Data are mean ± standard error of the mean of at least six separate experiments using two AND-1\_WT cell lines (AND-1\_WT1 and AND-1\_WT2) and two AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01. (b) Impaired calcium response of AND-1\_WASKO MKs. Intracellular calcium levels were evaluated in WASKO (open circles) and WT (black diamonds) Plts obtained from peripheral blood (right graph) or hESCs-cultures (middle graph) as well as in hESC-derived MKs (right graph). WAS patient (L101P on exon 3) peripheral blood was obtained at the Virgen del Rocio Hospital (Sevilla). Healthy donor peripheral blood was obtained as described in Materials and Methods. Ca<sup>2+</sup> flux was measured by flow cytometry using the Calcium Sensor Dye eFluor 514 at a final concentration of 5 µmol/l. Data represent the increase in calcium levels after thrombin stimulation over the basal calcium levels, measured by the intensity of fluorescence of the calcium sensor dye. Thrombin addition (2U/ml) is indicated by an arrow. (c) WASKO-MKs had altered fibrinogen receptor alterations but WASKO-Plts had near-normal responses. AND-1\_WT (left plots) and AND-1\_WASKO (right plots) were activated with thrombin and stained with CD42 (MK marker) and PAC-1 (antibody that recognizes the dimerized form of this integrin). Plots represent PAC-1 intensity on CD42-gated MKs (top) and Plts (bottom). The graphs show increment in % (left graph) and intensity (right graph) of PAC-1+ MKs and Plts derived from AND-1\_WT (white bars) and AND-1\_WASKO (black bars) cells. Data are Mean of at least three separate experiments ± standard error of the mean using two AND-1\_WT cell lines (AND-1\_WT1 and AND-1\_WT2) and two AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.



**Figure 7** Ectopic expression of WAS on AND-1\_WASKO cells restored normal MKs and Plts development and function. **(a)** Ectopic expression of WAS restores normal levels of CD34+CD41+ progenitors from hESCs-WASKO. The percentages of CD34+CD41+ were determined at day 15 of Megakaryocytic differentiation. The graph shows the ratio between the percentages of CD34+CD41+ cells derived from different hESCs as indicated at the bottom of each bar. Note that a ratio of 1 indicates no differences as observed in the WT/WW (ratio between WT and AND-1\_WASKO\_WW) and WT1/WT2 (ratio between WT1 and WT2) bars. Data are mean from at least five different experiments  $\pm$  standard error of the mean. **\*\*** $P < 0.01$ . **(b)** Ectopic expression of WAS restores normal levels of MKs and Plts generated from hESCs-WASKO. Supernatant from OP9 cocultures from AND-1\_WT, AND-1\_WASKO, and AND-1\_WASKO\_WW were collected every 2 days from day 18 and the percentage of MKs (left graph) and Plts (right graph) determined as described in Figure 4. **(c)** Ectopic expression of WAS restores normal calcium responses to AND-1\_WASKO\_WW derived MKs. Calcium responses to thrombin (arrow) were evaluated in MKs derived from AND-1\_WT, AND-1\_WASKO, and AND-1\_WASKO\_WW. The upper plots show the population considered as MKs. An example of the data generated for each cell line is shown in the bottom-left plots. A graph showing WASKO (open circles), WT (black diamonds) and WASKO\_WW MKs (open squares) Ca<sup>2+</sup> responses along time is shown at the bottom-right corner. Data represent the increase in calcium levels after thrombin stimulation over the basal calcium levels, measured by the intensity of fluorescence of the calcium sensor dye. Thrombin addition (2U/ml) is indicated by an arrow. Data represent mean  $\pm$  SEM of at least three separate experiments using two AND-1\_WT cell lines (AND-1\_WT1 and AND-1\_WT2), two AND-1\_WASKO (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2) and two AND-1\_WASKO\_WW (AND-1\_WASKO\_WW.1 and AND-1\_WASKO\_WW.2). **\*** $P < 0.05$ ; **\*\*** $P < 0.01$ .

in AND-1\_WASKO cell lines restored normal megakaryocytic development.

We next studied whether the expression of WAS in AND-1\_WASKO could also restore normal MKs calcium responses to thrombin. Calcium responses were therefore evaluated in MKs derived from AND-1\_WT, AND-1\_WASKO and AND-1\_WASKO\_WW. Our data clearly indicates that the ectopic expression of WAS in AND-1\_WASKO restored the ability of MKs to respond to thrombin (Figure 7c, lower-left plots

and graph; AND-1\_WASKO versus AND-1\_WASKO\_WW;  $P < 0.01$ ).

## DISCUSSION

The present work aims to unveil the defects associated with the absence of WASp during hematopoietic and megakaryocytic development as well as Plts production. A matter still not well understood due to the obvious difficulties in isolation of human hematopoietic progenitors from WAS patients, together with

incapability of the WASKO mice in resembling human thrombocytopenia. In addition, these mice models have not been able to detect the genotoxicity of retroviral insertions when used to test gene therapy safety in preclinical studies. Therefore, we were also interested in the development of human cellular models that could be used to study efficiency and safety of new gene therapy strategies for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. We therefore proposed the development of a human stem cellular model for WAS. Based on the AND-1 cell line<sup>31</sup> and using ZFNs targeted to the WAS locus,<sup>41</sup> we have developed two pluripotent cell line clones (AND-1\_WASKO\_c1.1 and AND-1\_WASKO\_c1.2) with a complete absence of WASp to mimic WAS patients with a severe phenotype.

WASp expression starts at the first stages of hematopoietic differentiation<sup>12</sup> but little is known about its role in early hematopoiesis. We investigated if WAS-deficient hESCs displayed any alterations during early hematopoietic development. WAS patients and animal models exhibit some abnormal hematopoietic parameters.<sup>12,23</sup> These abnormalities could be explained by defects in proliferation, migration, and/or apoptosis of the different mature hematopoietic lineages rather than due to a defective hematopoietic development. In fact, most of the data generated from WASKO mice indicate that WASp does not play a major role during hematopoietic development. However, recent publications showed increased number of hematopoietic progenitors in the peripheral blood and spleen of WASKO mice.<sup>12,23</sup> Charrier *et al.*<sup>23</sup> showed that the total number of progenitors in WASKO mice (taken together CFC from peripheral blood, spleen, and bone marrow) was almost double the total number of progenitors found in WT mice. This is in agreement with our data indicating that the absence of WASp can promote hematopoietic differentiation and generate higher numbers of progenitors and blood cells. A recent publication by Ingrungruanglert *et al.*<sup>34</sup> reported the development of the first induced pluripotent Stem Cells (iPSCs) from two WAS patients. In this work, the authors did not find alterations in hematopoiesis of the WAS-iPSCs. However, although their data did not reach significance, a similar tendency can be observed in their data (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Average of 0.56% WT-iPSCs versus 0.9% WAS-iPSCs in their Figure 1d (ref. 34)) corroborating our results with hESCs WASKO.

The role of WASp in Plts development remains also largely unknown with contradictory results.<sup>12,13</sup> Different studies showed either, abnormal<sup>14,36</sup> or normal<sup>15–17,20</sup> megakaryocytic development. Interestingly, Sabri *et al.*<sup>14</sup> published evidences of premature MK differentiation in WASKO mice. Our data corroborate the idea of an enhanced differentiation toward the megakaryocytic lineage in the absence of WASp favoring the hypothesis that WASp is negatively regulating megakaryocytic differentiation in the absence of the appropriate signals. In agreement with our data, Ingrungruanglert *et al.*<sup>34</sup> reported enhanced megakaryocytic differentiation in one of their WAS iPSCs (WASX503R-R#1), although this result was not repeated in the other WAS iPSCs they generated.

It is a matter of active discussion whether the microthrombocytopenia observed in WAS patients is due to defective production of Plts in bone marrow or due to Plts depletion by the spleen and other organs. AND-1\_WASKO cells produced higher levels

of MKs and Plts compared to WT MKs. Importantly, these data was confirmed by demonstrating that the ectopic expression of WAS in AND-1\_WASKO cell lines restored normal megakaryocytic development and Plt production. Contrary to our results, Ingrungruanglert *et al.* reported similar (WASQ19X cell lines) or reduced (WASX503R cell lines) Plts production compared to control iPSCs. These contradictory results can be explained by several factors: (i) Ingrungruanglert *et al.* data was obtained at day 24 and at this day of production, we had similar data (Figure 5a, day 24). (ii) Ingrungruanglert *et al.* used iPSCs derived from two patients harboring two different mutations, Q19X, which introduce a premature stop codon and X503R, which produce a larger, instable WASp protein. These mutations can render different phenotypes. In addition, the reprogramming factors can induce alterations in the differentiation process. Our two WASKO hESCs lines harbor the same mutation generated by gene edition and can be compared with the original hESCs used to generate the mutations (AND-1).

We finally investigated whether WASKO-HPCs, WASKO-MKs, and WASKO-Plts mimicked the functional defects found previously in HPCs, MK, and Plts from WAS patients and WASKO mice models. Some authors reported reduced clonogenic potential of HPCs from WASKO mice and WAS patients<sup>33</sup> while others found normal CFU formation capabilities and maintenance of WAS HPCs.<sup>34,42</sup> We found a slight, although not significant, reduction in the clonogenic potential of WASKO-HPCs compared to WT-HPCs, indicating that the absence of WASp does not play a relevant role in this property of HPCs, at least under this experimental conditions. Mani *et al.*<sup>22</sup> showed that WASp is involved in kit (SCF-receptor)-mediated signal transduction and required for kit-induced cellular Ca<sup>++</sup> signaling and survival. Interestingly, we found defective Ca<sup>++</sup> responses to SCF in WASKO-HPCs compared to WT-HPCs. This finding corroborates Mani *et al.*<sup>22</sup> data and back up a role of WASp in HPCs survival/maintenance through its function as an effector of SCF signaling.

The phenotypic and functional alterations of MK and Plts from WAS patients are also an open debate. Some authors maintain that Plts function normally but have phenotypic alterations (enhanced phosphatidylserine expression, low CD43 expression) that give rise to its clearance by the spleen.<sup>15–18</sup> However, other groups have reported increased basal intracellular Ca<sup>++</sup> content and prolongation of agonist-induced Ca<sup>++</sup> flux upon stimulation<sup>19</sup> as well as reduced activation of the fibrinogen receptor,<sup>20,21</sup> both important players in Plts function. WASKO-Plts generated from WASKO-hESCs presented the typical phenotypic alterations found in Plts from WAS patients (reduced size and granularity as well as reduced expression levels of CD43). In addition, we confirmed the ability of WASp-deficient Plts to respond to different agonist presenting near-normal Ca<sup>++</sup> flux and fibrinogen receptor activation. These data are in agreement with the hypothesis that Plts from WAS patients have a near-normal activity and that the recurrent bleeding observed in these patients are due to the thrombocytopenia caused by Plts clearance by resident macrophages in spleen and other tissues. This hypothesis is further confirmed by the restoration of Plts count and coagulation rates in most splenectomized WAS patients.

Interestingly, contrary to the near-normal function observed in WASKO-Plts, WASKO-MKs had significant alterations in both,



intracellular  $Ca^{++}$  flux and fibrinogen receptor activation upon stimulation with thrombin. Mkcs require a very structured and dynamic organization of the actin cytoskeleton to generate Plts at the correct place and time. We hypothesized that the absence of WASp deregulated actin cytoskeleton dynamics that became now governed by WASp-homologs (N-WASp, WAVE, etc.) leading to enhanced megakariopoiesis and altered Plts phenotypes.

In summary, we have developed and validated the first human embryonic stem cell model that mimics WAS patients with a severe phenotype. Using these cells, we have demonstrated that WASp is regulating early hematopoietic development, megakaryocytic differentiation, and thrombopoiesis. We have also demonstrated that WASp plays an important role in HPCs and MKs function by showing defective  $Ca^{++}$  responses in its absence. Finally, we have demonstrated that these cells can be used to investigate efficiency and safety of gene therapy strategies by restoring WAS phenotype by lentiviral transduction of hESCs WASKO.

## MATERIALS AND METHODS

**Embryonic stem cell lines culture.** Human embryonic stem cells AND-1\_WT1 (ref. 31) (AND-1; International Stem Cell Registry; Spanish National Stem Cell Bank, Granada, Spain) were cultured in Matrigel (BD Biosciences)-coated T25 flasks in human mesenchymal stem cells-conditioned medium supplemented with 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) obtained from the Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía or onto irradiated human mesenchymal stem cells (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía) in DM medium (KO-DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20% fetal bovine serum (FBS), 1% Glutamax, 1% non-essential aminoacids, and 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol) as previously described.<sup>9</sup> Approval from the Spanish National Embryo Ethical Committee was obtained to work with hESCs. AND-1\_WT2 was generated by cloning the original AND-1\_WT1 cells following a similar procedure as for the generation of the WASKO clones but without antibiotic selection.

**Gene edition of hESCs.** Plasmids encoding the ZFN pairs targeting the WAS locus and the plasmid containing the Donor DNA (harboring a Neomycin-resistance expression cassette) were previously published.<sup>41</sup> The hESCs were pretreated with 10  $\mu$ M/ml ROCK inhibitor (Millipore, Billerica, MA) for 1 hour, detached with 1 ml of TrypLE (Invitrogen), neutralized with DM medium (KO-DMEM (Invitrogen), 20% FBS, 1% Glutamax, 1% non-essential aminoacids, and 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol) and resuspended in 100  $\mu$ l of Amaxa nucleofector solution II (Lonza, Basel, Switzerland). The three plasmids (two ZFNs and one donor DNA) were added to this solution and applied the program A23. The cells were resuspended in 500  $\mu$ l of prewarmed RPMI medium and recovered for 15 minutes at 37°C and transferred onto a matrigel-coated 10-cm dish with DM medium containing ROCK inhibitor for 3–4 days. The medium was complemented with 50  $\mu$ g/ml of G418 for 15 days, refreshing the medium each 2–3 days. Visual screening under the microscope was performed to identify gene-edited colonies. After growth, G418-resistant AND-1 colonies were collected and expanded. The different clones were stored in liquid nitrogen and analyzed for genomic edition by PCR using the NeoF1/WASR1 and the WASF1/WASR1 primer combinations (see **Supplementary Table S1**). Two clones were selected for characterization and analysis (AND-1\_WASKO c1.1 and AND-1\_WASKO c1.1; International Stem cell Registry, Spanish National Stem Cell Bank).

**DNA preparation, RNA preparation, and quantitative real-time PCR.** Genomic DNA was isolated at the GENYO general service facilities using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and reverse transcribed into cDNA using the

MultiScribe™ Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCRs were performed in the Mx3005P Stratagene thermal cycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The primers used to quantify relative levels of the different genes are showed in **Supplementary Table S1**.

**Vector production and transduction of hESCs-WASPKO cells.** The human immunodeficiency virus (HIV) packaging (pCMVΔ8.91) and VSV-G (pMD2.G) plasmids ([http://www.addgene.org/Didier\\_Trono](http://www.addgene.org/Didier_Trono)) are described elsewhere.<sup>44</sup> The lentiviral vector expressing WASP (WW-puro) was obtained by inserting the pSV40-puro cassette from the pPur Vector plasmid into the KpnI site of the WW plasmid<sup>45</sup> using standard cloning techniques. Vector production and concentration was performed as previously described.<sup>46</sup> For transduction, hESCs-WASKO cells were incubated with WW-puro lentiviral particles at multiplicity of infection = 10–20. Transduced hESCs-WASKO were incubated under 0.25  $\mu$ g/ml of puromycin to generate hESCs expressing WAS. Two bulk populations (AND-1\_WASKO\_WW.1 and AND-1\_WASKO\_WW.2) resistant to puromycin were generated in two different experiments.

**Western blot.** Cells were lysed with 0.2% NP-40 lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO), resolved by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electrotransferred to nitrocellulose membranes (Amersham, UK) and probed with anti-human WASP mAb D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). For detection, we used goat anti-mouse antibody conjugated with the 800CW infrared dye (1:10,000 dilution) (Li-cor Biotechnologies, Lincoln, NE). The blot was developed by the infrared detection system Odyssey (Li-cor Biotechnologies). Loading controls were carried out by rehybridization of stripped membranes with a rabbit anti-human Erk polyclonal antibody (anti-MAP kinase 1/2, Upstate Biotechnology, UK), followed by incubation with goat anti-rabbit antibody conjugated with the infrared dye 680LT at (1:20,000) (Li-cor Biotechnologies).

**hESCs hematopoietic differentiation through EB.** Near confluent hESCs (day 0) were treated with collagenase IV for 1 minute, scraped off, transferred to low-attachment plates (Corning Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands) and incubated overnight in DM medium. The next day, the EBs were centrifuged and resuspended in DM medium supplemented with cytokine cocktail 1 (CC1): BMP-4 (25 ng/ml), Flt-3L (300 ng/ml), SCF (300 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), and G-CSF (50 ng/ml) with medium changes every 4 days. EBs were dissociated using collagenase B (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) with Cell Dissociation Buffer (Gibco-Invitrogen) for FACS analysis and CFUs assays. To evaluate hematopoietic differentiation, dissociated cells were stained with 7-AAD (Life Technologies), anti-human CD31-PE, anti-human CD34-PE-Cy7, and anti-human CD45-APC (all from eBiosciences, San Diego, CA). The samples were analyzed in a FACS Canto II flow cytometer equipped with the FACS Diva analysis software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

**hESCs hematopoietic differentiation in OP9 coculture system.** Hematopoietic differentiation was induced by transferring the hESCs lines onto OP9 feeders as previously described for at least 15 days (see **Supplementary Figure S4**). To evaluate hematopoietic differentiation at the different days, cells were treated with collagenase IV 1 hour, 10 minutes with Tryple (Gibco), resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) 1 × +3% FBS + 2 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid buffer, filtered through a 70- $\mu$ m cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA) and stained with anti-mouse CD29-FITC (AbD Serotec, Raleigh, GBK), anti-human CD31-PE, anti-human CD34-PE-Cy7, and anti-human CD45-APC (all from eBiosciences) and analyzed in a FACS Canto II flow cytometer.

**CFU assay.** For CFU assays, 20,000–35,000 cells were filtered through a 40- $\mu$ m cell strainer (BD Biosciences) and directly plated into

methylcellulose H4034 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The colonies were counted based on morphological characteristics after 10–14 days.

**Megakaryocytic differentiation protocol.** We used a protocol adapted from Lu *et al.*<sup>26</sup> and is depicted in **Supplementary Figure S5**. The hESCs contained in a T-25 flask were treated with collagenase IV, scrapped, and incubated in DM medium on ultralow attachment plates in order to form EBs (day 0). Twenty-four hours later, the DM medium was complemented with the cytokine cocktail 1 (cc1: BMP4 (50 ng/ml), vascular endothelial growth factor (50 ng/ml), and bFGF (20 ng/ml)) for 2 days (till day 3). From day 3 till day 8, the cytokine cocktail 2 (cc2: SCF, thrombopoietin (TPO), and FLT3 ligand (20 ng/ml each)) were added to the previous cytokine cocktail. Finally, from day 8 to day 15, the EB medium is complemented only with cytokine cocktail 3 (cc3: 350 ng/ml of TPO and 20 ng/ml of SCF) (all cytokines were from PeproTech-London, UK). At day 10 of the EB differentiation protocol, 3 × 10<sup>4</sup> OP9 cells/well were plated on 0.1% gelatine-coated 6-well plates to form the stroma. On day 15, the EBs were dissociated with 1 ml of collagenase B (Roche, Switzerland) diluted 1:10 in EB medium and collected at 1100 rpm for 2 min. The samples were then incubated with 1 ml of dissociation buffer (Gibco) without pipetting, incubated at 37 °C for 10 minutes, washed with PBS, centrifuged at 1,200 rpm for 4 minutes and resuspended in 1 ml of OP9 differentiation medium ( $\alpha$  minimum essential medium basal medium, 10% non-heat-inactivated FBS, 100  $\mu$ mol/l monothioglycerol, and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid) containing TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml), and heparin (25 U/ml) very carefully until no clumps were seen. Cells were then added onto the OP9 stroma and maintained in this medium during the rest of the differentiation protocol (for another 10–15 days).

To evaluate megakaryocytic differentiation, day 15 EBs from one well of a six-well plate were dissociated, the megakaryocytic progenitors analyzed in 1/5 of the sample and the rest plated again onto one OP9-coated well of a six-well plate. The progenitors were analyzed by staining with 7AAD, mouse anti human CD34-PECy7 (eBiosciences) and mouse anti human CD41-PE (eBiosciences). With the remaining sample, at the indicated days during the differentiation protocol, half of the medium was harvested (containing emerging MKs and Plts) and replaced by fresh medium. Collected samples were spun down at 900 g for 5 minutes, stained in PBS with 3% FBS and 2 mmol/l of Ethylenediaminetetraacetic acid using 7-AAD, mouse anti human CD41-PE (eBiosciences) (1/100 dilution) and CD42b-APC (Biolegend, San Diego, CA) (1/50 dilution) antibodies. Samples were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer.

**Isolation of peripheral blood platelets from healthy donors and WAS patients.** All healthy donors and a WAS patient (L101P on exon 3) gave written informed consent following the Declaration of Helsinki Protocols and the research was approved by the ethical committee of the HU Virgen del Rocío (Sevilla). Blood extractions were performed at the H. Virgen del Rocío. To isolate the Plts, 5 ml of blood were diluted 1/1 in PBS and centrifuged at 300 g for 20 minutes at RT without break. The supernatant containing the Plts were collected and counted.

**PAC-1 binding assay.** MKs and Plts were collected from the supernatant by centrifugation at 900 g for 5 minutes, washed with Tyrode's buffer (TB) with calcium and magnesium (150 mmol/l NaCl, 2.9 mmol/l KCl, 12 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% glucose, 0.1% BSA, 5 mmol/l 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) and resuspended in 100  $\mu$ l of the same buffer. The cells were activated with thrombin (2 units/ml) during 10' at RT, stained with the anti-CD42b-APC and PAC-1-FITC antibodies and incubated for 25' at RT. The cell suspension was then washed with TB and fixed in 0.25% PFA in TB.

**Calcium flux.** For hESCs-derived CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>-derived cells: On day 15 (EBs) or Day 8 (OP9) of differentiation, suspension cells were collected by centrifugation (400 g for 7 minutes) and stained with the anti-CD34-APC

antibody for 30 minutes at RT, and washed with TB. Cells were diluted in TB containing the calcium sensor dye eFluor 514 (eBiosciences) at a final concentration of 5  $\mu$ mol/l. For loading the cells with the dye and establish the background, they were incubated for 40 minutes at 37 °C, then washed and resuspended in TB without dye. Cells were then analyzed by flow cytometry with continuous acquisition for 30 seconds to measure background levels ( $T = 0$ ). Acquisition was then paused to add the SCF (100 ng/ml) and immediately restarted for the continuous acquisition for 6 minutes.

For MKs and Plts: On selected days of differentiation, suspension cells were collected by centrifugation (900 g for 7 minutes), stained with the anti-CD42b-APC antibody for 30 minutes at RT and washed with TB. The rest of the procedure is the same as above but using 2 U/ml of thrombin as stimuli.

**Statistical analysis.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical comparisons were performed using the Student *t*-test, with the assumption of normal distribution. Statistical significance was defined as a *P* value < 0.05.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

- Figure S1.** Phenotypic characterization of AND-1\_WASKO cell lines.  
**Figure S2.** AND-1\_WASKO\_C1.1 generates normal teratomas in an immunodeficient mice model.  
**Figure S3.** Karyotype of hESCs used.  
**Figure S4.** hESCs hematopoietic differentiation in OP9 co-culture system.  
**Figure S5.** Scheme of megakaryocytic differentiation of hESCs.  
**Figure S6.** MKs and Plts derived from hESCs.  
**Figure S7.** Characterization of MKs and Plts derived from hESCs.  
**Figure S8.** Characterization of Plts from Peripheral blood.  
**Figure S9.** AND-1\_WASKO cells produce higher number of MKs and Plts.  
**Figure S10.** WASKO-MKs had increased basal levels of PAC-1 binding.  
**Figure S11.** WW-puro LVs Transduced AND-1\_WASKO cell express WAS.  
**Figure S12.** Plots showing the population analyzed to measure hematopoietic differentiation on the EB system  
**Table S1.** List of primers used for qPCR and RT-qPCR.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias ISCIII (Spain) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) from the European Union, through the research grants PI12/01097 (F.M.); CD09/00200 (P.M.); CP09/00228 and PI12/01390 (P.A.); CP12/03175 (V.R.-M.); CP09/00663 and PI12/01598 (P.J.R.), and ISCIII Red de Terapia Celular (TerCel: RD12/0019/0006) (F.M.), by the CICE and CS de la Junta de Andalucía FEDER/Fondo de Cohesion Europeo (FSE) de Andalucía 2007–2013 through research grants P09-CTS-04532, PI-57069, PI-0001/2009 and PAIDI-Bio-326 (F.M.); PI-0160/2012 (K.B.); PI-0407/2012 (M.C.); SAS-111244 and P10-CTS/6406 (P.J.R.). The authors thank Raquel Marrero Diaz from the Microscopy Unit for the help with confocal imaging. The authors declared no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Parolini, O, Berardelli, S, Riedl, E, Bello-Fernandez, C, Strobl, H, Majdic, O *et al.* (1997). Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood* **90**: 70–75.
- Derry, JM, Ochs, HD and Francke, U (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**: 635–644.
- Stewart, DM, Treiber-Held, S, Kurman, CC, Facchetti, F, Notarangelo, LD and Nelson, DL (1996). Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J Clin Invest* **97**: 2627–2634.
- Ochs, HD (1998). The Wiskott-Aldrich syndrome. *Springer Semin Immunopathol* **19**: 435–458.
- Shcherbina, A, Rosen, FS and Remold-O'Donnell, E (1999). WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction. *J Immunol* **163**: 6314–6320.
- Snapper, SB, Rosen, FS, Mizoguchi, E, Cohen, P, Khan, W, Liu, CH *et al.* (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9**: 81–91.

7. Nguyen, DD, Wurbel, MA, Goettel, JA, Eston, MA, Ahmed, OS, Marin, R *et al.* (2012). Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in innate immune cells leads to mucosal immune dysregulation and colitis in mice. *Gastroenterology* **143**: 719–29.e1.

8. Recher, M, Burns, SO, de la Fuente, MA, Volpi, S, Dahlborg, C, Walter, JE *et al.* (2012). B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood* **119**: 2819–2828.

9. Molina, JJ, Kenney, DM, Rosen, FS and Remold-O'Donnell, E (1992). T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* **176**: 867–874.

10. Toscano, MG, Frecha, C, Ortega, C, Santamaría, M, Martín, F and Molina, JJ (2004). Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther* **11**: 956–961.

11. Strom, TS (2009). The thrombocytopenia of WAS: a familial form of ITP? *Immunol Res* **44**: 42–53.

12. Massaad, MJ, Ramesh, N and Geha, RS (2013). Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci* **1285**: 26–43.

13. Bosticardo, M, Marangoni, F, Aiuti, A, Villa, A and Grazia Roncarolo, M (2009). Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* **113**: 6288–6295.

14. Sabri, S, Foudi, A, Boukour, S, Franc, B, Charrier, S, Jandrot-Pernus, M *et al.* (2006). Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* **108**: 134–140.

15. Haddad, E, Cramer, R, Rivière, C, Rameau, P, Louache, F, Guichard, J *et al.* (1999). The thrombocytopenia of Wiskott-Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* **94**: 509–518.

16. Rengan, R, Ochs, HD, Sweet, LJ, Keil, ML, Gunning, WT, Lachant, NA *et al.* (2000). Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood* **95**: 1283–1292.

17. Shcherbina, A, Bretscher, A, Rosen, FS, Kenney, DM and Remold-O'Donnell, E (1999). The cytoskeletal linker protein moesin: decreased levels in Wiskott-Aldrich syndrome platelets and identification of a cleavage pathway in normal platelets. *Br J Haematol* **106**: 216–223.

18. Higgins, EA, Siminovitch, KA, Zhang, DL, Brockhausen, I and Dennis, JW (1991). Aberrant O-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Biol Chem* **266**: 6280–6290.

19. Shcherbina, A, Rosen, FS and Remold-O'Donnell, E (1999). Pathological events in platelets of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* **106**: 875–883.

20. Grötum, KA, Hovig, T, Holmsen, H, Abrahamsen, AF, Jeremic, M and Seip, M (1969). Wiskott-Aldrich syndrome: qualitative platelet defects and short platelet survival. *Br J Haematol* **17**: 373–388.

21. Tsuboi, S, Nonoyama, S and Ochs, HD (2006). Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in alphaIIb beta3-mediated cell adhesion. *EMBO Rep* **7**: 506–511.

22. Mann, M, Venkatasubrahmanyam, S, Samyal, M, Levy, S, Butte, A, Weinberg, K *et al.* (2009). Wiskott-Aldrich syndrome protein is an effector of Kit signaling. *Blood* **114**: 2900–2908.

23. Charrier, S, Blundell, M, Cédron, G, Louache, F, Vainchenker, W, Thrasher, AJ *et al.* (2013). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient cells can be efficiently mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Haematologica* **98**: 1300–1308.

24. Chadwick, K, Wang, L, Li, L, Menendez, P, Murdoch, B, Rouleau, A *et al.* (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**: 906–915.

25. DeRouen, MC, McCormick, JB, Owen-Smith, J and Scott, CT (2012). The race is on: human embryonic stem cell research goes global. *Stem Cell Rev* **8**: 1043–1047.

26. Gaj, T, Gersbach, CA and Barbas, CF 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**: 397–405.

27. Urnov, FD, Miller, JC, Lee, YL, Beausejour, CM, Rock, JM, Augustus, S *et al.* (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**: 646–651.

28. Hockemeyer, D, Soldner, F, Beard, C, Gao, Q, Mitalipova, M, DeKaveler, RC *et al.* (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **27**: 851–857.

29. Soldner, F, Laganà, J, Cheng, AW, Hockemeyer, D, Gao, Q, Alagappan, R *et al.* (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* **146**: 318–331.

30. Lu, SJ, Li, F, Yin, H, Feng, Q, Kimbrel, EA, Hahm, E *et al.* (2011). Platelets generated from human embryonic stem cells are functional *in vitro* and in the microcirculation of living mice. *Cell Res* **21**: 530–545.

31. Cortes, JL, Sanchez, L, Ligerio, G, Gutierrez-Aranda, I, Catalina, P, Blosua, C *et al.* (2009). Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum Reprod* **24**: 1844–1851.

32. Muñoz, P, Toscano, MG, Real, PJ, Benabdellah, K, Cobo, M, Bueno, C *et al.* (2012). Specific marking of hESCs-derived hematopoietic lineage by WAS-promoter driven lentiviral vectors. *PLoS One* **7**: e39091.

33. Kajiwara, M, Nonoyama, S, Eguchi, M, Morio, T, Imai, K, Okawa, H *et al.* (1999). WASP is involved in proliferation and differentiation of human hematopoietic progenitors *in vitro*. *Br J Haematol* **107**: 254–262.

34. Ingrungruangler, P, Amarinthukrow, P, Rungsiwitt, P, Maneeesri-le Grand, S, Sosothikul, D, Suphapeetiporn, K *et al.* (2015). Wiskott-Aldrich syndrome iPSC cells produce megakaryocytes with defects in cytoskeletal rearrangement and proplatelet formation. *Thromb Haemost* **113**: 792–805.

35. Litzman, J, Jones, A, Hann, I, Chapel, H, Strobel, S and Morgan, C (1996). Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Arch Dis Child* **75**: 436–439.

36. Miki, H, Nonoyama, S, Zhu, Q, Aruffo, A, Ochs, HD and Takenawa, T (1997). Tyrosine kinase signaling regulates Wiskott-Aldrich syndrome protein function, which is essential for megakaryocyte differentiation. *Cell Growth Differ* **8**: 195–202.

37. Bender, M, Stritt, S, Nurdan, P, van Eeuwijk, JM, Zieger, B, Kentouche, K *et al.* (2014). Megakaryocyte-specific Profilin-1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott-Aldrich syndrome-like platelet defect. *Nat Commun* **5**: 4746.

38. Reisinger, D and Parkman, R (1987). Molecular heterogeneity of a lymphocyte glycoprotein in immunodeficient patients. *J Clin Invest* **79**: 595–599.

39. Khan, S, Holding, S, Doré, PC and Sewell, WA (2008). Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Med Hypotheses* **70**: 269–272.

40. Gross, BS, Wilde, JJ, Quek, L, Chapel, H, Nelson, DL and Watson, SP (1999). Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI. *Blood* **94**: 4166–4176.

41. Toscano, MG, Anderson, P, Muñoz, P, Lucena, G, Cobo, M, Benabdellah, K *et al.* (2013). Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Dis Model Mech* **6**: 544–554.

42. Lacout, C, Haddad, E, Sabri, S, Svinarchouk, F, Garçon, L, Capron, C *et al.* (2003). A defect in hematopoietic stem cell migration explains the nonrandom X-chromosome inactivation in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* **102**: 1282–1289.

43. Ramos-Mejía, V, Fernández, AF, Ayllón, V, Real, PJ, Bueno, C, Anderson, P *et al.* (2012). Maintenance of human embryonic stem cells in mesenchymal stem cell-conditioned media augments hematopoietic specification. *Stem Cells Dev* **21**: 1549–1558.

44. Zufferey, R, Nagy, D, Mandel, RJ, Naldini, L, Trono, D (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol* **15**: 871–875.

45. Martín, F, Toscano, MG, Blundell, M, Frecha, C, Srivastava, GK, Santamaría, M *et al.* (2005). Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther* **12**: 715–723.

46. Toscano, MG, Frecha, C, Benabdellah, K, Cobo, M, Blundell, M, Thrasher, AJ *et al.* (2008). Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum Gene Ther* **19**: 179–197.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



