

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	13
1. Hematopoyesis	13
1.1. Órganos hematopoyéticos	15
1.2. Hematopoyesis en el ratón	16
2. Síndromes mielodisplásicos (SMD)	17
2.1. Epidemiología y etiología	18
2.2. Sintomatología	18
2.3. Diagnóstico	19
2.4. Clasificación según la OMS	21
2.5. Pronóstico (IPSS-R)	22
2.6. Tratamiento	25
2.7. Mutaciones somáticas en SMD	26
3. <i>Splicing</i>	28
3.1. Spliceosoma	29
3.1.1. <i>Splicing</i> alternativo	31
3.2. Relación <i>splicing</i> y metilación	32
4. <i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1)</i>	33
4.1. Estructura	33
4.2. Mutaciones de <i>U2AF1</i> en SMD	35
4.3. Modelos murinos de <i>U2af1</i>	36
5. <i>Ten-eleven translocation 2 (TET2)</i>	39
5.1. Estructura	39
5.2. Mutaciones en SMD y CHIP	40
5.3. Modelos murinos de <i>Tet2</i>	42
6. Sistema de edición genética CRISPR/Cas9	43
6.1. Historia y componentes	43
6.2. Generación de modelos murinos en SMD	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53

1. Ratones	53
1.1. Generación de los ratones mutantes	53
1.2. Descripción de los grupos de estudio	55
2. Procesamiento de tejidos hematopoyéticos	55
2.1. Sangre periférica	55
2.2. Médula ósea	55
2.3. Bazo	56
3. Estudio de la mutación del gen	56
3.1. Genotipado mediante PCR	56
3.2. Secuenciación Sanger	57
3.3. RT-qPCR	58
3.4. <i>Western blot</i>	61
3.4.1. Sobreexpresión de la proteína U2AF1	61
3.4.2. Amplificación del vector	61
3.4.3. Transfección en HEK293T	62
3.4.4. Obtención y cuantificación de proteínas	62
3.4.5. Electroforesis, SDS-PAGE y transferencia	63
3.4.6. Incubación y revelado	64
4. Caracterización hematológica	65
4.1. Hemograma	65
4.2. Citometría de flujo	65
4.2.1. Generalidades	65
4.2.2. Análisis citómico de los tejidos hematopoyéticos	66
4.3. Análisis morfológico	67
4.3.1. Citospin	67
4.3.2. Histología	68
4.4. Estudios funcionales de las células hematopoyéticas	68
4.4.1. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)	68
4.4.2. Trasplante hematopoyético	69
4.4.2.1. De médula ósea total	70
4.4.2.2. De células LSK purificadas	70

4.4.2.3. Seguimiento y evaluación de los trasplantes	72
5. Comparación del perfil transcriptómico	72
5.1. Obtención de células LSK	72
5.2. Extracción de ARN	73
5.3. Secuenciación del ARN (ARN-seq) y análisis de los resultados	74
5.3.1. Validación de las variantes mediante RT-PCR	75
5.3.2. Estudio de las variantes empleando CF	76
5.3.2.1. Análisis del ciclo celular	76
5.3.2.2. Análisis del daño al ADN.	77
6. Análisis estadístico	77
RESULTADOS	81
1. Consecuencias moleculares de la mutación en <i>U2af1</i>	81
2. Consecuencias moleculares de la mutación en <i>Tet2</i>	86
3. Efectos hematológicos de la mutación en <i>U2af1</i> , <i>Tet2</i> o ambos en el ratón	89
3.1. Alteraciones en sangre	89
3.2. Alteraciones en bazo	90
3.3. Alteraciones en médula ósea	92
3.3.1. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) de progenitores hematopoyéticos	95
3.3.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos	96
3.4. Resumen del fenotipo hematológico observado en los diferentes ratones mutantes	99
4. Efectos en el perfil transcriptómico de las HSPC de los diferentes ratones mutantes	100
4.1. Calidad de los datos de ARN-seq	100
4.2. Análisis de la expresión génica de los ratones mutantes	101
4.3. Análisis del <i>splicing</i> alternativo de los ratones mutantes	102
4.3.1. Validación molecular de las variantes de <i>splicing</i> encontradas en ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> y <i>U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}</i>	106
4.3.2. Estudio de las rutas biológicas con alteraciones en el <i>splicing</i> en ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> y <i>U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}</i>	108
4.3.2.1. Análisis del ciclo celular	108

4.3.2.2. Análisis del daño al ADN	109
5. Efectos hematológicos de la mutación en <i>U2af1</i> en ratones envejecidos	110
5.1. Alteraciones en sangre	110
5.2. Alteraciones en bazo	111
5.3. Alteraciones en médula ósea	112
DISCUSIÓN	117
La delección en la proteína U2AF1 genera en los ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> un efecto de haploinsuficiencia	117
Las alteraciones observadas en la hematopoyesis de los ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> no son suficiente para producir SMD	119
Las HSPC de los ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> son incapaces de injertar en los ratones receptores en los experimentos de trasplante competitivo	120
Los ratones <i>U2af1^{mut/+}</i> envejecidos tampoco desarrollan SMD	121
Los ratones <i>Tet2^{-/-}</i> presentan anomalías en la hematopoyesis	122
La delección de la proteína TET2 es insuficiente para producir SMD en nuestra línea <i>Tet2^{-/-}</i>	123
La cooperación de las alteraciones en <i>U2af1</i> y <i>Tet2</i> no produce SMD	124
El <i>splicing</i> de las líneas mutantes <i>U2af1^{mut/+}</i> , <i>Tet2^{-/-}</i> y <i>U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}</i> se encuentra alterado	125
Los resultados del ARN-seq pudieron ser validados en células c-kit ⁺	126
Las rutas biológicas que contenían más genes afectados por un <i>splicing</i> aberrante no se vieron alteradas	127
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	135