



Universitat Politècnica de València

Programa de Doctorado en Biotecnología

**Desarrollo y caracterización de un
modelo de ratón doble mutante en
U2af1 y *Tet2* para el estudio de los
Síndromes Mielodisplásicos.**

Cristina Martínez Valiente

Dirigida por:

Dra. Alejandra Sanjuan Pla

Valencia, julio 2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



La Dra. **Alejandra Sanjuan Pla**, investigadora principal del Grupo de Investigación en Hematología y Hemoterapia del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada “**Desarrollo y caracterización de un modelo de ratón doble mutante en *U2af1* y *Tet2* para el estudio de los Síndromes Mielodisplásicos**”, presentada por **Cristina Martínez Valiente**, para optar al título de Doctora en Biotecnología por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizada bajo su dirección en el Grupo de Investigación en Hematología y Hemoterapia del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

Valencia, julio 2022

Fdo. Alejandra Sanjuan Pla

*A mi familia,
por confiar en mí y apoyarme siempre.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Después de 4 años, por fin, parece que la tesis, mi tesis, termina. En más de una ocasión, por múltiples motivos, he pensado que no llegaría este día, pero aquí estoy, escribiendo los agradecimientos para ponerle punto y final.

En primer lugar, agradecerle a **Alejandra**, mi directora de tesis, que supiera ver mi potencial y me diera la oportunidad de estar con ella en el laboratorio, ayudándome y guiándome con todo lo que tenía.

A **José**, por hacerme sentir siempre tan valorada dentro del laboratorio. Ir a tu despacho se ha convertido en muchas ocasiones en una inyección de energía.

A **Lourdes**, responsable no reconocida de la Unidad de Citometría, por ser una persona admirable, llena de energía y, sobre todo, con un corazón enorme, que siempre me ha ofrecido su ayuda tanto en lo profesional como en lo personal.

A **David**, por hacerme las horas de espera delante del *sorter* muchísimo más amenas y por implicarse tantísimo con los experimentos. Los dos sabemos que, sin tus ganas, los sabotajes del aparato habrían podido con nosotros más de una vez.

A **Alessandro** por sacar hueco de donde no tienes para echarme una mano siempre. Tu capacidad para buscar alternativas a los diferentes problemas que han ido surgiendo me ha parecido siempre fascinante e inspiradora. A mi amiga y compañera, **Elisa**, por ser un pilar fundamental para mí en el laboratorio todos estos años. Sin nuestros desahogos y, sobre todo, sin tu apoyo, esto no habría sido posible. Teneros de *compis* de despacho ha hecho que los días fueran más llevaderos y agradables.

A mis compañeros de la 5ª, **Javi**, **Álvaro**, **Jessica** e **Inma**, por los ratitos de desconexión a vuestro lado. Es mucho más fácil sobrellevar la situación de la ciencia en este país si puedes ponerle un poco de humor y, con vosotros, las risas fluyen solas.

A mi **familia** entera, porque siempre me he sentido sumamente apoyada por todos. En especial a mi **madre**, por ser para mí un ejemplo a seguir. Te admiro en tantas cosas que me resulta imposible nombrarlas todas. Tu fuerza y perseverancia inagotables han sido para mí una fuente de inspiración desde pequeña. A mi **padre**, porque sé que estarías increíblemente orgulloso de mí, porque ya lo estabas y siempre me lo hacías saber. Porque recuerdo el brillo que se te ponía en los ojos cuando hablabas de mí. Ojalá hubieras podido vivir esto. Ojalá esta pequeña dosis de investigación sea un granito de arena en la gran montaña que supone entender cómo funciona el cáncer. Por ti y por todos.

A mi **hermana** y mi **cuñado**, por tener un hombro siempre disponible por si lo necesitaba. A mi **sobrino** porque, siendo un bebé, te sentaba en mi regazo mientras le dedicaba tiempo a esta tesis y eso me hacía sentir una conexión muy especial contigo.

A **Borja**, por reaparecer en mi vida con más fuerza que nunca y sacar siempre tiempo para dedicarme tu mejor energía. Las alegrías y las penas se pasan mejor con gente como tú cerca. A **Tamara**, porque ya sabes que pienso que eres mi alma gemela, la persona que me hace sentir verdaderamente comprendida y puede que tu apoyo siempre sea el que siento más cerca. A **David**, por tener la capacidad de estar a mi lado y arroparme aún estando a muchísimos kilómetros de distancia. No sabes el valor que le aportas a mi vida. A **Jorge**, por estar ahí siempre, por hacerme sentir tan sumamente cuidada, por tus llamadas a la mínima que me ves triste, por tenerme siempre en mente. A **Enric**, por absolutamente todo. Porque eres esa persona que siempre está cuando la necesito, que aparece con sólo dar un silbidito. Mi vida es indudablemente mejor desde que estáis en ella y habéis hecho este camino un poquito más bonito.

A **Zero**, porque nada ni nadie en el mundo me da la paz que me das tú cuando te tumbas conmigo en el sofá. Ojalá pudiera hacer que entendieras todo el amor que siento hacia ti.

A **Manolo**, por cogerme la manita en cada ataque de ansiedad. Por esforzarte en darme tu mejor versión y apoyarme mientras trabajo yo en la mía. Eres de las pocas personas que sabe de primera mano lo difícil que ha sido esto. Gracias por no salir corriendo.

Por último, aunque tal vez suene extraño (o no, si tenemos en cuenta que le he dedicado un agradecimiento a mi perra), quiero agradecerme **a mí misma** haber llegado hasta aquí. Porque mi ansiedad lleva años diciéndome que no podría y me he levantado día tras día a pelear contra ese monstruo y al final, he conseguido ganarle esta batalla. Porque puede que sea más válida, fuerte y capaz de lo que me decía, y quiero dejarlo por escrito por si alguna vez se me vuelve a olvidar. *#Post-it.*

Muchísimas gracias a todos por estar a mi lado todo este tiempo.

RESÚMENES

RESUMEN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades de naturaleza clonal caracterizadas por presentar una hematopoyesis ineficaz, citopenias y riesgo variable de evolución a leucemia mieloide aguda (LMA) secundaria. En la última década, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han revelado que más del 80 % de pacientes con SMD presenta mutaciones somáticas y que éstas pueden agruparse en diversas categorías en función de las rutas biológicas que se vean alteradas. Además, se ha visto que existen patrones de concurrencia y exclusión entre estas categorías de mutaciones. La adquisición secuencial y la concurrencia entre estas mutaciones desencadenan, en parte, el desarrollo de la enfermedad y genera la heterogeneidad clínica característica de los SMD.

Las mutaciones en factores de *splicing* aparecen a menudo simultáneamente con mutaciones en reguladores epigenéticos como es el caso de los genes *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1)* y *Ten-eleven translocation 2 (TET2)* que se encuentran co-mutados en un 13 % de los casos. A pesar de su prevalencia, los efectos de la concurrencia en las mutaciones en *U2AF1* y *TET2* no han sido estudiados. Por ello, en esta tesis nos propusimos estudiar esta cooperación cruzando, en primer lugar, dos líneas mutantes de ratón generadas mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9. El efecto de estas alteraciones sobre la hematopoyesis de las tres líneas mutantes, *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, fue examinado mediante el hemograma, citometría de flujo (CF), análisis morfológicos, ensayos de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) y estudios funcionales como el trasplante hematopoyético. Para finalizar, se realizó un análisis transcriptómico mediante secuenciación de ARN (ARN-seq) para detectar los posibles cambios en el patrón de *splicing* entre las líneas mutantes y los controles.

La línea mutante *U2af1^{mut/+}* no presentó ninguna alteración destacable de la hematopoyesis ni en ratones jóvenes (12-13 semanas) ni envejecidos (2 años). Sin embargo, sus células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) fueron incapaces de injertar en la médula ósea de ratones trasplantados. En el caso de los ratones mutantes *Tet2^{-/-}*, observamos un incremento de células mieloides, esplenomegalia, aumento del compartimento LSK (HSPC con inmunofenotipo Linaje⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) y, en los experimentos de trasplante, una capacidad de reconstitución hematopoyética superior a la de los controles. Por último, la cooperación de ambas alteraciones en la línea doble mutante *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, no mostró un efecto sinérgico entre ellas. Así pues, se detectaron variaciones en los progenitores mieloeritroides y un aumento significativo

Resúmenes

de células mieloides y LSK. No obstante, igual que ocurría con la línea *U2af1^{mut/+}*, las HSPC no producían prendimiento en los ratones trasplantados. A pesar de las alteraciones observadas, ninguna de las tres líneas mutantes desarrollaba SMD ni fallecía antes que los controles.

Respecto al análisis transcriptómico, el salto de exón fue el evento de *splicing* alternativo observado con mayor frecuencia en las líneas *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*. Únicamente un 6.6 % del total de genes que presentaba eventos de *splicing* alternativo fueron coincidentes en las tres líneas mutantes. A pesar de que en el análisis bioinformático se detectaron alteraciones en las rutas biológicas relacionadas con el ciclo celular, en los ratones *U2af1^{mut/+}*, y el daño al ADN, en las líneas *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, en la validación mediante CF no se encontraron variaciones respecto a los controles.

Para concluir, nuestros datos sugieren que, a pesar de producirse alteraciones en la hematopoyesis, la cooperación entre la mutación en *U2af1* y la pérdida de *Tet2* es insuficiente para iniciar SMD en ratón.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of clonal malignancies characterized by ineffective hematopoiesis, cytopenia and a variable risk of progression to secondary acute myeloid leukemia (AML). In the last decade, next-generation sequencing technologies have deciphered that more than 80 % of MDS patients have somatic mutations and that those can be grouped into several categories depending on which biological routes have been altered. Furthermore, it has been observed that there are concurrency and exclusion patterns among these mutation categories. The sequential acquisition and the concurrency between these driver mutations trigger, in part, the development of the disease and generate the clinical heterogeneity characteristic of MDS.

The splicing factor mutations often occur simultaneously with mutations in epigenetic regulators such as the U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (*U2AF1*) and Ten-eleven translocation 2 (*TET2*) genes, which are found co-mutated in 13 % of cases. Despite their prevalence, the effects of concurrence in mutations in *U2AF1* and *TET2* have not been studied. Consequently, in this thesis we aim to study this cooperation. Firstly, we crossed two mutant mouse lines that were previously generated using the CRISPR/Cas9 gene editing system. The effects of these alterations on hematopoiesis in the three mutant lines, *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, was examined by the blood counts, flow cytometry (FC), morphological analysis, Colony Forming Units assays (CFU) and functional studies such as the hematopoietic transplantation. Finally, transcriptomic analysis was performed by RNA sequencing (RNA-seq) to detect possible splicing pattern changes between mutant lines and control samples.

U2af1^{mut/+} mutant line did not present any remarkable alteration of hematopoiesis in either in young (12-13 weeks) or aged (2 years) mice. However, their hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) were unable to engraft into the bone marrow of transplanted mice. In the case of *Tet2^{-/-}* mutant mice, we observed an increase of myeloid cells, splenomegaly, an increased LSK compartment (HSPC: Lineage⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) and an enhanced ability, relative to wild-type, to reconstitute hematopoiesis in transplantation assays. Finally, the cooperation of both alterations in *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* double mutant line did not show a synergistic effect between them. Nonetheless, the myeloerythroid progenitors were altered and also myeloid and LSK cells were increased. However, as in the *U2af1^{mut/+}* line, HSPC did not produce any engraftment in transplanted mice. Despite the observed alterations, none of the three mutant lines developed MDS or die earlier than control mice.

Resúmenes

Regarding the transcriptomic analysis, exon skipping was the most frequently observed alternative splicing event in the *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* lines. Only 6.6 % of the total number of genes showing alternative splicing events were coincident in the three mutant lines. Although the bioinformatic analysis revealed alterations in biological pathways related to the cell cycle in the *U2af1^{mut/+}* mice and DNA damage in the *U2af1^{mut/+}* and *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* lines, the validation by CF found no variations with respect to the controls.

In conclusion, our data suggest that, despite alterations in hematopoiesis, the cooperation between *U2af1* mutation and *Tet2* loss is insufficient to initiate MDS in mice.

RESUM

Les síndromes mielodisplàstiques (SMD) constitueixen un grup heterogeni de malalties de naturalesa clonal caracteritzades per presentar una hematopoesi ineficaç, citopènies i risc variable d'evolució a leucèmia mieloide aguda (LMA) secundària. En l'última dècada, les noves tecnologies de seqüenciació massiva han revelat que més del 80 % de pacients amb SMD presenta mutacions somàtiques i que aquestes poden agrupar-se en diverses categories en funció de les rutes biològiques que es veuen alterades. A més, s'ha vist que hi ha patrons de concurrència i exclusió entre aquestes categories de mutacions. L'adquisició seqüencial i la concurrència entre aquestes mutacions desencadenen, en part, el desenvolupament de la malaltia i genera l'heterogeneïtat clínica característica de les SMD.

Les mutacions en factors de *splicing* apareixen sovint simultàniament amb mutacions en reguladors epigenètics com és el cas dels gens *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1)* i *Ten-eleven translocation 2 (TET2)* que es troben co-mutats en un 13 % dels casos. A pesar de la seua prevalença, els efectes de la concurrència en les mutacions en *U2AF1* i *TET2* no han sigut estudiats. Per això, en aquesta tesi ens vam proposar estudiar aquesta cooperació creuant, en primer lloc, dos línies mutants de ratolí generades per mitjà del sistema d'edició genètica CRISPR/Cas9. L'efecte d'aquestes alteracions sobre l'hematopoesi de les tres línies mutants, *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* i *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, va ser examinat per mitjà de l'hemograma, citometria de flux (CF), anàlisis morfològiques, assajos d'Unitats Formadores de Colònies (CFU) i estudis funcionals com el trasplantament hematopoètic. Per últim, es va realitzar l'anàlisi transcriptòmic per mitjà de seqüenciació d'ARN (ARN-seq) per a detectar els possibles canvis en el patró de *splicing* entre les línies mutants i els controls.

La línia mutant *U2af1^{mut/+}* no va presentar cap alteració destacable de l'hematopoesi ni en ratolins jòvens (12-13 setmanes) ni envellits (2 anys). No obstant això, les seues cèl·lules mare i progenitores hematopoètiques (HSPC) van ser incapaços d'empeltar en la medul·la òssia de ratolins trasplantats. En el cas dels ratolins mutants *Tet2^{-/-}*, observarem un increment de cèl·lules mieloides, esplenomegàlia, augment del compartiment LSK (cèl·lules mare amb immunofenotip Llinatge⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) i, en els experiments de trasplantament, una capacitat de reconstitució hematopoètica superior a la dels controls. Finalment, la cooperació d'ambdues alteracions en la línia doble mutant *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, no va mostrar un efecte sinèrgic entre elles. Així, doncs, es van detectar variacions en els progenitors mioeritroids i un augment significatiu de cèl·lules mieloides i LSK. No obstant això, igual que ocorria amb la línia *U2af1^{mut/+}*, les HSPC no

Resúmenes

produïen empelt en els ratolins trasplantats. A pesar de les alteracions observades, cap de les tres línies mutants desenvolupava SMD ni moria abans que els controls.

Respecte a l'anàlisi transcriptòmic, el salt d'exó va ser l'esdeveniment de *splicing* alternatiu observat amb major freqüència en les línies $U2af1^{mut/+}$, $Tet2^{-/-}$ i $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$. Únicament un 6.6 % del total de gens que presentava esdeveniments de *splicing* alternatiu van ser coincidents en les tres línies mutants. Encara que en l'anàlisi bioinformàtica es van detectar alteracions en les rutes biològiques relacionades amb el cicle cel·lular, en els ratolins $U2af1^{mut/+}$, i el dany a l'ADN, en les línies $U2af1^{mut/+}$ i $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$, en la validació per mitjà de CF no es van trobar variacions respecte als controls.

Per a concloure, les nostres dades suggerixen que, a pesar de produir-se alteracions en l'hematopoesi, la cooperació entre la mutació en $U2af1$ i la pèrdua de $Tet2$ és insuficient per a iniciar SMD en ratolí.

ÍNDICE

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. <i>Spliceosoma</i>	29
3.1.1. <i>Splicing alternativo</i>	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

Índice

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

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5mC:	5-metilcitosina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
Cas9:	Proteína 9 asociada a CRISPR, del inglés " <i>CRISPR-associated protein 9</i> "
CF:	Citometría de flujo
CFU:	Unidades Formadoras de Colonia, del inglés " <i>Colony Forming Unit</i> "
CFU-E:	Progenitor unidades formadoras de colonia eritroides; del inglés " <i>Colony Forming Unit-Erythroid</i> "
CHIP:	Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado, del inglés " <i>Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential</i> "
CLP:	Progenitor común linfoide, del inglés " <i>Common Lymphoid Progenitor</i> "
CMP:	Progenitor común mieloide, del inglés " <i>Common Myeloid Progenitor</i> "
CRISPR:	Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas, del inglés " <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> "
DSB:	Cortes de doble cadena, del inglés " <i>Double-Strand Breaks</i> "
FBS:	Suero fetal bovino, del inglés " <i>Fetal Bovine Serum</i> "
FDR:	Tasa de falsos descubrimientos, del inglés " <i>False discovery rate</i> "
GESMD:	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
GMLP:	Progenitor granulo-monocítico-linfoide, del inglés " <i>Granulocyte-Monocyte-Lymphoid progenitor</i> "
GMP:	Progenitor granulo-monocítico; del inglés " <i>Granulocyte-Monocyte Progenitor</i> "

Abreviaturas

HDR:	Reparación directa por recombinación homóloga, del inglés " <i>Homologous Direct Repair</i> "
HSC:	Células madre hematopoyéticas, del inglés " <i>Hematopoietic Stem Cells</i> "
HSPC:	Células madre y progenitoras hematopoyéticas, del inglés " <i>Hematopoietic Stem and Progenitor Cells</i> "
IPSS:	Sistema pronóstico internacional, del inglés " <i>International Prognostic Scoring System</i> "
KI:	Del inglés " <i>Knock-in</i> "
KO:	Del inglés " <i>Knock-out</i> "
LMA:	Leucemia mieloide aguda
LSK:	Células madre con inmunofenotipo Linaje ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺
LT-HSC:	Del inglés " <i>Long-term Hematopoietic Stem Cells</i> "
MkP:	Progenitor megacariocítico; del inglés " <i>Megakaryocyte Progenitor</i> "
MPP:	Progenitores multipotentes, del inglés " <i>MultiPotent Progenitors</i> "
NHEJ:	Unión de extremos no homóloga, del inglés " <i>Non-Homologous End Joining</i> "
PBS:	Tampón fosfato salino, del inglés " <i>Phosphate buffered saline</i> "
Pre CFU-E:	Progenitor de pre-unidades formadoras de colonia eritroides; del inglés " <i>Pre Colony Forming Unit-Erythroid</i> "
Pre GM:	Progenitor pre-granulo-monocítico, del inglés " <i>Pre Granulocyte-Macrophage Progenitor</i> "
Pre MegE:	Progenitor premegacariocítico-eritroide, del inglés " <i>Pre Megakaryocytic-Erythroid progenitor</i> "
pre-ARNm:	Precursor del ARNm
RBC:	Glóbulos rojos, del inglés " <i>Red Blood Cells</i> "
sgARN:	Guía de ARN de cadena simple, del inglés " <i>single guide RNA</i> "
SMD:	Síndromes mielodisplásicos

snRNP:	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, del inglés " <i>small nuclear Ribonucleoproteins</i> "
ST-HSC:	Del inglés " <i>Short-term Hematopoietic Stem Cells</i> "
TET2:	Del inglés " <i>Ten-eleven translocation 2</i> "
U2AF1:	Del inglés <i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i>
WBC:	Glóbulos blancos, del inglés " <i>White Blood Cells</i> "
ΔPSI:	Niveles de inclusión, del inglés " <i>Differential percent spliced-in</i> "

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso biológico mediante el cual se forman los componentes celulares de la sangre a partir de la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*). A nivel general, en este proceso se generan tres tipos de células: eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes), plaquetas y leucocitos (o glóbulos blancos). La función de los eritrocitos consiste en transportar oxígeno y dióxido de carbono a través de la sangre. Las plaquetas son las encargadas de la coagulación y reparación de heridas. Mientras que, los leucocitos defienden el organismo de agentes patógenos participando en procesos de inmunidad innata o adquirida. Este último grupo está compuesto por diversos tipos celulares como son los linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos, neutrófilos, células NK y células dendríticas.

Las células sanguíneas maduras presentan una vida media relativamente corta: 120 días en el caso de los glóbulos rojos, 8-10 días en el de las plaquetas y un tiempo que oscila entre unos pocos días a varios años dependiendo del tipo de glóbulo blanco. Por ello, para renovar y mantener estables los niveles de estas células en la sangre, es necesario que la hematopoyesis se realice durante toda la vida. Tradicionalmente se ha considerado la hematopoyesis como un proceso jerárquico que parte de las *Long-term* HSC (LT-HSC) (Figura 1). Las LT-HSC se caracterizan por poseer capacidad multipotente y de auto-renovación durante un largo periodo de tiempo (> 3-4 meses).¹ Su diferenciación origina las *Short-term* HSC (ST-HSC), las cuales conservan la capacidad multipotente, pero su habilidad de auto-renovarse dura menos de un mes. Estas ST-HSC dan lugar a los progenitores multipotentes (MPP, del inglés *Multipotent Progenitors*) que han perdido completamente su capacidad de auto-renovarse. Clásicamente, a partir de este punto, se consideraba que los progenitores se comprometían hacia un linaje mieloide o linfoide por vías completamente diferenciadas. Sin embargo, publicaciones de los últimos años²⁻⁵ han puesto de manifiesto la existencia de progenitores con potencial mieloide y linfoide (GMLP, del inglés *Granulocyte-Monocyte-Lymphocyte Progenitor*). Así pues, los MPP se diferencian en estos GMLP y en progenitores plenamente mieloides (CMP, del inglés *Common Myeloid Progenitor*). Por un lado, dentro de la diferenciación mieloide, los CMP dan lugar a progenitores bipotentes: el progenitor pre-granulo-monocítico (Pre GM, del inglés *Granulocyte-Monocyte Progenitor*) y el progenitor premegacariocítico-eritroide, (Pre MegE del inglés

Pre Megakaryocytic-Erythroid Progenitor). Los pre GM originan GMP, y después de diversos pasos de maduración, granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), monocitos y células dendríticas. Los Pre MegE generan finalmente eritrocitos y plaquetas. Mientras que, por otro lado, los GMLP producen dentro de la diferenciación mieloide, progenitores Pre GM y dentro de la diferenciación linfoide dan lugar a progenitores plenamente linfoides (CLP, del inglés *Common Lymphoid Progenitor*) que madurarán en linfocitos B, T y células NK.

Es importante destacar que este esquema de la hematopoyesis se encuentra en continuo cambio a medida que nuevas investigaciones descubren nuevas poblaciones con potenciales y marcadores celulares diferentes a los ya descritos.

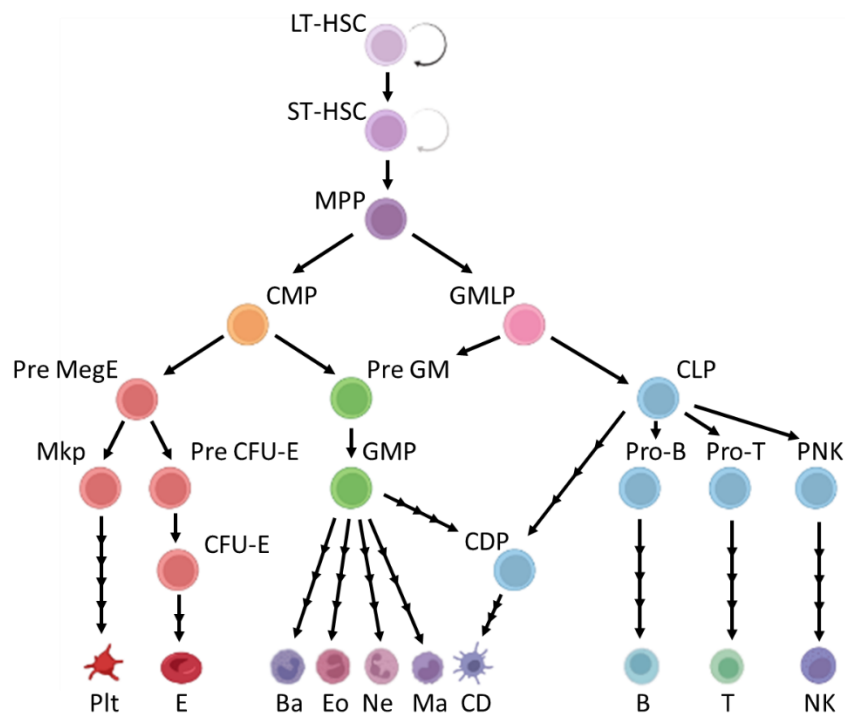


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis. Las LT-HSC se sitúan en la parte superior de la jerarquía hematopoyética. Estas células se diferencian en ST-HSC y, a continuación, en MPP. Después, se produce una separación entre los progenitores estrictamente mieloides, CMP, y los progenitores con capacidad mieloide y linfoide, GMLP. Posteriormente, se produce la diferenciación progresiva hacia las distintas células maduras. LT-HSC: *Long-term Hematopoietic Stem Cells*; ST-HSC: *Short-term Hematopoietic Stem Cells*; MPP: progenitores multipotentes; Pre MegE: progenitor premegacariocítico-eritroide; CMP: progenitor común mieloide; GMLP: progenitor granulo-monocítico-linfoide; Pre GM: progenitor pre-granulo-monocítico; CLP: progenitor común linfoide; Mkp: progenitor megacariocítico; Pre CFU-E: progenitor de pre-unidades formadoras de colonia eritroides; GMP: progenitor granulo-monocítico; Pro-B: progenitor linfocitos B; Pro-T: progenitor linfocitos T; PNK: progenitor células NK; CFU-E: progenitor unidades formadoras de colonia eritroides; CDP: progenitores comunes de célula

dendrítica; Plt: plaquetas; E: eritrocitos; Ba: basófilos; Eo: eosinófilos; Ne: neutrófilos; Ma: Macrófagos; CD: célula dendrítica; B: linfocito B; T: linfocito T; NK: células *natural killer*.

1.1. Órganos hematopoyéticos

La hematopoyesis presenta diversas etapas, con diferentes patrones espaciales y temporales a lo largo de la vida.⁶ La hematopoyesis primitiva se inicia en el saco vitelino a partir de la segunda semana de gestación, y produce principalmente eritrocitos primitivos que serán los encargados de proveer de oxígeno a todos los tejidos del embrión. A partir de la sexta semana, las células madre migran desde el saco vitelino principalmente al hígado, pero también al bazo. Por último, a partir del cuarto mes y durante el resto de la vida, se da la hematopoyesis definitiva, donde el tejido hematopoyético se limita a la médula ósea que se encuentra en el interior de vértebras, esternón, costillas, fémur y pelvis. En condiciones patológicas, el bazo y el hígado pueden recuperar su función hematopoyética, generándose un proceso conocido como hematopoyesis extramedular que produce un agrandamiento significativo de estos órganos.

Así pues, en la edad adulta los tejidos y órganos que presentan importancia en la producción o maduración de células sanguíneas son:

- Médula ósea: en el momento del nacimiento, la médula ósea roja con capacidad hematopoyética, ocupa la totalidad de la cavidad de los huesos. En la edad adulta, la médula ósea roja se va sustituyendo por amarilla, con capacidad adiposa, limitándose a los huesos del cráneo, esternón, costillas, pelvis, cuerpos vertebrales y epífisis de los huesos largos. En la vejez, principalmente se encuentra médula ósea roja en los huesos del cráneo y los cuerpos vertebrales. Como se ha descrito anteriormente, su función principal es producir todas las células de la sangre mediante la hematopoyesis. Además, debido a su capacidad para producir y madurar linfocitos se considera un órgano linfoide primario. Los linfocitos B madurarán en la médula ósea, mientras que los T viajarán al timo para su maduración.
- Timo: se encuentra en la zona superior del tórax. A partir de la pubertad, su tamaño va disminuyendo hasta quedar completamente atrofiado en la vejez. Se considera también un órgano linfoide primario puesto que su función principal consiste en la maduración de los linfocitos T. En este proceso se seleccionan aquellos linfocitos T que desarrollan receptores contra antígenos externos (selección positiva), pero no muestran afinidad para antígenos propios (auto-antígenos).

- Bazo: es considerado un órgano linfoide secundario y se encuentra situado por detrás del estómago. Posee dos tipos de tejidos, la pulpa blanca y la pulpa roja. La primera, está formada por tejido linfoide donde se produce la presentación de antígenos a los linfocitos B y T para producir su activación. La pulpa roja se encarga de filtrar la sangre para retirar los eritrocitos viejos o defectuosos que han visto reducida su función de transportar oxígeno. Debido a fallos en la hematopoyesis, en ocasiones se produce un agrandamiento del tamaño del bazo conocido como esplenomegalia, que puede deberse a diversos motivos como acumulación indiscriminada de plaquetas o eritrocitos, hematopoyesis extramedular, infecciones víricas, etc.
- Ganglios linfáticos: considerado también un órgano linfoide secundario. Junto a los vasos linfáticos conforman el sistema linfático. Su función consiste en filtrar los antígenos que circulan en la linfa y presentarlos a los linfocitos B y T para activarlos.

1.2. Hematopoyesis en el ratón

La hematopoyesis ha sido ampliamente estudiada en el ratón dada la facilidad para examinar la funcionalidad de los progenitores y las HSC mediante ensayos de colonias y trasplante. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, a pesar de que el perfil transcripcional de las células hematopoyéticas humanas se encuentra muy conservado en el ratón,⁷ se ha visto que existen diferencias destacables entre ambos organismos.

A nivel general, los humanos y los ratones difieren, entre otros, en tamaño, vida media, maduración y en la exposición a patógenos. Así pues, estas diferencias afectan, por ejemplo, al número y la proporción de células madre y progenitoras (HSPC). Ya que, al presentar los humanos un mayor tamaño, la demanda proliferativa de estas células también es mayor, lo que afecta a su balance entre auto-renovación y diferenciación.⁸ Las proporciones de leucocitos también son bastante diferentes. Mientras que, en los humanos el 50-70 % de los leucocitos son neutrófilos y el 30-50 % son linfocitos, en los ratones el porcentaje de neutrófilos únicamente alcanza el 10-25 % mientras que el de los linfocitos supone el 75-90 %.⁹

Por otro lado, como se puede ver en la Figura 2, las HSC humanas y murinas poseen antígenos de superficie diferentes.^{10,11} Entre estas variaciones, destacamos por su importancia en nuestro estudio, el compartimento LSK (inmunofenotipo Linaje⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) ya que comprende la fracción de células más inmadura dentro de la hematopoyesis del ratón. La ausencia de marcadores de linaje implica que estas células no presentan ninguno de los antígenos de superficie característicos de las células maduras, como son

habitualmente: Ter119 específico del linaje eritroide, Mac-1 y Gr-1 representativo de macrófagos y granulocitos principalmente, B220 propio de linfocitos B y CD4 y CD8 típicos de linfocitos T.¹²

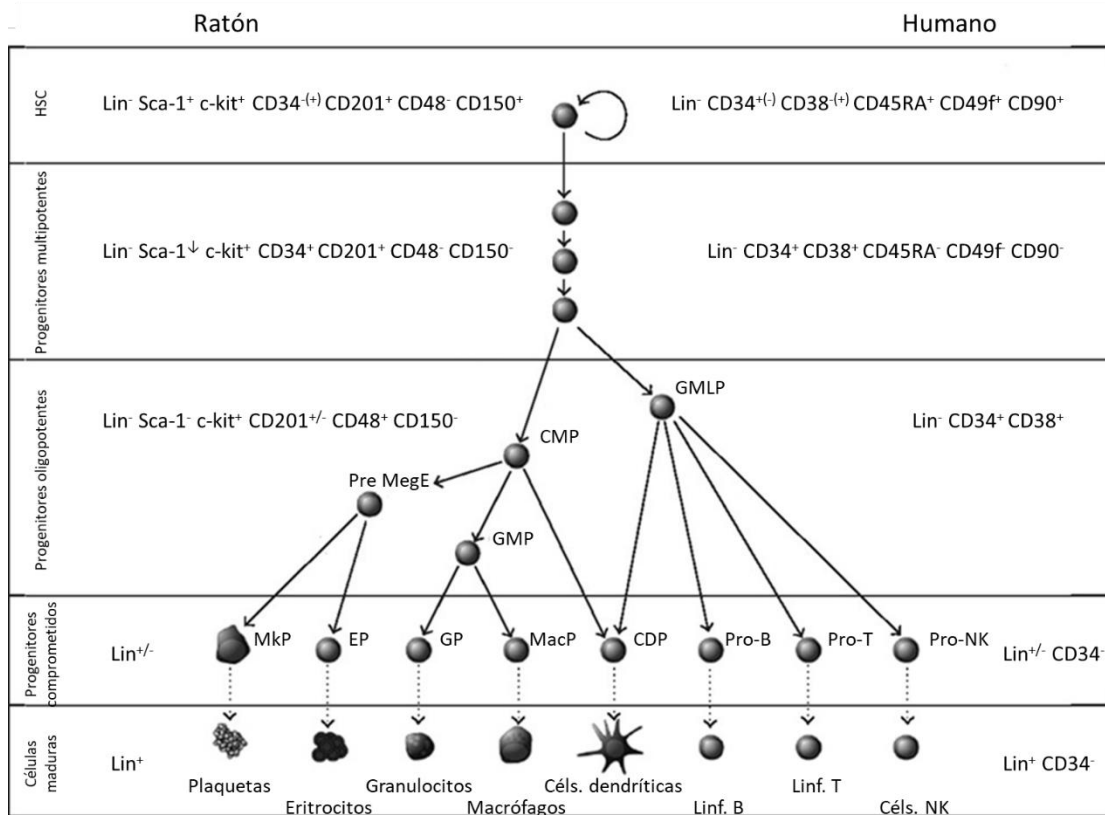


Figura 2. Marcadores hematopoyéticos en humano y ratón. GMLP: progenitor granulomonocítico-linfoide; CMP: progenitor común mieloide; Pre MegE: progenitor premegacariocítico-eritroide; GMP: progenitor granulo-monocítico; MkP: progenitor megacariocítico; EP: progenitor eritroide; GP: progenitor granulocitos; MacP: progenitor macrófagos; CDP: progenitores comunes de célula dendrítica; Pro-B: progenitor linfocitos B; Pro-T: progenitor linfocitos T; Pro-NK: progenitor células NK; NK: células *natural killer*. (Modificado de Chotinantakul, et al., 2012)¹⁰.

2. Síndromes mielodisplásicos (SMD)

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades de naturaleza clonal caracterizadas por presentar una hematopoyesis ineficaz, citopenias (disminución en el número de células sanguíneas), displasia (alteraciones morfológicas celulares) y un riesgo variable de progresión a leucemia mieloide aguda (LMA) secundaria.¹³⁻¹⁵ Los SMD se originan cuando las HSC o las células progenitoras de la médula ósea adquieren alteraciones genéticas somáticas que impiden su correcto funcionamiento¹⁶⁻¹⁸. Como consecuencia, el número de células

inmaduras (blastos) en médula ósea y sangre periférica aumenta, a la vez que se reduce el número de células maduras normales, produciéndose infecciones, hemorragias y anemias, entre otros.¹⁹

2.1. Epidemiología y etiología

Los SMD afectan fundamentalmente a personas de más de 60 años (mediana de edad de 75 años). Actualmente, su incidencia es de 3 - 5 casos por cada 100 000 habitantes en España, siendo más elevada en hombres que en mujeres.²⁰ Dado que es una enfermedad asociada al envejecimiento, el ratio de incidencia es muy bajo en personas menores de 40 años (~ 0.1 casos por 100 000 habitantes). Sin embargo, aumenta a 50 casos/100 000 habitantes en personas mayores de 75 años.²⁰ Como consecuencia del envejecimiento poblacional, en los últimos años se ha producido un incremento de la incidencia y prevalencia de casos de SMD, traduciéndose en un aumento del número de muertes.

La etiología de los SMD se desconoce todavía con exactitud. No se sabe cuál es el suceso patogénico inicial, pero el desarrollo y la progresión de la enfermedad parecen seguir un proceso escalonado de adquisición progresiva de alteraciones genéticas de las que se hablará en detalle más adelante. De acuerdo con la etiología, los SMD se pueden clasificar en primarios y secundarios. La mayoría de casos son primarios o de *novo*. Sin embargo, alrededor de un 10-15 % de los pacientes desarrolla SMD secundario tras haberse sometido a un tratamiento de radiación o de quimioterapia con agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa, para tratar otro tipo de cáncer.²¹⁻

23

2.2. Sintomatología

Los síntomas que padecen los pacientes de SMD habitualmente son generados por la presencia de citopenias. En caso de eritrocitopenia (hemoglobina < 10 g/dL), los pacientes muestran síntomas comunes de anemia como son: palidez, fatiga y cefalea. Si poseen trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10⁹/L), presentan problemas de coagulación que se hacen visibles a través de hemorragias y por la mayor tendencia a la formación de hematomas. Por último, en caso de neutropenia (neutrófilos < 1.8 x 10⁹/L), suelen sufrir infecciones de forma recurrente.²⁰ Además, para compensar la desregulación hematopoyética, los pacientes pueden desarrollar hematopoyesis

extramedular, lo que provoca un agrandamiento del tamaño del hígado (hepatomegalia) o del bazo (esplenomegalia).

2.3. Diagnóstico

Para establecer un diagnóstico de SMD, es necesario que el paciente se someta a diversos análisis tanto en sangre periférica como en médula ósea. Pero, además, el médico debe obtener una historia clínica lo más detallada posible, considerándose imprescindible que queden reflejados tanto posibles síntomas de anemia, hemorragia o infección, como la posible exposición a tóxicos (tabaco, alcohol, metales pesados...), fármacos o radioterapia. A continuación, se resumen las pruebas que se consideran imprescindibles para poder llegar a un diagnóstico de SMD, según la Guía Española de SMD y LMMC elaborada por el Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD).²⁰

Por un lado, a partir de una muestra de sangre periférica se obtiene el hemograma completo, para cuantificar las células maduras de las diferentes líneas, y se realiza un frotis tiñendo con May-Grünwald Giemsa para valorar los rasgos de displasia que se puedan encontrar. Además, con el fin de poder descartar otras posibles causas de citopenia y/o displasia, se realizan ensayos complementarios como, por ejemplo, pruebas de detección de los niveles de vitamina B12, ácido fólico, eritropoyetina, estudio del metabolismo del hierro, test serológicos de VIH, VHB, VHC, etc.

Por otro lado, a partir de una muestra de aspirado medular se realiza un estudio morfológico empleando la tinción de May-Grünwald Giemsa nuevamente y la tinción de *Perls*. En el primer caso, se cuentan al menos 500 células y se evalúa la proporción de blastos y el porcentaje de displasia en cada una de las líneas de la serie mieloide. Se considera que una línea es displásica si posee un 10 % o más de blastos. Si el porcentaje de blastos mieloides supera el 20 % se considera una LMA.²⁴⁻²⁷ La tinción de *Perls* se emplea para realizar el recuento de sideroblastos (eritroblastos con depósitos de hierro).²⁸ Además, en médula ósea también se realiza un estudio citogenético convencional de, al menos, 20 metafases para detectar las anomalías cromosómicas más recurrentes (Tabla 1). En algunos casos, este análisis deberá ser complementado con técnicas más sensibles como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o la hibridación genómica comparativa (CGH arrays).²⁹ Por último, en términos generales, si se detecta un porcentaje ≥ 5 % de sideroblastos, se debe estudiar la presencia de mutaciones en el gen *SF3B1*.^{30,31} En algunos casos, es necesaria una

biopsia de médula ósea para completar el diagnóstico. Aunque, actualmente hay grupos que ya consideran esta prueba imprescindible en todos los casos.³²

Tabla 1. Alteraciones citogenéticas recurrentes en los SMD.²⁰

No balanceadas	Balanceadas
+8	t(11;16)(q23.3;p13.3)
-7/7q-	t(3;21)(q26.2;q22.1)
-5/5q-	t(1;3)(p36.3;q21.2)
20q-	t(2;11)(p21;q23.3)
-Y	inv(3)(q21.3;q26.2)
i(17)(q10) ó t(17p)	t(3;3)(q21.3;q26.2)
-13 ó del(13q)	t(6;9)(p23;q34.1)
del(11q)	
del(12p) ó t(12p)	
idic(X)(q13)	

Una vez realizadas todas las pruebas imprescindibles, el paciente debe cumplir dos prerequisites y al menos uno de los requisitos decisivos descritos en la Tabla 2 para confirmar el diagnóstico de SMD. En caso de no cumplirse ninguno de los criterios decisivos, se emplean los co-criterios para determinar un caso con “sospecha alta de SMD”. Por este motivo, habitualmente es necesario llevar a cabo pruebas complementarias para alcanzar el diagnóstico, como son el análisis de linfocitos T o células CD34⁺ por CF. Además, debido a que, como se explicará más adelante en profundidad, el 80-90 % de los pacientes presenta mutaciones somáticas en el momento del diagnóstico, cada vez es más habitual que para alcanzar un diagnóstico se realicen estudios de secuenciación masiva (NGS) para detectar alteraciones en los genes más frecuentemente mutados (*TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TP53*, *U2AF1*, *EZH2*, *ZRSR2*, *STAG2*, *CBL*, *NRAS*, *JAK2*, *SETBP1*, *IDH1*, *IDH2* y *ETV6*).^{14,33-}

³⁵ Esto contribuye no sólo a la estratificación de los pacientes durante el diagnóstico, sino también a la evaluación del pronóstico.

Tabla 2. Criterios mínimos para el diagnóstico de SMD.²⁰

A. Prerrequisitos (ambos se deben cumplir)	1. Citopenia constante (6 meses) en una o más de las líneas eritroide, neutrofílica o plaquetar (excepción: presencia de un exceso de blastos y anomalías citogenéticas relacionadas con SMD que por sí son diagnósticas de SMD). 2. Exclusión de enfermedades hematológicas y no hematológicas como causa de citopenia/displasia.	
B. Criterios decisivos (relacionados con el SMD) (se debe cumplir al menos uno)	1. Displasia $\geq 10\%$ de células en 1 o más líneas mieloides en MO 2. 5-19 % de blastos en MO (o 2-19 % en SP). 3. $\geq 15\%$ sideroblastos en anillo. $\geq 5\%$ sideroblastos en anillo en presencia de mutación <i>SF3B1</i> . 4. Anomalías cromosómicas típicas (+8, -7, 5q-, 20q-, otras).	
C. Co-criterios	Si se cumple (A) pero NO (B) , y presenta clínica.	1. Alteraciones histológicas en la MO. 2. Fenotipo atípico en MO por CF. 3. Clonalidad (detectada por NGS).
El diagnóstico de SMD se establece ante la presencia de los prerrequisitos (A) junto con, al menos, uno de los criterios decisivos (B) . En ausencia de criterio decisivo (B), el cumplimiento de los co-criterios (C) ayuda a establecer la condición de "sospecha alta de SMD".		

MO: médula ósea. SP: sangre periférica. CF: citometría de flujo. NGS: secuenciación de nueva generación.

2.4. Clasificación según la OMS

En 1982 se estableció la primera clasificación diagnóstica de los SMD por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB).³⁶ Ésta se mantuvo en vigor hasta que en 2002 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación que se ha ido revisando y modificando hasta llegar a la última versión actualizada en 2017.³⁷ Esta actualización permite clasificar los SMD según el número de blastos y criterios morfológicos y citogenéticos principalmente, aunque también se incorporaron las mutaciones en el gen *SF3B1* como marcador de gran valor diagnóstico (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los SMD según OMS (2017).²⁰

	Líneas displásicas	Citopenias	SA (%)	Blastos (%)		Bastones de Auer	Citogenética
				SP	MO		
SMD con displasia unilínea SMD-DU	1	1 - 2	<15/<5 ^a	<1	<5	NO	Cualquiera ^b
SMD con displasia multilínea SMD-DM	2 - 3	1 - 3	<15/<5 ^a	<1	<5	NO	Cualquiera ^b
SMD con SA: SMD-SA-DU SMD-SA-DM	1 2 - 3	1 - 2 1 - 3	≥15/≥5 ^a	<1	<5	NO	Cualquiera ^b
SMD con del(5q) aislada	1 - 3	1 - 2	Ninguno o alguno	<1	<5	NO	Del(5q) sólo o con 1 anomalía adicional (excepto -7 o del(7q))
SMD con exceso de blastos: SMD-EB-1 SMD-EB-2	1 - 3	1 - 3	Ninguno o alguno	2 - 4 5 - 19	5 - 9 10 - 19	NO Sí ^c / NO	Cualquiera
SMD inclasificable: Con 1% de blastos en SP	1 - 3	1 - 3	Ninguno o alguno	1 ^d	<5	NO	Cualquiera
Con displasia en una línea y pancitopenia	1	3	Ninguno o alguno	<1	<5	NO	Cualquiera
Basado en alteraciones citogenéticas	0	1 - 3	<15 ^e	<1	<5	NO	Anomalía citogenética definitoria de SMD

^a Si hay mutación en *SF3B1*.

^b Cualquier anomalía citogenética a menos que cumpla criterios de SMD con del(5q-) aislada.

^c La presencia de bastones de Auer en blastos define cualquier tipo de SMD como SMD-EB-2 independientemente del porcentaje de blastos.

^d Recuento realizado al menos en dos ocasiones separadas.

^e Los casos con ≥ 15 % de sideroblastos en anillo tienen por definición displasia eritroide.

MO: médula ósea. SP: sangre periférica. SA: sideroblastos en anillo.

2.5. Pronóstico (IPSS-R)

Como se ha comentado anteriormente, los SMD comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades. Por ello, presentan un pronóstico muy variable en cuanto a supervivencia global y riesgo de evolución a LMA secundaria. Los esfuerzos por alcanzar criterios pronósticos, con el fin de adaptar el tratamiento al riesgo estimado, han sido notables. En 1997, comenzó a emplearse en la práctica clínica el Índice Pronóstico Internacional (IPSS) que empleaba variables analíticas como el número de blastos o de citopenias y variables citogenéticas para clasificar a los pacientes dentro de 4 grupos de riesgo: bajo, intermedio-1, intermedio-2, alto.³⁸ Sin embargo, esta clasificación presentaba algunas limitaciones como: no evaluar la citogenética en un número elevado de pacientes, establecer inadecuadamente el riesgo para muchas de estas alteraciones, asignar mayor peso pronóstico al porcentaje de blastos que a la citogenética, así como no reconocer otras características con peso pronóstico

demostrado.³⁹ No fue hasta 2012 que se obtuvo un IPSS-Revisado (IPSS-R)⁴⁰ que incluía una nueva categorización de las alteraciones citogenéticas (Tabla 4) propuesta por Schanz y colaboradores⁴¹. De esta forma, se mejoraba la estratificación pronóstica de los pacientes en 5 grupos (muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto) con índices de supervivencia global y riesgo de evolución a LMA secundaria muy diferenciados.⁴²⁻

44

Tabla 4. Categorías citogenéticas incluidas en el IPSS-R.⁴¹

		Anomalías citogenéticas
Subgrupo pronóstico	Muy bueno	<ul style="list-style-type: none"> ○ -Y ○ del(11q)
	Bueno	<ul style="list-style-type: none"> ○ Normal ○ del(5q) ○ del(12p) ○ del(20q) ○ Anomalías dobles que incluyen del(5q) (excepto con -7 o del(7q))
	Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> ○ del(7q) ○ +8 ○ +19 ○ i(17q) ○ Cualquier otra anomalía única o doble en clones independientes
	Pobre	<ul style="list-style-type: none"> ○ -7 ○ inv(3)/t(3q)/del3q ○ Anomalías dobles que incluyen -7/del(7q)) ○ Anomalías complejas con 3 anomalías
	Muy pobre	<ul style="list-style-type: none"> ○ > 3 anomalías complejas

Como se puede observar en la Tabla 5, de la misma forma que ocurría con el IPSS, el IPSS-R se calcula asignando puntos a las diferentes variables: grupo citogenético, porcentaje de blastos en médula ósea y nivel de hemoglobina, plaquetas y granulocitos. El número que se obtiene de la suma de todos esos puntos, es el que nos informa del riesgo calculado y se emplea para estratificar a los pacientes proporcionándoles el tratamiento más adecuado a su condición (Tabla 6).

Tabla 5. Variables pronósticas del IPSS-R con sus respectivas puntuaciones.⁴⁰

	Puntuación						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Grupo riesgo citogenético	Muy bueno	-	Bueno	-	Intermedio	Pobre	Muy pobre
Blastos MO (%)	0 - 2	-	3 - 4.9	-	5 - 10	> 10	-
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10	-	8 - 9.9	< 8	-	-	-
Plaquetas (x10⁹ L)	≥ 100	50 - 99	< 50	-	-	-	-
Granulocitos (x10⁹ L)	≥ 0.8	< 0.8	-	-	-	-	-

MO: médula ósea

Tabla 6. Grupos pronóstico de riesgo según el IPSS-R.⁴⁰

Grupo de riesgo	Puntuación total
Muy bajo	≤ 1.5
Bajo	> 1.5 - 3
Intermedio	> 3 - 4.5
Alto	> 4.5 - 6
Muy alto	> 6

A pesar de que se ha visto que más del 80 % de pacientes con SMD y más del 50 % de pacientes con cariotipo normal presentan mutaciones somáticas,^{14,34,35} actualmente estas alteraciones no se incluyen en el IPSS-R. Sin embargo, se ha demostrado que mutaciones en genes como *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1* y *SRSF2* proporcionan por sí solas un pronóstico desfavorable para el paciente.^{14,15,33,34,45,46} De la misma forma que las mutaciones en *SF3B1* confieren un pronóstico favorable, sobre todo si se presenta como una única alteración.^{30,31,47,48} Además, también se ha asociado un mayor número de mutaciones somáticas con un peor pronóstico.³⁵ Por ello, en los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo por revisar el IPSS-R e incorporar el peso de estas mutaciones somáticas.^{33,49} Este nuevo algoritmo pasará a llamarse IPSS-Molecular (IPSS-M). Las variables de riesgo candidatas serán los recuentos sanguíneos, los blastos, la citogenética y 38 mutaciones genéticas. Esta nueva fórmula estratificará a los pacientes en 6 grupos de riesgo: muy bajo, bajo, moderadamente bajo, moderadamente alto, alto y muy alto.⁵⁰

2.6. Tratamiento

A continuación, se resume el actual protocolo de tratamiento para pacientes con SMD recomendado por el GESMD.²⁰ A pesar de que el IPSS-R clasifica a los pacientes en 5 categorías de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto, muy alto), a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado, éstos se dividen en dos grupos: bajo riesgo (puntuación IPSS-R < 3.5) y alto riesgo (puntuación IPSS-R > 3.5).⁵¹ Independientemente del grupo de riesgo al que pertenezcan, el tratamiento principal siempre irá acompañado de un tratamiento de soporte que tendrá como objetivo paliar los síntomas provocados por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de la anemia puede ser necesario realizar un soporte transfusional o tratar al paciente con agentes estimulantes de la eritropoyesis (como el Luspatercept); igualmente, para tratar las consecuencias derivadas de la neutropenia (infecciones, principalmente) es habitual dispensar antibióticos; por último, la administración de agentes estimulantes de la trombopoyetina (como son el Eltrombopag o el Romiplostim) o trasfusiones de plaquetas, pueden paliar los síntomas de la trombocitopenia.

Por un lado, los pacientes de SMD de bajo riesgo, poseen una supervivencia global superior,⁴⁰ por ello, el objetivo del tratamiento es disminuir los efectos de las citopenias y mejorar la calidad de vida. En caso de tratarse de pacientes asintomáticos, no es necesario realizar ningún tipo de tratamiento. Pero, será necesario reevaluar la situación realizando un análisis sanguíneo cada 3 - 4 meses. El síntoma más habitual suele ser la anemia, para la cual se administra el tratamiento de soporte detallado anteriormente. Si el paciente posee una anemia severa, será necesaria una transfusión y además deberá ser tratado con factores estimulantes de la maduración de los eritrocitos, agentes inmunosupresores, inmunomoduladores o hipometilantes, en función de la presencia o ausencia de la delección 5q y de sideroblastos en anillo.^{52,53} El tratamiento de elección para el SMD con delección 5q es la lenalidomida. En algunos casos puntuales, será necesario realizar un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH). El alo-TPH es un procedimiento en el cual un paciente recibe HSPC de un donante compatible, con el fin de restaurar el correcto funcionamiento de su médula ósea, después de superar un tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia.

Por otro lado, el tratamiento de los pacientes de SMD de alto riesgo, tiene como objetivo principal aumentar su esperanza de vida y disminuir la probabilidad de que se desarrolle una LMA secundaria. Por ello, en términos generales, son tratados con agentes hipometilantes, por ejemplo, azacitidina o decitabina, hasta encontrar, si es posible, un donante compatible para realizar un Alo-TPH.⁵⁴

Por último, cabe destacar que, el Alo-TPH es actualmente la única alternativa terapéutica curativa en pacientes con SMD. El resto de terapias y medicamentos intentan paliar los síntomas y consecuencias de esta enfermedad. Sin embargo, debido a que la mediana de edad de los pacientes con SMD es de 75 años y que habitualmente presentan comorbilidades, sólo una minoría son candidatos a recibir el Alo-TPH.⁵⁵

2.7. Mutaciones somáticas en SMD

En la última década, diversos grupos de investigación han secuenciado el genoma, exoma o transcriptoma de pacientes con SMD y han observado que más del 80 % presenta mutaciones somáticas.^{14,34,35} La adquisición secuencial y la concurrencia entre estas mutaciones desencadena, en parte, el desarrollo de la enfermedad⁵⁶ y genera la heterogeneidad clínica característica de los pacientes de SMD.^{14,34}

Aunque el número de genes con mutaciones *driver* encontrado en los pacientes de SMD es amplio, a nivel general, se pueden organizar según su función celular en 6 grupos:

a) Factores de *splicing*: es el grupo de genes que se encuentra mutado en mayor frecuencia, afectando aproximadamente al 50-60 % de los pacientes.⁵⁷ En él se incluyen las mutaciones que afectan a las proteínas que forman el spliceosoma, la maquinaria encargada de realizar el *splicing* del ARN. Estas alteraciones ocurren en las primeras etapas de la enfermedad, considerándose mutaciones fundadoras. Además, por lo general son excluyentes entre sí (aunque se han detectado algunos casos puntuales de simultaneidad)⁵⁸ y, habitualmente, se encuentran en heterocigosis, lo que subraya la necesidad de la célula de conservar al menos una copia *wild-type* para su supervivencia.⁵⁹

Las mutaciones en los genes *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1* se caracterizan por ser alteraciones con cambio de sentido (*missense*) y aparecer habitualmente en residuos concretos (*hotspots*).³⁵ Mientras que las mutaciones en *ZRSR2* se distribuyen a lo largo del gen.⁶⁰ La supervivencia global y el riesgo de progresión a LMA secundaria, difiere en función del gen afectado. Así, por ejemplo, las mutaciones en *SF3B1*, fuertemente ligadas a la presencia de sideroblastos en anillo, se caracterizan por un pronóstico bueno y una baja progresión a LMA secundaria.³¹ Mientras que, las mutaciones en *U2AF1* se relacionan con SMD con displasia multilínea y,

generalmente, un riesgo alto de progresión a LMA secundaria, lo que disminuye la supervivencia global de los pacientes.^{14,35}

b) Reguladores epigenéticos: es el siguiente grupo más frecuentemente mutado.⁶¹

También se consideran mutaciones fundadoras, al observarse en etapas tempranas de la enfermedad. En este grupo se incluyen tanto los genes implicados en la metilación del ADN como en la modificación de las histonas.

- Factores de metilación del ADN: este grupo comprende aquellos genes que codifican proteínas que intervienen de forma directa en la metilación (*DNMT3A*) o desmetilación del ADN (*TET2*) o de forma indirecta al participar en la síntesis de cofactores de este proceso (*IDH1/2*).⁶² Las mutaciones en estos genes, alteran el patrón de metilación del ADN modificando la expresión de algunos genes. Así pues, en SMD se ha visto hipermetilación y silenciamiento en genes relacionados con el control de la proliferación, la adhesión de las HSC, genes supresores de tumores y genes relacionados con la reparación del ADN.⁶³

- Factores modificadores de histonas: en esta categoría se agrupan las diferentes proteínas que se encargan de modificar las histonas en residuos concretos mediante acetilación, metilación o ubiquitinación, entre otros. Destacan las mutaciones en *EZH2* y *ASXL1* las cuales se asocian con un pronóstico adverso y una supervivencia global menor.⁶⁴

c) Cohesinas: en este grupo se encuentran las proteínas encargadas de alinear y estabilizar cromátidas hermanas antes de la división celular.⁶⁴ Aunque también poseen importancia en los procesos de reparación de ADN después de la replicación y en la regulación transcripcional.⁶¹ A menudo se presentan en heterocigosis y resultan en procesos de haploinsuficiencia o dominancia negativa. Algunos de los genes presentes en esta categoría son: *STAG1/2*, *SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*. El gen más frecuentemente mutado es *STAG2*, el cual se relaciona con un pronóstico adverso. Además, este gen se encuentra en una elevada frecuencia en pacientes de LMA y LMA secundaria, lo que sugiere que posee alguna función importante en su patogénesis.⁶⁵

d) Factores de transcripción: se ha observado que las mutaciones en los genes que se incluyen en este grupo afectan a la diferenciación y al mantenimiento de las HSC.⁶⁶ *RUNX1*, *GATA2* y *ETV6*, son los que se encuentran mutados con mayor frecuencia y se relacionan con un peor pronóstico.^{17,59} Las alteraciones del gen *RUNX1* en la

línea germinal se han relacionado con SMD familiar caracterizado por presentar un desorden plaquetario y elevado riesgo de evolución a LMA secundaria.⁶⁶

- e) Proteínas de señalización celular:** los pacientes de SMD frecuentemente tienen mutaciones en genes de transducción de señales. Estas alteraciones suelen generar la activación constitutiva de rutas relacionadas con la proliferación, apoptosis y diferenciación.⁶¹ En este grupo se encuentran genes que intervienen en las cascadas de señalización de las quinasas como *FLT3*, *KIT* y *JAK2* y con la ruta RAS como *N-RAS*, *K-RAS*, *CBL*, *NF1* y *PTPN11*.⁵⁹ Estas mutaciones se han descrito en menos del 10 % de los pacientes de SMD y en la mayoría de ocasiones se observan en *N-RAS* y *K-RAS* durante la transformación a LMA secundaria.³⁴
- f) TP53:** a pesar de que *TP53* es un factor de transcripción, es habitual encontrarlo en un grupo independiente del resto debido a que por sí sólo ya alcanza una frecuencia del 5-10 % de los casos de SMD, y, además, no suele concurrir con otras mutaciones.⁶⁷ Este gen es un supresor de tumores que actúa como “protector del genoma” al activar vías de apoptosis, arresto del ciclo celular y reparación del ADN en respuesta al estrés celular.⁵⁹ En SMD se asocia con cariotipos complejos, alto riesgo y mal pronóstico.⁶⁸ Además, es común encontrar mutaciones de *TP53* en pacientes que han desarrollado SMD secundario.⁶⁹

Se ha observado que los pacientes de SMD poseen una media de 2-4 mutaciones *driver* en el momento del diagnóstico.⁵⁶ La combinación de genes co-mutados y la interacción entre las diferentes rutas alteradas, podría ser el causante de la heterogeneidad característica de los SMD.^{14,34} Además, se ha observado la presencia de mutaciones en genes como *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* en individuos sanos de edad avanzada, condición denominada “hematopoyesis clonal de potencial indeterminado” (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential* o CHIP, por sus siglas en inglés).⁷⁰⁻⁷² Todo ello en su conjunto, parece indicar que es la cooperación con otras mutaciones lo que genera la patogénesis de los SMD.⁵⁹ Por ello, es importante estudiar no únicamente las alteraciones encontradas en los pacientes de forma individual sino también las interacciones que se dan con otras mutaciones.

3. *Splicing*

La función principal del *splicing* consiste en eliminar los intrones del precursor del ARNm (pre-ARNm) y empalmar los exones generando el ARNm maduro. Este proceso

es llevado a cabo por dos complejos moleculares conocidos como el spliceosoma mayor y el spliceosoma menor. Estos complejos están formados por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (*small nuclear ribonucleoproteins* o snRNP, por sus siglas en inglés) y diversas proteínas que interaccionan con ellas. El spliceosoma mayor lo componen las snRNP U1, U2, U4, U5 y U6 y es el responsable del procesamiento de los intrones dependientes de U2, los cuales constituyen el 99 % de los intrones totales. Mientras que, el spliceosoma menor está compuesto por las snRNP U5, U11, U12, U4atac y U6atac (análogas funcionales de las snRNP del spliceosoma mayor) y procesa los intrones dependientes de U12, los cuales conforman el 1 % restante.^{73,74}

3.1. Spliceosoma

El spliceosoma es una estructura dinámica que se ensambla *de novo* en cada intrón del pre-ARNm que debe ser escindido.⁷⁵ El procesado de intrones por el spliceosoma mayor comienza con la unión de la snRNP U1 a la secuencia GU del extremo 5' (sitio donador). Mientras, la proteína *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1* (U2AF1, también conocido como U2AF35) interacciona con U2AF2 (también conocido como U2AF65) formando un heterodímero conocido como U2AF. U2AF1 reconoce los dinucleótidos AG del extremo 3' del intrón (sitio aceptor) y U2AF2 interacciona con el tramo de polipirimidinas localizado cerca de ese extremo.⁷⁶ Al mismo tiempo, la proteína SF1 se une al punto de ramificación (*branch point*) adyacente a esta región. De esta forma, queda constituido el spliceosoma temprano o complejo E (Figura 3A). A continuación, la proteína SF1 permite a la snRNP U2 reconocer, a través de la proteína SF3B1, la adenosina localizada en la región de polipirimidinas. El heterodímero U2AF estabiliza este reconocimiento posibilitando que U2 interaccione con U1 acercando así los dos extremos del intrón^{73,77} y formando el pre-spliceosoma o complejo A. Seguidamente, el trímero formado por U4/U6.U5 es reclutado escindiéndose las snRNP U1 y U4 y constituyendo el spliceosoma activado o complejo B*. Este complejo realiza la primera reacción de transesterificación separando el primer exón del intrón y, formando un lazo con el intrón y el segundo exón, lo que constituye en su conjunto el spliceosoma catalítico o complejo C. A continuación, este complejo realiza otra reacción de transesterificación que da lugar a la escisión del intrón del segundo exón y posibilita el empalme de los dos exones (complejo post-spliceosoma). Por último, las snRNP U2, U5 y U6 se liberan para poder ser reutilizadas en las siguientes rondas de *splicing* (Figura 3B).^{74,78}

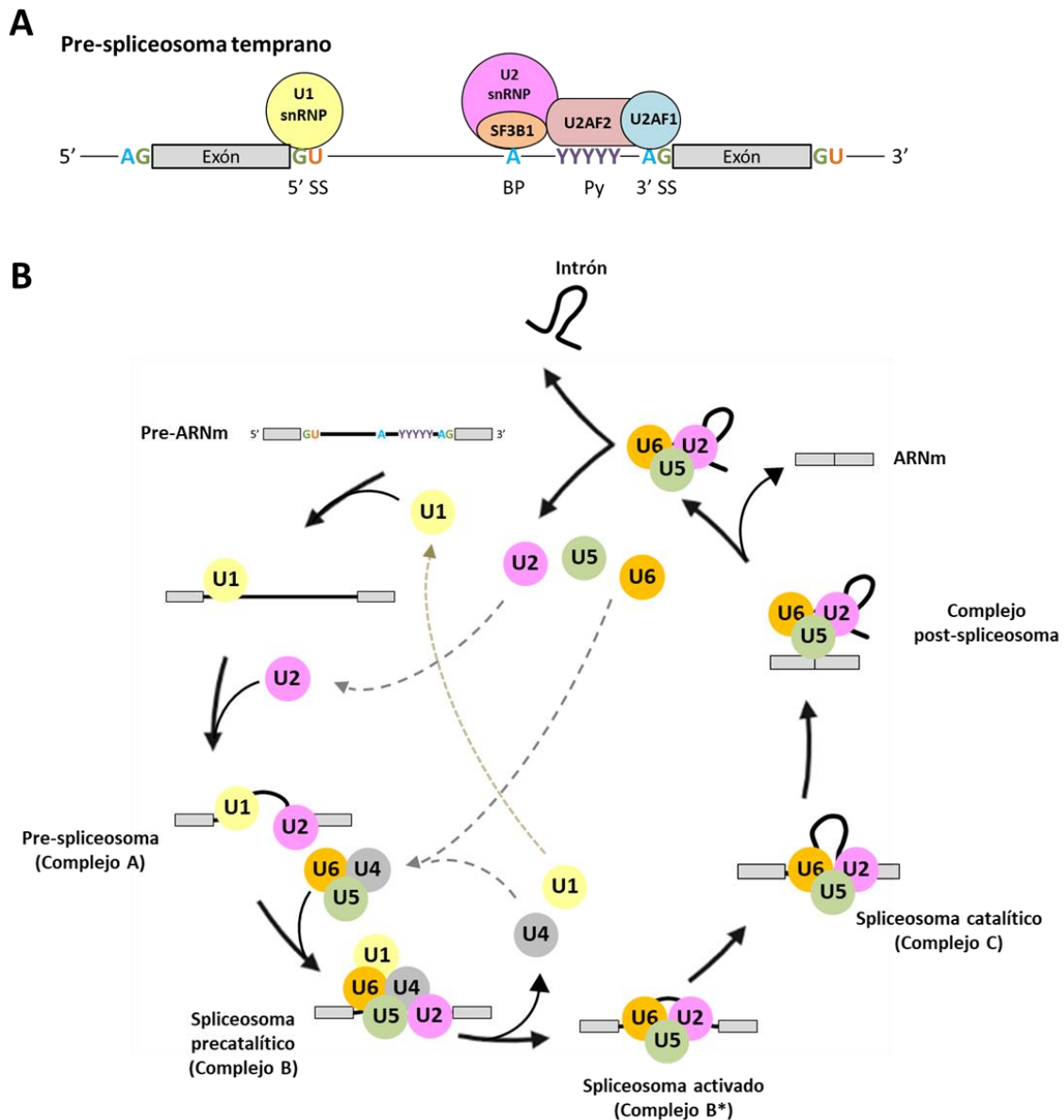


Figura 3. Ensamblaje y actividad del spliceosoma mayor. (A) Estructura del pre-spliceosoma temprano o complejo E. 5' SS: sitio donador 5'; BP: *branch point* o punto de ramificación; Py: tramo de polipirimidinas; 3' SS: sitio aceptor 3'. (B) Proceso de *splicing* en intrones dependientes de U2. Se indican en círculos las distintas snRNP.

Las proteínas que componen el spliceosoma se encuentran altamente conservadas entre especies, al igual que las secuencias de los sitios aceptores y donadores. Sin embargo, las secuencias intrónicas y el sitio de ramificación son muy variables entre especies.^{79–81} Esto implica que los genes ortólogos entre humano y ratón, a menudo, poseen una estructura intrón/exón similar aunque las secuencias de los intrones no se encuentren conservadas.⁸⁰ En consecuencia, al comparar las secuencias de los transcritos de ambas especies a menudo difieren, lo que dificulta la interpretación de los datos obtenidos mediante el análisis del *splicing* alternativo en el ratón.^{82,83}

3.1.1. *Splicing alternativo*

Habitualmente se habla de dos tipos de *splicing*: el constitutivo y el alternativo. En el primero, el spliceosoma detecta las secuencias preferentes en el pre-ARNm, eliminando los intrones y ligando los exones en el orden que aparecen en el gen. Mientras que durante el *splicing* alternativo se produce una desviación de esta secuencia preferente excluyendo ciertos exones o incluyendo ciertas regiones intrónicas, dando como resultado diferentes formas de ARNm maduro y, por tanto, diferentes isoformas de la proteína. El *splicing* alternativo es el mecanismo que explica la gran discrepancia existente entre el número de genes codificantes de proteínas y el número de proteínas diferentes existentes en los organismos complejos (en el humano existen 25 000 genes y > 90 000 proteínas diferentes, aproximadamente).⁸⁴⁻⁸⁶ En mamíferos cerca del 95 % de los genes presentan *splicing* alternativo.⁸⁷ Las isoformas generadas varían en función de la etapa de desarrollo del organismo, del tejido analizado o de las diferentes señales del entorno que pueda recibir.⁸⁸

Existen principalmente 5 tipos de eventos de *splicing* alternativo (Figura 4): A) salto de exón, B) retención de intrón, C) exones mutuamente excluyentes, D) sitio alternativo en 5' y E) sitio alternativo en 3'. Estos eventos vienen regulados por elementos en *cis* y factores en *trans*. Los elementos *cis* son secuencias de, aproximadamente, 10 nucleótidos de longitud que se encuentran tanto en exones como en intrones del propio pre-ARNm y que estimulan el *splicing* (potenciadores) o lo inhiben (silenciadores).⁸⁹ Dentro de los factores *trans* se encuentran las proteínas reguladoras específicas como las proteínas ricas en serina-arginina (SR) o las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* o hnRNPs, por sus siglas en inglés).⁹⁰

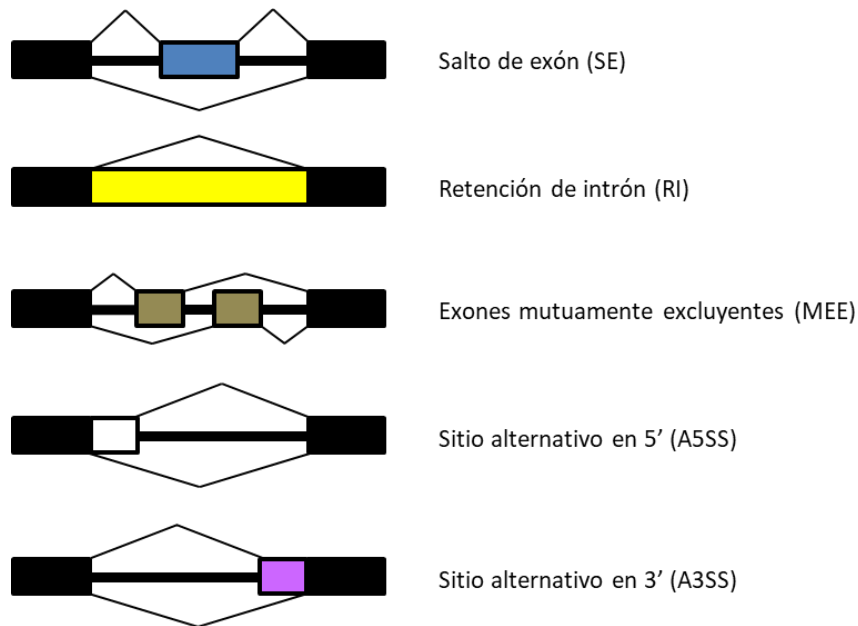


Figura 4. Esquema de los diferentes eventos de *splicing* alternativo. Las líneas de la parte superior indican el *splicing* constitutivo mientras que la inferior representa el proceso de *splicing* alternativo. Los exones se muestran en negro.

En la última década, se ha prestado especial atención a los eventos de *splicing* y su regulación durante la hematopoyesis, en parte por el descubrimiento del elevado número de pacientes con SMD que poseen mutaciones en factores de *splicing* y en parte también porque la presencia de *splicing* aberrante es considerada una marca distintiva del cáncer.^{57,85,91-94}

La firma transcriptómica y el patrón de *splicing* son característicos de cada población hematopoyética y de cada estadio de maduración.⁹⁵⁻⁹⁷ La desregulación del proceso de *splicing* puede deberse tanto a mutaciones en las secuencias *cis* como en las proteínas *trans* y pueden provocar tanto, cambios en los patrones de *splicing*, como variaciones en la cantidad producida de las diferentes isoformas.⁸⁹

3.2. Relación *splicing* y metilación

En los últimos años se ha evidenciado el impacto sobre el *splicing* que tienen los cambios epigenéticos y estructurales de la cromatina. Pero, también, cómo las alteraciones en el *splicing* pueden influenciar la regulación epigenética.⁸⁷

Por un lado, las modificaciones epigenéticas de la cromatina y las histonas, como la metilación o la acetilación, pueden modificar el *splicing*, al menos, de tres maneras: 1)

alterando la posición de los nucleosomas a través de la interacción con proteínas remodeladoras;⁹⁸ 2) imposibilitando o facilitando la unión del spliceosoma a través de proteínas que interaccionan con las señales epigenéticas;⁹⁹ 3) modificando la tasa de elongación de la ARN polimerasa II, afectando de manera indirecta el *splicing*.¹⁰⁰

Centrándonos en la metilación, se ha visto que su impacto en el *splicing* del gen varía en función de la región metilada y el contexto genómico. Mientras que, en algunos genes la metilación promueve la elongación de la transcripción y, por tanto, la inclusión de exones alternativos¹⁰¹, en otros, produce la exclusión de los mismos.^{100,102,103}

Por otro lado, el proceso de regulación también ocurre en sentido contrario: el *splicing* puede modular los patrones epigenéticos de la cromatina. Por ejemplo, la disminución de la actividad de la snRNP U2 se ha asociado con la pérdida de la trimetilación en la lisina 36 de la histona 3 (H3K36me3).¹⁰⁴ Además, cabe destacar que dado que la mayoría de proteínas (entre las que se incluyen los modificadores epigenéticos) presentan *splicing* alternativo, las mutaciones en las proteínas del *splicing* pueden afectar indirectamente a la epigenética alterando el procesamiento de sus pre-ARNm.¹⁰⁵

A pesar de todo, todavía existe muy poca información acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre *splicing* y metilación del ADN en SMD.

4. ***U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1)***

4.1. **Estructura**

El gen *U2AF1* consta de 8 exones y se localiza en el cromosoma 21 en el humano y en el 17 en el ratón. El *splicing* alternativo de este gen, produce dos isoformas principalmente: U2AF1a y U2AF1b que difieren en la inclusión del exón 3 o el exón Ab, respectivamente (Figura 5). Estos exones surgieron inicialmente por un evento de duplicación y se han mantenido a través de la evolución con muy poca variabilidad.^{106,107} En general, U2AF1a se encuentra en mayor abundancia que U2AF1b, pero la expresión de las isoformas varía entre órganos y tejidos. Teóricamente existen dos isoformas más: U2AF1c y U2AF1s. La isoforma U2AF1c incluye los dos exones Ab y 3, lo que genera un codón de parada prematuro que produce la degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras (*Nonsense-mediated mRNA decay* o NMD, por sus siglas en inglés). La isoforma U2AF1s, que no contiene ninguno de estos dos exones, también es prácticamente indetectable.^{106,108}

Gen *U2AF1*

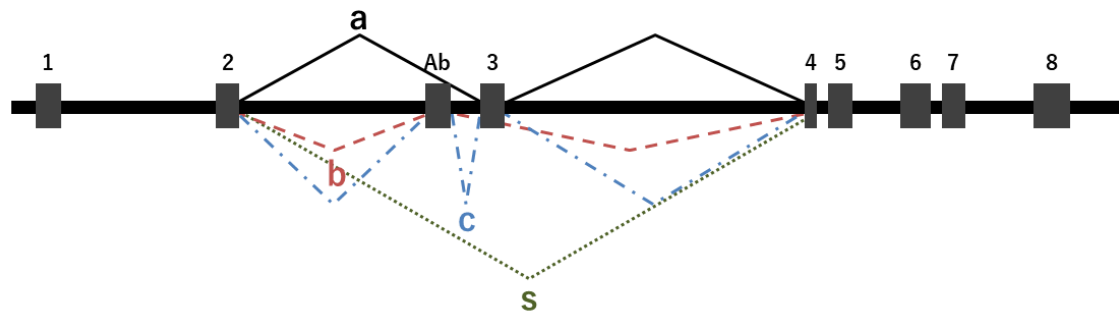


Figura 5. *Splicing* alternativo del gen *U2AF1*. Los exones se encuentran representados como cajas y los intrones como líneas horizontales. Las distintas isoformas se encuentran representadas (a, b, c, s) (Adaptado de Pacheco *et al.*, 2004)¹⁰⁶.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína U2AF1 posee una relevancia fundamental durante el *splicing*, reconociendo los dinucleótidos AG del extremo 3' del sitio aceptor del intrón. Por ello, esta proteína se encuentra altamente conservada y su pérdida en homocigosis es letal en muchos organismos.^{109–111} U2AF1 posee 4 dominios funcionales: dos dedos de zinc (ZnF1 y ZnF2) del tipo CCCH, un motivo homólogo de U2AF (UHM) y un dominio rico en arginina-serina (RS) (Figura 6).^{112,113} Las funciones de cada uno de los dominios todavía no se conocen con exactitud. Según los últimos estudios, los dedos de zinc permitirían a la proteína unirse al ARN interaccionando directamente con el extremo 3'.^{110,114} El motivo UHM participaría en la unión de U2AF1 y U2AF2 y actuaría como guía para que los dedos de zinc puedan desempeñar su función.^{112,114–117} Dentro de este motivo, se encuentran los 7 aminoácidos divergentes entre U2AF1a y U2AF1b. Sin embargo, todavía se desconoce cómo afecta esta variación a su función.^{108,118} Por último, el motivo RS se encuentra en el extremo C-terminal y participa en la interacción proteína-proteína con factores de *splicing* de la familia SR (SRSF1-12, TRA2A y TRA2B).^{106,107,119} La proteína U2AF1 humana únicamente difiere de la proteína de ratón en un aminoácido que se encuentra en el tramo de poli-glicinas de este dominio RS.



Figura 6. Dominios funcionales de la proteína U2AF1. ZF: dedo de zinc. UHM: motivo homólogo de U2AF. RS: dominio de Arginina-Serina.

4.2. Mutaciones de *U2AF1* en SMD

El gen *U2AF1* se encuentra mutado en un 7-11 % de los pacientes con SMD en etapas tempranas de la enfermedad, considerándose por ello un evento iniciador de la misma.^{35,67,120–122} Las alteraciones en este gen ocurren generalmente de forma excluyente con otras mutaciones que afectan a la maquinaria del *splicing* y en concurrencia con genes modificadores de la epigenética como *ASXL1*, *TET2* y *DNMT3A*.^{14,35,48,110,121–124} Aunque con menor frecuencia, también es posible encontrar mutaciones de *U2AF1* en otros tipos de cáncer como adenocarcinoma de páncreas o pulmón.^{125–128}

Las mutaciones en *U2AF1* se localizan, de forma prácticamente exclusiva, en los exones 2 y 6 afectando a dos aminoácidos: la serina 34 (S34) y la glutamina 157 (Q157). Las alteraciones en la S34 y la Q157 modifican el primer y segundo dedo de zinc, respectivamente.^{110,121,122} Esto genera variaciones en el reconocimiento de las posiciones -3 y +1 del límite intrón-exón induciendo cambios en la interacción de la proteína *U2AF1* con el extremo 3' durante el *splicing*.^{116,123} De forma general, la mutación *U2AF1*^{S34} tiende a reconocer en la posición -3 las secuencias CAG o AAG en los exones que incluye y UAG en los que excluye.^{76,83,116,127} Mientras que la mutación *U2AF1*^{Q157} refuerza el reconocimiento de una G en vez de una A en la posición +1.^{76,116} Habitualmente, las mutaciones en S34 se encuentran con mayor frecuencia que las Q157.^{110,123,129} Estas mutaciones generan un cambio estructural en la proteína que modifica los patrones de *splicing* de muchos ARNs, haciendo que aquellas células que no poseen el alelo *wild-type* sean inviables. Por ello, como se ha comentado anteriormente, estas alteraciones siempre se encuentran en heterocigosis.¹²⁵

Las mutaciones en S34 producen un cambio de aminoácido de serina a fenilalanina (S34F) o de serina a tirosina (S34Y). Mientras que en Q157 se sustituye la glutamina por arginina (Q157R) o prolina (Q157P). El hecho de que las alteraciones de *U2AF1* se encuentren localizadas en esos dos residuos concretos de la proteína (*hotspots*) sugiere que se trata de mutaciones de ganancia/cambio de función de la misma.^{30,110,121,122,130} Además, la sobreexpresión del alelo *wild-type* de *U2AF1* en células de SMD con la mutación S34F no revierte el *splicing* aberrante observado en éstas, apoyando la hipótesis de que las consecuencias de las mutaciones en *U2AF1* se deben a una ganancia de función de la proteína.¹³⁰

Las técnicas de secuenciación de ARN (ARN-seq) han revelado que las mutaciones en *U2AF1* producen principalmente saltos de exón.^{110,116,131} Sin embargo, cuando se compara la firma transcriptómica de células de pacientes con mutaciones *U2AF1*^{S34F} y

U2AF1^{Q157P} apenas existe solapamiento entre ellas.^{57,76,78,132} A pesar de que, el impacto funcional de la mutación *U2AF1*^{S34F} se ha estudiado más ampliamente,^{121,130,133,134} que los efectos de la *U2AF1*^{Q157}, diversos estudios concluyen que ambas mutaciones generan fenotipos clínicos diferentes tanto en humanos^{76,120,123,130,132,135,136} como en ratón¹³⁷.

El valor pronóstico de las mutaciones en *U2AF1* todavía no está claro. Mientras que en algunos estudios no observan que estas mutaciones tengan efecto pronóstico,^{110,122,138} son más los estudios que las relacionan con un pronóstico adverso,^{33,67,122,129,139–143} siendo Q157 de peor pronóstico que S34.^{123,135,136,139} Además, las diferencias en el valor pronóstico de las mutaciones en *U2AF1* también pueden deberse a la acumulación de diferentes combinaciones de genes co-mutados.¹³⁵

A nivel general, los estudios *in vitro* muestran que las células transducidas con *U2AF1*^{S34F} poseen una reducida proliferación, un marcado incremento de la fracción G₂/M del ciclo celular y un aumento de la apoptosis^{121,130,133,144}. Estos hallazgos resultan paradójicos puesto que, como se ha comentado anteriormente, las mutaciones en factores de *splicing* se consideran eventos iniciadores de la enfermedad y, por tanto, se espera que confieran una ventaja proliferativa a los clones mutantes. Por tanto, se desconoce todavía cómo estas mutaciones participan en la patogénesis de la enfermedad. Pellagatti *et al.* sugirieron que es posible que el microambiente de la médula ósea de individuos de edad avanzada proporcione un entorno favorable para la selección de estos mutantes.⁸⁶ Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

4.3. Modelos murinos de *U2af1*

Debido a la elevada frecuencia de mutaciones en el gen *U2AF1* que presentan los pacientes con SMD, son diversos los grupos que han intentado comprender la importancia de este gen en la hematopoyesis y su papel en la patogénesis de la enfermedad empleando modelos murinos.

La ausencia de expresión del alelo *wild-type* de *U2af1* en el sistema hematopoyético del ratón es letal incluso en las primeras fases del desarrollo del embrión¹⁴⁵. Tanto Dutta *et al.*,¹⁴⁶ como Wadugu *et al.*,¹⁴⁵ generaron un modelo de ratón condicional que poseía una delección en el exón 2 de *U2af1*, que producía la ausencia de expresión de la proteína, ocasionando la muerte de los ratones a los pocos días. En ambos casos, este

fallecimiento era debido a una citopenia multilínea derivada de una aplasia medular severa. Esto demuestra que *U2af1* es esencial para la supervivencia de las HSC.

A pesar de que U2AF1 es imprescindible para la supervivencia celular, la expresión de la mutación S34F o Q157P en heterocigosis no genera un fenotipo claro de SMD y los ratones no enferman ni fallecen antes que los controles.^{83,137,147} En 2015, Shirai *et al.* generaron un modelo de ratón transgénico inducible que expresaba la mutación U2AF1^{S34F} al suministrarle doxiciclina.⁸³ Para observar el efecto de la mutación en el sistema hematopoyético, realizaron experimentos de trasplante no competitivo inyectando células control o *U2af1* mutantes en ratones previamente irradiados. Al analizar la sangre periférica de estos ratones trasplantados, en términos generales, observaron leucopenia, disminución de células B e incremento de células LSK. Sin embargo, los animales no presentaban displasia en médula ósea ni desarrollaban la enfermedad durante al menos un año de exposición a doxiciclina. Tres años después, Fei *et al.* generaron el primer ratón U2AF1^{S34F} condicional inducible que expresaba la mutación únicamente en el sistema hematopoyético al suministrarle poli I:C.¹⁴⁷ Los efectos que observaron fueron citopenia multilínea, anemia macrocítica, descenso de LSK y displasias de bajo grado. Por último, en 2019, Alberti *et al.*, crearon un modelo de ratón transgénico inducible que expresaba la mutación U2AF1^{Q157P} al administrarle doxiciclina.¹³⁷ Esta mutación ocasionaba un fenotipo más leve que la mutación S34F en los ratones trasplantados de forma no competitiva, no observándose alteraciones destacables ni en sangre periférica ni en médula ósea.

En estos estudios también se realizaron experimentos de trasplante competitivo. Para ello, se inyectó, en ratones previamente irradiados, la misma cantidad de células test (procedentes de ratones control o mutantes S34F o Q157P) y células competidoras (derivadas de un ratón *wild-type*). En todos los casos vieron que las células procedentes de ratones U2AF1^{S34F} o U2AF1^{Q157P} presentaban una desventaja en la capacidad de reconstituir la médula ósea de los ratones trasplantados.^{83,137,147} Como se ha indicado anteriormente, esto contrasta con el hecho de que las mutaciones en *U2AF1* son eventos mutacionales tempranos en los pacientes de SMD y cabría esperar que supusieran una ventaja evolutiva y proliferativa para los clones portadores.

Al analizar por ARN-seq la firma transcriptómica generada por las mutaciones en *U2af1* en los diferentes modelos de ratón, se vio una sobreexpresión de los genes relacionados con la apoptosis, la respuesta al daño al ADN y al estrés celular.^{83,147,148} Esta firma transcriptómica era consistente entre especies⁸³ y diferente de la observada en los ratones KO^{145,146} indicando que es más probable que la mutación genere un

cambio/ganancia de función de la proteína en vez de una pérdida de función. Además, el salto de exón era el evento de *splicing* más observado, igual que ocurría en las células humanas analizadas con la mutación S34F.^{83,121,130,133,144} Por último, las alteraciones encontradas en las secuencias consenso del extremo 3' afectaban a la posición -3 en los ratones U2AF1^{S34F} y a la posición +1 en los ratones U2AF1^{Q157P}.¹³⁷ Y, de la misma forma que ocurría en las células humanas que presentan la mutación S34F, los exones que se incluían con mayor frecuencia poseían la secuencia CAG o AAG, mientras que los que se excluían presentaban la secuencia UAG.^{83,137,147}

A pesar de los diferentes modelos murinos de las mutaciones en U2AF1, todavía no se ha conseguido obtener un modelo que desarrolle SMD. En un intento de iniciar la patogénesis de la enfermedad, el ratón U2AF1^{S34F} generado por Fei *et al.*,¹⁴⁷ fue cruzado con un ratón con delección del gen *Runx-1* habitualmente concurrente en los pacientes con SMD.^{124,135} Sin embargo, esta combinación tampoco fue suficiente para el desarrollo de la enfermedad en los ratones doble mutantes U2AF1^{S34F} *Runx-1*^{-/-}. Por ello, se les administró un mutágeno muy potente (N-etil-N-nitrosourea, también conocido como ENU) con el fin de observar si alguno de ellos enfermaba y, a continuación, estudiar por NGS la combinación de genes mutados que presentaba. Usando esta aproximación farmacológica, de los 16 ratones analizados, 3 desarrollaron LMA. El análisis del ADN concluyó que uno de ellos poseía mutaciones en los genes *Tet2* y *Gata2*, otro en *Idh1* y el último en *Ikzk1*. Lo más sorprendente de este estudio es que en los dos últimos ratones, la mutación U2AF1^{S34F} se había perdido al secuenciar los clones malignos. Esto apuntaría a un papel de U2AF1 en el inicio de la leucemogénesis pero no en su mantenimiento.

Los motivos por los cuales las mutaciones del *splicing* a menudo se asocian con mutaciones en modificadores epigenéticos en pacientes con SMD^{14,122,123,130} todavía no están claros. Existe por ello un interés particular por comprender las contribuciones biológicas de estas mutaciones coexistentes. Algunos estudios previos han observado que las mutaciones en *U2AF1* alteran el *splicing* del gen *H2AFY*,^{83,130} el cual codifica una variante de la histona H2A. Kim *et al.* observaron que ratones *H2afy*^{-/-}, presentaban una disminución de los linfocitos B,¹⁴⁸ similar a la observada en los ratones U2AF1^{S34F} producidos por Shirai *et al.*⁸³ Posteriormente, al sobreexpresar la isoforma H2AFY1.1 se producía un rescate del fenotipo en ambos modelos. Esto les permitió concluir que uno de los mecanismos por los cuales la mutación S34F puede desencadenar una desregulación en la hematopoyesis, en este caso en la linfopoyesis B, es a través del desequilibrio en el *splicing* de las isoformas de genes que pueden afectar directa o indirectamente a la epigenética como *H2afy*.

5. *Ten-eleven translocation 2 (TET2)*

5.1. Estructura

El gen *Ten-eleven translocation 2 (TET2)* codifica una de las proteínas pertenecientes a la familia TET (TET1-3). Estas proteínas median la desmetilación del ADN en presencia de hierro (Fe^{2+}) y 2-oxoglutarato (2-OG). Para ello, oxidan sucesivamente la 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y, por último, a 5-carboxilcitosina (5caC). La 5hmC sirve como producto intermediario de la desmetilación de citosinas a través de dos vías: la pasiva y la activa. Por un lado, en la vía pasiva, la presencia de la 5hmC impide la remetilación del ADN mediada por la metiltransferasa DNMT1 cuando la célula se divide.¹⁴⁹ Por otro lado, en la vía activa los productos derivados de la oxidación de la 5mC, actúan como sustratos de distintas rutas de reparación que finalizan con la sustitución de la citosina metilada por una citosina sin modificaciones.¹⁵⁰⁻¹⁵² Además, se ha observado que la proteína TET2 también participa en la regulación transcriptómica y la modificación de histonas colaborando con complejos como la transferasa N-acetilglucosamina O-ligada (OGT) y desacetilasas de histonas (HDACs).¹⁵³ En conjunto, las proteínas TET regulan la autorenovación y la diferenciación de las HSC adultas y embrionarias.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Todas las proteínas TET poseen un centro catalítico en el extremo C-terminal que se encuentra altamente conservado. Este centro está compuesto por una región rica en cisteína y un dominio en hélice β de doble cadena (*double stranded beta helix* o DSBH, por sus siglas en inglés). Dentro de este dominio DSBH, se encuentran tres sitios de unión al Fe^{2+} y uno al 2-OG, ambos necesarios para que la proteína realice su función. Además, también se encuentra una región de baja complejidad poco conservada que posee todavía función desconocida.¹⁵² A diferencia de TET2, las proteínas TET1 y TET3 tienen, además, en el extremo N-terminal un dominio dedo de zinc de tipo CXXC que permite la unión al ADN (Figura 7).^{157,158} Actualmente, se desconoce qué dominio o región es la empleada por TET2 para unirse al ADN, aunque parece que la región rica en cisteínas estabiliza el ADN alrededor del dominio DSBH.¹⁵²

Introducción

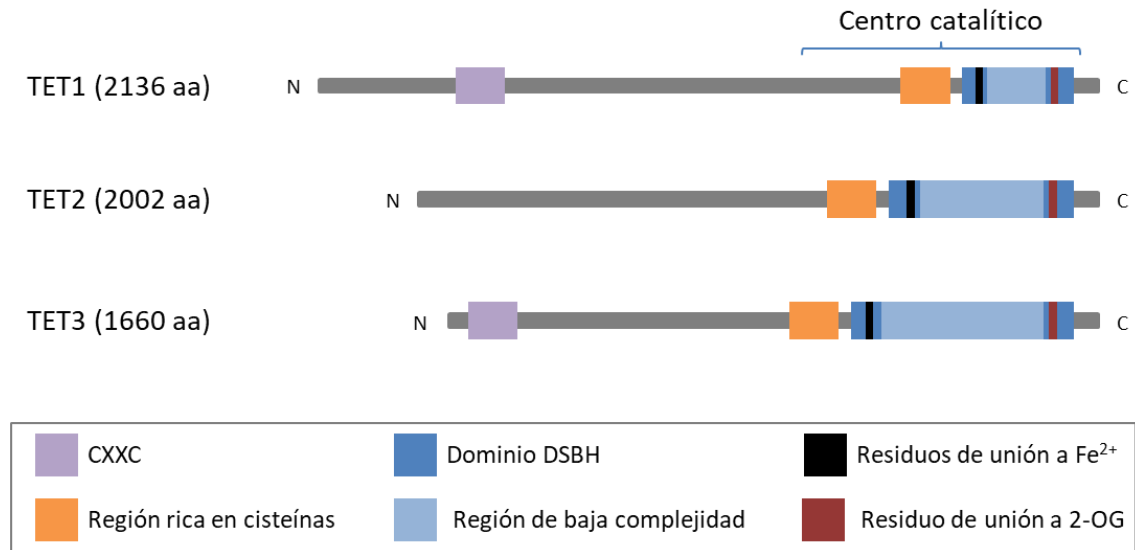


Figura 7. Estructura de las proteínas TET. El centro catalítico se encuentra en el extremo C-terminal y contiene un dominio en hélice β de doble cadena (DSBH), una región rica en cisteínas y sitios de unión a los cofactores Fe²⁺ y 2-oxoglutarato (2-OG). El dominio DSBH presenta una región de baja complejidad. Las proteínas TET1 y TET3 presentan, además, en el extremo N-terminal un dominio dedo de zinc de tipo CXXC (Adaptado de Rasmussen & Helin, 2016).¹⁵²

5.2. Mutaciones en SMD y CHIP

El gen *TET2* se localiza en el cromosoma 4 en el humano y en el 3 en el ratón. En ambos casos, posee una longitud de 11 exones que dan lugar a una proteína de 2002 aminoácidos en el caso del humano y 1912 en el ratón. *TET2* es uno de los genes que se encuentra mutado con mayor frecuencia en enfermedades mieloides apareciendo en un 30 % de los casos de SMD, 20 % en neoplasias mieloproliferativas (NMP), 18 % en LMA y 50-60 % en leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).^{154,159} También se ha encontrado mutado con menor frecuencia en el linfoma de célula T y en el linfoma B difuso de célula grande en un 33 % y 12 % de los casos, respectivamente.^{154,160,161} Debido a la gran variedad de desórdenes hematológicos en los que se encuentra el gen *TET2* mutado, se considera que representa un evento inicial/precursor del proceso de transformación maligna y que, en función de las mutaciones somáticas secundarias que adquieren las HSC, se producirá finalmente una enfermedad u otra.¹⁶²⁻¹⁶⁴

Además, el gen *TET2* es uno de los modificadores epigenéticos que se encuentra mutado con mayor frecuencia (junto con *DNMT3A* y *ASXL1*) en individuos con CHIP.^{70-72,165} Esta condición hematológica se caracteriza porque el individuo presenta una expansión aberrante de clones derivados de una HSC, pero no muestra ningún síntoma

asociado a ella. Por tanto, se trata de personas sanas, habitualmente de edad avanzada, sin ninguna hemopatía. Sin embargo, se ha visto que las personas que presentan CHIP poseen un mayor riesgo de desarrollar posteriormente neoplasias hematológicas (como SMD o LMA) o enfermedades cardiovasculares.^{70,165} Por tanto, parece que las mutaciones en *TET2* incrementan la capacidad de las HSC para promover una expansión clonal. Pero, es necesario que la célula sufra otros eventos genéticos o epigenéticos para inducir la transformación.⁷⁰ De esta forma, Hirsch *et al.* revelaron que, al analizar los eventos mutacionales, se observaba que los subclones procedentes de pacientes con clones precursores con *TET2* mutado, poseían un gran número de mutaciones en otros genes, como son *SF3B1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *TP53*, *IDH1/2* y *U2AF1*.¹⁶⁶

Las mutaciones de *TET2* son habitualmente de pérdida de función y se encuentran distribuidas a lo largo de toda la región codificante del gen,^{166–169} lo que parece indicar que *TET2* actúa como un gen supresor de tumores.^{150,170,171} Aunque la mayoría de mutaciones provocan una pérdida total de la proteína, algunas afectan únicamente a la región catalítica o no catalítica de ésta,^{159,172} siendo el exón 3 habitualmente el más afectado debido a su gran tamaño.¹⁷³ En el ADN procedente de pacientes que poseen mutaciones en *TET2*, la cantidad de 5hmC es menor^{159,167,174} y sus promotores se encuentran hipermetilados¹⁷⁵ confirmando que estas mutaciones son habitualmente de pérdida de función.

El valor pronóstico y el impacto en la sintomatología de los pacientes con mutaciones en el gen *TET2* es un tema controvertido. Existen estudios,¹⁷⁶ incluyendo un metaanálisis realizado en 1983 pacientes,¹⁷¹ donde no se encuentra ningún efecto significativo de estas mutaciones sobre el pronóstico de los pacientes. Mientras que otros, las relacionan con un pronóstico adverso.¹⁷⁷ Esta heterogeneidad en los resultados, puede deberse a la propia heterogeneidad de las mutaciones en *TET2*, la concurrencia con otras mutaciones o al propio microambiente de los clones.^{48,166} Por los mismos motivos, algunos estudios asocian las mutaciones en *TET2* con una mejor respuesta a fármacos hipometilantes,^{177,178} mientras que otros no observan ninguna relación.¹⁷⁹

5.3. Modelos murinos de *Tet2*

Inicialmente, los estudios *in vitro* de silenciamiento del gen *Tet2* mediante shRNA (*small hairpin RNA*, por sus siglas en inglés) en precursores hematopoyéticos murinos, mostraron una alteración de la diferenciación de las células hacia linaje de monocito/macrófago.^{174,175} Posteriormente, el papel que desarrolla *TET2* en la hematopoyesis y en la patogénesis de las enfermedades hematológicas, fue ampliamente estudiado utilizando modelos murinos constitutivos o condicionales.

En los distintos modelos murinos de *Tet2*-KO se vió que, tanto si la proteína se veía afectada desde el extremo N-terminal,^{150,170,173} como desde el C-terminal,¹⁸⁰⁻¹⁸² los efectos observados en los ratones eran similares. Por un lado, la fracción LSK se encontraba significativamente incrementada, presentaban esplenomegalia, leucocitosis caracterizada por neutrofilia y monocitosis y un perfil de metilación aberrante con una significativa disminución de la cantidad de 5hmC. Por otro lado, en los experimentos de trasplante competitivo, se observó una ventaja proliferativa de las células procedentes de los ratones KO frente a las *wild-type*, generándose un quimerismo mayor en todos los linajes. Aproximadamente 1/3 de los ratones KO en *Tet2* y de los trasplantados con sus células acaba sufriendo una muerte prematura debido a una hematopoyesis ineficaz. Las alteraciones observadas parecen ser más compatibles con la LMMC, una afección hematológica que presenta síntomas solapantes tanto de SMD como de NMP.

Cabe destacar que una parte de los ratones *Tet2*-KO presentaba también un defecto en la linfopoyesis.^{150,170,180} Para conocer el origen de este efecto, Ito *et al.* generaron, mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9, un modelo de ratón mutante que poseía una sustitución en la región catalítica que impedía el correcto funcionamiento de la proteína.¹⁸³ A continuación, compararon este modelo con el *Tet2*-KO de Li *et al.*¹⁷⁰ El modelo mutante únicamente presentaba mielopoyesis aberrante, mientras que el KO desarrollaba problemas tanto en la línea mieloide como en la linfoide. Por tanto, la región no catalítica de la proteína parece desempeñar un papel importante durante la linfopoyesis, mientras que el dominio catalítico es esencial durante la mielopoyesis. Son necesarios más estudios para discernir mejor cuál es el papel de cada una de las regiones de la proteína TET2 durante la hematopoyesis.

En los distintos estudios realizados con estos modelos,^{150,170,173,180-182} se detectó que los cambios en los ratones *Tet2*^{-/-} presentaban penetrancia incompleta. Es decir, sólo una parte de los ratones mostraba el fenotipo patológico y acababa desarrollando la enfermedad. Además, los tiempos de latencia observados eran muy variables, oscilando entre 6 semanas a 20 meses. Tanto los ratones KO como los pacientes que presentan

mutaciones en *TET2*, adquieren más mutaciones somáticas que aquellos sin alteraciones en este gen, porque la falta de *Tet2* contribuye a la hipermutagenicidad de HSPC, lo que podría explicar la elevada variabilidad observada.^{150,184,185} Sin embargo, se desconoce si la pérdida de función de *TET2* promueve estas mutaciones adicionales o si otros factores pueden estar afectando, como puede ser la elevada proliferación de las HSC.^{150,170} Todos estos datos sugieren que, aunque las mutaciones en *TET2* generan expansión clonal de las HSC, son necesarios algunos cambios genéticos y epigenéticos adicionales para inducir la transformación mieloide o linfoide.¹⁸⁶ Todavía se desconoce si las mutaciones en *TET2* pueden promover estos cambios complementarios. Un estudio de Pan *et al.* sugiere que el proceso de oxidación de la 5mC mediado por la proteína TET2 evita, en cierta manera, que el genoma adquiera mutaciones en estas posiciones.¹⁵⁰ Por tanto, al mutar el gen *TET2* estas posiciones quedarían desprotegidas, aumentando su frecuencia mutacional.

Se han generado diversos modelos de ratón con mutaciones en *Tet2* en concurrencia con alteraciones en otros genes como *Dnmt3A*,¹⁸⁷ *Flt3*,¹⁸⁸ *Asx1*,¹⁸⁹ *Bcor*,¹⁹⁰ *Sf3b1*,¹⁹¹ *N-RAS*,¹⁸⁶ y *Jak2*,¹⁹² entre otros¹⁵¹. Sin embargo, todavía no se ha estudiado *in vivo* el efecto que poseen las alteraciones simultáneas de *Tet2* y *U2af1*, a pesar de presentarse habitualmente en un 13 % de los pacientes con *U2AF1* mutado.¹²⁴

6. Sistema de edición genética CRISPR/Cas9

6.1. Historia y componentes

La ingeniería genética ha sido ampliamente utilizada para estudiar el funcionamiento de los diferentes genes humanos y entender las bases fisiopatológicas de las enfermedades. Con el fin de introducir alteraciones concretas en el genoma, la ingeniería genética ha aprovechado distintas estrategias de recombinación homóloga empleando ADN foráneo. Con el desarrollo de las nucleasas quiméricas, como son las meganucleasas, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), la eficiencia de recombinación homóloga aumentó respecto a los sistemas más tradicionales. Sin embargo, esta mejora en la recombinación venía supeditada a la predicción de la interacción proteína-ADN de la nucleasa con la secuencia genómica deseada. Esto hacía que el proceso fuera costoso, lento y difícil en comparación con las nuevas técnicas basadas en la tecnología de secuencias de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas

(*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o CRISPR, por sus siglas en inglés).

Las secuencias CRISPR fueron reportadas por primera vez en *Escherichia coli* por Ishino *et al.*¹⁹³ y, posteriormente, en *Haloflex mediterranei* por Mojica *et al.*¹⁹⁴ Este sistema está constituido por un conjunto de secuencias palindrómicas repetidas entre las que se encuentran intercalados pequeños fragmentos de ADN exógeno.¹⁹⁵ Adyacente a estas secuencias, existe un gen que codifica una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas). En 2003, se observó que las secuencias CRISPR actúan como parte de un sistema inmune adaptativo en organismos procariontas. Cuando se produce una primera infección, la endonucleasa Cas reconoce y degrada el ADN del organismo patógeno y posteriormente incorpora parte de estos fragmentos en las regiones CRISPR. Así pues, si se produce un intento de re-infección, el organismo hospedador sintetiza ARN antisentido (ARNas) a partir de las secuencias incorporadas anteriormente. El ARNas es empleado como un guía que permite al enzima Cas reconocer y desactivar el material genético del patógeno realizando cortes específicos.

En el año 2014, las investigadoras Doudna y Charpentier describieron por primera vez el uso del sistema CRISPR/Cas9 para generar cortes de doble cadena (*double-strand breaks* o DSB, por sus siglas en inglés) en regiones concretas del ADN.¹⁹⁶ Para ello, empleaban una secuencia de ARN de cadena simple que actuaba como guía (sgARN) para dirigir el enzima Cas9, el enzima más utilizado en edición genética, a la región deseada del ADN. Por tanto, los componentes de esta tecnología son principalmente dos: el sgARN y la endonucleasa Cas9 (Figura 8). El sgARN, está constituido por una secuencia de ARN de 20 pares de bases (pb) complementaria a la región que se quiere editar (crARN) y un segundo ARN que permite la interacción del guía con la endonucleasa (tracrARN). Además, adyacente a la secuencia de unión del guía, debe haber un motivo conservado de dos a seis nucleótidos (*protospacer adjacent motif* o PAM, por sus siglas en inglés), propio de cada nucleasa, que es necesario para que la endonucleasa reconozca la secuencia y la corte. En el caso de la Cas9, el enzima más utilizado en edición genética, esta secuencia PAM es NGG, siendo N cualquier nucleótido. Una vez que la endonucleasa ha producido el DSB, la célula debe reparar esta rotura en el ADN. Para ello, podrá utilizar dos vías de reparación: la unión de extremos no homóloga (*Non-homologous end joining* o NHEJ, por sus siglas en inglés) o la reparación directa por recombinación homóloga (*homology-directed repair* o HDR, por sus siglas en inglés). Por un lado, en la vía NHEJ la célula produce inserciones o deleciones (*indels*) aleatorias para reparar el corte de doble cadena, rompiendo, generalmente, la pauta de lectura del gen y produciendo su inactivación. Esta vía es

aprovechada en ingeniería genética para generar organismos *knock-out* (KO). Por otro lado, en el caso de la vía HDR, la célula necesita una molécula de ADN adicional que empleará como molde para reparar el corte. Este molde presenta homología al sitio que se quiere modificar, bien para corregir mutaciones existentes, como es el caso de la terapia génica, o bien para introducir cambios puntuales, por ejemplo, con el fin de generar organismos modelos *knock-in* (KI) de enfermedades.

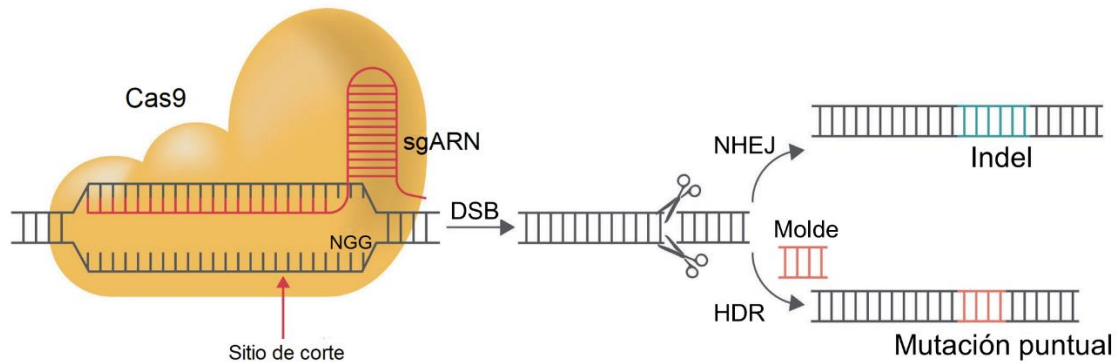


Figura 8. Esquema de los componentes del sistema CRISPR/Cas9. El enzima Cas9 produce DSB que pueden ser reparados por la célula por la vía NHEJ, introduciendo *indels*, o en el caso de tener un ADN molde, por la vía HDR, lo que permite generar inserciones, translocaciones o mutaciones puntuales. DSB: cortes de doble cadena. NHEJ: unión de extremos no homólogos. HDR: reparación directa por recombinación homóloga (HDR). Indel: inserciones y deleciones (Adaptado de González-Romero *et al.*, 2019)¹⁹⁷.

6.2. Generación de modelos murinos en SMD

La tecnología CRISPR/Cas9 supone una herramienta de edición genética sencilla, versátil, eficiente, específica y con un bajo coste económico en comparación con las tecnologías de edición convencionales.^{197,198} Este sistema de edición se ha empleado para generar diversos modelos murinos en genes relacionados con los SMD, como *Tet2*,¹⁸³ *Zrsr2*,¹⁹⁹ o *Runx1*.²⁰⁰ Sin embargo, una de las principales aplicaciones que posee la tecnología CRISPR/Cas9, es la posibilidad de editar simultáneamente diversos genes. Tradicionalmente los modelos de ratón que presentaban múltiples genes mutados se generaban a partir de recombinaciones secuenciales en células madre embrionarias o a partir de cruzamientos convencionales de líneas de ratón con mutaciones individuales. La tecnología CRISPR/Cas9 ha permitido obtener estos modelos de manera más económica, rápida y sencilla.^{201,202} Así pues, en un único paso, se creó una línea de ratón con mutaciones en *Tet1* y *Tet2* co-inyectando en zigotos la

Introducción

Cas9, los sgARN y dos oligos de ADN que actuaban como molde para introducir mutaciones puntuales.²⁰² Por otra parte, la inactivación “multiplex” de genes en HSPC mediante CRISPR/Cas9 y su posterior trasplante a ratones irradiados, permitió estudiar cómo afectan estas alteraciones al sistema hematopoyético de éstos. Heckl *et al.* combinó sgARN contra 8 genes diferentes en HSPC murinas para, a continuación, trasplantarlas en ratones previamente irradiados.²⁰³ Estas sgARN estaban dirigidas a genes que habitualmente aparecen silenciados en pacientes con SMD (*Tet2*, *Runx1*, *Dnmt3a*, *Ezh2*, *Nf1*, *Smc3*, *p53* y *Asx1*), generando así diversos ratones con fenotipo leucémico que poseían hasta 5 de estos genes mutados.²⁰³ El mismo grupo, realizó un experimento similar a partir de células HSPC CD34⁺ de cordón umbilical o de adulto, trasplantadas posteriormente en ratones inmunodeprimidos. Algunos de estos ratones desarrollaron SMD o CHIP y pudieron ser empleados como modelos terapéuticos en los que se testaron tratamientos como la azacitidina.²⁰⁴

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años, diversos grupos han observado que entre el 80-90 % de los pacientes de SMD poseen mutaciones somáticas y que, además, existen entre ellas patrones de concurrencia o exclusión que pueden estar contribuyendo a la elevada variabilidad fenotípica de la enfermedad. De esta forma se ha podido comprobar que algunos pacientes presentan mutaciones en el gen del spliceosoma *U2AF1* y que éstas, a menudo, ocurren simultáneamente con mutaciones en el gen epigenético *TET2*.

Con todo ello, nuestra **hipótesis** es que la cooperación entre mutaciones en *U2af1* y *Tet2* en un modelo murino podría iniciar la patogénesis de un subgrupo de SMD. Así pues, el **objetivo principal** de esta tesis es caracterizar un modelo de ratón doble mutante, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, para comprender las anomalías hematopoyéticas y en el *splicing* que desarrolla. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Generar un modelo de ratón doble mutante *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, a partir de los modelos *U2af1^{mut/+}* y *Tet2^{-/-}* obtenidos por el sistema de edición CRISPR/Cas9.
2. Caracterizar funcional e inmunofenotípicamente la hematopoyesis en los ratones *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*.
3. Describir el fenotipo hematológico de ratones envejecidos *U2af1^{mut/+}*.
4. Analizar el transcriptoma de las HSPC procedentes de los ratones mutantes en *U2af1*, *Tet2* y en ambos genes y detectar posibles cambios en el *splicing*.
5. Estudiar las posibles rutas afectadas con genes mal procesados durante el *splicing* en los ratones *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

1.1. Generación de los ratones mutantes

Los ratones mutantes *U2af1* y KO *Tet2* fueron creados en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por el equipo del Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán. Brevemente, mediante el programa online Breaking Cas9 (<https://omictools.com/breaking-cas-tool>), se diseñaron sgARN específicas contra el exón 6 del gen *U2af1* y contra el exón 3 del gen *Tet2*. Los sgARN se produjeron mediante transcripción *in vitro* (MEGAscript T7 kit, Life Technologies) a partir de gBlocks (IDT) que contenían el promotor T7. El ARNm codificante para el enzima Cas9, se produjo, en este caso, empleando el kit de transcripción *in vitro* mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies) a partir del plásmido pMJ920 (Addgene 42234) linearizado y tratado con las enzimas BstBI y AnP (NEB). El ARNm para expresar Cas9 y los sgARN se purificaron mediante el kit MEGAClear (Life Technologies) eluyendo en tampón TE.

Tanto el ARNm de la Cas9 (50 ng/ μ l) como el sgARN (20 ng/ μ l) correspondiente (CTGCCGCCAGTATGAAATGG para *U2af1*, y CTGCCGCCAGTATGAAATGG para *Tet2*) fueron microinyectados en embriones en estadio de cigoto¹⁹⁹ obtenidos a partir del cruzamiento de una hembra de la cepa híbrida C57BL/6J x CBAF1 y un macho C57BL/6J para el caso de los mutantes en *U2af1*, y en el caso de los KO en *Tet2* los embriones procedían del cruce de machos y hembras C57BL/6J. A continuación, se incubaron los embriones resultantes hasta alcanzar el estado de blastocisto, cuando fueron transferidos a úteros de hembras CD1 pseudopreñadas para producir los ratones fundadores (F0) (Figura 9).²⁰⁵ Una vez obtenida la F0, los ratones mutantes en *U2af1* se retrocruzaron con ratones puros C57BL/6J hasta 6 generaciones, para así obtener el fondo genético homogéneo necesario para los estudios posteriores de trasplante hematopoyético. Los ratones *U2af1* homocigotos, editados en los dos alelos, alcanzaban el estado de blastocisto pero morían poco después de la implantación, por lo que sólo los heterocigotos (*U2af1^{mut/+}*) eran viables. Sin embargo, los ratones homocigotos para *Tet2* (*Tet2^{-/-}*) eran viables y fueron los que se analizaron en el estudio.

Materiales y métodos

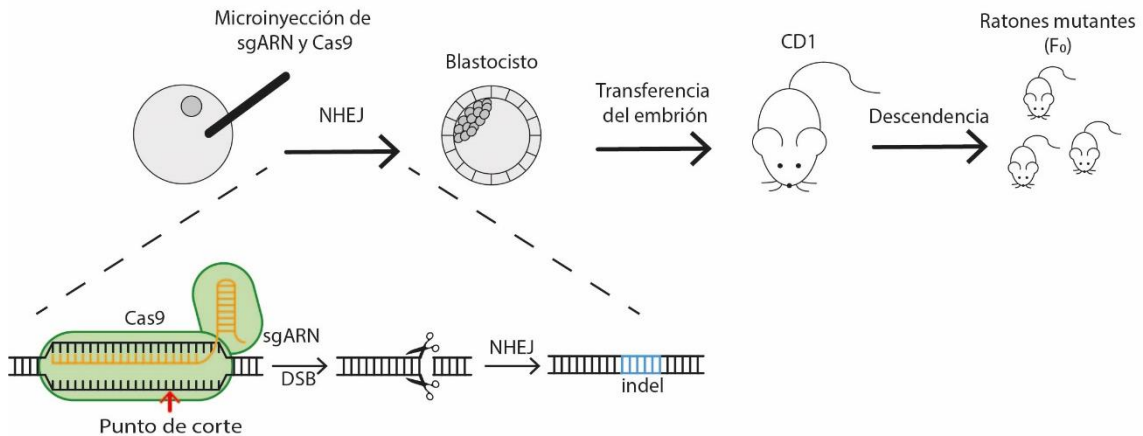


Figura 9. Obtención de los ratones mutantes en *U2af1* o *Tet2* mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9. NHEJ: unión de extremos no homólogos. DSB: corte de doble cadena. sgARN: guía específico contra *U2af1* o *Tet2*.

Los ratones doble mutantes *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} fueron obtenidos mediante cruzamiento convencional entre ratones de ambas líneas. Cabe destacar la elevada dificultad de conseguir la cantidad suficiente de ratones doble mutantes para el análisis, ya que, la probabilidad con la que se obtiene el genotipo deseado es escasa (Figura 10).

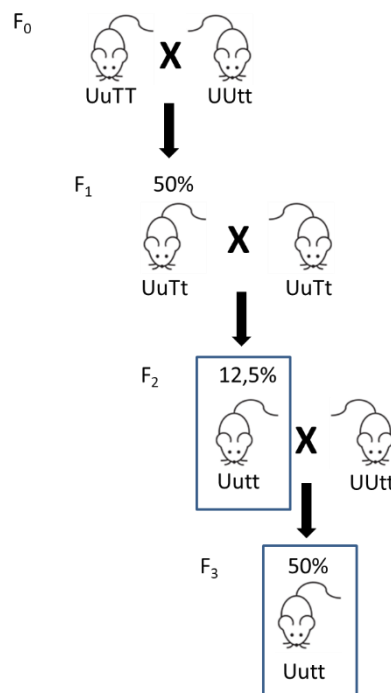


Figura 10. Esquematación de los cruces de ratones necesarios para la obtención del genotipo doble mutante deseado: *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-}. U: alelo *U2af1* wt; u: alelo *U2af1* mutante; T: alelo *Tet2* wt; t: alelo *Tet2* mutante.

1.2. Descripción de los grupos de estudio

Se analizaron ratones machos y hembras con genotipo control, *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* con edades comprendidas entre las 8-39 semanas. Además, la caracterización hematológica también se llevó a cabo en ratones control y *U2af1^{mut/+}* envejecidos (23 meses).

Todos los procedimientos realizados con ratones, fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del IIS La Fe (ref. 2016/0756) y por la Generalitat Valenciana bajo el proyecto: 2017/VSC/PEA/00200.

2. Procesamiento de tejidos hematopoyéticos

2.1. Sangre periférica

La sangre periférica de los ratones, se obtuvo mediante punción de la vena facial con ayuda de una lanceta (Marienfeld) y se recogió en tubos tratados con anticoagulante EDTA (Sarstedt). En todos los casos se recolectaron un mínimo de 50 μ l y un máximo de 200 μ l. Los tubos se mantuvieron en agitación en una noria hasta su procesamiento.

2.2. Médula ósea

Para extraer las células de la médula ósea, los ratones fueron eutanasiados mediante inhalación de CO₂ durante 7 min. La defunción se confirmó ejerciendo presión con unas pinzas en las patas posteriores de los ratones. En caso de no existir ningún tipo de reflejo, los ratones se colocaron bocarriba y se procedió a realizar una incisión desde la zona inferior hasta el cuello. Se recolectaron los fémures, tibias y las cristas de los ratones en tampón fosfato salino (PBS) suplementado con 2-5 % de suero bovino fetal (FBS). A continuación, los huesos se molieron en 15 ml del mismo tampón con ayuda de un mortero y se filtraron a través de un filtro celular de nylon de 70 μ m (SPL Life Sciences). Se contaron las células obtenidas empleando la cámara de Neubauer y el tinte de exclusión azul de tripán (Merck). Este tinte es incapaz de penetrar en las células vivas que mantienen su membrana plasmática intacta. Por ello, las células muertas se tiñen de azul, mientras que las vivas se mantienen blancas.

2.3. Bazo

En el caso del bazo, los ratones fueron eutanasiados y diseccionados como se ha descrito anteriormente. El bazo de los animales se recolectó en PBS + 2 % FBS. Una parte de este órgano se mantuvo sumergido en 4 % paraformaldehído (PFA), para su posterior análisis histológico. Mientras que la otra, se disgregó en 10 ml de PBS + 2 % FBS empleando el émbolo de una jeringa de 1ml sobre un filtro celular de nylon de 70 μm .

3. Estudio de la mutación del gen

3.1. Genotipado mediante PCR

Cuando los ratones alcanzaron las 4 semanas de edad, se tomó una muestra de la oreja utilizando un perforador y se extrajo el ADN utilizando un protocolo convencional de precipitación a partir de isopropanol y etanol. Brevemente: las muestras se incubaron a 56°C durante toda la noche en 700 μl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) suplementado con proteinasa K (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Genochem). Al día siguiente, se mezclaron los tubos por inversión y se añadieron 200 μl de NaCl a una concentración elevada (5 M) y se centrifugaron durante 20 min a 13300 r.p.m. A continuación, se transfirieron 700 μl a un tubo nuevo, donde se añadió el mismo volumen de isopropanol. Una vez centrifugadas las muestras a 14000 r.p.m. durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se añadió al pellet 800 μl de etanol al 70 %. Después, se centrifugaron nuevamente en frío durante 20 min a 12000 r.p.m. Por último, se dejó secar el pellet al aire durante 1 h, y se resuspendió en tampón TE.

Para genotipar los ratones, se realizó una PCR (PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific) con *primers* flanqueantes a la región editada. Las condiciones y la descripción de los *primers* de estas PCR están detalladas en la Tabla 7. El producto de las PCR se cargó en un gel de agarosa (Clever Scientific) al 3 % para comprobar el tamaño del amplicón y conocer el genotipo de los ratones. Por un lado, en el caso de la PCR de genotipado para el gen *U2af1*, se obtenía en los controles una banda de 227 pb, mientras que en los mutantes *U2af1^{mut/+}* se obtenía la misma banda y además una banda de 222 pb, perteneciente al alelo mutado. Por otro lado, en el caso de la PCR de genotipado para el gen *Tet2*, en los ratones control se obtenía una banda de 91 pb, mientras que en los mutantes *Tet2^{-/-}* presentaba un tamaño de 80 pb. En todos los casos,

se cargó en el gel de agarosa un pocillo con marcador de bajo peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific).

Tabla 7. Condiciones PCR de genotipado.

PCR	Componentes	Condiciones	Primers
Genotipado <i>U2af1</i> (PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific)	12.5 µl PCR Master Mix (2X) 1 µl oligo F1 (10 µM) 1 µl oligo R2 (10 µM) 1.25 µl DMSO 8.25 µl H ₂ O 1 µl ADN (≤ 100 ng)	95°C 2 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 25 s 72°C 7 min } 35x	F1 TCAGCCCTTAGCAACACAGCAGT R2 TGCCACCACACCAGAGTCC
Genotipado <i>Tet2</i> (PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific)	12.5 µl PCR Master Mix (2X) 1 µl oligo F5 (10 µM) 1 µl oligo R5 (10 µM) 1.25 µl DMSO 8.25 µl H ₂ O 1 µl ADN (≤ 100 ng)	95°C 2 min 95°C 30 s 56°C 30 s 72°C 25 s 72°C 7 min } 35x	F5 CTCTCAAGTCACAGAAACACGTG R5 GTTGCTTGAGGCTCTGCAGCTC

3.2. Secuenciación Sanger

Para obtener la secuencia resultante de la edición mediante CRISPR/Cas9, se extrajo el ADN de 15 x 10⁶ células procedentes de médula ósea, utilizando el kit QIAamp DNA mini (QIAGEN) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para ello, fue necesario previamente lisar las células con ayuda de una jeringa con aguja de 20 G.

Para la secuenciación, se realizó una PCR con los mismos *primers* que se utilizaron para el genotipado a partir de 100 ng de ADN. Para eliminar los nucleótidos y *primers* restantes de la PCR, se añadió 1.5 µl de Illustra ExoProStar (Merck) y 4.5 µl de producto de PCR. Este proceso se llevó a cabo por duplicado para posteriormente realizar la reacción de secuenciación tanto en sentido *forward* como en *reverse* en todas las muestras. A continuación, se realizó la PCR de secuenciación utilizando el kit BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific) con las condiciones detalladas en la Tabla 8. En este caso, para eliminar los nucleótidos, *primers*, y enzimas restantes, se purificó la PCR de secuenciación mediante columnas de purificación (Performa DTR Gel Filtration Cartridges, EdgeBio). Para ello, se centrifugaron las columnas durante 2 min a 750g. Posteriormente, se colocaron las columnas en tubos Eppendorf, se añadieron los 10 µl resultantes de la PCR de secuenciación y se centrifugaron a 750g durante 2 min. El producto purificado se analizó en un secuenciador ABI PRISM 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Tabla 8. Condiciones PCR de secuenciación.

PCR	Componentes	Condiciones	Primers
Secuenciación (BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing, Thermo Fisher Scientific)	2 µl Tampón de secuenciación 1 µl Big Dye 1 µl primer (3.2 µM) F ó R 6 µl purificado Exosap	96°C 2 min 95°C 15 s 55°C 1 min 60°C 3 min } 30x	<i>U2af1</i> : F1 TCAGCCCTTAGCAACACAGCAGT R2 TGCCCACCACACCAGAGTCC <i>Tet2</i> : F5 CTCTCAAGTCACAGAAACACGTG R5 GTTGCTTGAGGCTCTGCAGCTC

3.3. RT-qPCR

La expresión de los genes *U2af1* y *Tet2* se midió tanto en médula ósea como en bazo. Se extrajo el ARN de 10×10^6 células (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) y, a continuación, se aplicó un tratamiento con ADNasa (DNA-free DNase Treatment and Removal Reagents, Ambion). Se comprobó la concentración y calidad del ARN obtenido mediante los ratios de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ medidos por Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó mediante retrotranscripción (RT) utilizando TaqMan Reverse Transcription Reagents (Thermo Fisher Scientific) y *primers* oligo(dT) en reacciones de 25 µl, a partir de 1 µg de ARN siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones RT-qPCR.

PCR	Componentes	Condiciones	Primers
RT-PCR (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Thermo Fisher Scientific)	2.5 µl 10X RT Buffer 1.88 µl MgCl ₂ 5 µl dNTPs 1.25 µl RNase Inh 1.25 µl MultiScribe 1 µl Olido d(T) ₁₆ 1 µg RNA X µl H ₂ O (hasta 25 µl)	65°C 5 min 4°C 2 min 37°C 30 min 95°C 5 min	Olido d(T) ₁₆
qPCR <i>U2af1</i> (AceQ SYBR qPCR Master Mix, Vazyme Biotech Co.)	<i>U2af1</i> y β -Actin : 10 µl 2x AceQ SYBR qPCR MM 0.8 µl oligo F (10 µM) 0.8 µl oligo R (10 µM) 0.4 µl 50x ROX Ref Dye 2 6 µl H ₂ O 2 µl ADNc (Dil 1:10)	95°C 5 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 40 s } 40x	F- <i>U2af1</i> AAGTTTCGACGTGAGGAGGA R- <i>U2af1</i> CCTCTTGTCACCTCTCCCAT F- β -Act GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA R- β -Act CTCCTTGATGTCACGCACGTATTC
qPCR <i>Tet2</i> (AceQ SYBR qPCR Master Mix, Vazyme Biotech Co.)	<i>Tet2</i> : 10 µl 2x AceQ SYBR qPCR MM 0.4 µl oligo F (10 µM) 0.4 µl oligo R (10 µM) 0.4 µl 50x ROX Ref Dye 2 6.8 µl H ₂ O 2 µl ADNc (Dil 1:10)	95°C 5 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 31 s } 40x	F- <i>Tet2</i> CTCTCCAAGCCGTGACAATG R- <i>Tet2</i> GCAGCCTGGATATCTGTTGG F- <i>Hprt</i> GCCCTTGACTATAATGAG R- <i>Hprt</i> GATAAGCGACAATCTACC
	<i>Hprt</i> : 10 µl 2x AceQ SYBR qPCR MM 0.6 µl oligo F (10 µM) 0.6 µl oligo R (10 µM) 0.4 µl 50x ROX Ref Dye 2 6.4 µl H ₂ O 2 µl ADNc (Dil 1:10)		

Se llevó a cabo una cuantificación relativa mediante PCR cuantitativa a partir del ADNc (qPCR). En este procedimiento, se analizan los cambios de expresión de un gen de interés *versus* un gen endógeno de referencia.

Las condiciones de los programas de amplificación de la qPCR (concentración de *primers*, temperatura de hibridación -o *annealing*- y tiempo de extensión) se optimizaron previamente hasta obtener una eficiencia > 82 %, tanto en los genes de interés (*U2af1* y *Tet2*) como en los genes de referencia (β -Actin y *Hprt*). Para ello, se siguió el protocolo descrito por Pfaff *et al.*, 2001.²⁰⁶ Se diseñaron *primers* que detectaban específicamente el ARNm *wild-type* de los genes de interés y se preparó una curva estándar con 7 diluciones de ADNc control (1:1, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Cada dilución se midió por triplicado. Se amplificaron las muestras en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 20 µl usando AceQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme Biotech Co.) en el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher

Scientific). Los datos de amplificación se analizaron con el programa QuantStudio Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) obteniendo los ciclos umbrales (Ct) para cada muestra.

A continuación, mediante el programa Excel (Microsoft), se representó en un gráfico de dispersión: la media de los Ct obtenidos frente a las diferentes diluciones de ADNc empleadas (expresadas como logaritmo de la dilución). Después, se agregó la línea de tendencia (relación lineal) y se obtuvo su ecuación. La pendiente de esta ecuación fue utilizada para calcular la eficiencia de la amplificación según la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pte})} - 1$$

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación, se realizó la qPCR para ambos genes (*U2af1* y *Tet2*) en ambos tejidos (médula ósea y bazo). Para la medición de la expresión de *U2af1* se utilizó el gen de referencia β -Actin, mientras que con el gen *Tet2* se empleó *Hprt*. De la misma forma que con la curva de eficiencia, la amplificación de cada muestra se llevó a cabo en triplicado, en placas de 96 pocillos, en un volumen final de reacción de 20 μ l con AceQ SYBR qPCR Master Mix siguiendo las condiciones detalladas en Tabla 9. La amplificación se realizó en el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System y los datos se analizaron también con el programa QuantStudio Real-Time PCR. Se eliminaron aquellos pocillos que presentaban más de un amplificado en la curva de fusión -o *melting*-. Además, en todos los casos se realizaron controles de contaminación los cuales no presentaban ADN.

A pesar de que las eficiencias resultantes fueron superiores al 82 % y la R² de la recta de la línea de tendencia de la eficiencia fue, en todos los casos, superior a 0.98, las eficiencias de los genes de referencia (β -Actin y *Hprt*) diferían en más de un 10 % de las eficiencias de los genes de estudio (*U2af1* y *Tet2*). Por este motivo, fue necesario calcular los ratios de expresión relativa en ratones control y mutantes siguiendo la fórmula detallada en ²⁰⁶:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E_{\text{interés}}^{\Delta Ct_{\text{interés(Controles - Mutantes)}}}}{E_{\text{referencia}}^{\Delta Ct_{\text{referencia(Controles - Mutantes)}}}}$$

Donde la E fue calculada como:

$$E = \text{Eficiencia} + 1$$

3.4. Western blot

3.4.1. Sobreexpresión de la proteína U2AF1

Con el fin de estudiar si la proteína aberrante llegaba a producirse, se sobreexpresó la proteína U2AF1 *wild-type* o mutante en células HEK293T. Para ello, primero de todo, en la empresa VectorBuilder (Estados Unidos) clonaron el vector de expresión pcDNA3.1+ con las secuencias correspondientes unidas al epítipo FLAG (Figura 11).

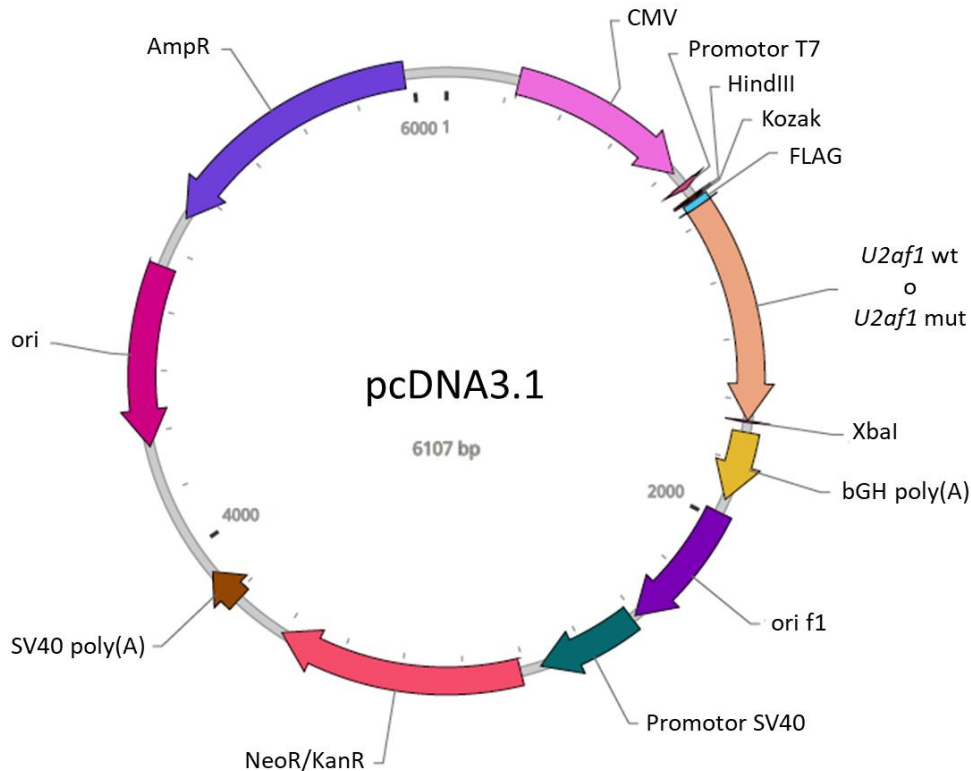


Figura 11. Vector de expresión de *U2af1* *wild-type* o mutante. Mapa del vector empleado en la transfección de las células HEK293T para inducir la expresión del gen *U2af1* murino, *wild-type* o mutante, unido al epítipo FLAG.

3.4.2. Amplificación del vector

Se partió de un stock de glicerol de bacterias recombinantes que presentaban el vector de sobreexpresión de la proteína *wild-type* (pcDNA3.1-FLAG-U2AF1wt) o mutante (pcDNA3.1-FLAG-U2AF1mut) (VectorBuilder). Una pequeña parte del stock, se creció durante 1h en agitación a 37°C en 300 µl de LB (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, para facilitar la expresión de la resistencia a antibiótico. Después, se sembró todo el volumen en una placa Petri de LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se seleccionó una de las colonias crecidas en la placa y se transfirió a un tubo con 4 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml). Esta suspensión bacteriana se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendiéndolo en 30 µl de tampón EB.

3.4.3. Transfección en HEK293T

Se sembraron, en placas de 6 pocillos, 15×10^4 células HEK293T en 2 ml de DMEM alta glucosa (Gibco) suplementado con un 10 % de FBS (Gibco), penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Gibco), y se dejaron crecer a 37°C y 5 % CO₂ durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo, las células se transfectaron utilizando el reactivo FuGENE (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente: por cada construcción, se mezclaron 94 µl de DMEM con 6 µl de FuGENE. A continuación, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 1 µg de construcción a una concentración de 200 ng/µl. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por último, se renovó el medio de las células y se añadió la mezcla. Tras 72 h de crecimiento a 37°C y 5 % CO₂, se extrajeron las proteínas de las células para realizar el *Western blot*.

3.4.4. Obtención y cuantificación de proteínas

Un mínimo de 20×10^6 células procedentes de médula ósea o bazo fueron lisadas en frío, con la ayuda de una aguja de 20 G, en 200 µl de tampón comercial RIPA (Abcam) suplementado con una tableta del cóctel completo de proteasas (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Merck). Para el *Western blot* de TET2, el tampón de lisis RIPA se suplementó, además, con 0.5 µl/ml benzonase (Merck) y 5 mM MgCl₂. La mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a 4°C y, posteriormente, se centrifugó a 12000 r.p.m. 20 min. Una vez finalizada la centrifugación, se recuperó el sobrenadante donde se encontraban disueltas las proteínas.

Para cuantificar la cantidad de proteína total de la muestra, se empleó el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Para realizar la cuantificación, previamente se preparó una curva estándar en el mismo tampón de extracción que las muestras para minimizar la absorbancia residual de fondo. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de albúmina sérica bovina a partir de un stock de 2 mg/ml. A continuación, se realizó la

medición de absorbancia a 550 nm de las muestras en duplicado, en placas de 96 pocillos.

3.4.5. Electroforesis, SDS-PAGE y transferencia

La misma cantidad de proteína (20-45 µg) se separó en función del peso molecular en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) con un porcentaje de poliacrilamida variable según el tamaño de la proteína objetivo: 12.5 % para U2AF1 o 7.5 % para TET2. Para elaborar estos geles de resolución o *resolving*, se utilizó poliacrilamida al 30 % (Acrylamide: Bis-Acrylamide ratio 37.5:1, Bio-Rad), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS y 0.1 % TEMED. La composición del gel de apilamiento o *stacking*, con un 3.75 % de poliacrilamida, fue 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS y 0.1 % TEMED. Antes de cargar las muestras, se desnaturalizaron, añadiéndoles el mismo volumen de tampón Laemmli 2x (0.125 M Tris-HCl 6.8 pH, 20 % glicerol, 4 % SDS, 10 % β-mercaptoetanol y 0.5 % azul de bromofenol) y calentándolas a 95°C durante 10 min. Como marcador de peso molecular, se empleó Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Life Technologies). Para la electroforesis, se utilizó el sistema *Mini-PROTEAN electrophoresis system* (Bio-Rad) y el tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0.2 M Glicina y 3 mM SDS).

Se llevó a cabo la transferencia húmeda de las proteínas a una membrana de PVDF (*GE Healthcare Life Sciences Amersham Hybond PVDF membrane*, Thermo Fisher Scientific). En el caso de la proteína U2AF1, la transferencia se realizó a 350 mA durante 1 h en hielo empleando un tampón que consistía en 25 mM Tris y 0.2 M Glicina. Mientras que en el caso de TET2, al tratarse de una proteína de gran tamaño (210 kDa), fue necesario añadir SDS al tampón de transferencia, quedando con la misma composición que el tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0.2 M Glicina y 3 mM SDS). Además, la transferencia de esta proteína se llevó a cabo durante toda la noche a 20 V en frío.

Para comprobar si la electroforesis y la transferencia fueron correctas, se tiñeron las membranas con 0.1 % Rojo Ponceau (Fisher Bioreagents) en ácido acético. A continuación, se lavaron con agua destilada y TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl y 0.1 % Tween).

3.4.6. Incubación y revelado

Una vez lavada y eliminada toda la tinción de Rojo Ponceau, se bloqueó la membrana incubándola con 5 % de leche desnata en TBST durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Este proceso disminuye las interacciones inespecíficas del anticuerpo con la membrana.

Por un lado, en el caso del *Western blot* de TET2, una vez bloqueada, la membrana se dividió en dos teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína control (β -ACTINA 42 kDa) y de interés (TET2 210 kDa). Cada una de ellas se incubó durante toda la noche a 4°C, en agitación suave, con el anticuerpo correspondiente diluido en TBST. Para detectar TET2, se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo contra la región N-terminal de la proteína a una dilución 1:1000 y como control de carga, se utilizó anti- β -ACTINA-Peroxidasa (A3854, Merck) a una dilución 1:20000. Al día siguiente, después de realizar 3 lavados de 10 min con TBST, las membranas se incubaron a temperatura ambiente, en agitación suave, durante 1 h, con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): anti-conejo IgG H&L (Abcam) a una dilución 1:5000. Una vez transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron nuevamente 3 veces con TBST, 10 min por lavado, para eliminar el anticuerpo excedente. Para la detección, se usó el kit de revelado *UltraScence Western Substrate* (Bio-Helix) y el equipo Amersham Imager 600 (Cytiva). En estos kits, la HRP conjugada a los anticuerpos secundarios, oxida el luminol presente en los reactivos de revelado produciendo quimioluminiscencia que es captada por los equipos de detección.

Por otro lado, en el caso del *Western blot* de U2AF1, se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en agitación suave bien: i) con un anticuerpo monoclonal de conejo que reconocía el extremo N-terminal de la proteína (D6S3Q, Cell Signaling Technology), ii) con un anticuerpo policlonal de conejo que reconocía el extremo C-terminal (ab86305, Abcam) (ambos a una dilución 1:2000 en TBS-T) o iii) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG (F1804, Merck) a una dilución 1:1000. Al día siguiente, después de realizar los lavados con TBS-T, las membranas se incubaron 1h a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón IgG H&L (Abcam) a una dilución 1:5000. A continuación, se realizaron los lavados y el revelado de la misma forma que se ha detallado con TET2. Una vez detectada la proteína U2AF1 o el péptido FLAG (en los experimentos de sobreexpresión), se procedió a detectar la proteína β -ACTINA como control de carga. Para ello, primero se realizó el *stripping* de las membranas para eliminar los anticuerpos unidos a ellas. Con este fin, se incubaron a 56°C durante 30 minutos en tampón de *stripping* (143 μ l β -mercaptoetanol, 4 ml SDS 10

%, 1.25 ml TRIS 1M pH 6.8M, 14.6 ml H₂O). Posteriormente, se lavaron las membranas y se bloquearon nuevamente. Una vez transcurrido el tiempo, se incubaron con anti- β -ACTINA-Peroxidasa (A3854, Merck) a una dilución 1:20 000 durante 4 h en frío y agitación. Para finalizar, las membranas se lavaron y se revelaron.

En el caso del *Western blot* con proteína extraída de células HEK293T que sobreexpresaban U2AF1 *wild-type* o mutante, quisimos confirmar que el anticuerpo anti-FLAG estaba verdaderamente detectando la proteína U2AF1. Para ello, una vez detectado el control de carga, se realizó un nuevo *stripping* y se reincubó la membrana con el anticuerpo que reconocía el extremo N-terminal de la proteína (D6S3Q), siguiendo el procedimiento detallado anteriormente.

4. Caracterización hematológica

4.1. Hemograma

Para determinar el perfil hematológico (también conocido como hemograma), la sangre periférica fue analizada por la empresa ACVLAB (Valencia) empleando un equipo Sysmex XT-2000. El hemograma nos permitió conocer diversos parámetros de la sangre, de los cuales cabe destacar los siguientes por su importancia en el diagnóstico de los SMD: por un lado, el recuento hematológico proporciona el número de glóbulos rojos o hematíes, glóbulos blancos o leucocitos, plaquetas y cantidad de hemoglobina; por otro lado, con la fórmula leucocitaria se cuantifican los diferentes tipos de leucocitos (monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, neutrófilos inmaduros y segmentados).

4.2. Citometría de flujo

4.2.1. Generalidades

En todos los ensayos de citometría de flujo (CF) se empleó un control sin teñir, es decir, células que no habían sido incubadas con el mix de anticuerpos y que permitían marcar el límite, a partir del cual la señal de un fluorocromo se consideraba positiva. Los paneles de CF fueron puestos a punto estableciendo los voltajes óptimos y compensando la fluorescencia que era captada en otros canales. Los datos fueron adquiridos en el equipo analizador FACSCanto-II (Becton Dickinson) de la Unidad de Citómica del IIS La Fe con el software DIVA y exportados para su posterior análisis con el software FlowJo v10 (TreeStar).

4.2.2. Análisis citómico de los tejidos hematopoyéticos

Se estudiaron células procedentes de sangre periférica, bazo y médula ósea. Las células maduras fueron analizadas tanto en sangre como en bazo. Se identificaron células mieloides (inmunofenotipo Mac-1⁺ y Mac-1⁺ Gr-1⁺), linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y B (B220⁺). Por un lado, 50 μ l de sangre se incubaron con el mismo volumen de mix de anticuerpos (Tabla 10) a una concentración 2X, durante 15 min en oscuridad. A continuación, se fijaron y lisaron las células incubando con 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) y mezclando vigorosamente con un vortex. El exceso de solución de lisis se eliminó centrifugando a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet obtenido, se lavó con 1 ml de PBS + 2 % FBS y se resuspendió en 200 μ l del mismo tampón. En el caso del bazo, 10 x 10⁶ células esplénicas se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet se resuspendió en 50 μ l de mix de anticuerpos descrito en Tabla 10 y se incubó en hielo y oscuridad durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió 1 ml de PBS + 2 % FBS, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 300 μ l del mismo tampón.

Tabla 10. Descripción de anticuerpos empleados en citometría de flujo para analizar las células maduras.

Tinción	Tejido	Anticuerpo	Conjugado	Clon	Dilución	Compañía
Células maduras	Sangre Bazo	CD4	PE	-	1/200	Miltenyi Biotec
		Gr-1	PE-Cy5	RB6-8C5	1/800	BioLegend
		CD8	FITC	53-67	1/400	Miltenyi Biotec
		B220	PE-Cy7	RAS-6B2	1/400	BD Bioscience
		Mac-1	V450	M1/70	1/400	BD Bioscience

Las HSPC se analizaron como células LSK que, como se ha comentado anteriormente, comprende la fracción más inmadura de células hematopoyéticas. Además, se analizaron los progenitores (inmunofenotipo Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺). Dentro de esta fracción, se identificaron los progenitores mieloeritroides según el inmunofenotipo establecido por Pronk *et al.*¹²:

- Megacariocíticos:

MkP: Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ CD150⁺ CD41⁺ CD16/32⁻ CD105⁻

- Granulo-monocíticos:

GMP: Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ CD150⁻ CD41⁻ CD16/32⁺ CD105⁻

Pre GM: Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ CD150⁻ CD41⁻ CD16/32⁻ CD105⁻

- Eritroides:

CFU-E: Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ CD150⁻ CD41⁻ CD16/32⁻ CD105⁺

Pre CFU-E: Linaje⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ CD150⁺ CD41⁻ CD16/32⁻ CD105⁺

- Megacariocíticos-eritroides:

Pre MegE: Linaje⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺ CD150⁺ CD41⁻ CD16/32⁻ CD105⁻

Primero, se lisaron 20×10^6 células de médula ósea incubando 1 min con 1.5 ml de tampón de lisis (NH_4Cl 8.3 g/L, NaHCO_3 1.0 g/L, EDTA 37 mg/L). Se añadieron 7.5 ml de PBS + 2 % FBS y se centrifugaron a 1200 r.p.m. 5 min. Las muestras se incubaron en hielo y oscuridad, durante 15 min, con 100 μl de mix de anticuerpos de linaje, anti-CD150, anti-c-kit, anti-Sca-1, anti-CD41 y anti-CD105 a las concentraciones detalladas en la Tabla 11. A continuación, se lavó con 1 ml de PBS + 2 % FBS y se centrifugaron nuevamente. Una vez eliminado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 100 μl de anticuerpo anti-CD16/32 a una dilución 1:400 (Tabla 11) y se incubó 15 min en hielo y oscuridad. Por último, los pellets se resuspendieron en 300 μl PBS + 2 % FBS.

Tabla 11. Descripción de anticuerpos empleados en citometría de flujo para el análisis de progenitores mieloeritroides.

Tinción	Tejido	Anticuerpo	Conjugado	Clon	Dilución	Compañía	
Progenitores mieloeritroides	Médula ósea	Anticuerpos de Linaje	PE-Cy5	Mac-1	M1/70	1/800	BioLegend
				B220	RA3-6B2	1/400	
				CD5	53-7.3	1/400	
				Ter119	TER-119	1/200	
				Gr-1	RB6-8C5	1/800	
				CD4	GK15	1/800	
				CD8	53-6.7	1/800	
		CD150	APC	9D1	1/100	eBioscience	
		c-kit	APC-eF780	2B8	1/200	eBioscience	
		Sca-1	Pacific Blue	E13-161.7	1/100	BioLegend	
		CD41	FITC	MWRReg30	1/100	Invitrogen	
		CD105	PE	MJ7/18	1/100	eBioscience	
		CD16/32	PE-Cy7	93	1/400	Invitrogen	

4.3. Análisis morfológico

4.3.1. Citospin

El citospin es empleado para analizar la morfología de células que se encuentran en una muestra líquida. Este proceso consiste en centrifugar la suspensión celular para aislar, concentrar y depositar una monocapa de células en una pequeña área circular

de un portaobjetos. Para ello, se sitúa la muestra en un embudo específico que contiene un filtro en su interior y se realiza una centrifugación. El líquido de la muestra es absorbido por el filtro, mientras que las células lo atraviesan depositándose en el portaobjetos. A continuación, los portaobjetos se tiñen con May-Grünwald Giemsa, la cual aprovecha la afinidad electrostática ácido-base de los compuestos de los tintes y los componentes de las células para observar su morfología.

En nuestro caso, se separaron 2×10^5 células de médula ósea y se llevaron a un volumen final de 200 μ L PBS + 2 % FBS. Se pre-humedecieron los filtros pipeteando 200 μ l de PBS en los embudos específicos de la citocentrífuga Shandon Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific) y centrifugando 2 min a 350 r.p.m. A continuación, se depositaron las células en los portaobjetos mediante centrifugación durante 5 min a 600 r.p.m. y se dejaron secar 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se fijaron y tiñeron con solución May-Grünwald Giemsa (Merck). Para ello, se sumergieron los portaobjetos en la solución May-Grünwald durante 5 min. A continuación, se lavaron con agua destilada 5 veces y se sumergieron en la solución Giemsa durante 20 min. Por último, se lavaron nuevamente 5 veces con agua destilada y se dejaron secar. Posteriormente al montaje del portaobjetos con Entellan (Merck), se analizaron y se capturaron las imágenes en un microscopio Leica DMD 108 (Leica Biosystems) a 40X.

4.3.2. Histología

Como se ha comentado anteriormente, las porciones de los bazos destinadas a histología se fijaron sumergiéndolas en 4 % de PFA. Brevemente, las muestras fueron embebidas en parafina utilizando el procesador de tejidos Leica ASP6025. Posteriormente, fueron seccionadas con el microtomo Leica RM2245 y teñidas con hematoxilina-eosina de forma automática usando el equipo Dako CoverStainer (Agilent). Las secciones teñidas fueron visualizadas y analizadas utilizando un microscopio Leica DM 2000.

4.4. Estudios funcionales de las células hematopoyéticas

4.4.1. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)

El estudio de Unidades Formadoras de Colonias (*colony-forming unit* o CFU) permite obtener una medida de la capacidad que poseen los progenitores presentes en la muestra de proliferar y dividirse en células sanguíneas maduras formando colonias, bajo

ciertas condiciones de crecimiento que se dan en el cultivo. Así pues, se estudió la formación de colonias mieloides (*granulocyte-macrophage colony-forming unit* o CFU-GM) y eritroides (*Erythroid burst-forming units* o BFU-E) en medio semisólido de metilcelulosa. Se emplearon los medios Methocult M3534 y M3436 (Stem Cell Technologies). El medio Methocult M3534 está suplementado con insulina, transferrina y las citoquinas SCF, IL-3 y IL-6, que promueven el crecimiento de CFU-GM. Mientras que el Methocult M3436 posee insulina, transferrina, y EPO, entre otras citoquinas, para el crecimiento de BFU-E.

Para plaquear 5×10^4 células de médula ósea por placa, se prepararon 5×10^5 células en 1 ml de medio IMDM suplementado con 5X penicilina/estreptomicina (Gibco) y 1 % GlutaMAX (Gibco). A continuación, se añadieron 400 μ l de la dilución de células en la alícuota de 4 ml de metilcelulosa, se mezclaron vigorosamente con el vortex y se dejaron reposar durante aproximadamente 15 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se plaqueó, por triplicado, 1.1 ml de la mezcla de células y metilcelulosa en placas de 35 mm con ayuda de una jeringa de 5 ml con una aguja de 20 G. Las placas se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂. El conteo de las colonias CFU-GM se realizó a los 7 días, mientras que las colonias BFU-E se mantuvieron hasta los 10 días.

4.4.2. Trasplante hematopoyético

El trasplante hematopoyético permite determinar *in vivo* la funcionalidad de las células madre hematopoyéticas. En el trasplante competitivo se trasplanta el mismo número de células *test* y células competidoras y se compara la capacidad del *test* para injertar y producir los diferentes linajes hematopoyéticos en el receptor. Habitualmente, en los experimentos de trasplante murino, los ratones receptores y donantes presentan variantes alélicas diferentes del gen *Cd45* (También conocido como *Ly5* o *Ptprc*). El antígeno leucocitario común, CD45, se encuentra presente en todas las células nucleadas del sistema hematopoyético. Al utilizarse cepas de ratones que poseen alelos diferentes para este gen, es posible evaluar la eficiencia del trasplante con una prueba de sangre rutinaria en el ratón quimera, puesto que somos capaces de diferenciar de qué cepa provienen las células analizadas. En nuestro caso, los ratones receptores y los ratones de los que se obtenían las células competidoras presentaban el alelo CD45.1, mientras que los ratones donantes o *test* presentaban el alelo CD45.2.

Los ratones receptores utilizados eran CD45.1 (B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyCrl, Charles River Laboratories) de 8-16 semanas. Éstos fueron sometidos a una dosis letal de

radiación gamma (dos dosis de 6 Gy con 3 horas en medio) empleando un irradiador gamma BIOBEAM GM (Gamma-Service Medical GmbH) en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

4.4.2.1. De médula ósea total

Se preparó en PBS + 5 % FBS un mix 1:1 de células test:competidoras de forma que en el volumen a trasplantar, 200 μ l, hubiera 1 x 10⁶ células procedentes de los ratones donantes y la misma cantidad de células de ratones competidores. Los 200 μ l fueron inyectados a través de la vena lateral de la cola en los ratones receptores. Previamente los ratones receptores irradiados fueron calentados con una lámpara de calor rojo para asegurar la dilatación de los vasos sanguíneos y hacer que la vena lateral fuera más visible (Figura 12).

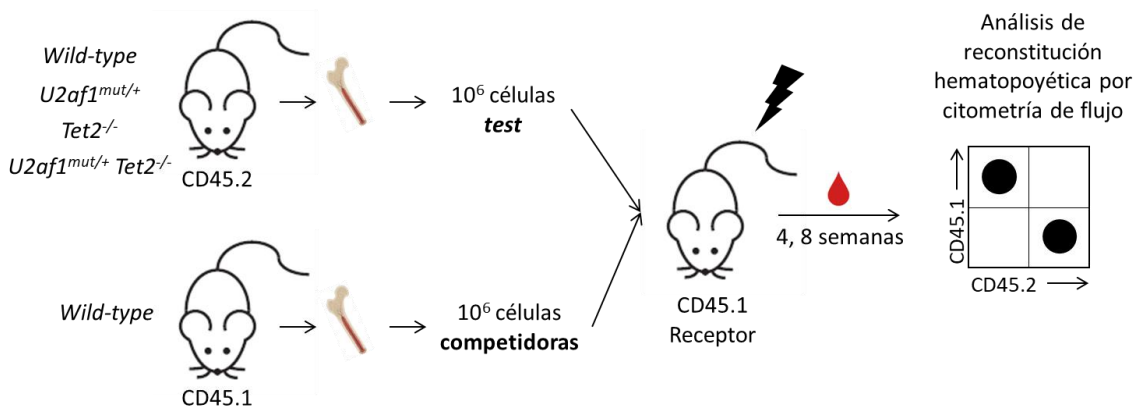


Figura 12. Representación esquemática del trasplante hematopoyético competitivo. El mismo número de células test (*wild-type* o mutantes *U2af1^{mut/+}, Tet2^{-/-}* o *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*) CD45.2 y células competidoras (*wild-type*) CD45.1 fueron inyectadas a través de la vena de la cola en ratones receptores CD45.1 previamente irradiados. El análisis de reconstitución hematopoyética se realizó por citometría de flujo a las 4 y 8 semanas.

4.4.2.2. De células LSK purificadas

En otro set de experimentos, se llevaron a cabo trasplantes con células LSK purificadas. Ya que las HSPC tardan unas semanas en diferenciarse hasta producir las células maduras de los diferentes linajes, es necesario trasplantar también células de soporte (CD45.1) que proporcionarán al ratón las células necesarias para su

supervivencia durante este periodo de tiempo. Por tanto, se inyectaron 8 000 LSK (CD45.2) junto con 2×10^5 células de médula ósea total (CD45.1) por ratón trasplantado (Figura 13).

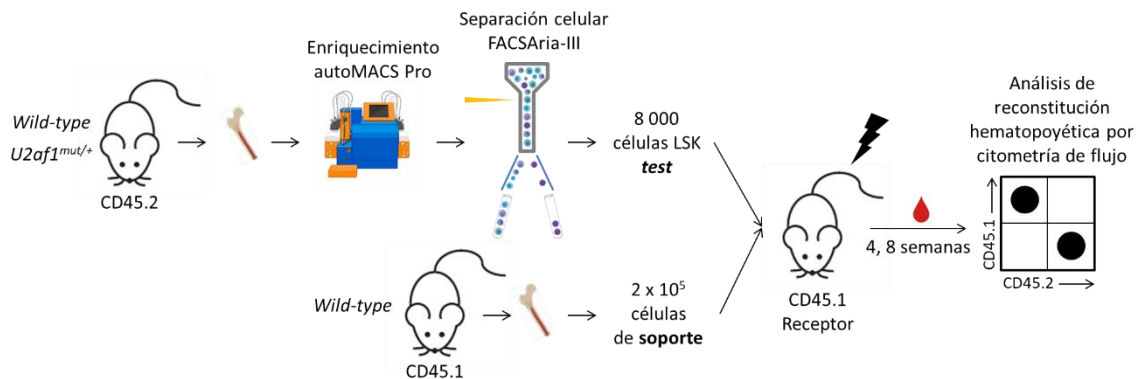


Figura 13. Representación esquemática del trasplante hematopoyético con LSK purificadas. Una muestra de células de médula ósea de ratones test (*wild-type* o mutantes *U2af1^{mut/+}*) CD45.2 se enriqueció en *c-kit⁺* para posteriormente separar las células LSK mediante un FACS Aria-III. Se inyectaron 8 000 células LSK junto con 2×10^5 células de soporte (*wild-type*) CD45.1 a través de la vena de la cola en ratones receptores CD45.1 previamente irradiados. El análisis de reconstitución hematopoyética se realizó por citometría de flujo a las 4 y 8 semanas.

Dada la baja frecuencia que presentan las células LSK en la médula ósea ($< 1\%$), las muestras se enriquecieron en *c-kit⁺* mediante el separador celular magnético autoMACS Pro (Miltenyi Biotec). Para ello, se lisaron con tampón de lisis las células de la médula ósea procedentes de 5 ratones por genotipo (control y *U2af1^{mut/+}*) como se ha detallado anteriormente. A continuación, las células se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet resultante se incubó 20 min con microbolas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-*c-kit* (Miltenyi Biotec) añadiendo 2.5 μ l de microbolas y 100 μ l de PBS + 5 % FBS por cada 100×10^6 células, en hielo, oscuridad y agitando ocasionalmente. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó el anticuerpo restante con 10 ml de PBS + 5 % FBS, se centrifugó nuevamente a 1200 r.p.m. durante 5 min y el pellet resultante se resuspendió en 500 μ l por cada 100×10^6 células. Las células enriquecidas en *c-kit⁺* fueron obtenidas con el separador magnético autoMACS Pro con el programa de selección positiva POSSEL.

Una vez obtenidas las células *c-kit⁺*, se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet resultante se resuspendió en 50 μ l de mix de anticuerpo detallado en la Tabla 12 y se incubó durante 15 min en frío y en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron con 1 ml de PBS + 5 % FBS, se centrifugaron nuevamente a 1200 r.p.m. durante 5 min y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS + 5 % FBS. Las células LSK se

obtuvieron mediante el separador celular FACS Aria-III (Becton Dickinson) de la Unidad de Citómica del IIS La Fe en medio PBS + 5 % FBS.

Tabla 12. Descripción de anticuerpos empleados para detectar y separar las células LSK.

Tinción	Tejido	Anticuerpo	Conjugado	Clon	Dilución	Compañía	
Separación LSK	Médula ósea	Anticuerpos de Linaje	Mac-1	PE-Cy5	M1/70	1/800	BioLegend
			B220		RA3-6B2	1/400	
			CD5		53-7.3	1/400	
			Ter119		TER-119	1/200	
			Gr-1		RB6-8C5	1/800	
			CD4		GK15	1/800	
			CD8		53-6.7	1/800	
		c-kit	APC-eF780	2B8	1/200	eBioscience	
		Sca-1	PE-Cy7	E13-161.7	1/200	BioLegend	

4.4.2.3. Seguimiento y evaluación de los trasplantes

Los ratones trasplantados se mantuvieron con el antibiótico enrofloxacino (Bayer, Alemania) en el agua de bebida durante las 4 semanas después del trasplante. El quimerismo en la sangre periférica (células donantes CD45.2 *versus* receptoras CD45.1) y la contribución a los diferentes linajes hematopoyéticos se analizó mediante CF a las 4 y 8 semanas post-trasplante. Para ello, se extrajo sangre de la vena facial de los ratones trasplantados y se tiñó con el mix de anticuerpos detallados en la Tabla 13 siguiendo el protocolo de tinción y análisis de sangre periférica detallado anteriormente.

Tabla 13. Descripción de anticuerpos empleados en citometría de flujo para el análisis de reconstitución hematopoyética.

Tinción	Tejido	Anticuerpo	Conjugado	Clon	Dilución	Compañía
Evaluación del trasplante	Sangre	CD4	PE	-	1/200	Miltenyi Biotec
		Gr-1	PE-Cy5	RB6-8C5	1/800	BioLegend
		CD8	FITC	53-67	1/400	Miltenyi Biotec
		B220	PE-Cy7	RAS-6B2	1/400	BD Bioscience
		Mac-1	V450	M1/70	1/400	BD Bioscience
		CD45.1	APC	A20	1/200	BioLegend
		CD45.2	APC-Cy7	104	1/200	BD Bioscience

5. Comparación del perfil transcriptómico

5.1. Obtención de células LSK

En este caso, el enriquecimiento en c-kit⁺ se realizó de forma manual con el sistema de columnas magnéticas LS (Miltenyi Biotec). Se procesaron y lisaron las células de la

médula ósea de 3 ratones por genotipo (control, *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*). El total de células, se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet resultante se incubó 20 min en hielo, oscuridad y agitando ocasionalmente, con microbolas magnéticas anti-c-kit (Miltenyi Biotec) a una concentración de 2.5 μ l microbolas/100 μ l de tampón PBS + 5 % FBS/100 x 10⁶ células. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó con 10 ml de PBS + 5 % FBS, se centrifugó nuevamente a 1200 r.p.m. durante 5 min y se resuspendió en 3 ml del mismo tampón. A continuación, se colocó la columna de separación magnética LS en el imán y se equilibró lavando con 3 ml de PBS + 5 % FBS. Una vez pasado todo el volumen, se filtraron los 3 ml de muestra con filtros de 70 μ m (Miltenyi Biotec) y se colocaron en la columna. Después, se hicieron 3 lavados añadiendo, en cada uno de ellos, 3 ml de PBS + 5 % FBS a la columna. Posteriormente, se separó la columna del imán, se añadieron 5 ml del mismo tampón y se pasaron con ayuda de un émbolo. A continuación, se añadieron 3 ml más a la columna y se repitió el proceso. Quedando, por tanto, la muestra c-kit⁺ eluida en 8 ml totales.

Las muestras se contabilizaron y centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. Los pellets se resuspendieron en 50 μ l de mix de anticuerpos detallado en Tabla 12, durante 15 min en frío y oscuridad. Se lavaron con 1 ml de PBS + 5 % FBS y una vez centrifugados, se resuspendieron en 4 ml de tampón. Se obtuvieron 5 x 10⁴ células LSK mediante el separador celular FACSAria-III (Becton Dickinson) de la Unidad de Citómica del IIS La Fe en 700 μ l de medio RLT (QIAGEN) suplementado con 7 μ l de β -mercaptoetanol (Merck). Se separaron todas las células LSK hasta agotar la muestra, consiguiendo así replicados técnicos.

5.2. Extracción de ARN

Para extraer el ARN total de las muestras, se utilizó el RNeasy Micro Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Destacando que previamente a la extracción, las muestras se pasaron 10 veces a través de una jeringa con aguja de 20 G para lisar las células. A continuación, se siguió el protocolo sin modificaciones, teniendo en cuenta que se realizó el tratamiento con ADNasa en la propia columna de extracción como recomienda la casa comercial.

La cantidad y calidad del ARN total fue medida en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) empleando el kit Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape Assay y el equipo Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies). Únicamente las muestras con

un Número de Integridad del ARN (RIN) ≥ 7 fueron seleccionadas para el posterior análisis por ARN-seq.

5.3. Secuenciación del ARN (ARN-seq) y análisis de los resultados

Las muestras fueron enviadas en hielo seco y secuenciadas por la empresa Novogene (China). Las librerías *low input* se prepararon y purificaron utilizando el kit NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep (Illumina Cat nº 7420). Las secuencias fueron obtenidas mediante secuenciación paired-end en el equipo NovaSeq 6000 (Illumina).

El equipo bioinformático del grupo de Investigación en Hematología y Hemoterapia llevó a cabo el análisis de los resultados. Primero, midieron la calidad de los datos obtenidos en los FastQ usando FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>). Las lecturas fueron mapeadas al genoma de ratón de referencia GRCm38 (mm10), con anotaciones genómicas en GENCODE vM24, usando el software STAR, específico para mapear lecturas y analizar *splicing* (version 2.6.1c)²⁰⁷. Para aumentar las uniones entre las lecturas, se realizaron dos mapeos y únicamente aquellas lecturas que mapearon fueron las seleccionadas para análisis posteriores. Con el software RSeQC 2.6.4 se midió la calidad de las secuencias mapeadas contenidas en los archivos BAM.

El análisis del *splicing* alternativo diferencial entre los diferentes genotipos se llevó a cabo con el programa rMATS 4.0.2²⁰⁸. Categorizándose así los eventos de *splicing* en 5 grupos: intrón retenido (RI), exón saltado (SE), sitio alternativo 5' (A5SS), sitio alternativo 3' (A3SS) y exones mutuamente excluyentes (MXE). Se identificaron los eventos de *splicing* alternativo asociados a cada grupo en comparación con el grupo control (*U2af1^{mut/+}* vs Control, *Tet2^{-/-}* vs Control y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* vs Control) aplicando parámetros muy estrictos (Tasa de falsos descubrimientos (FDR) = 0.01 y niveles de inclusión (Δ PSI) = 0.1). Se realizó el enriquecimiento funcional de las listas de genes con *splicing* diferencial con la herramienta DAVID (versión 6.8)²⁰⁹ estableciendo como punto de corte un p-valor < 0.01.

Para el análisis de los genes diferencialmente expresados, se calculó la cantidad de lecturas por gen empleando el paquete Bioconductor Rsubread²¹⁰ y se determinó la expresión con DESeq2 (version 1.26.0)²¹¹.

Todos los análisis se llevaron a cabo en la versión 3.6 de R. Los datos obtenidos en la secuenciación de ARN se depositaron en la base de datos ArrayExpress de EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) con el número de acceso: E-MTAB- 4872.

5.3.1. Validación de las variantes mediante RT-PCR

Para la validación del ARN-seq se seleccionaron aquellos genes con *splicing* diferencial que poseían un p-valor y un FDR menor, un Δ PSI mayor y menor variabilidad entre muestras.

Con ayuda del programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) se localizó la región que presentaba el cambio de *splicing*, y con la herramienta online *Primer3* se diseñaron *primers* que permitían diferenciar con una PCR convencional la isoforma habitual de aquellas detectadas en el análisis.

Para la RT-PCR, primero se extrajo el ARN de muestras c-kit⁺ control, *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*. Para ello, se empleó el RNeasy micro kit (QIAGEN) y se midió la cantidad y calidad de las muestras con el Nanodrop 2000. El ADNc se obtuvo retrotranscribiendo 1 μ g ARN obtenido en la extracción con TaqMan Reverse Transcription Reagents (Thermo Fisher Scientific) y *primers* oligo(dT) en un volumen final de 25 μ l. A continuación, se amplificaron las muestras realizando una PCR a partir de 40 ng de ADNc en las condiciones detalladas en Tabla 14. Los amplicones fueron visualizados y separados en geles de agarosa al 3 %.

Tabla 14. Condiciones de las PCR para validar los datos obtenidos en ARN-seq.

PCR	Componentes	Condiciones	Primers
<i>Ammecr1l</i>	12.5 μ l PCR Master Mix (2X) 1 μ l oligo F (10 μ M) 1 μ l oligo R (10 μ M) 9.5 μ l H ₂ O 1 μ l ADN (40 ng)	95°C 2 min 95°C 30 s 62°C 30 s 72°C 20 s 72°C 7 min	35x F AGAGGAAGAGAAGGCAGAGC R GGGGAGGAACACAACGTCTT
<i>H2-T24</i>	12.5 μ l PCR Master Mix (2X) 1 μ l oligo F (10 μ M) 1 μ l oligo R (10 μ M) 1.25 μ l DMSO 8.25 μ l H ₂ O 1 μ l ADN (40 ng)	95°C 2 min 95°C 30 s 56°C 30 s 72°C 20s 72°C 7 min	35x F CTTCTGGAGAGGAGCAGAGA R TACATTGTCCCTGGGTCCTG

5.3.2. Estudio de las variantes empleando CF

El enriquecimiento funcional del conjunto de genes afectados con *splicing* diferencial empleando la herramienta DAVID, dio lugar a la lista de rutas biológicas en las que se encuentran los genes alterados.

5.3.2.1. Análisis del ciclo celular

Una de las rutas afectadas en los mutantes *U2af1^{mut/+}* fue el ciclo celular. Por ello, se analizaron por CF las diferentes fases del ciclo celular dentro de la fracción LSK de ratones control y *U2af1^{mut/+}*.

Las muestras se enriquecieron en células c-kit⁺ de forma manual mediante columnas LS y las células se contabilizaron con azul de tripán como se ha detallado anteriormente. A continuación, se centrifugaron a 1200 r.p.m. 5 min y los pellets se resuspendieron en 50 µl de mix de anticuerpos (Tabla 12) en frío y oscuridad. Una vez lavados con 1 ml de PBS + 5 % FBS y centrifugados nuevamente, se continúa con el protocolo de tinción de las células con el marcador fluorescente DAPI (Merck). Este marcador se une a las regiones ricas en AT del surco menor de la molécula de ADN y aumenta hasta 20 veces su fluorescencia si la molécula es de doble cadena. La membrana celular es impermeable a DAPI, por ello, el protocolo de tinción incluye una fase de fijación y permeabilización de las células para permitir su entrada. De esta forma, la intensidad de la fluorescencia emitida por DAPI es proporcional a la cantidad de ADN que contienen las células teñidas y esto se puede correlacionar con la fase del ciclo celular en la que se encuentran.

Las células teñidas se resuspendieron en 100 µl de tampón de fijación/permeabilización (Becton Dickinson) por cada 5×10^5 células y se incubaron en hielo durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, las células se lavaron dos veces para eliminar el exceso de tampón de fijación. El primer lavado se realizó con 2 ml de tampón de lavado, mientras que el siguiente fue con 1 ml. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 r.p.m y 5 min. A continuación, las muestras se resuspendieron con PBS + 5 % FBS a una concentración de 2×10^5 células/100 µl y se incubaron con DAPI (0.5 µg/ml) durante 40 min en frío. Por último, se centrifugaron a 1200 r.p.m durante 5 min y se resuspendieron en 500 µl. Las muestras fueron analizadas mediante CF. Para la adquisición de los datos se siguieron las recomendaciones descritas anteriormente por Galvin *et al.*²¹²

5.3.2.2. Análisis del daño al ADN.

Se analizó el estado de la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) por CF, dentro de las células LSK en ratones *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*. Esta histona se encuentra fosforilada en la Serina 139 cuando se producen roturas de doble hebra en el ADN. Por tanto, existe una correlación directa entre el daño al ADN y la presencia de γ H2AX. Se utilizó el kit H2A.X Phosphorylation Assay (Millipore).

Se centrifugaron, a 1200 r.p.m. durante 5 min, 2×10^6 células c-kit⁺ obtenidas por enriquecimiento manual con columnas LS y contabilizadas con azul de tripán. Después, se incubaron 15 min en frío y oscuridad con el mix de anticuerpos para la detección de células LSK (Tabla 12). Una vez lavadas con 1 ml de PBS + 5 % FBS, las células se centrifugaron a 1200 r.p.m. 5 min. El pellet se resuspendió en 50 μ l de solución de fijación y se incubó 20 min más en hielo. A continuación, se realizaron 2 lavados con 3 ml de PBS centrifugando en cada uno de ellos a 1200 r.p.m 5 min. Después, las muestras se incubaron en 50 μ l de solución de permeabilización con 3.5 μ l de anticuerpo anti- γ H2AX-FITC durante 20 min en hielo, oscuridad y agitando ocasionalmente. Para lavar las muestras y eliminar el exceso de anticuerpo, se emplearon 100 μ l de solución de lavado y se centrifugaron a 1200 r.p.m. 5 min. Por último, las muestras se resuspendieron en 300 μ l de PBS + 5 % FBS y se mantuvieron en hielo hasta su análisis.

Para el ensayo se empleó tanto un control positivo como uno negativo. Para el control positivo, 5×10^5 células c-kit⁺ procedentes de la médula ósea de un ratón control, se incubaron con peróxido de hidrógeno a una concentración 100 μ M durante 1h en StemSpan (Stem Cell) a 37°C y 5 % CO₂. Para el control negativo, se separaron 2×10^6 células c-kit⁺ de un ratón control y, en lugar de incubarse con anticuerpo anti- γ H2AX-FITC, se incubaron con anticuerpo anti-isotipo-IgG conjugado a FITC. Con ambos controles se siguió el mismo protocolo de tinción, fijación y permeabilización que con el resto de muestras.

6. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo con GraphPad Prism version 8. Para determinar la significancia estadística se utilizó un test t-Student de dos colas, comparando individualmente los grupos mutantes (*U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*) con el control. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

El gen *U2AF1* codifica para una proteína del *spliceosoma* encargada de reconocer el extremo 3' del intrón durante el proceso de *splicing*. Diversos estudios han visto que este gen aparece mutado en concurrencia con el gen *TET2* en pacientes con SMD. La proteína TET2 es una proteína epigenética encargada de la desmetilación del ADN. Sin embargo, se desconoce como la cooperación entre estas alteraciones puede intervenir en la patogénesis de la enfermedad.

El presente estudio se inició con la generación de dos líneas de ratones mutantes en *U2af1* (*U2af1^{mut/+}*) o *Tet2* (*Tet2^{-/-}*) empleando el sistema CRISPR/Cas9 con sgARN específicos contra estos genes. Para ello, aprovechamos el mecanismo de reparación de ADN mediante recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) que se da de forma intrínseca en las células. Tanto el enzima Cas9 como los sgARN correspondientes, fueron microinyectados en embriones en estadio de cigoto. Éstos se incubaron hasta que fueron transferidos a úteros de hembras CD1 pseudopreñadas cuando alcanzaron el estadio de blastocisto. Una vez generada la F0, los ratones mutantes en *U2af1* fueron retrocruzados hasta 6 generaciones con ratones puros C57BL/6J para originar un fondo genético homogéneo. Los ratones *U2af1^{mut/mut}* no eran viables y morían poco después de la implantación en las hembras CD1. Esto no ocurría en los ratones homocigotos para *Tet2* que sí eran viables. A continuación, se generaron los ratones doble mutantes, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, por cruzamiento convencional entre ratones de ambas líneas. Por tanto, el estudio se llevó a cabo en ratones *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*.

1. Consecuencias moleculares de la mutación en *U2af1*

Antes de comenzar la caracterización hematológica de los ratones, era necesario comprender cómo afectaba la mutación a distintos niveles: genómico, transcriptómico y proteómico.

En el caso de los ratones *U2af1^{mut/+}*, en primer lugar, se secuenció con la tecnología Sanger el ADN extraído de la médula ósea de ratones control y *U2af1^{mut/+}*. Como se puede observar en la Figura 14, se detectó que los ratones mutantes presentaban una delección en heterocigosis de 5 nucleótidos en el exón 6 del gen.

Resultados

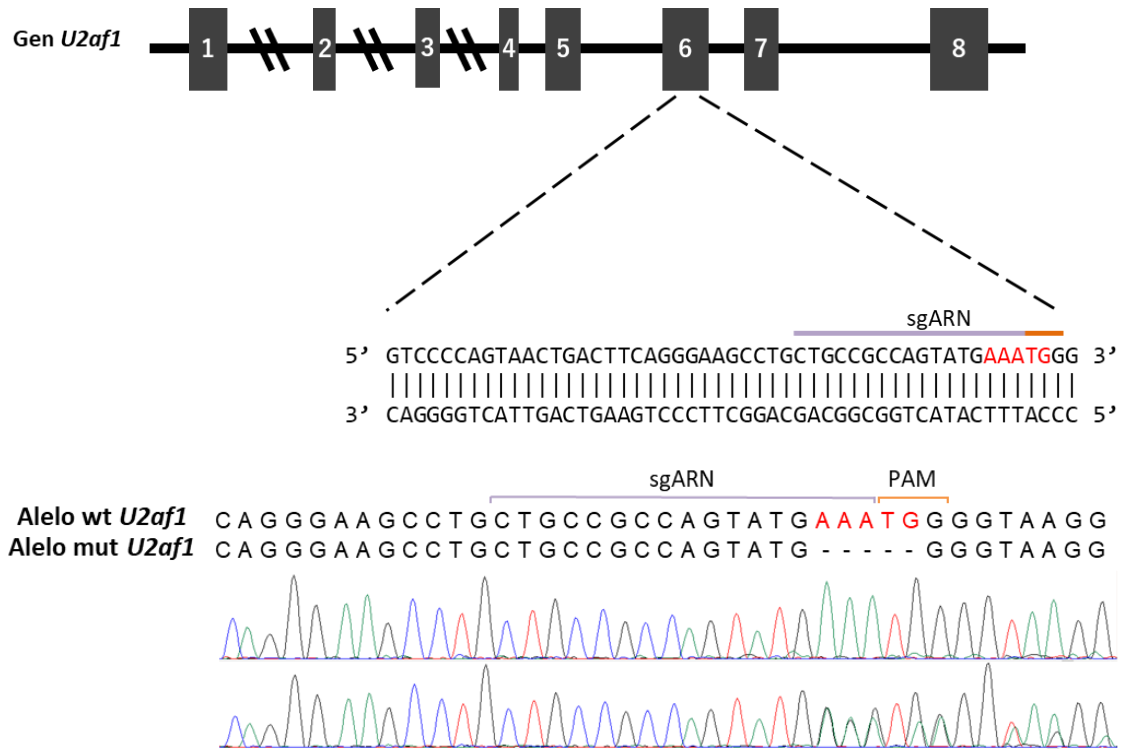


Figura 14 . Generación del ratón mutante *U2af1^{mut/+}*. Panel superior: secuencia sgARN contra el exón 6 del gen *U2af1* murino. Panel inferior: cromatogramas obtenidos por secuenciación Sanger con muestras de médula ósea de ratones *wild-type* (wt) y *U2af1^{mut/+}*. La delección de 5 nucleótidos se indica en rojo.

Dado que la mutación se originó de forma germinal, todas las células de los ratones presentaban la delección. Por este motivo, para genotipar las camadas que se fueron generando a lo largo del estudio, en el momento del destete se adquiría una muestra de oreja a partir de la cual se extraía el ADN y se realizaba una PCR rutinaria con *primers* flanqueantes a la región editada. Los amplicones se analizaban en un gel de agarosa al 3 %, observándose una banda de 227 pb en los ratones *wild-type* y dos bandas (227 y 222 pb) en los ratones *U2af1^{mut/+}*. Además, empleando la misma PCR, se confirmó que la delección estuviera tanto en médula ósea como en bazo (Figura 15).

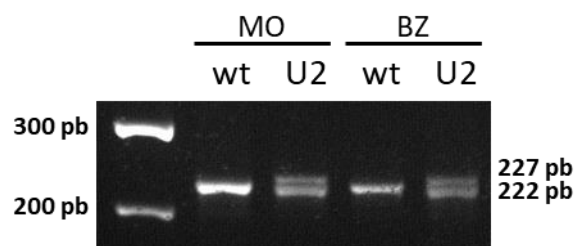


Figura 15. Confirmación de la delección en el gen *U2af1* mediante PCR convencional. Se amplificó la región editada en *U2af1* en muestras de médula ósea (MO) y bazo (BZ) de ratones *wild-type* (wt) y *U2af1^{mut/+}* (U2).

A continuación, se estudió la expresión del gen realizando una RT-qPCR empleando *primers* que reconocían específicamente el ARNm *wild-type* del gen *U2af1*.

La abundancia relativa de este ARNm se calculó en relación a la abundancia del ARNm del gen de referencia, β -*actin*. Las eficiencias de amplificación entre el gen de estudio (*U2af1*) y el gen de referencia (β -*actin*) distaban más de un 10 % (82 y 96 % respectivamente). Por ello, para calcular la abundancia relativa se siguió el protocolo descrito por ²⁰⁶ y no el método del $\Delta\Delta Ct$. Como se puede ver en la Figura 16, tanto en médula ósea como en bazo, se detectó una disminución significativa en la expresión del ARNm *wild-type*. El porcentaje de disminución en el caso del bazo fue del 50 % respecto a la expresión en los controles, mientras que en médula ósea llegó a suponer un 63 % menos.

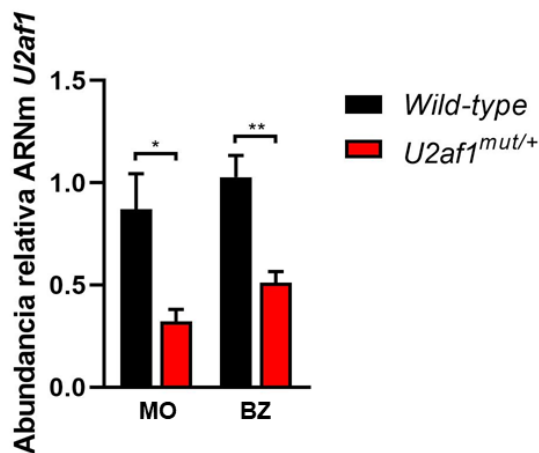


Figura 16. Análisis de la expresión de *U2af1* mediante RT-qPCR. Abundancia relativa del ARNm *wild-type* del gen *U2af1* respecto al gen de referencia β -*Actin* en médula ósea (MO) y bazo (BZ) (MO: wt n = 5, *U2af1*^{mut/+} n = 4; BZ: wt n = 6, *U2af1*^{mut/+} n = 5; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Consultando las diferentes bases de datos de proteínas como Uniprot (www.uniprot.org/) y Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) se observó que la delección de 5 nucleótidos que presentaban los ratones *U2af1*^{mut/+}, afectaba directamente al segundo dedo de zinc (ZF2) de la proteína U2AF1. Esta alteración modificaba la pauta de lectura produciéndose, teóricamente, una proteína aberrante a partir de ese punto. Empleando la herramienta informática *online* ExPASy ProtParam, se predijo, *in silico*, que esta proteína aberrante poseería un tamaño aproximado de 191 aminoácidos y un peso molecular de 22 kDa, atendiendo únicamente a su estructura primaria, en lugar de 235 aminoácidos y 35 kDa que presenta la proteína U2AF1 *wild-type* (Figura 17).

Resultados

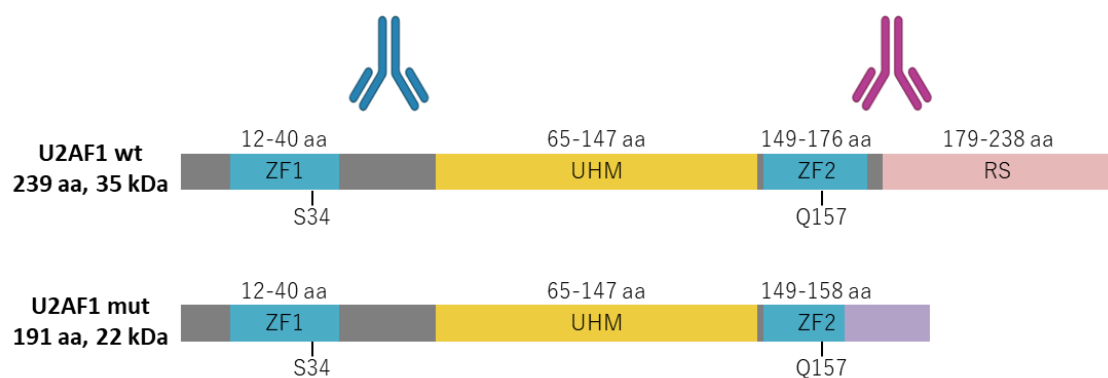


Figura 17. Representación de la proteína U2AF1 *wild-type* y mutante como resultado de la edición genética por CRISPR/Cas9. El valor de los kDa de la proteína mutante se calculó usando la herramienta informática *online* ExPASy ProtParam. En azul el anticuerpo cs-D6S3Q (Cell Signaling Technology). En morado el anticuerpo ab86305 (Abcam) (ZF: dedo de zinc. UHM: motivo homólogo de U2AF. RS: dominios ricos en arginina y serina).

Para detectar la proteína U2AF1 mediante *Western blot*, se obtuvo el extracto proteico total de células procedentes de la médula ósea y del bazo de ratones *wild-type* y *U2af1^{mut/+}*. En primer lugar, se utilizó un anticuerpo anti-U2AF1 (ab86305, Abcam) que reconocía el extremo C-terminal de la proteína (aminoácidos 140-190), permitiendo identificar únicamente la forma *wild-type*. El análisis comparativo con el programa ImageJ, desveló que la proteína *wild-type* disminuyó en los mutantes *U2af1^{mut/+}* un 79 % en las muestras de médula ósea. Sin embargo, en las muestras de bazo no se observó una disminución de la proteína U2AF1 estadísticamente significativa (Figura 18A). Con intención de detectar la proteína aberrante, se empleó un anticuerpo que reconocía los residuos que rodean la alanina de la posición 47 de la proteína U2AF1 (cs-D6S3Q, Cell Signaling Technology). Esta región se encuentra muy alejada de la zona afectada por la delección, permitiendo teóricamente, la detección tanto de la proteína *wild-type* como la mutante. Sin embargo, fuimos incapaces de detectar esta proteína aberrante resultante de la mutación en los ratones *U2af1^{mut/+}*. En este caso, igual que ocurría con el otro anticuerpo, la disminución de la proteína U2AF1 *wild-type* no fue estadísticamente significativa en el bazo. En la médula ósea el descenso de la proteína respecto a los controles fue prácticamente igual (76 %) (Figura 18B). El siguiente paso fue examinar si la proteína U2AF1 aberrante realmente se estaba produciendo. Para ello, transfectamos células HEK293T con un plásmido que permitía la sobreexpresión de la proteína *wild-type* o mutante unida a una etiqueta FLAG. De esta forma, incubando con un anticuerpo anti-FLAG pudimos observar una banda que correspondía con el tamaño esperado de la proteína mutante (Figura 18C). Sin embargo, a pesar de la sobreexpresión, la proteína truncada se observó de forma muy

tenue. Por ello, posteriormente al *stripping* de la membrana, esta banda no se detectó al incubar con anti-U2AF1 (cs-D6S3Q). Cabe destacar que, con este último anticuerpo detectábamos tanto la proteína U2AF1 *wild-type* y *mutante* murina como la procedente de las propias células HEK293T. Por ello, y teniendo en cuenta el tamaño de la proteína, deducimos que la banda que se observa en las células transfectadas con el vector de expresión *U2af1* *mutante*, se debe en realidad a la proteína U2AF1 *wild-type* procedente de las células HEK293T. En el caso de las células transfectadas con el vector de expresión *U2af1* *wild-type*, se observó una banda mucho más intensa que engloba tanto la proteína U2AF1 *wild-type* sobreexpresada como la propia de las células HEK293T. En todos los casos, como control de carga se empleó un anticuerpo anti- β -ACTIN (Sigma).

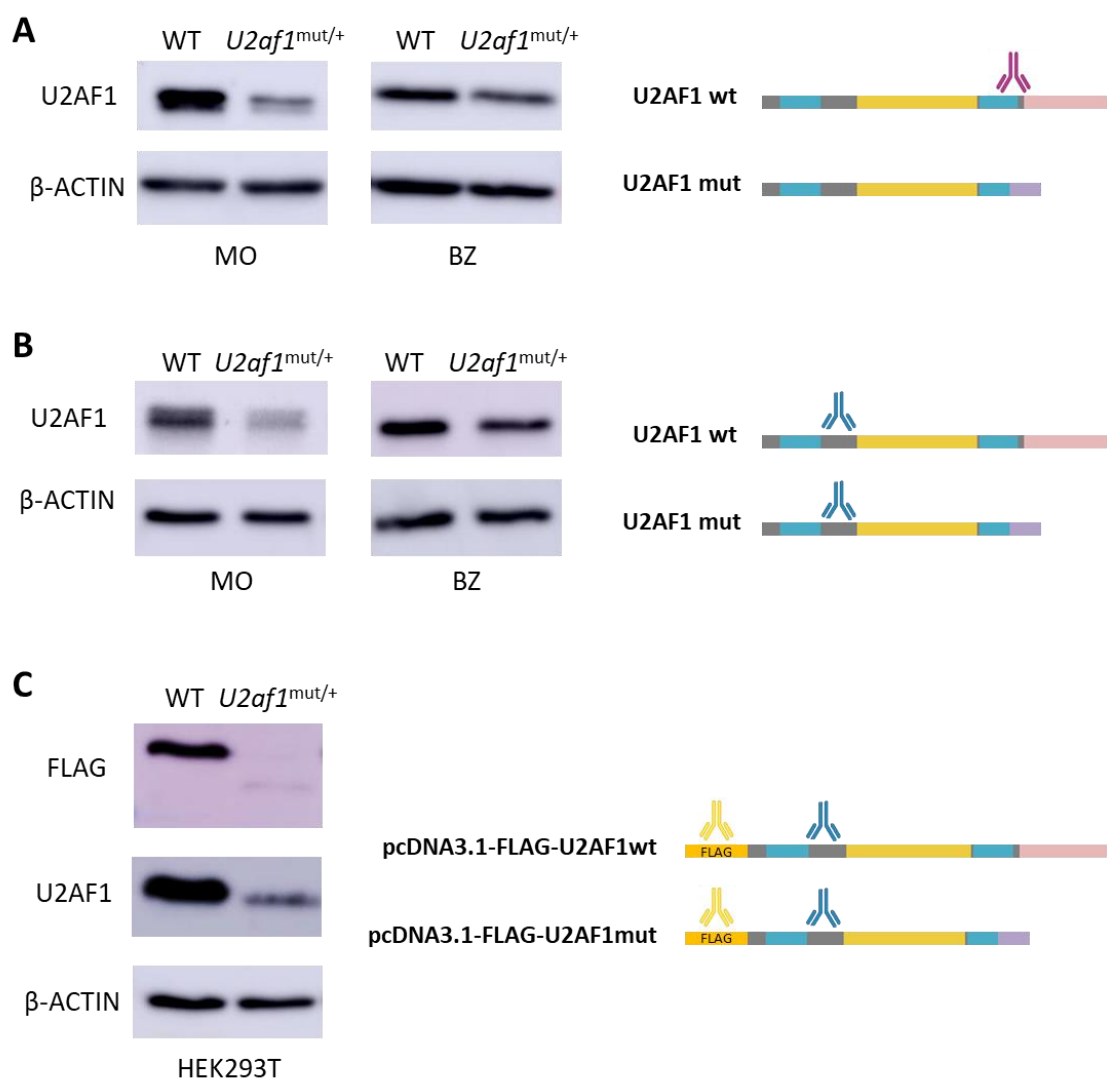


Figura 18. Detección de la proteína U2AF1 por Western blot. (A) Western blot de U2AF1 en células procedentes de médula ósea (MO) y bazo (BZ) usando un anticuerpo C-terminal (ab86305) (WT n = 2, *U2af1*^{mut/+} n=2). (B) Western blot de U2AF1 en células procedentes de MO

Resultados

y BZ usando un anticuerpo N-terminal (cs-D6S3Q) (MO: WT n = 2, *U2af1^{mut/+}* n=2; BZ: WT n = 4, *U2af1^{mut/+}* n=4). (C) *Western blot* de U2AF1 en células HEK293T transfectadas con un vector de sobreexpresión de la proteína *wild-type* (pcDNA3.1-FLAG-U2AF1wt) o mutante (pcDNA3.1-FLAG-U2AF1mut) (WT n = 2, *U2af1^{mut/+}* n=2). Los dominios de la proteína U2AF1 se encuentran representados con diferentes colores; azul: dedos de zinc; gris: región entre dominios; amarillo: sitio de reconocimiento del ARN; rosa: dominios ricos en arginina y serina; morado: secuencia resultante de la delección de 5 nucleótidos.

En conclusión, dado los niveles de expresión del ARNm y de la proteína *wild-type* y mutante, podríamos considerar que nuestra línea *U2af1^{mut/+}* realmente se comporta como una línea *U2af1^{+/-}* y que, por tanto, los posibles efectos en la hematopoyesis o el *splicing* se deben realmente a un efecto de haploinsuficiencia de la proteína.

2. Consecuencias moleculares de la mutación en *Tet2*

De la misma forma que se ha detallado anteriormente con los ratones *U2af1^{mut/+}*, se secuenció por Sanger el ADN procedente de células de la médula ósea de ratones *Tet2^{-/-}*, se corroboró la delección tanto en médula ósea como en bazo mediante PCR convencional con *primers* flanqueantes, y se realizó el análisis de expresión a nivel transcriptómico y proteómico por RT-qPCR y *Western blot*, respectivamente.

Mediante secuenciación Sanger se comprobó que los ratones *Tet2^{-/-}* presentaban una delección de 11 nucleótidos en homocigosis en el exón 3 del gen (Figura 19).

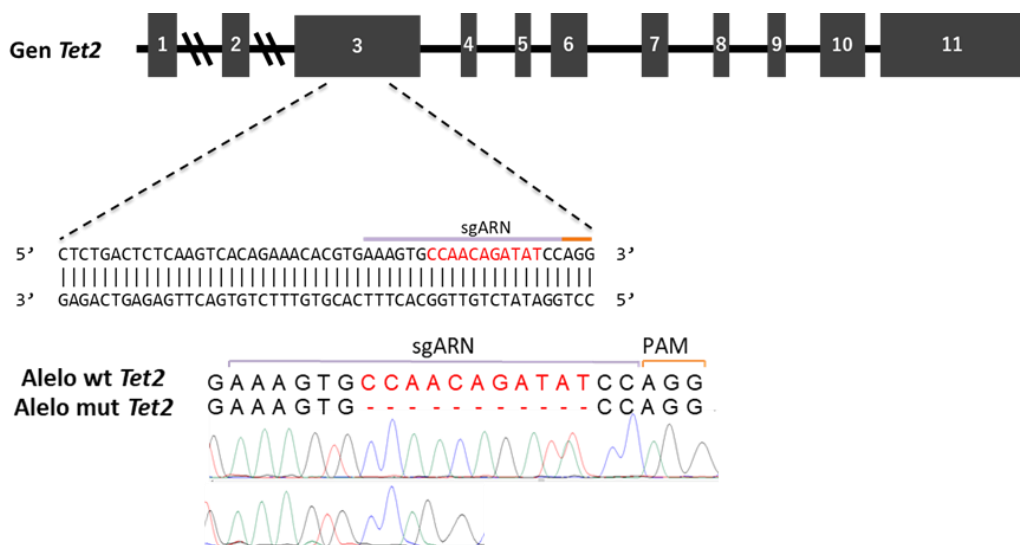


Figura 19. Generación del ratón mutante *Tet2^{-/-}*. Panel superior: secuencia sgARN contra el exón 3 del gen *Tet2* murino. Panel inferior: cromatogramas obtenidos por secuenciación Sanger

con muestras de médula ósea de ratones *wild-type* y *Tet2^{-/-}*. La delección de 11 nucleótidos se indica en rojo.

Esta delección se pudo observar mediante PCR convencional tanto en ADN procedente de la muestra de oreja tomada durante el genotipado, como en células de la médula ósea y el bazo. En el gel de agarosa al 3 % donde se visualizaban los amplicones resultantes de la amplificación, se detectó una banda de 91 pb en los ratones *wild-type*, mientras que en los mutantes *Tet2^{-/-}* presentaba un tamaño de 80 pb (Figura 20).

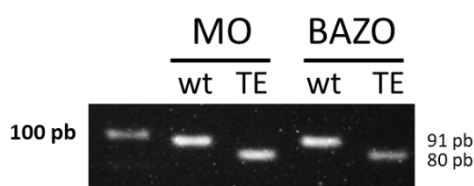


Figura 20. Confirmación de la delección en el gen *Tet2* mediante PCR convencional. Se amplificó la región editada en *Tet2* en muestras de médula ósea (MO) y bazo (BZ) de ratones *wild-type* (wt) y *Tet2^{-/-}* (TE).

El ADNc de las muestras de médula ósea y bazo de los ratones control y *Tet2^{-/-}* y el análisis posterior por qPCR se realizó de la misma forma que se ha detallado anteriormente.

Para calcular la abundancia relativa se empleó la expresión del gen de referencia *Hprt*. Mediante RT-qPCR no se detectó ARNm *wild-type* *Tet2* en ninguno de los tejidos, en las muestras procedentes de los ratones *Tet2^{-/-}* (Figura 21). De esta forma se confirmó que la delección impedía que se generara el ARNm *wild-type* del gen, tratándose por tanto de un modelo de ratón *Tet2* KO.

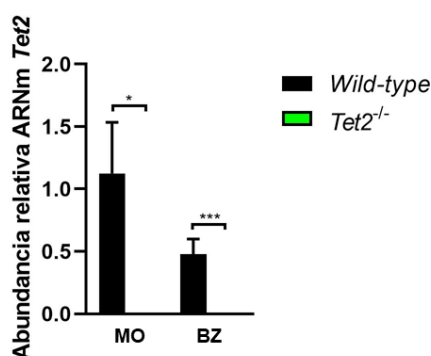


Figura 21. Análisis de la expresión de *Tet2* mediante RT-qPCR. Abundancia relativa del ARNm *wild-type* del gen *Tet2* respecto al gen de referencia *Hprt* en médula ósea (MO) y bazo (BZ) (MO: wt n = 6, *Tet2^{-/-}* n = 7; BZ: wt n = 4, *Tet2^{-/-}* n = 7; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Resultados

En este caso, dado que la delección de 11 nucleótidos se originó al principio de la secuencia codificante de la proteína TET2, su estructura se veía alterada prácticamente en su totalidad, generando teóricamente una proteína de mucho menor tamaño y peso (1036 aminoácidos, 114 kDa) que la proteína *wild-type* (1912 aminoácidos, 210 kDa) (Figura 22).

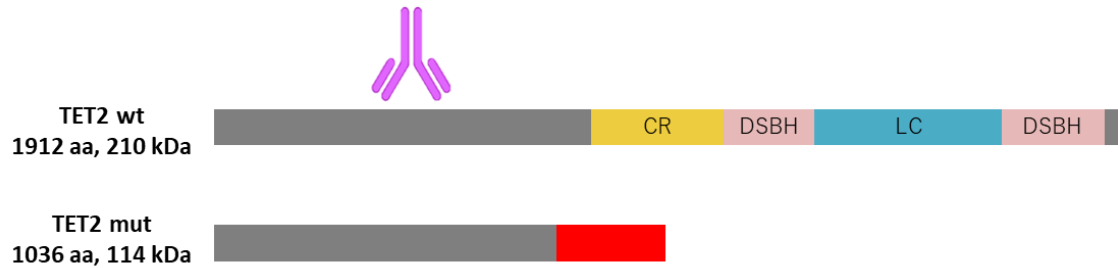


Figura 22. Representación de la proteína TET2 *wild-type* y mutante como resultado de la edición genética por CRISPR/Cas9. El valor de los kDa de la proteína mutante se calculó usando la herramienta informática *online* ExpAsy ProtParam. En morado el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de TET2 (CR: región rica en cisteínas; DSBH: dominio de doble cadena de hélice β ; LC: región de baja complejidad).

Para detectar la proteína *wild-type* y la posible proteína truncada, se empleó un anticuerpo anti-TET2 cedido por el Dr. Kasper Rasmussen (Helin Lab),²¹³ que reconocía el extremo N-terminal de la proteína. Teóricamente, esta región no se veía afectada de forma directa por la mutación.

Tanto en las bases de datos *online* como en nuestra RT-qPCR, se observó una mayor expresión del gen *Tet2* en la médula ósea. Por ello, para llevar a cabo el *Western blot*, se obtuvo el extracto de proteína total de las células procedentes de este tejido. Como se puede observar en la Figura 23, en los ratones *Tet2*^{-/-}, no se detectó la proteína *wild-type* ni la truncada.

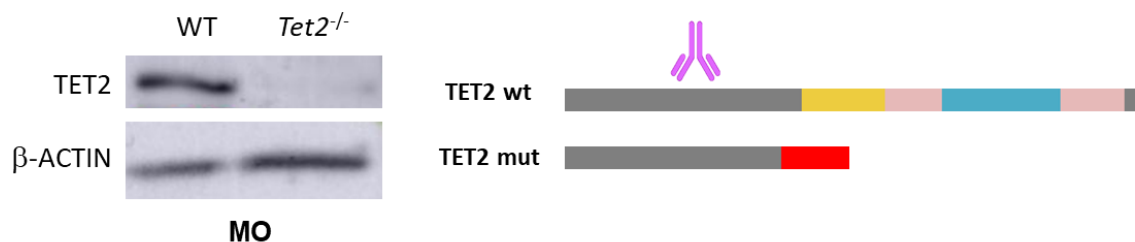


Figura 23. Detección de la proteína TET2 por *Western blot*. *Western blot* de TET2 en células procedentes de la médula ósea (MO) usando un anticuerpo no comercial que reconoce el extremo N-terminal (wt n = 2, *Tet2*^{-/-} n = 2).

3. Efectos hematológicos de la mutación en *U2af1*, *Tet2* o ambos en el ratón

En este apartado se pretendía estudiar cómo las alteraciones en un factor de *splicing* como es *U2af1*, podían afectar a la hematopoyesis en concurrencia o no de mutaciones en genes epigenéticos, como es *Tet2*. Para ello, se realizó un estudio en profundidad de los 3 tejidos hematopoyéticos que se encuentran principalmente afectados en SMD: sangre, médula ósea y bazo, en ratones *U2af1^{mut/+}*, *Tet2^{-/-}* y el doble mutante *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*.

3.1. Alteraciones en sangre

Las muestras de sangre se emplearon para su análisis por CF y, el volumen restante, para estudiar el hemograma.

Por CF las células mieloides se identificaron con el inmunofenotipo Mac-1⁺ y Mac-1⁺ Gr-1⁺, mientras que los linfocitos T eran CD4⁺ o CD8⁺ y los B, B220⁺. Como se puede ver en la Figura 24, las células T se vieron incrementadas en los ratones *U2af1^{mut/+}*. Sin embargo, este incremento fue mucho mayor en los ratones doble mutantes. Éstos presentaban, además, un aumento en las células mieloides con inmunofenotipo Mac-1⁺ Gr-1⁺. Estas células se encontraban también muy incrementadas en los ratones *Tet2^{-/-}*, en concordancia con otros modelos KO de *Tet2* que muestran un sesgo mioide.

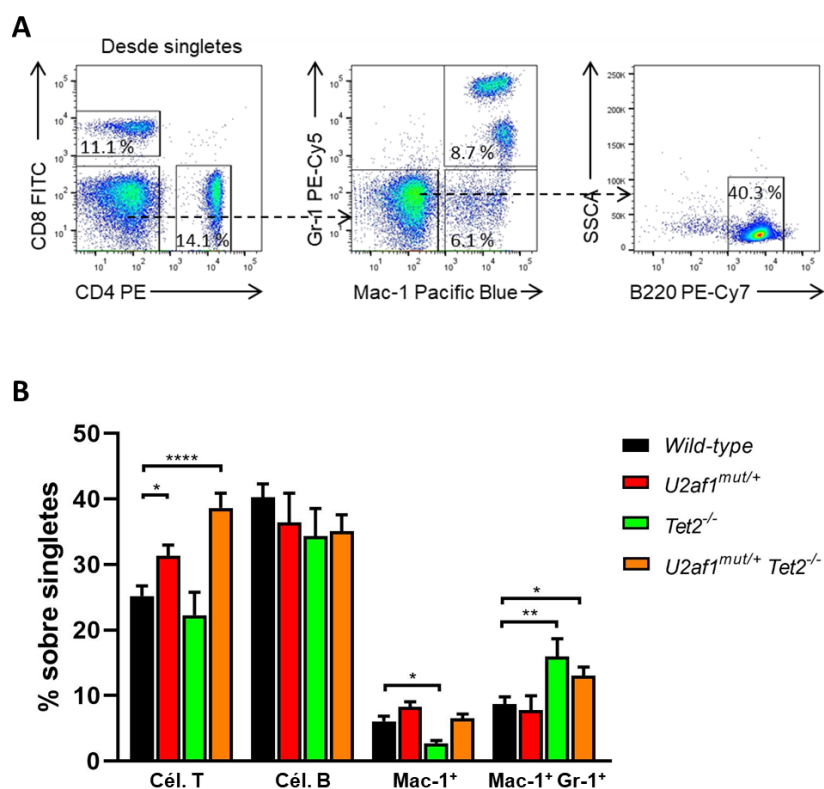


Figura 24. Determinación por citometría de flujo de las poblaciones maduras halladas en sangre periférica. (A) Estrategia de análisis representativa del grupo control. Los números indican las medias de los valores. **(B)** Frecuencias de las células maduras en sangre periférica en ratones de 8-39 semanas (wt n = 30, *U2af1^{mut/+}* n = 9, *Tet2^{-/-}* n = 11, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 13. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Los parámetros del hemograma más relevantes se encuentran representados en la Figura 25. Como se puede observar, los ratones *U2af1^{mut/+}* presentaron un aumento de glóbulos blancos (WBC) y una ligera disminución de glóbulos rojos (RBC) respecto a los controles. Esta disminución fue observada también en los ratones *Tet2^{-/-}*. Sin embargo, en este caso, iba acompañada de una disminución en los niveles de hemoglobina. Por el contrario, los ratones *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* no presentaron ninguna alteración estadísticamente significativa, aunque mostraban un ligero descenso en el número de plaquetas.

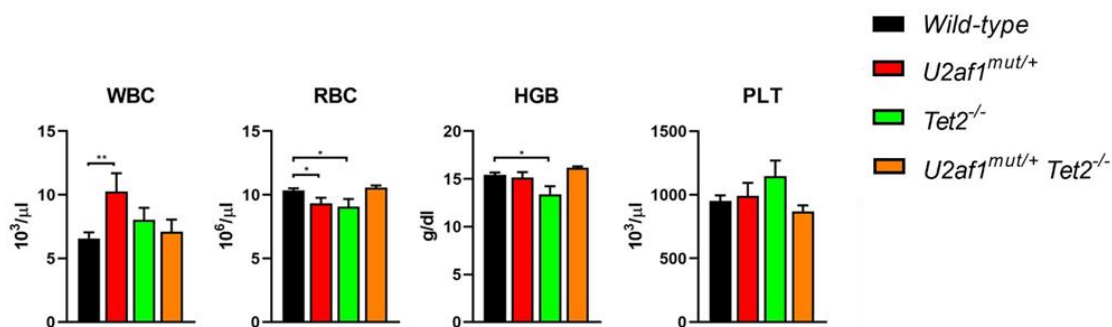


Figura 25. Conteo celular en sangre periférica adquirido en un analizador hematológico. Niveles de las células maduras obtenidas por un equipo Sysmex XT-2000 en ratones de 8-39 semanas (WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; PLT: plaquetas. wt n = 22, *U2af1^{mut/+}* n = 8, *Tet2^{-/-}* n = 11, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 12. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.2. Alteraciones en bazo

Algunos pacientes de SMD pueden presentar esplenomegalia, es decir, un aumento significativo del tamaño del bazo debido a una hematopoyesis extramedular. Por ello, los bazos se pesaron utilizando una balanza de peso convencional.

Por un lado, los ratones *Tet2^{-/-}* presentaban un tamaño de bazo significativamente superior. Este rasgo presentaba penetrancia incompleta, puesto que este aumento no se daba en todos los ratones *Tet2^{-/-}*. En el caso de los ratones *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* la mayor parte de los bazos presentaba un tamaño similar al de los controles. Sin embargo, hubo

un caso (1/14) en el que también se detectó esplenomegalia. En el análisis del bazo por CF, este ratón presentaba una notable disminución de linfocitos T (5.46 vs 28.33 %), linfocitos B (8.7 vs 37.5 %) y un incremento de células mieloides Mac-1⁺ Gr-1⁺ (2.19 vs 5.63 %). Por otro lado, los ratones de la línea *U2af1^{mut/+}* tenían un bazo significativamente menor que los controles. Esto posiblemente era debido al menor tamaño de los ratones *U2af1^{mut/+}* respecto a los *wild-type* (Figura 26A y 26B).

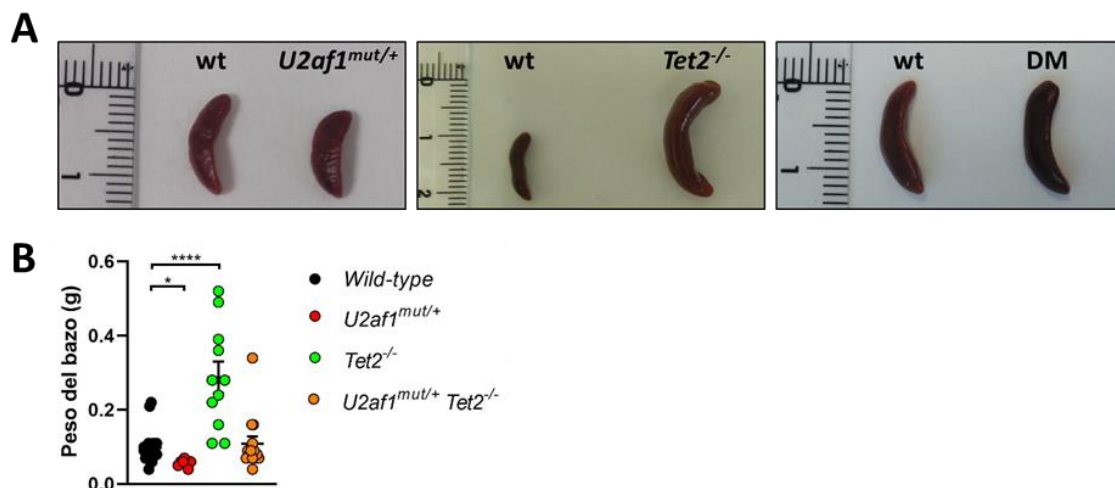


Figura 26. Análisis macroscópico del bazo. (A) Imágenes representativas del tamaño de los bazo (DM: doble mutante *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*). (B) Cuantificación del peso del bazo en ratones de 8-39 semanas (wt n = 23, *U2af1^{mut/+}* n = 7, *Tet2^{-/-}* n = 11, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 14. * p < 0.05; **** p < 0.0001).

A continuación, se llevó a cabo el análisis de una fracción del bazo por CF. Los marcadores de inmunofenotipo fueron los mismos que los empleados en la tinción de sangre periférica (CD4⁺, CD8⁺, Mac-1⁺, Mac-1⁺ Gr-1⁺ y B220⁺). En los esplenocitos procedentes de los ratones *Tet2^{-/-}* se observó, de forma estadísticamente significativa, un descenso en los linfocitos B e, igual que en sangre, un aumento de las células mieloides Mac-1⁺ Gr-1⁺. En el caso de los ratones *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, las células B se vieron incrementadas, pero este crecimiento no fue significativo en ninguno de los casos (Figura 27).

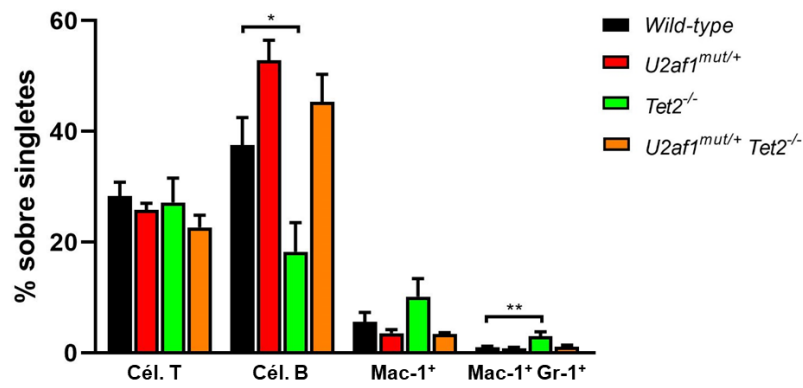


Figura 27. Determinación por citometría de flujo de las poblaciones maduras halladas en bazo. Frecuencias de las células maduras en bazo en ratones de 8-39 semanas (wt n = 21, *U2af1^{mut/+}* n = 7, *Tet2^{-/-}* n = 11, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 11. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Por último, como se ha comentado anteriormente, una porción de los bazos se guardó para su análisis histológico. Las muestras se fijaron y parafinaron y, a continuación, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Como se puede ver en la Figura 28, el ratón doble mutante con esplenomegalia poseía una estructura aberrante del bazo con disrupción de la pulpa blanca y la pulpa roja.

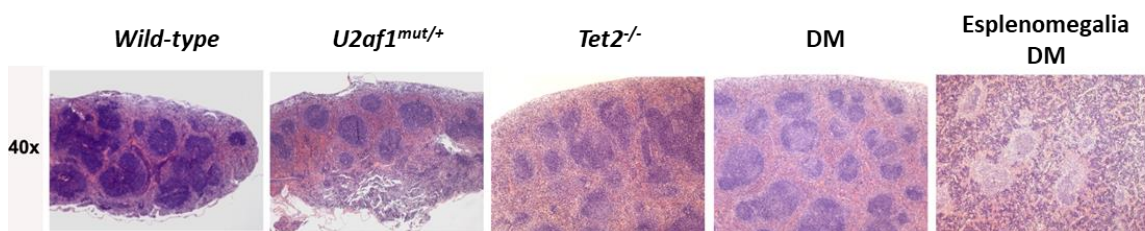


Figura 28. Imágenes histológicas representativas de secciones de bazo. Tinción con hematoxilina-eosina de porciones de bazos de ratones de 8-39 semanas (DM: doble mutante *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*. wt n = 2, *U2af1^{mut/+}* n = 1, *Tet2^{-/-}* n = 1, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 2).

3.3. Alteraciones en médula ósea

Como se puede observar en la tinción May-Grünwald Giemsa (MGG) de células de médula ósea de los ratones, no se detectaron grandes diferencias entre los diferentes genotipos en cuanto a los tipos celulares que constituían el citospin. En todos los casos se pudieron detectar eritroblastos así como células mieloides, principalmente neutrófilos y monocitos (Figura 29).

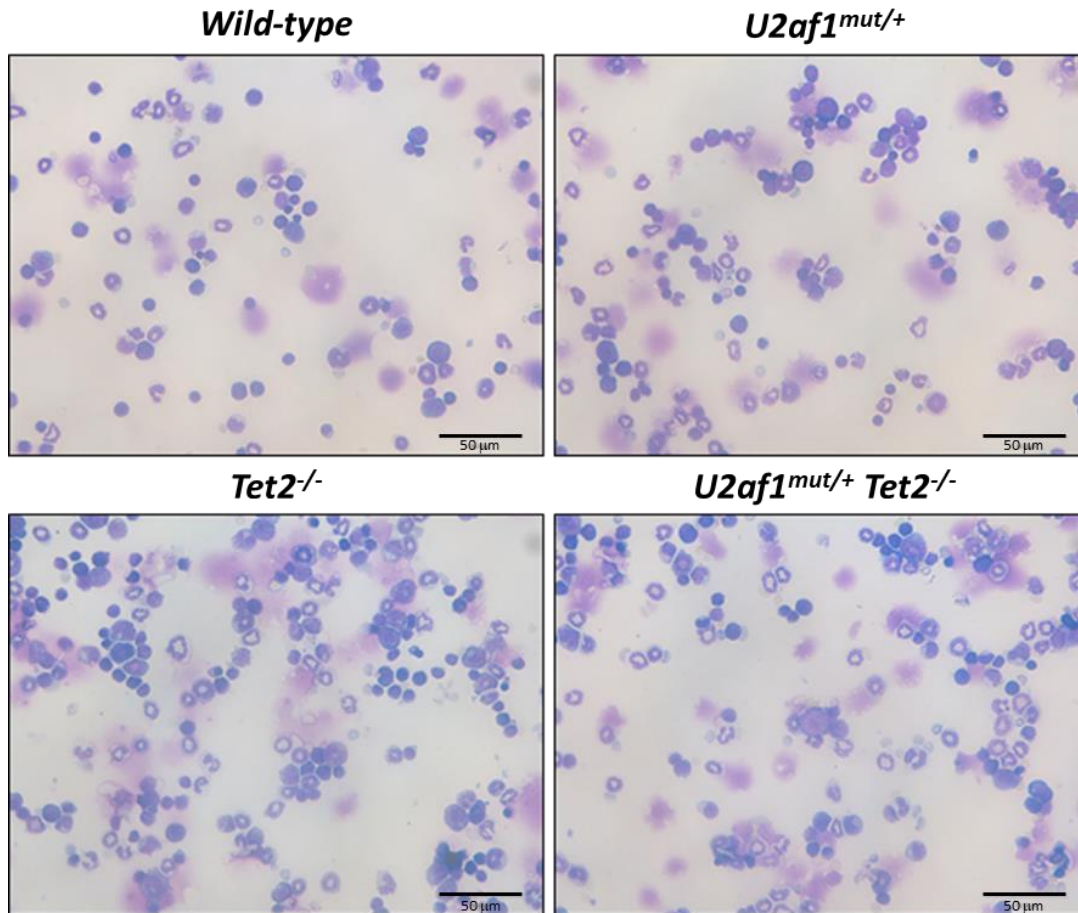


Figura 29. Imágenes morfológicas representativas de la médula ósea. Tinción con May-Grünwald Giemsa en células de médula ósea procedentes de ratones de 8-39 semanas (wt n = 3, $U2af1^{mut/+}$ n = 3, $Tet2^{-/-}$ n = 3, $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ n = 3).

A continuación, se empleó CF para la detección y clasificación de las células madre y los progenitores mieloeritroides ($Lin^{-} Sca-1^{-} c-kit^{+}$) según el inmunofenotipo establecido por ¹². Esta fracción no se vio alterada de forma estadísticamente significativa en ninguna de las líneas mutantes (Figura 30A).

A partir de este compartimento, se analizaron los diferentes progenitores mieloeritroides. En el caso de los ratones $U2af1^{mut/+}$, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los precursores analizados, a pesar de que los Pre CFU-E se encontraban marcadamente disminuidos. Los ratones $Tet2^{-/-}$ únicamente mostraban un descenso significativo de los progenitores eritroides CFU-E. Sin embargo, los doble mutantes $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$, presentaban alteraciones en casi todos los progenitores analizados, viéndose incrementados los precursores mieloides Pre GM y disminuidos los eritroides Pre CFU-E y CFU-E y megacariocíticos-eritroides Pre MegE (Figura 30B).

Resultados

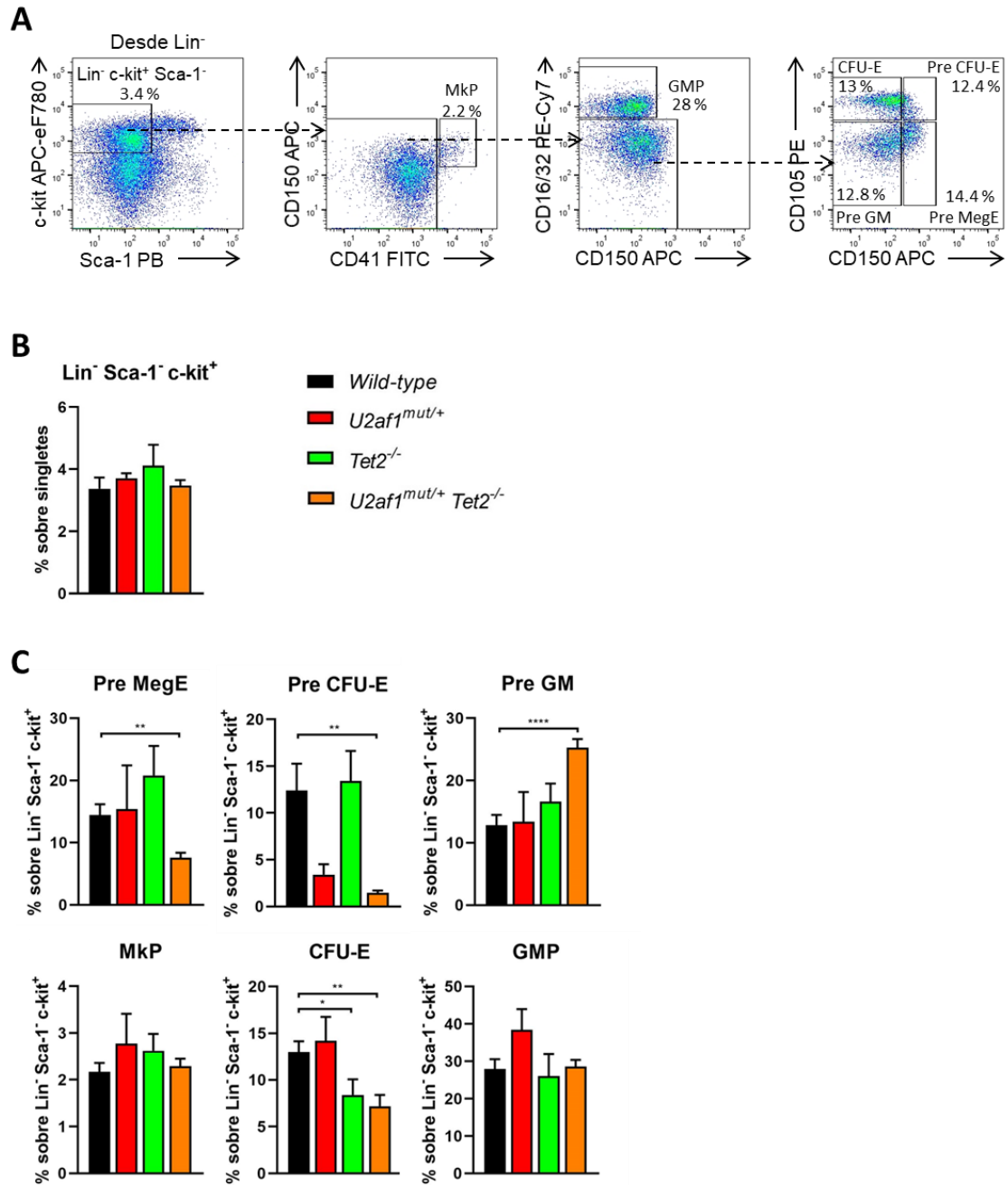


Figura 30. Determinación por citometría de flujo de los progenitores mieloeritroides hallados en médula ósea. (A) Estrategia de análisis representativa del grupo control. Los números indican las medias de los valores. **(B)** Frecuencias de los progenitores (Lin⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺) en médula ósea de ratones de 8-39 semanas. **(C)** Frecuencias de los diferentes progenitores mieloeritroides, siguiendo el inmunofenotipo detallado por Pronk *et al.*, 2007 (wt n = 30, *U2af1*^{mut/+} n = 9, *Tet2*^{-/-} n = 11, *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} n = 13. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Los SMD se producen cuando las células hematopoyéticas más inmaduras adquieren mutaciones que afectan al correcto funcionamiento de la célula. Por ello, para comprender mejor los efectos de estas alteraciones y su trascendencia en la

patogénesis de la enfermedad, es muy importante estudiar la funcionalidad de las HSPC tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello, se analizó la fracción LSK porque esta fracción comprende el compartimento más inmaduro e indiferenciado de las células hematopoyéticas y por su similitud a la fracción CD34⁺ en humano. Como se puede ver en la Figura 31, las LSK se encontraron visiblemente incrementadas en los ratones *Tet2*^{-/-} y todavía más en el doble mutante *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-}.

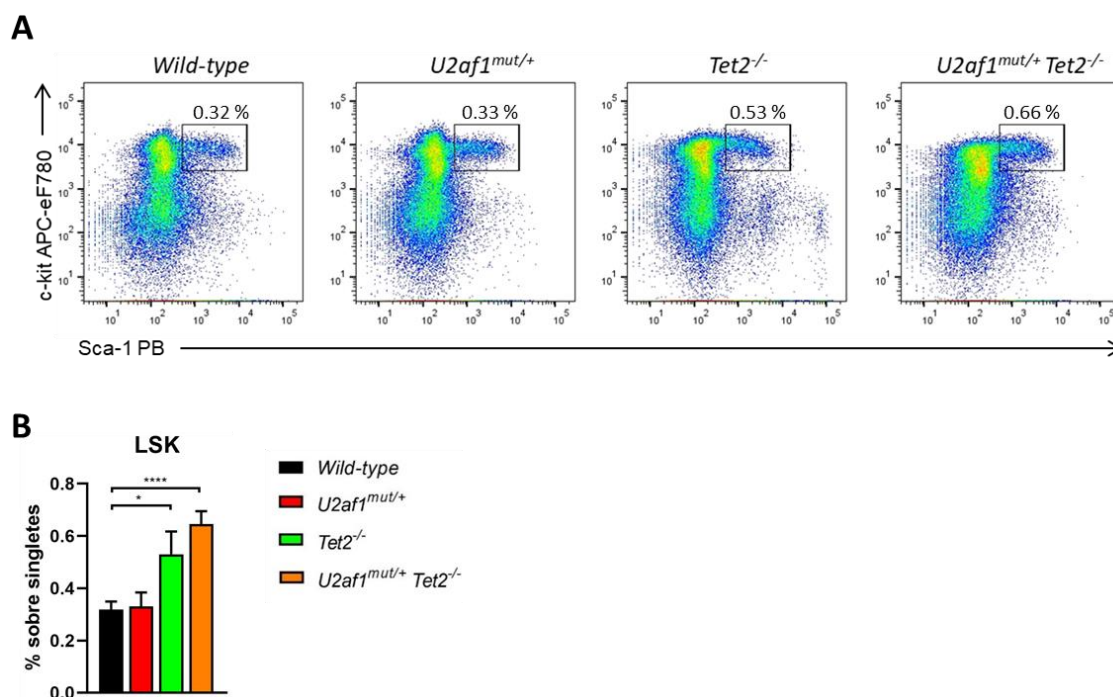


Figura 31. Determinación por citometría de flujo de las LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) halladas en médula ósea. (A) Estrategia de análisis representativa de cada grupo analizado. Los números indican las medias de los valores. **(B)** Frecuencias de LSK en médula ósea de ratones de 8-39 semanas (wt n = 20, *U2af1*^{mut/+} n = 5, *Tet2*^{-/-} n = 11, *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} n = 13. * *p* < 0.05; **** *p* < 0.0001).

3.3.1. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) de progenitores hematopoyéticos

Para determinar *in vitro* la funcionalidad de las HSPC de los ratones, se plaquearon células de la médula ósea en metilcelulosa que contenía citoquinas de soporte, bien para el crecimiento de CFU-GM (SCF, IL-3, IL-6) o para el crecimiento de BFU-E (EPO).

Como se puede ver en la Figura 32, se detectó un incremento significativo en el número de colonias mieloides CFU-GM en los ratones *Tet2*^{-/-}. El número de colonias eritroides BFU-E observado en los ratones *Tet2*^{-/-} y *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} fue menor que en los

controles. No obstante, esta variación no resultó estadísticamente significativa. Los ratones *U2af1^{mut/+}* no presentaron ningún cambio con respecto a los controles.

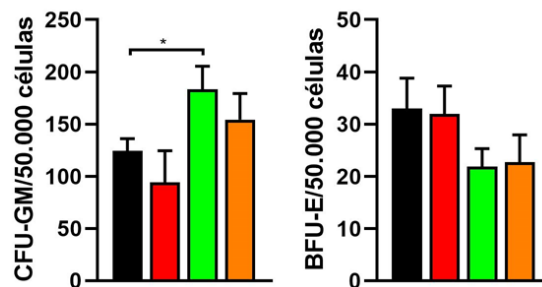


Figura 32. Determinación de CFU originadas a partir de células de la médula ósea. Frecuencias de las CFU-GM o BFU-E después de incubar, durante 7 o 10 días (respectivamente), en metilcelulosa células procedentes de la médula ósea de ratones de 12-18 semanas (CFU-GM: wt n = 8, *U2af1^{mut/+}* n = 4, *Tet2^{-/-}* n = 4, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 4; BFU-E: wt n = 7, *U2af1^{mut/+}* n = 3, *Tet2^{-/-}* n = 4, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 4. * p < 0.05).

3.3.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante hematopoyético competitivo permite valorar *in vivo* la funcionalidad de las HSPC, evaluándose la capacidad de injertar y producir los diferentes linajes hematopoyéticos en el receptor. Para poder evaluar la eficiencia del trasplante mediante un sencillo análisis de sangre por CF, se emplearon ratones que poseían diferentes alelos del gen del antígeno común leucocitario *Cd45*. Así pues, los ratones controles y mutantes a estudiar presentaban el alelo CD45.2; mientras que, los ratones competidores poseían el alelo CD45.1.

En primer lugar, se realizó un trasplante competitivo de médula total (sin fraccionar). Para ello, se inyectaron, a través de la vena de la cola de ratones previamente irradiados, 1×10^6 células *test* (procedentes de ratones mutantes o controles CD45.2) y el mismo número de células competidoras (procedentes de un ratón *wild-type* CD45.1). A las 4 y 8 semanas post-trasplante, se analizó una muestra de sangre periférica de los ratones receptores y se calculó el quimerismo de células donantes CD45.2⁺.

Como se puede observar en la Figura 33A, las células procedentes de los ratones mutantes *U2af1^{mut/+}* y de los doble mutantes, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, fueron incapaces de injertar en los ratones receptores. Por el contrario, los ratones trasplantados con células *Tet2^{-/-}*, presentaron un quimerismo incluso mayor que los controles. Al analizar los diferentes linajes hematopoyéticos procedentes de las células donantes, se observó un descenso de linfocitos T y un incremento de células Mac-1⁺ Gr-1⁺ (Figura 33B). Este

incremento ya se observó con anterioridad en el análisis de sangre periférica de los ratones *Tet2*^{-/-} (Figura 24), y es consistente con la tendencia mielóide que caracteriza a los ratones *Tet2* KO.

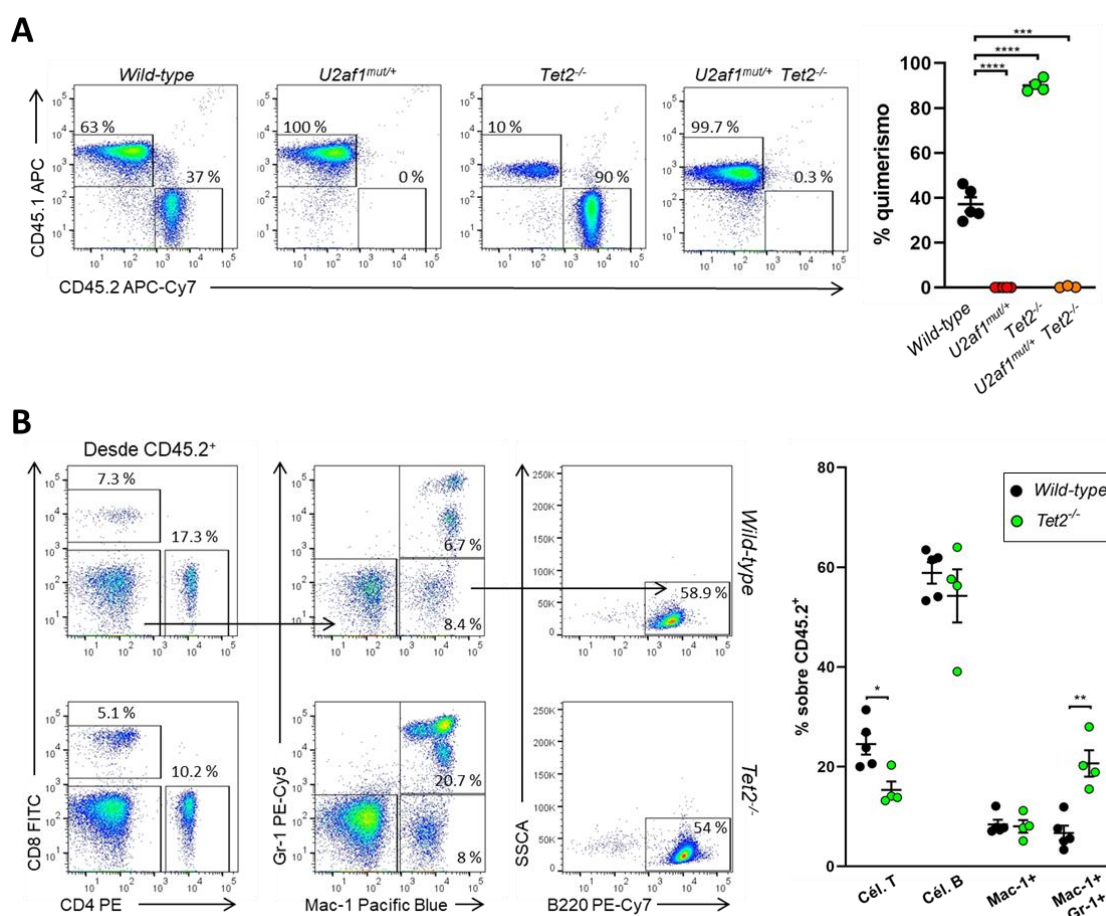


Figura 33. Trasplante competitivo de células de la médula ósea. Se trasplantaron a través de la vena de la cola 1×10^6 células *wild-type* o mutante (CD45.2) junto con la misma cantidad de células competidoras (CD45.1). **(A)** Análisis del quimerismo (células donantes CD45.2 *versus* receptoras CD45.1) a las 8 semanas post-trasplante (*wt* $n = 5$, *U2af1*^{mut/+} $n = 5$, *Tet2*^{-/-} $n = 4$, *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} $n = 3$; $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). **(B)** Evaluación del quimerismo hematopoyético multilínea a las 8 semanas post-trasplante en ratones trasplantados con células *wt* o *Tet2*^{-/-}. Los números indican las medias de los valores dentro de la fracción del donante (CD45.2) (*wt* $n = 5$ y *Tet2*^{-/-} $n = 4$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

En segundo lugar, para confirmar si el fallo en la capacidad de injertar de las células procedentes de los ratones *U2af1*^{mut/+} y *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} se debía a un problema en las HSPC, se realizó un trasplante competitivo de células LSK. Una vez obtenidas las células LSK empleando el separador celular FACS Aria-III (Becton Dickinson) de la Unidad de Citómica del IIS La Fe, se comprobó la pureza de la fracción separada (Figura 34), la cual alcanzaba en promedio un 85 %.

Resultados

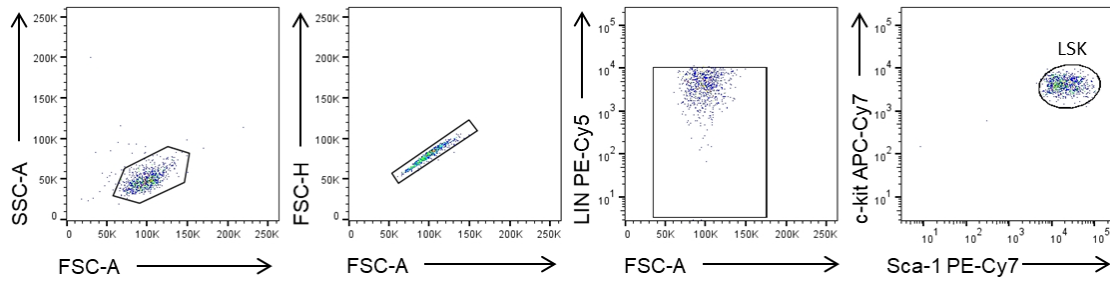


Figura 34. Determinación de la pureza de las células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$), procedentes de la médula ósea, para trasplantar.

Para realizar el trasplante, se inyectaron a través de la vena de la cola de ratones CD45.1 previamente irradiados, 8 000 LSK CD45.2, procedentes de ratones controles o mutantes $U2af1^{mut/+}$, y 2×10^5 células de soporte, procedentes de ratones CD45.1. Estas últimas, proporcionan al ratón trasplantado las células maduras necesarias para su supervivencia durante el periodo de tiempo que las células LSK se diferencian y producen el resto de linajes.

Al igual que se observó en el trasplante de médula total, las células LSK de los ratones $U2af1^{mut/+}$ fueron totalmente incapaces de injertar en los ratones receptores (Figura 35). Confirmando, por tanto, que el problema reside en las células LSK.

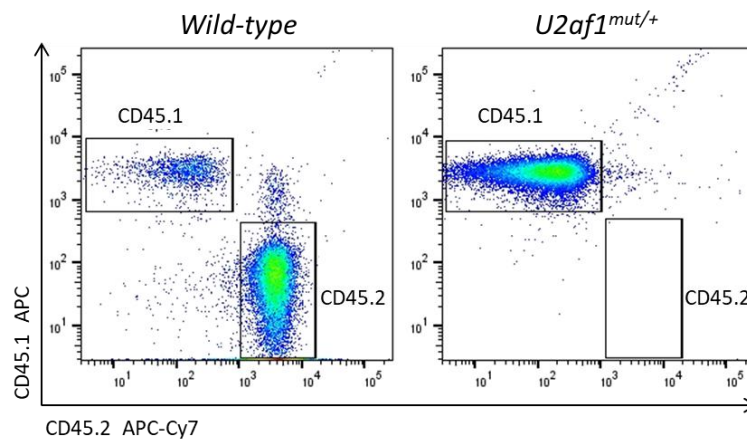


Figura 35. Trasplante competitivo de células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) de la médula ósea. Se trasplantaron a través de la vena de la cola 8 000 LSK *wild-type* o $U2af1^{mut/+}$ (CD45.2) junto con 2×10^5 células de soporte/competidoras (CD45.1). Se analizó el quimerismo (células donantes CD45.2 versus receptoras CD45.1) a las 8 semanas post-trasplante (wt n = 13, $U2af1^{mut/+}$ n = 14).

3.4. Resumen del fenotipo hematológico observado en los diferentes ratones mutantes

En la Tabla 15, se puede observar un resumen de todas las alteraciones hematológicas que presentaban los ratones de los diferentes genotipos en comparación con los controles *wild-type*.

Tabla 15. Resumen de los cambios fenotípicos encontrados en las diferentes líneas de ratones mutantes en comparación con los controles.

		<i>U2af1^{mut/+}</i>	<i>Tet2^{-/-}</i>	Doble mutante
Sangre	CF	↑ Células T	↓ Mac-1 ⁺ ↑↑ Mac-1 ⁺ Gr-1 ⁺	↑↑↑↑ Células T ↑ Mac-1 ⁺ Gr-1 ⁺
	Hemograma	↑↑ Leucocitos ↓ Hematíes	↓ Hematíes ↓ Hemoglobina	-
Bazo	Análisis macroscópico	↓ Tamaño	↑↑↑↑ Tamaño	1/14: ↑ Tamaño
	Histología	-	-	1/14: Disrupción pulpa roja y pulpa blanca
	CF	-	↓ Células B ↑↑ Mac-1 ⁺ Gr-1 ⁺	-
Médula ósea	HSPC	-	↑ LSK ↑ CFU-GM	↑↑↑↑ LSK
	Progenitores	-	↓ CFU-E	↓↓ Pre MegE ↓↓ Pre CFU-E ↑↑↑↑ Pre GM ↓↓ CFU-E
	Morfología	-	-	-
	Trasplante	Nula capacidad de injertar	Capacidad de injertar incrementada	Nula capacidad de injertar

↑: incremento. ↓: disminución. El número de flechas aumenta en función de la significancia. Doble mutante: *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*; CF: citometría de flujo, HSPC: células madre y progenitoras hematopoyéticas.

4. Efectos en el perfil transcriptómico de las HSPC de los diferentes ratones mutantes

Para comprender mejor la incapacidad de las células $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ de injertar en los ratones trasplantados, se comparó el perfil transcriptómico de las HSPC de los ratones mutantes frente al de los controles. Las muestras *paired-end* fueron secuenciadas por la empresa Novogene (China) en el equipo Novaseq 6000 (Illumina). Posteriormente, el bioinformático del grupo de Investigación en Hematología y Hemoterapia analizó los resultados.

4.1. Calidad de los datos de ARN-seq

El primer paso de nuestro análisis de datos de ARN-seq, fue el análisis de calidad de nuestras lecturas. Para ello se utilizaron los ficheros FASTQ y el programa FASP, una herramienta de control de calidad de datos de secuenciación de nueva generación. Al concluir cada carrera se analizaron sus métricas para poder confirmar la correcta secuenciación de las muestras. En este paso se obtuvieron las lecturas limpias tras eliminar aquellas que contenían adaptadores, secuencias con poli-N y lecturas de baja calidad. Además, se calcularon el Q20 (equivale a 1 error cada 100 bases) y Q30 (equivale a 1 error cada 1000 bases) así como el contenido GC (Figura 36).

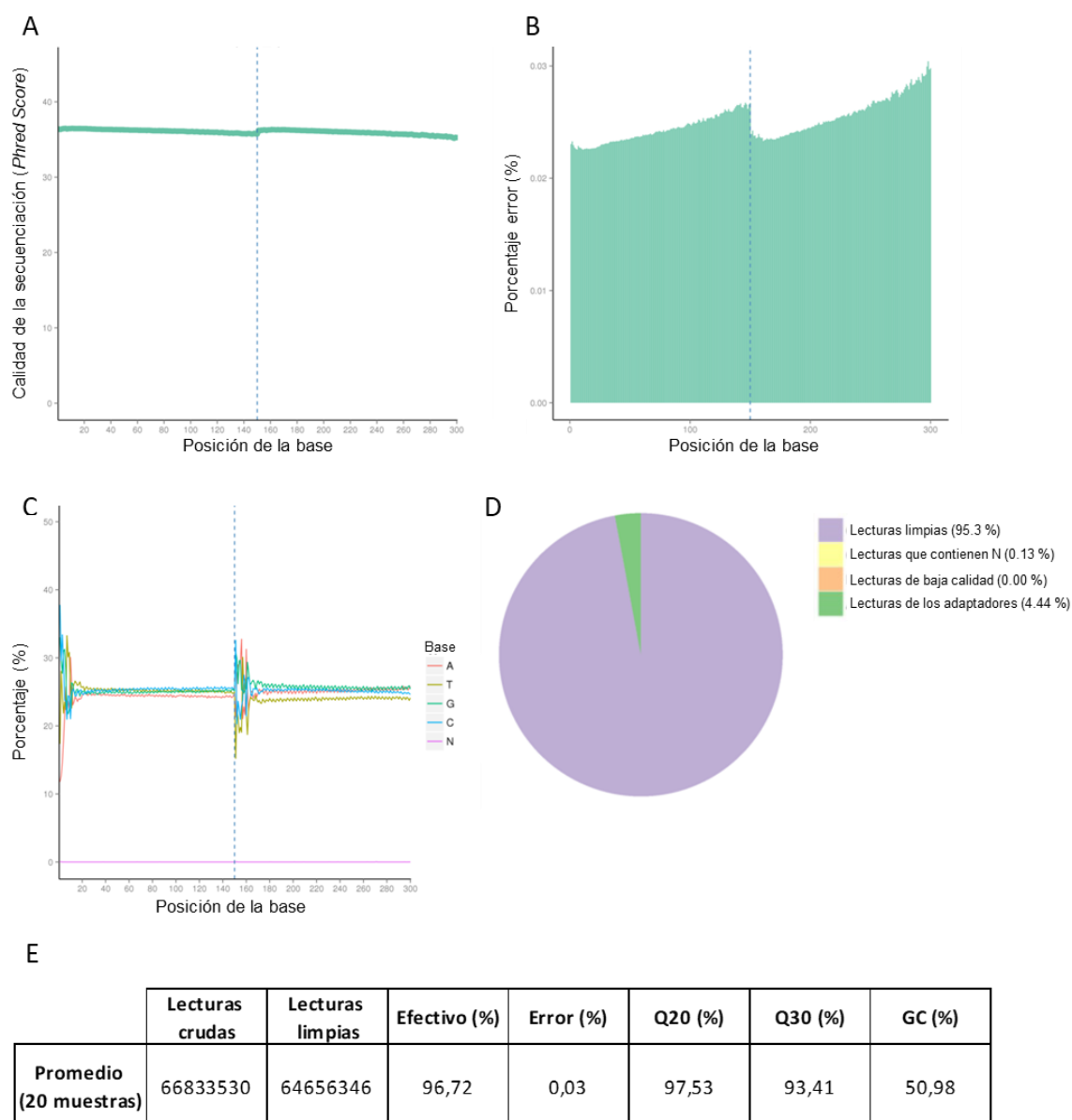


Figura 36. Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas por ARN-seq. Los gráficos mostrados son representativos de las 20 muestras secuenciadas. **(A)** Distribución de la calidad de la secuenciación. Phred score = 30 equivale a error = 1/1 000 bases. Phred score = 40 equivale a error = 1/10 000 bases. **(B)** Distribución del ratio de error de la secuenciación. **(C)** Distribución de las bases A/T/G/C en las lecturas. **(D)** Clasificación de las lecturas crudas. **(E)** Métricas de la calidad de la secuenciación. Los valores mostrados representan el valor promedio tras considerar las 20 muestras (wt n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 4, *Tet2^{-/-}* n = 6, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 5).

4.2. Análisis de la expresión génica de los ratones mutantes

Al comparar con los controles, se encontraron 180 genes desregulados (p-valor ajustado < 0.05) en los ratones *U2af1^{mut/+}* de forma estadísticamente significativa, 1504 en los ratones *Tet2^{-/-}* y 554 en los *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* (Tabla 16).

Tabla 16. Genes diferencialmente expresados en las diferentes líneas de ratones mutantes en comparación con los controles.

	Diferencialmente expresados	Sobreexpresados	Infraexpresados
<i>U2af1^{mut/+}</i>	180	58	122
<i>Tet2^{-/-}</i>	1504	728	776
<i>U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}</i>	554	325	229

4.3. Análisis del *splicing* alternativo de los ratones mutantes

Empleando el paquete bioinformático rMATS se estudió el *splicing* alternativo diferencial entre mutantes y controles. Se consideraron eventos estadísticamente significativos aquellos que poseían p -valor ≤ 0.01 , $FDR \leq 0.01$ y $\Delta PSI \geq 0.1$. Así pues, los ratones *U2af1^{mut/+}* fueron los que presentaron un mayor número de eventos alternativos, 1578, respecto a los controles. Mientras que, en los ratones *Tet2^{-/-}* se detectaron 1211 eventos alternativos y en los doble mutantes 1242. En todos los casos el tipo de evento más predominante fue el salto de exón (Figura 37A). De todos los genes que presentaban eventos de *splicing* alternativo diferencial respecto a los controles, 152 fueron coincidentes en las 3 líneas mutantes de ratón (Figura 37B).

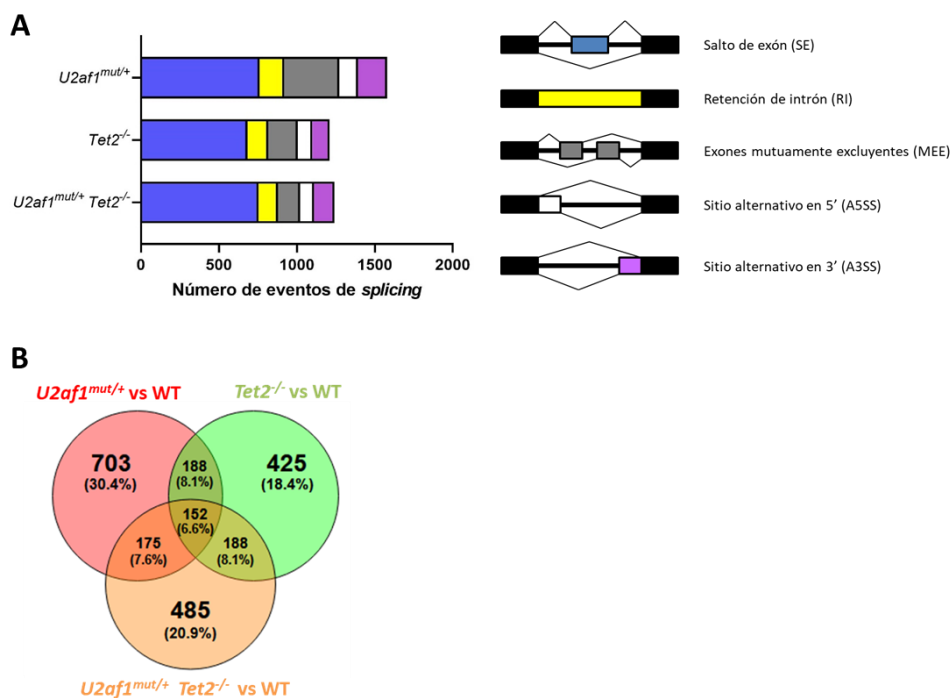


Figura 37. Análisis de los eventos de *splicing* aberrante detectados por ARN-seq. (A) Número de eventos de *splicing* alternativo detectados por rMATS que presentaban $p \leq 0.01$, $FDR \leq 0.01$ y $\Delta PSI \geq 0.1$. **(B)** Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de los genes que poseen eventos de *splicing* alternativo en los diferentes grupos comparados (wt $n = 5$, *U2af1^{mut/+}* $n = 4$, *Tet2^{-/-}* $n = 6$, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* $n = 5$).

En el análisis de componentes principales de los eventos de *splicing* alternativo, hubo segregación de todos los genotipos respecto al control, siendo el grupo de los ratones *U2af1^{mut/+}* el que presentaba mayor heterogeneidad (Figura 38).

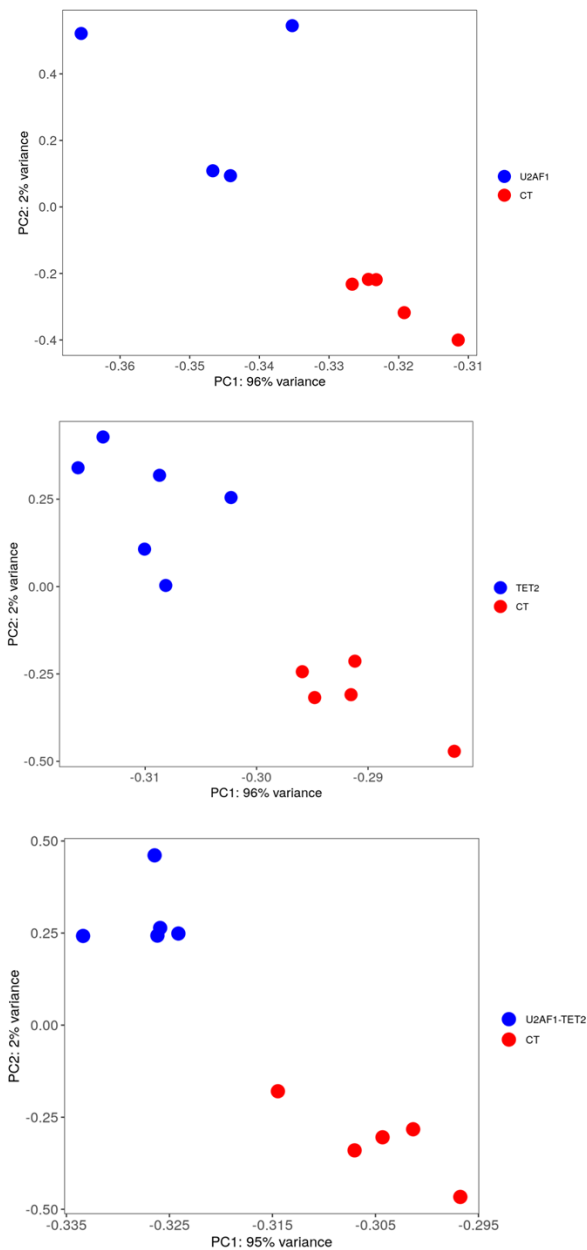


Figura 38. Análisis de componentes principales (PCA) de los genes que presentan *splicing* aberrante en los mutantes en comparación con los controles (*wt* n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 4, *Tet2^{-/-}* n = 6, *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* n = 5).

Empleando la herramienta DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), se realizó el enriquecimiento funcional de la lista de genes que poseían *splicing* diferencial. De esta forma, se obtuvieron las rutas biológicas alteradas en los mutantes (Figuras 39-41). Por

Resultados

un lado, las rutas que se vieron más afectadas en los ratones *U2af1^{mut/+}* fueron aquellas relacionadas con el ciclo celular, el daño al ADN o la división celular (Figura 39).

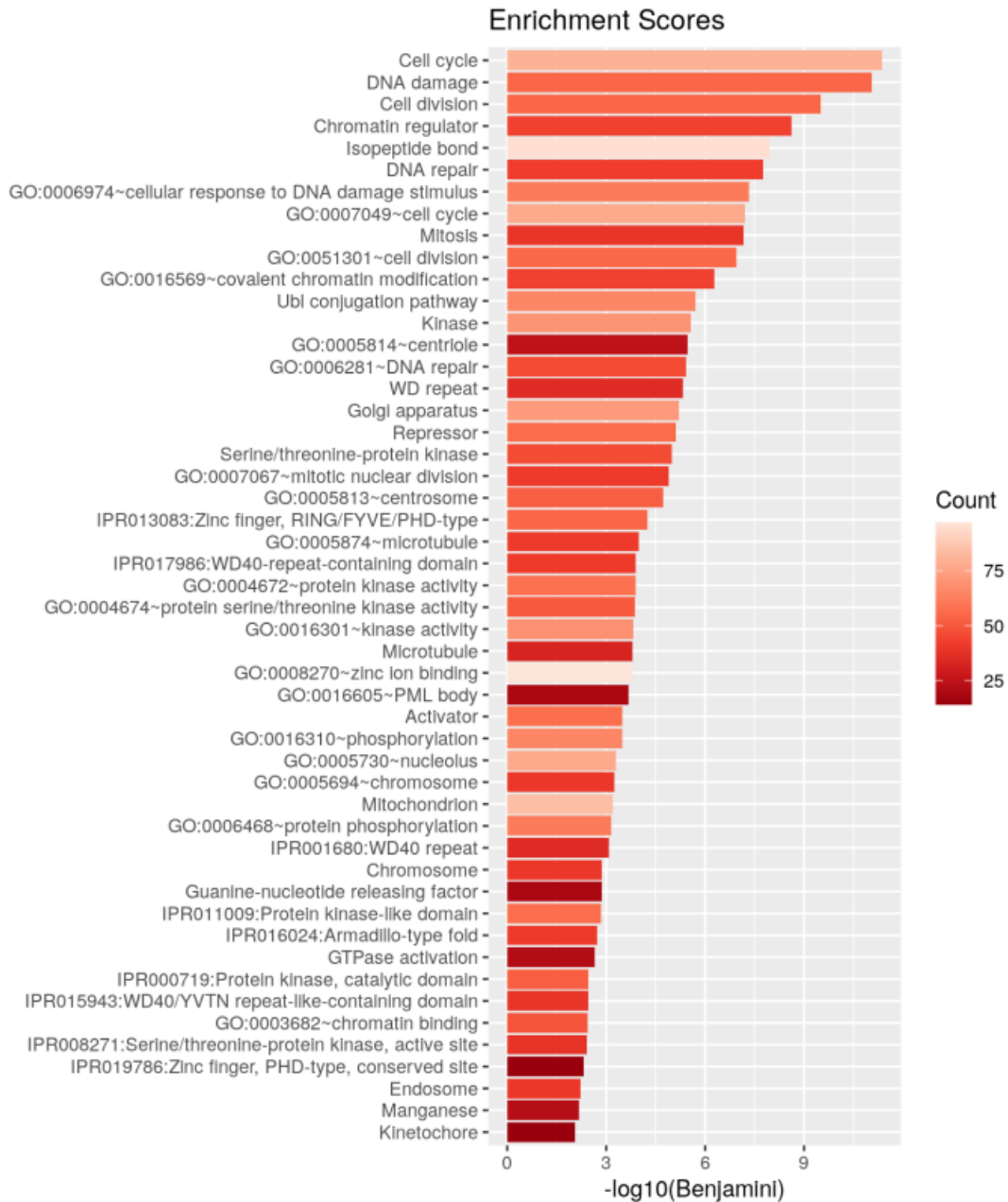


Figura 39. Enriquecimiento funcional de las rutas biológicas afectadas por eventos de *splicing* aberrante en las células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) de los ratones *U2af1^{mut/+}* (12-14 semanas). Para obtener la información funcional se empleó la herramienta DAVID (wt n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 4).

El patrón de *splicing* de los ratones mutantes *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* presentaba, en general, rutas afectadas similares. Sin embargo, las rutas que presentaban más alteraciones en el caso de los dobles mutantes, fueron las

relacionadas con el daño al ADN, ruta de señalización de kinasas y reparación de ADN (Figura 40).

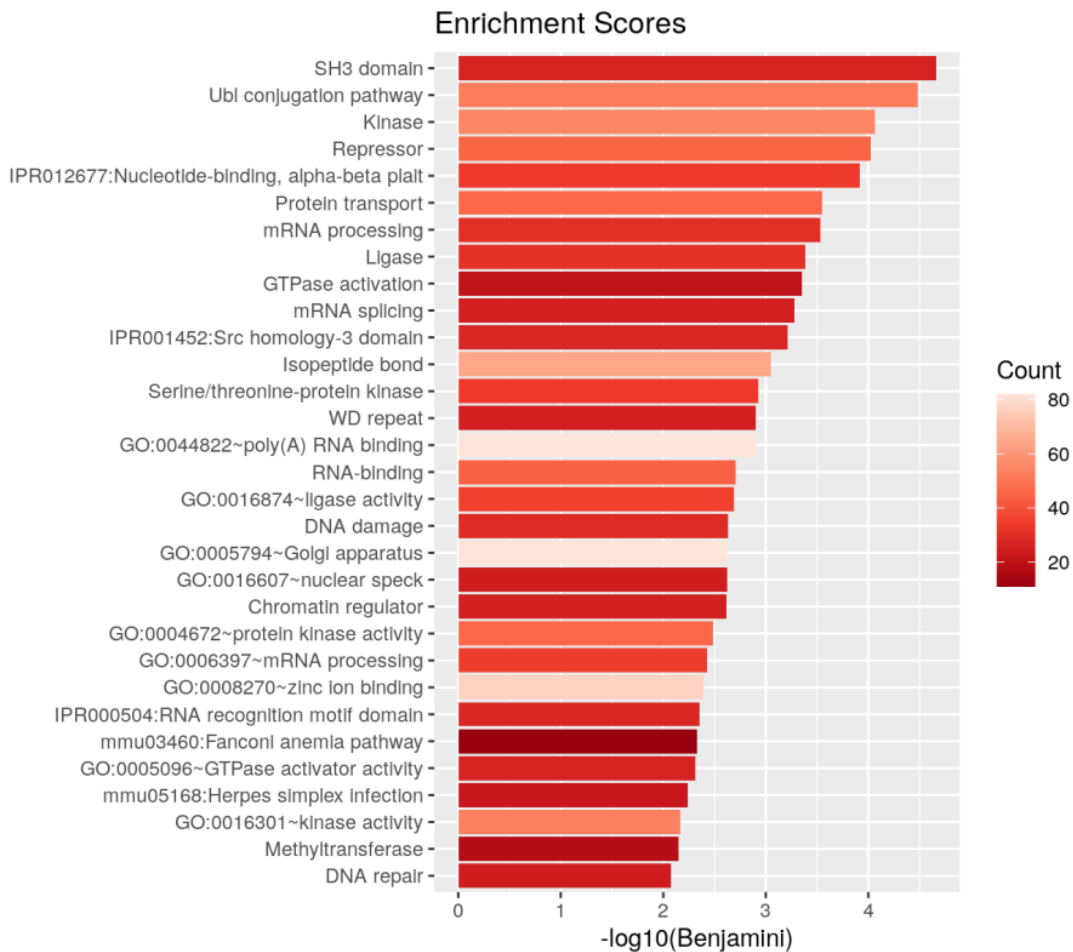


Figura 40. Enriquecimiento funcional de las rutas biológicas afectadas por eventos de *splicing* aberrante en las células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) de los ratones $\text{Tet2}^{-/-}$ (12-14 semanas). Para obtener la información funcional se empleó la herramienta DAVID (wt n = 5, $\text{Tet2}^{-/-}$ n = 6).

Por otro lado, el patrón de *splicing* de $\text{Tet2}^{-/-}$ presentaba rutas afectadas diferentes, como son las relacionadas con el dominio de interacción SH3 y las rutas de señalización de ubiquitinas y kinasas (Figura 41).

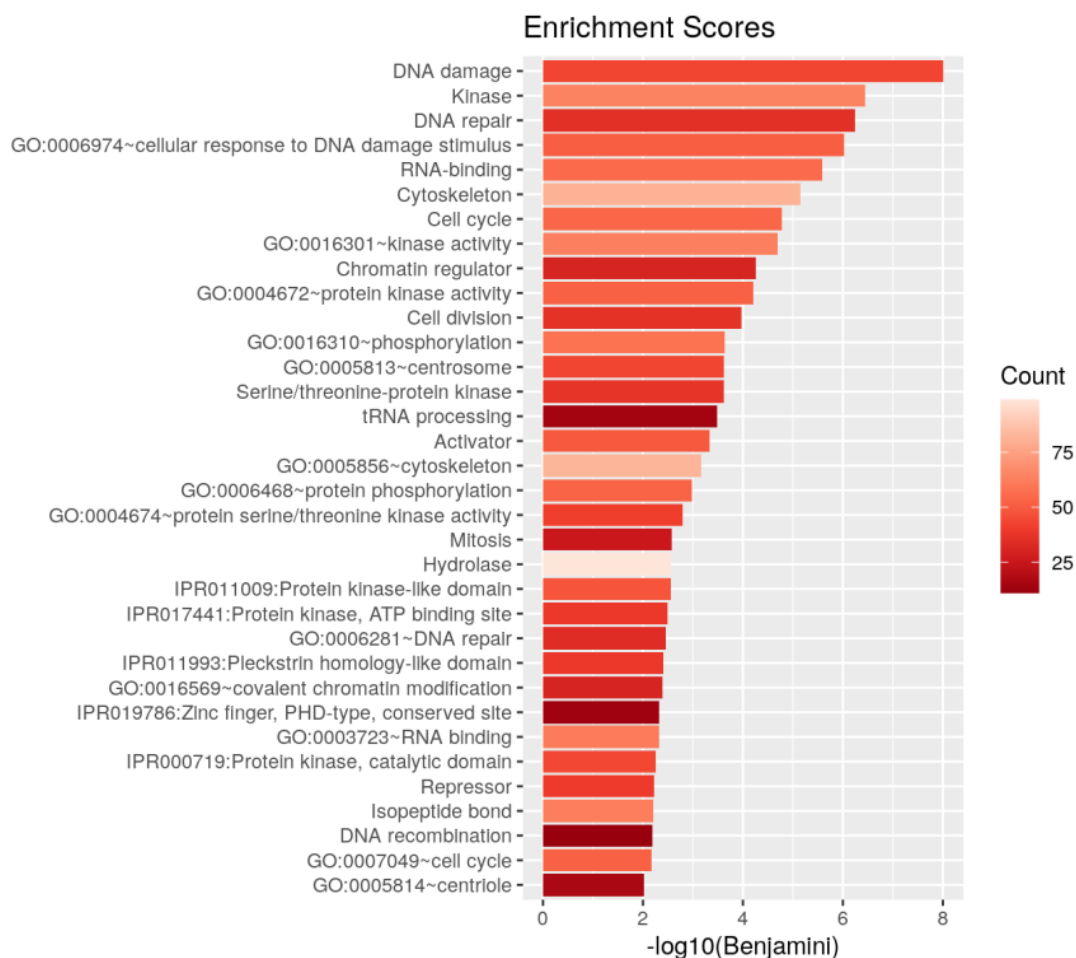


Figura 41. Enriquecimiento funcional de las rutas biológicas afectadas por eventos de *splicing* aberrante en las células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) de los ratones $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ (12-14 semanas). Para obtener la información funcional se empleó la herramienta DAVID (wt n = 5, $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ n = 5).

4.3.1. Validación molecular de las variantes de *splicing* encontradas en ratones $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$

Para la validación de los eventos de *splicing* diferencial detectados en el análisis, se seleccionaron los genes *Ammecr1l* (AMMECR1L-like protein o *AMME chromosomal region gene 1-like*) y *H2-T24* (*Histocompatibility 2, T region locus 24*), por poseer un p-valor y un FDR menores, un ΔPSI mayor en valor absoluto y una menor variabilidad entre las réplicas biológicas.

En el caso del gen *Ammecr1l*, los mutantes $U2af1^{mut/+}$ poseían un salto del exón 2 que no se detectaba en los controles (p-valor < 0.001, FDR < 0.001, ΔPSI = -0.492). Mientras que, el gen *H2-T24* presentaba un salto del exón 5 en los controles que no se detectaba ni en los mutantes $U2af1^{mut/+}$ (p-valor = 0, FDR = 0, ΔPSI = 0.39) ni en el doble

mutante $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ (p -valor = 0, FDR = 0, Δ PSI = 0.325). Estas alteraciones pudieron ser examinadas en la herramienta Sashimi del programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Figura 42).

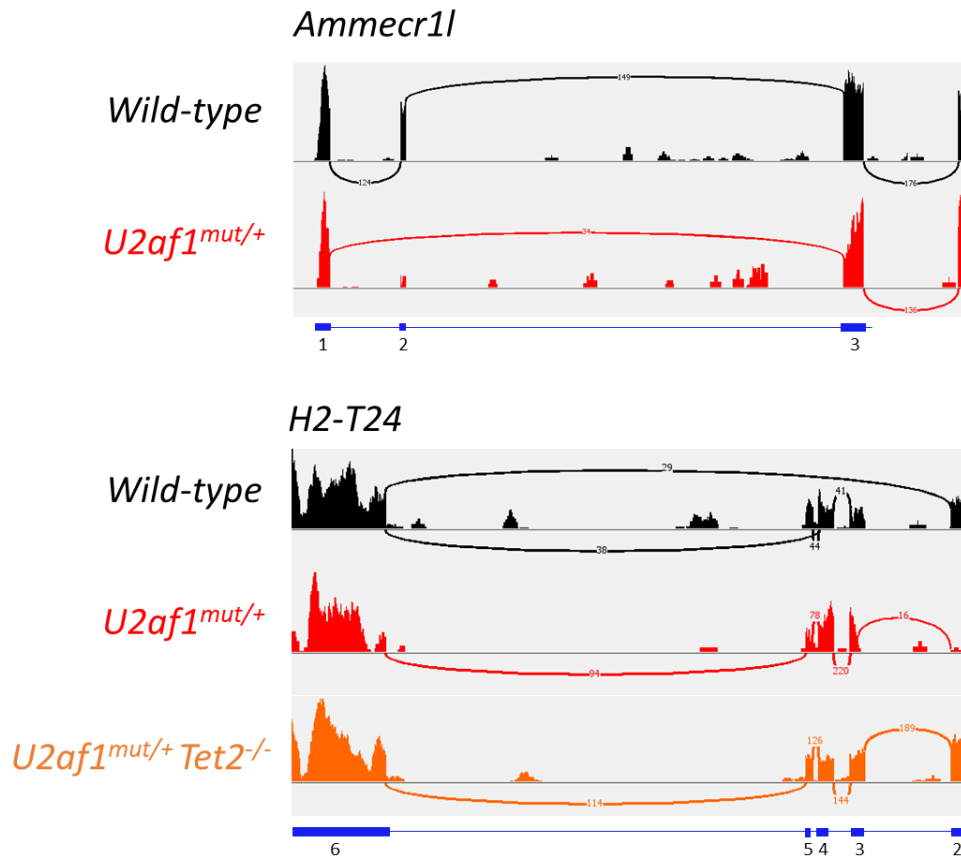


Figura 42. Representación de los cambios en el *splicing* de los genes *Ammecr1* y *H2-T24* empleando la herramienta Sashimi del programa IGV. En el gen *Ammecr1* el salto de exón se produce en los ratones $U2af1^{mut/+}$ respecto a los controles. Mientras que, en el gen *H2-T24* se observa un salto de exón en los ratones control respecto a los mutantes $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ (wt n = 5, $U2af1^{mut/+}$ n = 4, $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ n = 5).

Para validar estos saltos de exón, se extrajo ARN de las células LSK de ratones control, $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ y se sintetizó el ADNc. A continuación, se realizó una PCR convencional con *primers* flanqueantes a la región que poseía el salto de exón. Sin embargo, debido a la baja cantidad de ARN de partida (< 6 ng), no se consiguió observar por RT-PCR los cambios en el patrón de *splicing*. Por ello, se decidió utilizar células c-kit⁺ para la validación debido a que estas células se encuentran en mayor frecuencia en la médula ósea, pudiéndose obtener una mayor cantidad de ARN y, además, contienen la fracción LSK. Así pues, se extrajo el ARN de células c-kit⁺ de ratones control, $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ y se sintetizó el ADNc a partir de 1 μ g de ARN. Amplificando el ADNc mediante PCR, se pudo confirmar la presencia del salto de

exón en ambos genes. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 43, las bandas resultantes de la amplificación, se observaban de forma muy tenue.

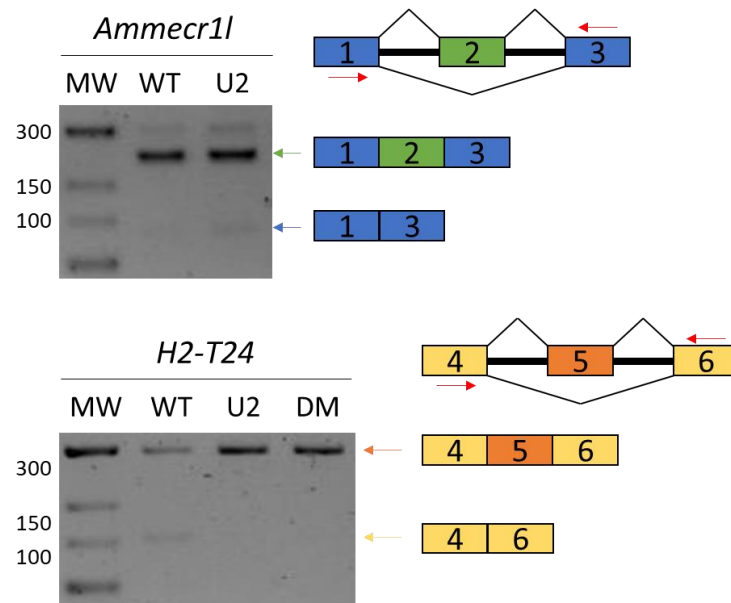


Figura 43. Validación por RT-PCR de los saltos de exón detectados por ARN-seq en los genes *Ammecr1l* y *H2-T24* en muestras *c-kit*⁺. Se utilizaron *primers* flanqueantes (flechas rojas) al exón afectado (*Ammecr1l*: wt n = 4, *U2af1*^{mut/+} n = 4. *H2-T24*: wt n = 4, *U2af1*^{mut/+} n = 4, *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-} n = 4)

4.3.2. Estudio de las rutas biológicas con alteraciones en el *splicing* en ratones *U2af1*^{mut/+} y *U2af1*^{mut/+} *Tet2*^{-/-}

Una vez validadas por RT-PCR las variantes seleccionadas, se analizaron mediante CF algunas de las rutas biológicas afectadas para examinar el efecto ocasionado por las alteraciones en el *splicing*. Estos ensayos se realizaron en el compartimento LSK de la médula ósea.

4.3.2.1. Análisis del ciclo celular

Se analizaron células LSK procedentes de médula ósea de ratones control y *U2af1*^{mut/+}. En este caso, se empleó el marcador fluorescente DAPI (Merck), el cual se une al ADN y aumenta su fluorescencia si la molécula es de doble cadena. Esta propiedad permite correlacionar la emisión de fluorescencia con la fase del ciclo celular en la que se encuentran.

Como se puede observar en la Figura 44, no se detectaron cambios en el porcentaje de células presentes en las diferentes fases del ciclo celular al comparar ratones controles y mutantes *U2af1^{mut/+}*.

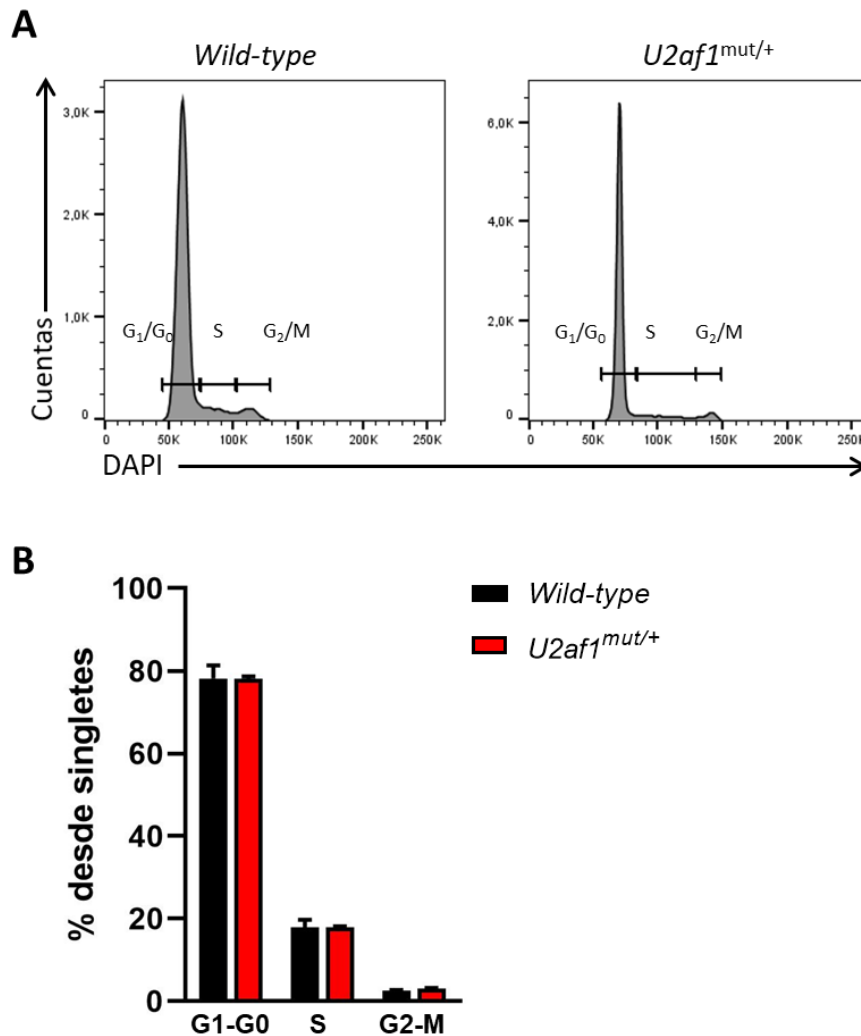


Figura 44. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en células LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) procedentes de la médula ósea. **(A)** Histogramas representativos de las diferentes fases del ciclo celular. **(B)** Porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular (wt n = 3, *U2af1^{mut/+}* n = 3).

4.3.2.2. Análisis del daño al ADN

Existe una correlación directa entre la fosforilación de la histona H2AX (pH2AX) en la Serina 139 y las roturas de doble hebra del ADN. Por ello, para determinar el daño que presentaba el ADN celular, se empleó el kit H2A.X Phosphorylation Assay (Millipore) para detectar, por CF, la presencia de pH2AX en células LSK.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de pH2AX detectada en controles, mutantes $U2af1^{mut/+}$ y doble mutantes $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ (Figura 45).

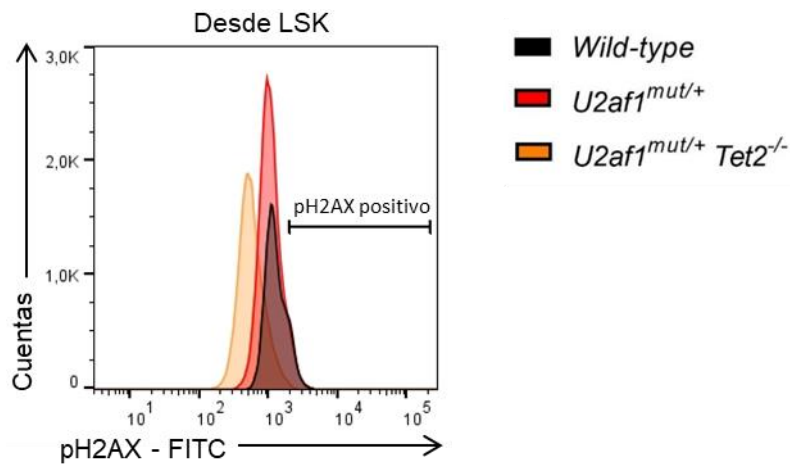


Figura 45. Análisis por citometría de flujo del daño presente en el ADN de células LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺) procedentes de la médula ósea. El daño al ADN se midió detectando la cantidad de histona H2AX fosforilada (pH2AX) dentro de la fracción LSK (wt n = 10, $U2af1^{mut/+}$ n = 4, $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ n = 6).

5. Efectos hematológicos de la mutación en $U2af1$ en ratones envejecidos

A pesar de que los ratones $U2af1^{mut/+}$ no mostraban un fenotipo característico de SMD, se comprobó tanto en los trasplantes, como en el patrón de *splicing*, que sus HSPC presentaban ciertas alteraciones alrededor de las 13 semanas. Puesto que los SMD en humanos se manifiestan en edades avanzadas, se decidió estudiar una cohorte de ratones envejecidos (> 2 años) para comprobar si con la edad se llegaba a originar la enfermedad. Esta caracterización hematológica en los tejidos hematopoyéticos se llevó a cabo de la misma forma que se ha detallado anteriormente con los ratones jóvenes.

5.1. Alteraciones en sangre

Como se puede ver en la Figura 46A, al igual que ocurría en los ratones jóvenes, se vio un incremento de células T y Mac-1⁺ y una disminución de células B. En todos los casos, esta variación fue más acentuada que en los ratones jóvenes. Sin embargo, aun así, no se detectó ningún cambio estadísticamente significativo. Tampoco se detectó en el hemograma ningún cambio relevante en ninguno de los parámetros evaluados: WBC,

RBC, hemoglobina y plaquetas (Figura 46B). El notable incremento de WBC detectado en los ratones jóvenes, se perdía, observándose incluso una ligera disminución de este valor en los ratones envejecidos.

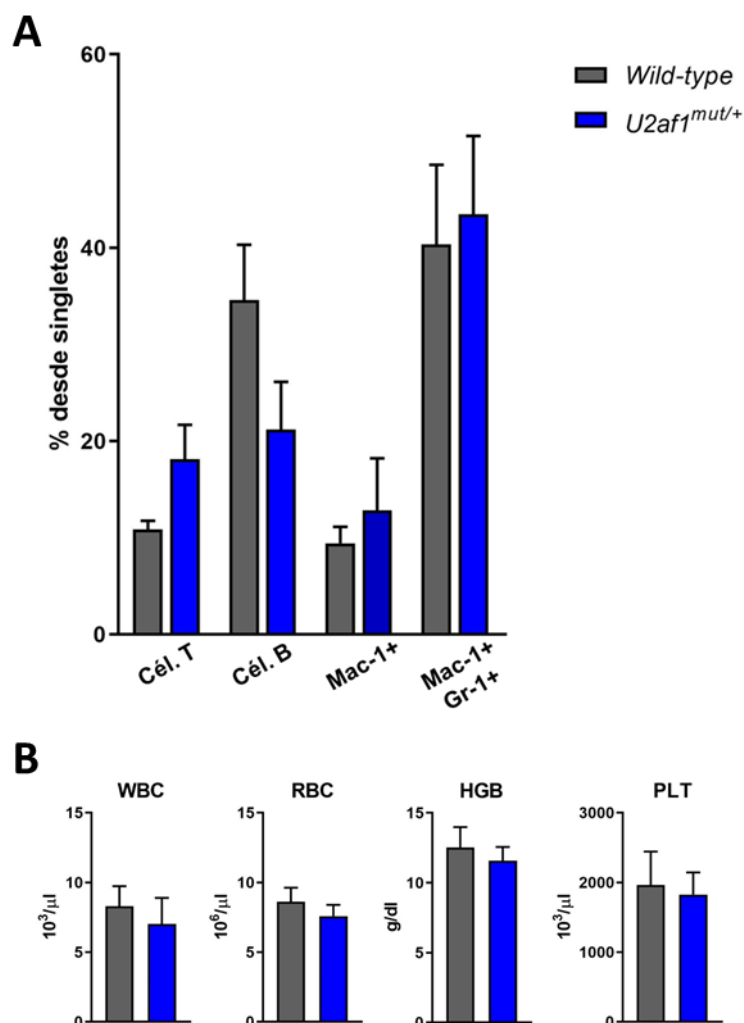


Figura 46. Análisis de la sangre periférica de ratones *U2af1^{mut/+}* envejecidos (> 2 años). **(A)** Frecuencias de las células maduras en sangre periférica. **(B)** Frecuencias de las células maduras obtenidas por un equipo analizador Sysmex XT-2000 (WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; PLT: plaquetas. wt n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 6).

5.2. Alteraciones en bazo

Al contrario de lo observado en ratones jóvenes, los ratones *U2af1^{mut/+}* envejecidos presentaban un bazo de mayor tamaño que el de los controles. Sin embargo, debido a la gran variabilidad entre ratones, este aumento no resultó estadísticamente significativo (Figura 47A).

Las células maduras procedentes del bazo, fueron analizadas empleando la misma tinción que en la sangre. La tendencia general observada en los ratones jóvenes *U2af1^{mut/+}*, no se mantenía en los envejecidos. Así pues, se vio un ligero descenso en las células B y las mieloides Mac-1⁺ Gr-1⁺, y un incremento en las células T y las mieloides Mac-1⁺. Pero, en ningún caso fue estadísticamente significativo (Figura 47B).

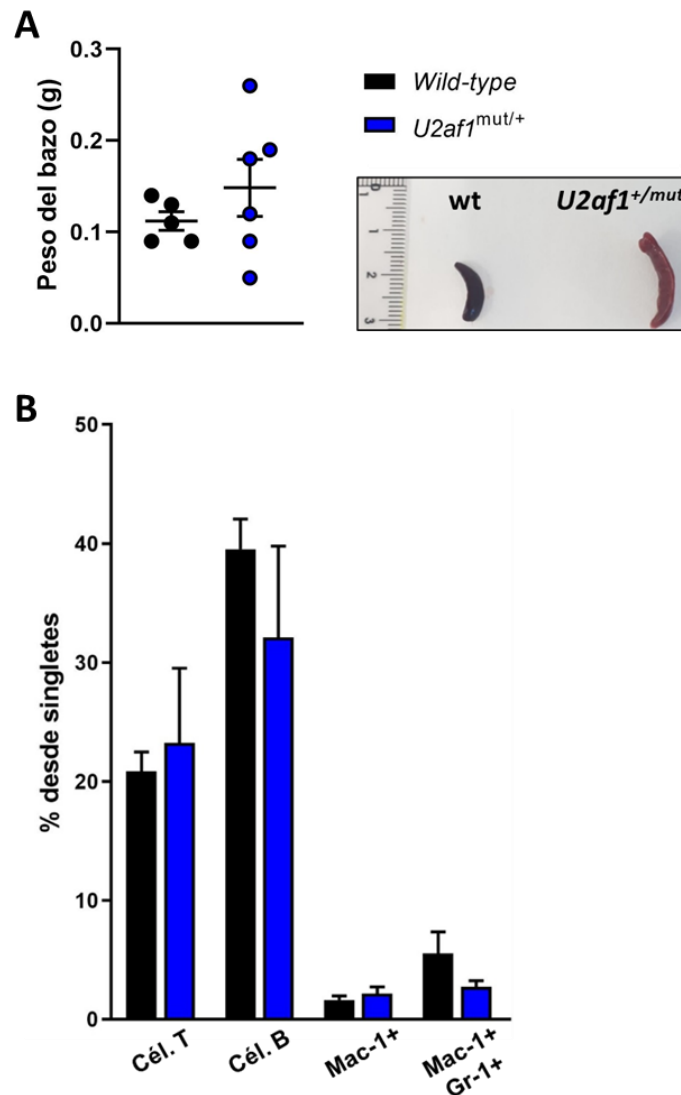


Figura 47. Análisis del bazo de ratones *U2af1^{mut/+}* envejecidos (> 2 años). (A) Imágenes representativas y cuantificación del peso del bazo. (B) Frecuencias de las células maduras en bazo (wt n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 6).

5.3. Alteraciones en médula ósea

Igual que ocurría con los ratones jóvenes, no se detectaron cambios estadísticamente significativos en el número de LSK ni de progenitores (Figura 48A). Para observar la morfología celular de la médula ósea, las células se centrifugaron y

tiñeron con MGG. Como se puede ver en la Figura 48B, no se detectaron al microscopio diferencias entre los tipos celulares procedentes de ratones control y *U2af1^{mut/+}*.

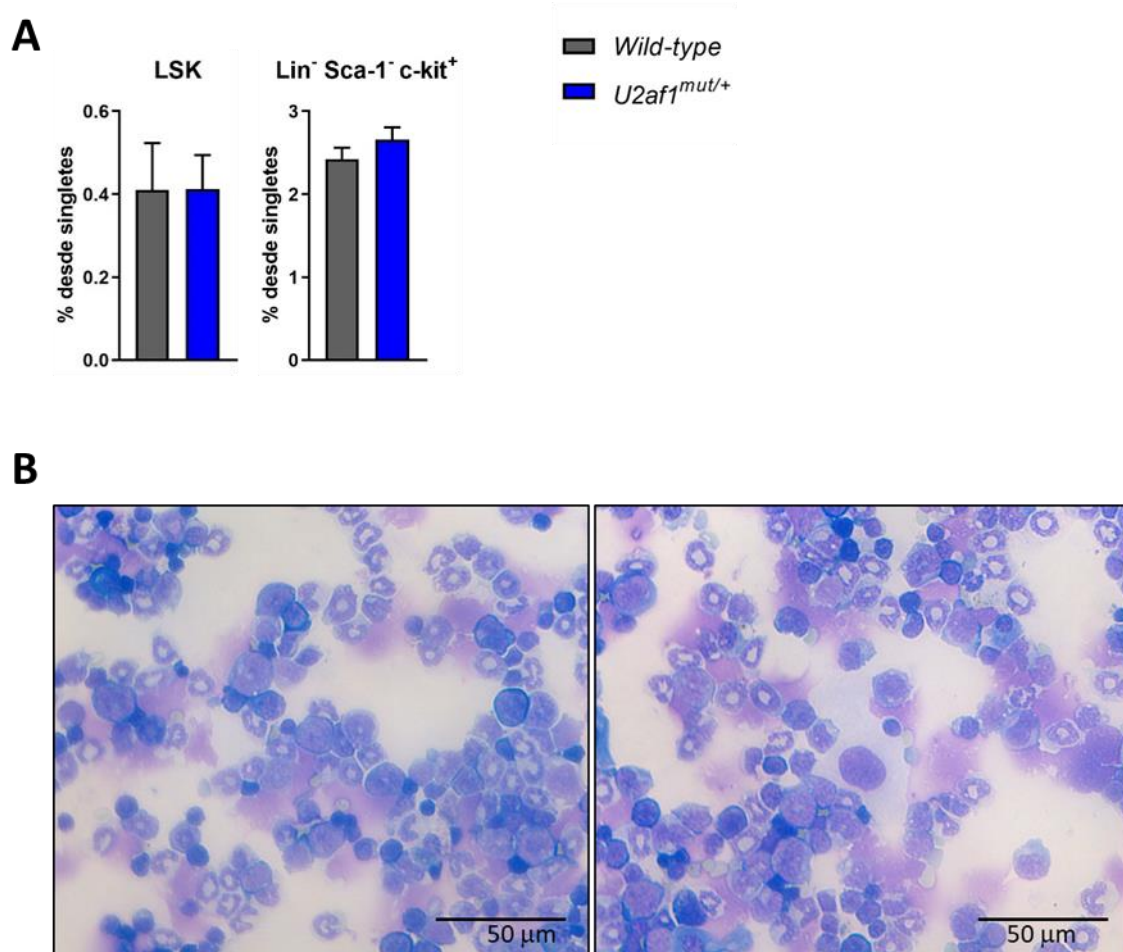


Figura 48. Análisis de la médula ósea de ratones *U2af1^{mut/+}* envejecidos (> 2 años). (A) Frecuencias de LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) y progenitores (Lin⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺) adquiridas por citometría de flujo (wt n = 5, *U2af1^{mut/+}* n = 6). **(B)** Imágenes morfológicas representativas de la médula ósea con tinción de células May Grünwald-Giemsa (wt n = 4, *U2af1^{mut/+}* n = 6).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los SMD constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades hematológicas de naturaleza clonal que se caracterizan por presentar una hematopoyesis ineficaz que da lugar a citopenias, displasias y un riesgo variable de progresión a LMA secundaria. La gran mayoría de los pacientes presenta mutaciones somáticas en genes que pueden agruparse en estas categorías: factores de *splicing*, reguladores epigenéticos, cohesinas, factores de transcripción, proteínas de señalización celular y la proteína TP53. Algunas de estas alteraciones genéticas, se han podido relacionar con fenotipos y pronósticos concretos. Por ejemplo, las mutaciones en el gen *SF3B1* producen SMD con sideroblastos en anillo y se asocian con un pronóstico favorable.³⁰

Además, se ha visto que existen patrones de concurrencia y exclusión entre estas categorías de mutaciones y se cree que parte de la heterogeneidad observada en los SMD podría deberse a diferentes combinaciones de estos genes.^{14,34} Así pues, las mutaciones en factores de *splicing* aparecen a menudo simultáneamente con mutaciones en reguladores epigenéticos^{14,35} como es el caso de los genes *U2AF1* y *TET2* que se encuentran co-mutados en un 13 % de los casos de SMD.¹²⁴ Sin embargo, a pesar de ello, no se han realizado estudios *in vitro* ni *in vivo* para analizar los efectos que produce la concurrencia de estas dos alteraciones. Por este motivo, en este trabajo pretendimos estudiar si la cooperación entre mutaciones en *U2af1* y *Tet2* en un modelo murino podría iniciar la patogénesis de SMD. Para ello, generamos una línea de ratón doble mutante a partir del cruzamiento de dos líneas de ratón creadas mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9.

La delección en la proteína U2AF1 genera en los ratones *U2af1^{mut/+}* un efecto de haploinsuficiencia

La proteína U2AF1 reconoce los dinucleótidos AG del extremo 3' del intrón durante el inicio del *splicing*. Las mutaciones en este gen en pacientes con SMD siempre se presentan en heterocigosis y se dan, casi exclusivamente, en las posiciones S34 y Q157 de la proteína, afectando al primer y segundo dedo de zinc, respectivamente¹¹⁰. La elevada prevalencia de estas mutaciones en los SMD las convierte en objetivo de estudio. La mutación S34, al encontrarse con mayor frecuencia, ha sido más ampliamente estudiada en modelos murinos.^{83,137,147} Sin embargo, la mutación Q157 es la que se relaciona con un peor pronóstico en pacientes con SMD.^{123,135,139} No obstante, más recientemente se han descrito mutaciones diferentes a las clásicas, como es el

caso de las mutaciones I24T/V (en el primer dedo de Zinc), R156H/Q o E159_M160insYE (en el segundo dedo de Zinc), que no afectan a los *hotspots* tradicionales.⁹² En este estudio de Pangallo *et al.* estas mutaciones pudieron clasificarse como iniciadoras de la enfermedad si los efectos que producían en el *splicing* y la expresión génica fenocopiaban a las mutaciones S34 y Q157.⁹² Se observó que las mutaciones R156H/Q o E159_M160insYE fenocopiaban las mutaciones en U2AF1^{Q157P/R}. Por tanto, el citado estudio demuestra la posibilidad de que alteraciones que no se producen en los *hotspot* de U2AF1 se comporten de la misma forma patogénica que las que sí afectan a estas posiciones. Nuestra delección no mimetiza ninguna de las mutaciones observadas en la clínica, pero sí produce efectos sobre el *splicing*, igual que ocurre con estas alteraciones menos frecuentes reportadas en la base de datos COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) y estudiadas por Pangallo *et al.*

El hecho de que las mutaciones en U2AF1 en pacientes con SMD sean mutaciones heterocigotas que se encuentran principalmente en los residuos S34 y Q157, indica que estas alteraciones en lugar de producir la inactivación de la proteína, generan una ganancia de función de la proteína aberrante resultante.^{30,130} En nuestro caso, la línea U2af1^{mut/+} presentaba una delección de 5 nucleótidos en el exón 6 del gen que pudimos confirmar mediante secuenciación Sanger. Esta alteración, teóricamente, generaba una proteína aberrante a partir del segundo dedo de zinc. Debido, por tanto, a la naturaleza de la mutación generada en el gen U2af1, cabría esperar que nuestra delección produjera en los ratones efectos similares a los generados por la mutación E159_M160insYE que, como se describe en el estudio de Pangallo *et al.*⁹², fenocopia la alteración Q157.

Sin embargo, fuimos incapaces de detectar por *Western blot* la proteína derivada de la delección en los ratones U2af1^{mut/+}. Únicamente al sobreexpresar esta proteína mutante en células HEK293T fuimos capaces de observarla, aunque de forma muy tenue, lo que sugeriría que la proteína mutante se expresa a unos niveles muy bajos y/o se degrada fácilmente por el proteosoma celular. Además, por otro lado, se detectó por RT-qPCR una remarcada disminución del ARNm *wild-type* U2af1 en las células procedentes de la médula ósea de los ratones mutantes. En este sentido, podríamos decir que nuestro modelo se asemeja más a un genotipo U2af1^{+/-} que a un genotipo U2af1^{mut/+}.

Todo ello, nos llevó a pensar que la proteína aberrante no se estaba expresando de forma natural y que las alteraciones observadas posteriormente en la hematopoyesis de estos ratones U2af1^{mut/+} se debían a un efecto de haploinsuficiencia de la proteína. Este fenómeno se da cuando una sola copia funcional de un gen no produce cantidad

suficiente de proteína necesaria para el correcto funcionamiento de la célula. Acorde a esto, un estudio de Wadugu *et al.* confirmó la importancia de la cantidad de proteína U2AF1 *wild-type* que se expresa en la célula en ratones mutantes en *U2af1* y cómo esta cantidad puede variar el fenotipo observado.¹⁴⁵

Las alteraciones observadas en la hematopoyesis de los ratones *U2af1^{mut/+}* no son suficiente para producir SMD

Si nos centramos en las variaciones del hemograma, en los modelos de la mutación S34F^{83,147} los WBC se encuentran reducidos, mientras que en nuestro caso se encontraban incrementados. Además, igual que ocurría en nuestro modelo, el ratón descrito por Fei *et al.* presentaba una disminución de RBC.¹⁴⁷ La mutación U2AF1^{S34F} no produce esplenomegalia en ninguno de estos modelos murinos,^{83,147} es decir, los bazo presentan el mismo tamaño que los controles. Sin embargo, en nuestro caso, el tamaño del bazo de los ratones *U2af1^{mut/+}* era incluso menor que los de los controles. Esto podría deberse a que en general los ratones *U2af1^{mut/+}*, tanto los machos como las hembras, presentaban un tamaño menor con respecto a los ratones *wild-type*.

Cabe destacar también que el modelo de la mutación Q157P,¹³⁷ no presentaba alteraciones significativas en las cuentas hematológicas del hemograma. Debido a que la delección en nuestra línea mutante afecta a partir del segundo dedo de zinc, cabría esperar que los efectos que nosotros observamos fueran más similares a los observados en este modelo. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en nuestro caso, parece que está ocurriendo un efecto de haploinsuficiencia de la proteína *wild-type* U2AF1.

Las discrepancias observadas entre modelos pueden deberse, por un lado, a la cantidad de proteína U2AF1 *wild-type* y mutante que se está expresando en cada uno de ellos. Y, por otro lado, a la metodología por la cual se induce la expresión de la mutación. En nuestro caso, la delección de 5 nucleótidos está presente en todas las células de nuestro modelo puesto que la edición se realizó de forma germinal mediante el sistema CRISPR/Cas9. Sin embargo, en el caso del modelo de ratón KI condicional inducible de Fei *et al.*¹⁴⁷ es necesario suministrar poli-IC para activar el transgén Mx1-Cre y expresar así la proteína mutante U2AF1^{S34F}. Este tratamiento induciría la expresión únicamente en los tejidos hematopoyéticos que es donde se expresa el promotor Mx1²¹⁴. Por otro lado, el modelo transgénico "Tet-On" de Shirai *et al.*⁸³ expresa la proteína humana U2AF1^{S34F} al administrar doxiciclina a los ratones.

A pesar de observarse ligeras alteraciones en la hematopoyesis de los ratones *U2af1^{mut/+}* estos ratones no presentaban displasia, no desarrollaban SMD y, por tanto, no veían disminuida su vida media, igual que ocurría con los modelos murinos de sobreexpresión de la mutación S34F⁸³ o Q157P¹³⁷ o el modelo KI condicional de S34F¹⁴⁷. Cabe destacar que, mientras que estos modelos heterocigotos no consiguen iniciar la patogénesis de la enfermedad, los modelos KO del gen *U2af1* mueren antes de nacer o a los pocos días.^{145,146} Lo que destaca la necesidad de la copia *wild-type* del gen para el funcionamiento normal de la célula y el papel fundamental de la proteína en la hematopoyesis. Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos *in vitro* en el estudio de Fei *et al.* donde observan como los cambios en el *splicing* alternativo en una línea celular de epitelio pulmonar humano que expresa la mutación U2AF1^{S34F}, son proporcionales al ratio entre proteína *wild-type* y mutante.¹²⁵ Así pues, nuestros ratones *U2af1^{mut/mut}* no eran viables y no pudimos registrar el nacimiento de ninguno de ellos.

Las HSPC de los ratones *U2af1^{mut/+}* son incapaces de injertar en los ratones receptores en los experimentos de trasplante competitivo

Respecto a las HSPC, no observamos cambios estadísticamente significativos en el número de células LSK procedentes de los ratones *U2af1^{mut/+}* en comparación con los controles; a diferencia del modelo descrito por Fei *et al.*¹⁴⁷ donde esta población se veía disminuida, mientras que el descrito por Shirai *et al.*⁸³ la presentaba incrementada.

Las HSPC de los ratones *U2af1^{mut/+}* eran incapaces de injertar en el receptor durante experimentos de trasplante competitivo tanto cuando se inyectaban células sin fraccionar como células LSK previamente seleccionadas. Esta característica no sólo ha sido observada en todos los modelos murinos con alteraciones en *U2af1*^{83,137,145,147} sino también en otros modelos con alteraciones en genes del *splicing* como son *Sf3b1*^{82,191} y *Srsf2*²¹⁵. Si bien estos modelos son diferentes al nuestro en cuanto a que las células sí son capaces de injertar pero, al inducir la expresión del factor de *splicing* mutante en las quimeras, las células trasplantadas no son capaces de mantener una reconstitución sostenida en el tiempo. En cambio, un estudio reciente de Madan *et al.* no observó ningún déficit en la habilidad de las células *Zrsr2*-KO para repoblar la médula de ratones trasplantados²¹⁶ y otro estudio de Inoue *et al.* mostró una reconstitución incluso mayor que la obtenida con los controles²¹⁷. Estas diferencias pueden deberse a que ZRSR2 participa fundamentalmente en el *splicing* menor el cual únicamente procesa un 0.5-1 % de los intrones del genoma humano.

La desventaja proliferativa que presentan la mayoría de modelos murinos con mutaciones o deleciones en los genes de *splicing*, resulta paradójica si tenemos en cuenta que estas mutaciones se consideran eventos iniciadores de la patogénesis de los SMD. Por tanto, todavía se desconoce cómo sobreviven estos clones a lo largo de la enfermedad. Por un lado, un estudio de Pellagatti y Boulwood sugiere que el microambiente de la médula ósea en los individuos de avanzada edad podría estar proporcionando un entorno favorable para la selección de los clones mutantes en *U2AF1*.⁸⁶ Por otro lado, dado que las mutaciones en *U2AF1* habitualmente aparecen en concurrencia con otras, puede que estas alteraciones sean las que verdaderamente confieren la ventaja proliferativa a los clones. Sin embargo, todavía es necesario realizar más estudios para poder confirmar estas hipótesis.

Los ratones *U2af1^{mut/+}* envejecidos tampoco desarrollan SMD

Debido a que los ratones adultos *U2af1^{mut/+}* de 13 semanas no desarrollaban SMD y, teniendo en cuenta que en humanos esta enfermedad se manifiesta habitualmente en personas mayores de 60 años, decidimos estudiar una cohorte de ratones envejecidos (2 años). Al contrario de lo que cabría esperar, las variables del hemograma que resultaban alteradas en los mutantes *U2af1^{mut/+}* jóvenes (incremento de WBC y descenso de RBC) se estabilizaban en los ratones envejecidos. Así pues, presentaban unos valores de WBC y RBC más cercanos a los observados en los ratones control. Además, el tamaño del bazo presentaba mucha variabilidad, alcanzando la mitad de ellos un valor superior al de los controles, al contrario de lo que se observó en los ratones jóvenes. Sin embargo, su histología no mostraba ninguna anomalía.

A pesar de las alteraciones hematopoyéticas observadas en los distintos modelos murinos con mutaciones en *U2af1*, ninguno de ellos (incluido el nuestro) es capaz de recapitular todas las características de los SMD humanos. Por tanto, concluimos que la mutación del gen *U2af1* *per se* no es suficiente para causar SMD en ratones. Estos resultados son consistentes con los observados en clínica donde individuos sanos²¹⁸ o con hematopoyesis clonal asociada a la edad²¹⁹ poseen mutaciones en *U2AF1*, comportándose, por tanto, como un factor de riesgo de desarrollo de SMD o LMA.

Los ratones *Tet2*^{-/-} presentan anomalías en la hematopoyesis

Posteriormente, decidimos generar un modelo de ratón KO en el gen *Tet2* y cruzarlo con la línea mutante en *U2af1* para así poder estudiar la cooperación entre estas alteraciones. Sin embargo, primero, fue necesario evaluar los efectos que produce la pérdida de la proteína TET2 en la hematopoyesis.

La proteína TET2 media la desmetilación del ADN oxidando la 5mC a 5hmC en presencia de Fe²⁺ y 2-OG. Las mutaciones del gen *TET2* son frecuentes en diversas enfermedades hematológicas de origen mielóide como SMD, NMP, LMA y LMMC, de origen linfóide como el linfoma de célula T y de célula B difuso^{154,159,160} e incluso en pacientes sanos con CHIP^{71,165}. El amplio espectro de patologías en las que *TET2* aparece mutado podría indicar que se trata de eventos iniciadores con una elevada trascendencia para el desarrollo de la enfermedad. Las mutaciones del gen *TET2* en SMD son habitualmente de pérdida de función y se localizan a lo largo de todo el gen.¹⁶⁶

En nuestro caso, la línea *Tet2*^{-/-} presentaba una deleción de 11 nucleótidos en el exón 3 que impedía la expresión del ARNm y de la proteína. Aunque estos ratones no enfermaban ni veían disminuida su vida media (igual que ocurría con los ratones *U2af1*^{mut/+}), mostraban anomalías similares a las observadas en SMD/LMMC. La hematopoyesis de los ratones *Tet2*^{-/-} presentaba un incremento de las células mieloides, la expansión de las HSPC y esplenomegalia. Estas variaciones han sido observadas también en otros modelos murinos con déficit de la proteína TET2.^{150,170,173,180-182,220}

Algunos ratones *Tet2* KO descritos en la bibliografía, presentaban anomalías tanto en la línea mielóide como en la linfóide.^{150,180,181,183} Además, las alteraciones en la linfopoyesis se atribuyen a la disrupción de la región no catalítica de la proteína TET2, mientras que la región catalítica parece ser más relevante durante la mielopoyesis.¹⁸³ Así pues, cabría esperar que algunos de nuestros ratones *Tet2*^{-/-} desarrollaran patologías de origen linfóide. Sin embargo, a pesar de que el tamaño de los nódulos linfáticos era significativamente superior al de los controles y presentaban una disminución relevante de linfocitos B en bazo por CF, no llegaban a enfermar. Esto podría explicarse por la edad de los ratones de nuestro estudio (32-39 semanas), ya que, se ha visto que los periodos de latencia para desarrollar tumores de célula B en ratones *Tet2*-KO son más elevados que en las enfermedades mieloides.¹⁸¹ Por otro lado, el estudio de Pan *et al.* sugiere que las mutaciones secundarias que adquieren las células *TET2* mutantes son las que realmente dirigirían la transformación de la célula hacia alteraciones mieloides o linfoides.¹⁵⁰

Cabe destacar además que las distintas variables analizadas en los ratones *Tet2*^{-/-} muestran una elevada variabilidad. Esto es debido a que las alteraciones en este gen presentan en el ratón penetrancia incompleta y expresividad variable. Lo que se manifiesta con modelos de ratón *Tet2*-KO que presentan una severidad variable con periodos de latencia diferentes que varían desde las pocas semanas^{170,180,182} o meses^{173,181} hasta alcanzar incluso los 2 años.¹⁵⁰

La delección de la proteína TET2 es insuficiente para producir SMD en nuestra línea *Tet2*^{-/-}

Como cabía esperar por lo detallado en los modelos de *Tet2*-KO anteriores, las HSPC de nuestros ratones *Tet2*^{-/-} presentaban una capacidad de injertar en la médula de los ratones receptores muy superior a la de los controles *wild-type*. Esto concordaba con la expansión de HSPC observada en la médula ósea de los ratones de la línea *Tet2*^{-/-}. Además, al analizar la sangre de los ratones trasplantados, se detectó un incremento significativo de las células mieloides que ya se había observado también en la línea *Tet2*^{-/-} en estado basal (*steady-state*) Esto estaría en concordancia con el sesgo intrínseco a linaje mielóide que poseen las células deficientes en *Tet2*.^{174,175} Así pues, se confirmó que los efectos detectados en la hematopoyesis de nuestra línea son generados por las alteraciones en las propias HSPC y no promovidos por la presencia de la delección del gen en todas las células del organismo del ratón.

Todos los modelos descritos de *Tet2*-KO presentan alteraciones hematopoyéticas similares, independientemente de los exones del gen que se vean afectados o de la técnica mediante la cual ha sido originada la línea mutante. Estos resultados, junto con los nuestros, parecen confirmar que la deficiencia de la proteína TET2 altera las propiedades de HSPC induciendo, en general, un sesgo de la hematopoyesis hacia el linaje mielóide. En nuestro caso, la delección que posee la línea *Tet2*^{-/-} por sí misma es insuficiente para producir SMD en el ratón a las 32-39 semanas. Sin embargo, como se ha comentado antes, dado que las alteraciones en este gen presentan periodos de latencia muy variables, cabría la posibilidad de que nuestros ratones enfermaran posteriormente.

La cooperación de las alteraciones en *U2af1* y *Tet2* no produce SMD

Los modificadores epigenéticos y los factores del *splicing* aparecen co-mutados en un 25 % de los casos de SMD.²²¹ Además, diversos estudios demuestran que la combinación entre mutaciones en *Tet2* y en otros genes oncogénicos como *Asx1*, *Ezh2*, *Jak2*, *c-Kit*, *Flt3*, *Bcor*, *Sf3b1* y *AML1-ETO* promueve diversas patologías en el ratón.^{152,190,191} Dado que tanto nuestras líneas *U2af1^{mut/+}* y *Tet2^{-/-}* presentaban alteraciones de la hematopoyesis, quisimos estudiar si la cooperación entre ambas mutaciones conllevaba finalmente a que los ratones doble mutantes enfermaran por SMD.

Si nos centramos en el análisis del doble mutante, el efecto de las mutaciones en *U2af1* y *Tet2* no fue sinérgico. Es decir, la línea *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* no presentaba alteraciones de la hematopoyesis más destacables que las líneas *U2af1^{mut/+}* y *Tet2^{-/-}* de forma individual.

Al analizar los esplenocitos procedentes del bazo de los doble mutantes mediante CF, no se observaron diferencias significativas. Es más, el tamaño de este órgano era semejante al de los controles, excepto un caso (1/14) que presentaba una evidente esplenomegalia. Histológicamente se vio que poseía una estructura anormal con disrupción de la pulpa blanca y la pulpa roja.

A pesar de que los progenitores (inmunofenotipo Lin⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺) no se encontraban alterados, algunos de los progenitores mieloeritroides presentaban diferencias respecto a los controles. Por un lado, se observó una reducción de los progenitores eritroides Pre MegE, Pre CFU-E y CFU-E. Sin embargo, en el hemograma no se observaron variaciones en los valores eritroides (RBC, plaquetas y hemoglobina). Por otro lado, los progenitores mieloides Pre GM se encontraban incrementados. Este aumento no producía consecuencias detectables en el hemograma pero, mediante CF sí se manifestaba un aumento de células mieloides (inmunofenotipo Mac-1⁺ Gr-1⁺) en sangre.

Las HSPC procedentes de los ratones *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}* reflejaban un incremento muy significativo respecto a los controles, incluso mayor que las derivadas de los ratones *Tet2^{-/-}*. Sin embargo, paradójicamente, eran incapaces de injertar en los receptores en experimentos de trasplante, igual que sucedía con las HSPC de los ratones *U2af1^{mut/+}*. Esto coincide con el estudio realizado por Yoshimi *et al.*, donde la delección de *Tet2* en cooperación con la mutación del factor de *splicing* *Srsf2^{P95H}*, también fue insuficiente para rescatar el defecto en la reconstitución de las células mutantes en *Srsf2*.²²²

A pesar de las variaciones detectadas en la hematopoyesis, los ratones doble mutantes $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ no presentaron una vida media menor ni enfermaron durante nuestro tiempo de estudio (8-22 semanas). Por tanto, la combinación de la mutación en $U2af1$ con la deficiencia en $Tet2$ en nuestro caso no es suficiente para producir SMD en el ratón. Esto podría indicar que es necesario que se produzcan alteraciones moleculares adicionales para desarrollar la enfermedad. No obstante, una limitación de nuestra aproximación es la dificultad para combinar mutaciones en el ratón. Ya que, es necesario realizar cruzamientos convencionales entre líneas mutantes, lo que impide reproducir patrones moleculares más complejos. Para ello, se podrían emplear otras estrategias *multiplex* como la descrita por Heckl *et al.*, donde células LSK se transducen con una mezcla de vectores lentivirales que contienen sgARN para lograr una combinación de mutaciones que, al trasplantarla en ratones previamente irradiados, de lugar a un fenotipo patológico.²⁰³ Sin embargo, para estudiar la cooperación de las mutaciones en $U2af1$ con otros genes no es posible realizar esta alternativa, puesto que, como hemos visto, las alteraciones en este gen impiden que se produzca injerto en los ratones trasplantados.

El *splicing* de las líneas mutantes $U2af1^{mut/+}$, $Tet2^{-/-}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ se encuentra alterado

La alteración del patrón de *splicing* del pre-ARNm es una de las consecuencias más ampliamente estudiada de las células humanas y murinas mutantes en $U2AF1$.^{60,76,116,125,127}

Por un lado, empleando el paquete bioinformático rMATS se estudió en células LSK el *splicing* alternativo diferencial entre las líneas $U2af1^{mut/+}$, $Tet2^{-/-}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ y los controles *wild-type*. Se detectaron 1578 eventos de *splicing* diferencial en los ratones $U2af1^{mut/+}$ respecto a los controles, 1211 en $Tet2^{-/-}$ y 1242 en los doble mutantes. El hecho de que los ratones $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ presenten menos eventos de *splicing* alternativo respecto a los controles que los ratones $U2af1^{mut/+}$ evidencia que se está produciendo una interacción entre los procesos de *splicing* y metilación. Son diversos los estudios que han puesto de manifiesto esta interacción y han demostrado que las consecuencias de la metilación en el *splicing* son diferentes en función del *locus* del genoma que se analice; produciendo, mediante diferentes procesos, la inclusión¹⁰¹ o exclusión¹⁰⁰ de exones alternativos. Además, estos datos son consistentes con la evidencia ya descrita de que las mutaciones en $TET2$ y otros modificadores epigenéticos, pueden por sí mismos generar variaciones en el *splicing*.^{191,222,223} Para

estudiar más en profundidad la forma en la que puede estar afectando la metilación al *splicing* de genes procesados por *U2af1*, se podría realizar un análisis del metiloma con técnicas de NGS o microarrays e integrar los datos obtenidos con los resultados del ARN-seq.

Por otro lado, el tipo de evento de *splicing* alternativo detectado con mayor frecuencia en las tres líneas mutantes fue el salto de exón. Esto coincide con lo observado en los otros modelos murinos descritos de *U2af1*, ya sea aquellos que expresan la mutación S34F^{83,147} como aquellos modelos *U2af1*-KO.^{145,146} En el caso de los ratones *Tet2*^{-/-} no es posible comparar con los otros modelos descritos,^{150,170,173,180–182,220} puesto que en ellos no se estudia el *splicing*. Para profundizar más en estos eventos de salto de exón, se debería estudiar la secuencia canónica de los exones saltados e incluidos en los ratones *U2af1*^{mut/+} y controles para ver si existen variaciones en la preferencia de las secuencias como se ha visto tanto en las células humanas^{76,116,127} como en los modelos murinos descritos.^{83,137,147}

Además, un estudio de Ilagan *et al.* encontró 140 genes que mostraban un patrón de *splicing* alternativo tanto en muestras de pacientes de LMA con la mutación U2AF1^{S34}, como en células K562¹¹⁶ que expresaban U2AF1^{S34} o U2AF1^{Q157}. De estos 140 genes, el *splicing* de 32 de ellos se encontraba también alterado en nuestra línea *U2af1*^{mut/+}. Esto sugeriría que algunos de los genes que se ven afectados por mutaciones en *U2AF1*, se ven alterados independientemente de la especie, la población celular o el tipo de mutación de *U2AF1*.

Los resultados del ARN-seq pudieron ser validados en células c-kit⁺

Para validar los eventos de *splicing* alternativo detectados, se escogieron los genes *Ammecr11* y *H2-T24*. A pesar de la poca información disponible de estos genes, la elección se realizó en base a que presentaban un p-valor y un FDR menores, un Δ PSI mayor en valor absoluto y, además, una menor variabilidad entre las réplicas biológicas.

Se procedió a realizar una RT-PCR empleando para la amplificación *primers* flanqueantes a la región de interés. Inicialmente, se extrajo el ARN de células LSK, se retrotranscribió y se amplificó. Sin embargo, debido al número tan bajo de células de partida (25 000 – 50 000) la cantidad de ARN obtenida fue muy baja (< 6 ng) y en el gel de electroforesis no se observaron los amplicones pertenecientes al *splicing* alternativo. Por ello, finalmente se decidió emplear células c-kit⁺ de ratones control o mutantes. Así pues, se detectó, por un lado, un salto del exón 2 del gen *Ammecr11* en los mutantes

U2af1^{mut/+} y, por otro lado, un salto del exón 5 del gen *H2-T24* en los controles. No obstante, los amplicones pertenecientes al *splicing* alternativo detectados en la electroforesis convencional, fueron, igualmente, muy tenues. Esto puede deberse, por un lado, a que la cantidad de ARNm alternativo para los genes *Ammecr1* y *H2-T24* es mucho menor, que la cantidad de ARNm constitutivo; amplificándose en menor cantidad y por tanto visualizándose de manera más tenue. Por otro lado, también hay que considerar que, para la validación mediante RT-PCR, se empleó ARN procedente de células c-kit⁺, las cuales contienen no sólo las LSK sino también progenitores que pueden, en cierta forma, enmascarar el *splicing* alternativo. Por último, también cabría destacar que el ARN para la validación se obtuvo de ratones individuales, mientras que para el ARN-seq fue necesario emplear 3 ratones por réplica biológica para obtener un número significativo de células LSK.

Las rutas biológicas que contenían más genes afectados por un *splicing* aberrante no se vieron alteradas

Existen diversos mecanismos por los cuales las mutaciones en genes de *splicing* pueden contribuir a la patogénesis de los SMD. Por ello, con el fin de estudiar a qué rutas biológicas pertenecían los eventos de *splicing* diferencial en los ratones mutantes, se empleó la herramienta DAVID de enriquecimiento funcional.

Por un lado, en el caso de los ratones *U2af1^{mut/+}*, el proceso que se vio más afectado fue el ciclo celular. Esta ruta se ha visto alterada tanto en ensayos *in vitro* con células humanas mutadas en *U2AF1*^{121,144} como en otros ratones mutantes en *U2af1*^{146,148} donde se ha observado un aumento de la fase G₂/M. Sin embargo, en nuestro caso, al analizar por CF las diferentes fases del ciclo celular (G₁/G₀, S y G₂/M) en células LSK procedentes de la médula ósea, no se observaron variaciones significativas en los ratones *U2af1^{mut/+}* respecto a los controles.

Por otro lado, tanto los ratones *U2af1^{mut/+}* como los doble mutantes *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*, presentaban alterados diversos genes que pertenecían a la respuesta y al daño al ADN. Se ha visto que las alteraciones del *splicing* pueden ocasionar inestabilidad genómica y daño al ADN, a través de la formación de bucles-R (*R-loops*) que promueven roturas de doble cadena.^{224,225} En nuestro caso, *Ercc8* y *Fancm*, dos genes que participan en la regulación de los bucles-R, presentaron un *splicing* aberrante en los ratones *U2af1^{mut/+}*. En algunos casos de SMD con mutaciones en *U2AF1*, ya había sido descrito que estos genes presentaban un *splicing* alterado.⁷⁹

Discusión

Para medir daño al DNA, se empleó un kit comercial que permitía detectar la fosforilación de la histona H2AX mediante CF. La presencia de pH2AX se relaciona de forma directa con las roturas de doble hebra del ADN.²²⁶ No obstante, fuimos incapaces de detectar diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de pH2AX de los controles y los mutantes *U2af1^{mut/+}* y *U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}*. Esto contrasta con otros estudios que observaron que células con mutaciones en *U2AF1* o con ausencia de la proteína presentan un mayor daño al DNA medido por la fosforilación de esta histona por inmunofluorescencia, *Western blot* y CF.^{83,146}

El hecho de que ninguna de las dos rutas biológicas estudiadas presente diferencias respecto a los controles, a pesar de poseer diversos genes con *splicing* alterado, puede estar indicando que estas alteraciones no impiden que los genes afectados realicen su función de forma habitual.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En la línea $U2af1^{mut/+}$, se produce un fenómeno de haploinsuficiencia de la proteína U2AF1 *wild-type* que genera pequeñas alteraciones de la hematopoyesis que son insuficientes para que los ratones jóvenes o envejecidos (> 2 años) desarrollen SMD.
2. En la línea $Tet2^{-/-}$, la delección de la proteína TET2 genera un desequilibrio en la hematopoyesis con una tendencia hacia el linaje mielóide que es insuficiente para producir SMD en los ratones.
3. En la línea doble mutante $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$, la cooperación de las alteraciones en los genes $U2af1$ y $Tet2$ no produce un efecto sinérgico y no genera SMD en los ratones.
4. Las HSPC con mutaciones en el gen $U2af1$ son incapaces de injertar en los ratones receptores en los experimentos de trasplante competitivo.
5. Las HSPC de las líneas mutantes $U2af1^{mut/+}$, $Tet2^{-/-}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$ presentan un patrón de *splicing* aberrante, siendo el salto de exón el tipo de evento más observado en las tres líneas.
6. El ciclo celular y la presencia de daño en el ADN fueron las rutas biológicas que contenían más genes afectados por un *splicing* aberrante en las líneas $U2af1^{mut/+}$ y $U2af1^{mut/+} Tet2^{-/-}$.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein and Cell*. 2020;11(1):34-44. doi:10.1007/s13238-019-0633-0
2. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774). doi:10.1038/35004599
3. Görgens A, Radtke S, Möllmann M, et al. Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Reports*. 2013;3(5):1539-1552. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.025
4. Rossi L, Lin KK, Boles NC, et al. Less is more: Unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. *Cell Stem Cell*. 2012;11(3):302-317. doi:10.1016/j.stem.2012.08.006
5. Arinobu Y, Mizuno S ichi, Chong Y, et al. Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4). doi:10.1016/j.stem.2007.07.004
6. Soares-da-Silva F, Peixoto M, Cumano A, Pinto-do-Ó P. Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00612
7. Lai S, Huang W, Xu Y, et al. Comparative transcriptomic analysis of hematopoietic system between human and mouse by Microwell-seq. *Cell Discovery*. 2018;4(1). doi:10.1038/s41421-018-0038-x
8. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2). doi:10.1016/j.stem.2012.01.006
9. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clinical Pathology*. 2003;3(1). doi:10.1186/1472-6890-3-3
10. Chotinantakul K, Leraanansaksiri W. Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Research*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/270425
11. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2010;2(6). doi:10.1002/wsbm.86
12. Pronk CJH, Rossi DJ, Månsson R, et al. Elucidation of the Phenotypic, Functional, and Molecular Topography of a Myeloerythroid Progenitor Cell Hierarchy. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4):428-442. doi:10.1016/j.stem.2007.07.005
13. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(5). doi:10.1200/JCO.2010.31.1175
14. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22). doi:10.1182/blood-2013-08-518886

Bibliografía

15. Haferlach T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology*. 2019;86(1). doi:10.1159/000488712
16. Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*. 2015;95(1). doi:10.1111/ejh.12515
17. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(1). doi:10.1038/nrc.2016.112
18. Woll PS, Kjällquist U, Chowdhury O, et al. Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell*. 2014;25(6). doi:10.1016/j.ccr.2014.03.036
19. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*. 2018;8(5). doi:10.1038/s41408-018-0085-4
20. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos y Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (GESMD y SEHH). *Guías Españolas de SMD y LMMC. 2a Edición. Boletín Del.*; 2020.
21. Chang CK, Storer BE, Scott BL, et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome: Similar outcomes in patients with de novo disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic disorders. *Blood*. 2007;110(4):1379-1387. doi:10.1182/blood-2007-02-076307
22. Sekeres MA. *Epidemiology, Natural History, and Practice Patterns of Patients with Myelodysplastic Syndromes in 2010*. Vol 9.; 2011.
23. Veryaskina YA, Titov SE, Kovynev IB, Pospelova TI, Zhimulev IF. Prognostic markers of myelodysplastic syndromes. *Medicina (Lithuania)*. 2020;56(8):1-16. doi:10.3390/medicina56080376
24. Florensa L, Arenillas L, Calvo X, et al. The importance of adequate recognition of normal and dysplastic myelopoiesis for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Histology and Histopathology*. 2019;34(8):857-873. doi:10.14670/HH-18-093
25. Arenillas L, Calvo X, Luño E, et al. Considering bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves the prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(27):3284-3292. doi:10.1200/JCO.2016.66.9705
26. Calvo X, Arenillas L, Luño E, et al. Enumerating bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes and permits a better definition of the intermediate risk category of the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). *American Journal of Hematology*. 2017;92(7):614-621. doi:10.1002/ajh.24732
27. Calvo X, Arenillas L, Luño E, et al. Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: A rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes. *Modern Pathology*. 2016;29(12):1541-1551. doi:10.1038/modpathol.2016.146

28. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and RARS with thrombocytosis (RARS-T): 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2017;92(3):297-310. doi:10.1002/ajh.24637
29. Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, et al. *Clinical Importance of Interphase Cytogenetics Detecting Occult Chromosome Lesions in Myelodysplastic Syndromes with Normal Karyotype*. Vol 15.; 2001. www.nature.com/leu
30. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts . *New England Journal of Medicine*. 2011;365(15):1384-1395. doi:10.1056/nejmoa1103283
31. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239-6246. doi:10.1182/blood-2011-09-377275
32. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: Recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964. doi:10.1182/blood-2013-03-492884
33. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(27):3376-3382. doi:10.1200/JCO.2011.40.7379
34. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2496-2506. doi:10.1056/nejmoa1013343
35. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-247. doi:10.1038/leu.2013.336
36. ben Nett JM, Catovsky, ^ D, Flandrin G, Galton, ^ DAG, Gralnick A N HR, Sultan, ^ The French-American-British DC. *Proposals for the Classification of the Myelodysplastic Syndromes*. Vol 51.; 1982.
37. Swerdlow SH CEHNJEPSSH et al. *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th Edition)*. IARC: Lyon 2017. 4th ed.; 2017.
38. Greenberg P, Cox C, Lebeau MM, et al. *International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes from Patients with Primary MDS from Seven Previously Re.*; 1997.
39. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the International Prognostic Scoring System. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(15):1963-1970. doi:10.1200/JCO.2010.28.3978
40. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489

Bibliografia

41. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(8):820-829. doi:10.1200/JCO.2011.35.6394
42. Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: A multicenter study. *Leukemia Research*. 2014;38(1):57-64. doi:10.1016/j.leukres.2013.10.013
43. Montoro J, Pomares H, Villacampa G, et al. Dichotomization of the new revised international prognostic scoring system for a better clinical stratification of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 2019;60(6):1522-1527. doi:10.1080/10428194.2018.1542151
44. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO prognostic scoring system: Validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian regional database. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(21):2671-2677. doi:10.1200/JCO.2012.48.0764
45. Cazzola M, della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. Published online 2013. doi:10.1182/blood-2013-09
46. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of Genetic mutations in Myelodysplastic syndrome. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(9):968-974. doi:10.1200/JCO.2016.71.0806
47. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. Published online 2014. doi:10.1182/blood-2014-03
48. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*. 2017;49(2):204-212. doi:10.1038/ng.3742
49. Tefferi A, Gangat N, Mudireddy M, et al. Mayo Alliance Prognostic Model for Myelodysplastic Syndromes: Integration of Genetic and Clinical Information. *Mayo Clinic Proceedings*. 2018;93(10):1363-1374. doi:10.1016/j.mayocp.2018.04.013
50. Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, et al. Molecular International Prognosis Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Abstract #61 In Proceedings of the 2021 American Society of Hematology Annual Meeting, Online, 11–13 December 2021*.
51. Pfeilstöcker M, Pfeilstöcker P, Tuechler H, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. Published online 2016. doi:10.1182/blood-2016-02
52. Volpe VO, Garcia-Manero G, Komrokji RS. Myelodysplastic Syndromes: A New Decade. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. Published online 2021. doi:10.1016/j.clml.2021.07.031
53. Estephan F, Tiu R v. Current and novel therapeutic approaches in myelodysplastic syndromes. *Journal of Community and Supportive Oncology*. 2014;12(7):236-249. doi:10.12788/jcso.0057

54. Platzbecker U, Kubasch AS, Homer-Bouthiette C, Prebet T. Current challenges and unmet medical needs in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2021;35(8):2182-2198. doi:10.1038/s41375-021-01265-7
55. Klepin HD, Rao A v., Pardee TS. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older adults. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(24):2541-2552. doi:10.1200/JCO.2014.55.1564
56. Chiereghin C, Travaglino E, Zampini M, et al. The genetics of myelodysplastic syndromes: Clinical relevance. *Genes (Basel)*. 2021;12(8). doi:10.3390/genes12081144
57. Shiozawa Y, Malcovati L, Gallì A, et al. Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nature Communications*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-06063-x
58. Taylor J, Mi X, North K, et al. Single-cell genomics reveals the genetic and molecular bases for escape from mutational epistasis in myeloid neoplasms. *Blood*. 2020;136(13):1477-1486. doi:10.1182/blood.2020006868
59. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2016;769:47-62. doi:10.1016/j.mrrev.2016.04.009
60. Madan V, Kanojia D, Li J, et al. Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nature Communications*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms7042
61. Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, et al. Spanish Guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2020;188(5):605-622. doi:10.1111/bjh.16175
62. Swoboda DM, Sallman DA. Mutation-Driven Therapy in MDS. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2019;14(6):550-560. doi:10.1007/s11899-019-00554-4
63. Christiansen DH, Anderson MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17(9):1813-1819. doi:10.1038/sj.leu.2403054
64. Awada H, Thapa B, Visconte V. The Genomics of Myelodysplastic Syndromes: Origins of Disease Evolution, Biological Pathways, and Prognostic Implications. *Cells*. 2020;9(11). doi:10.3390/cells9112512
65. Thota S, Viny AD, Makishima H, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*. 2014;124(11):1790-1798. doi:10.1182/blood-2014-04-567057
66. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: A review of the literature. *Haematologica*. 2011;96(10):1536-1542. doi:10.3324/haematol.2011.043422
67. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1049-1059. doi:10.1182/blood-2018-10-844621

Bibliografia

68. Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia*. 2019;33(7):1747-1758. doi:10.1038/s41375-018-0351-2
69. Schwind S, Jentzsch M, Kubasch AS, Metzeler KH, Platzbecker U. Myelodysplastic syndromes: Biological and therapeutic consequences of the evolving molecular aberrations landscape. *Neoplasia*. 2021;23(11). doi:10.1016/j.neo.2021.09.002
70. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/nejmoa1408617
71. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/nejmoa1409405
72. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature Medicine*. 2014;20(12):1472-1478. doi:10.1038/nm.3733
73. Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(7):1-2. doi:10.1101/cshperspect.a003707
74. Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(7):413-430. doi:10.1038/nrc.2016.51
75. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*. 2009;136(4):701-718. doi:10.1016/j.cell.2009.02.009
76. Okeyo-Owuor T, White BS, Chatrikhi R, et al. U2AF1 mutations alter sequence specificity of pre-mRNA binding and splicing. *Leukemia*. 2015;29(4):909-917. doi:10.1038/leu.2014.303
77. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(2):108-121. doi:10.1038/nrm3742
78. Herdt O, Neumann A, Timmermann B, Heyd F. The cancer-associated U2AF35 470A>G (Q157R) mutation creates an in-frame alternative 5' splice site that impacts splicing regulation in Q157R patients. *RNA*. 2017;23(12):1796-1806. doi:10.1261/rna.061432.117
79. Pellagatti A, Armstrong RN, Steeples V, et al. *Impact of Spliceosome Mutations on RNA Splicing in Myelodysplasia: Dysregulated Genes/Pathways and Clinical Associations*. Vol 132.; 2018. <http://broadinstitute.github.io/picard>;
80. Kol G, Lev-Maor G, Ast G. Human-mouse comparative analysis reveals that branch-site plasticity contributes to splicing regulation. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(11):1559-1568. doi:10.1093/hmg/ddi164
81. Abril JF, Castelo R, Guigó R. Comparison of splice sites in mammals and chicken. *Genome Research*. 2005;15(1):111-119. doi:10.1101/gr.3108805

82. Mupo A, Seiler M, Sathiaselan V, et al. Hemopoietic-specific Sf3b1-K700E knock-in mice display the splicing defect seen in human MDS but develop anemia without ring sideroblasts. *Leukemia*. 2017;31(3):720-727. doi:10.1038/leu.2016.251
83. Shirai CL, Ley JN, White BS, et al. Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell*. 2015;27(5):631-643. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.008
84. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 2010;463(7280):457-463. doi:10.1038/nature08909
85. Wang Y, Liu J, Huang B, et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*. 2015;3(2):152-158. doi:10.3892/br.2014.407
86. Pellagatti A, Boulwood J. Splicing factor mutant myelodysplastic syndromes: Recent advances. *Advances in Biological Regulation*. 2020;75. doi:10.1016/j.jbior.2019.100655
87. Zhang J, Zhang YZ, Jiang J, Duan CG. The Crosstalk Between Epigenetic Mechanisms and Alternative RNA Processing Regulation. *Frontiers in Genetics*. 2020;11. doi:10.3389/fgene.2020.00998
88. Zheng CL, Xiang-Dong FU, Gribskov M. Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse. *RNA*. 2005;11(12):1777-1787. doi:10.1261/rna.2660805
89. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*. 2011;144(1):16-26. doi:10.1016/j.cell.2010.11.056
90. Tang SJ, Shen H, An O, et al. Cis- and trans-regulations of pre-mRNA splicing by RNA editing enzymes influence cancer development. *Nature Communications*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-14621-5
91. Obeng EA, Ebert BL. Charting the "Splice" Routes to MDS. *Cancer Cell*. 2015;27(5):607-609. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.016
92. Pangallo Fred J, Polaski Fred J, Abdel-Wahab O, Bradley Fred R. Rare and private spliceosomal gene mutations drive partial, complete, and dual phenocopies of hotspot alterations. *Blood*. Published online 2020. doi:10.1182/blood.2019002894/1558011/blood.2019002894.pdf
93. Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; Expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*. 2016;35(19):2413-2427. doi:10.1038/onc.2015.318
94. Yang YT, Chiu YC, Kao CJ, et al. The prognostic significance of global aberrant alternative splicing in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer Journal*. 2018;8(8). doi:10.1038/s41408-018-0115-2
95. Liu P, Barb J, Woodhouse K, et al. Transcriptome profiling and sequencing of differentiated human hematopoietic stem cells reveal lineage-specific expression and alternative splicing of genes. *Physiol Genomics*. 2011;43:1117-1134. doi:10.1152/physiolgenomics.00099.2011.-He

Bibliografia

96. Cesana M, Guo MH, Cacchiarelli D, et al. A CLK3-HMGA2 Alternative Splicing Axis Impacts Human Hematopoietic Stem Cell Molecular Identity throughout Development. *Cell Stem Cell*. 2018;22(4):575-588.e7. doi:10.1016/j.stem.2018.03.012
97. Chen L, Kostadraia M, Martens JHA, et al. Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. *Science (1979)*. 2014;345(6204). doi:10.1126/science.1251033
98. Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, et al. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2009;16(9):996-1001. doi:10.1038/nsmb.1658
99. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (1979)*. 2010;327(5968):996-1000. doi:10.1126/science.1184208
100. Shukla S, Kavak E, Gregory M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011;479(7371):74-79. doi:10.1038/nature10442
101. Yang X, Han H, DeCarvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*. 2014;26(4):577-590. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.028
102. Marina RJ, Sturgill D, Bailly MA, et al. TET -catalyzed oxidation of intragenic 5-methylcytosine regulates CTCF -dependent alternative splicing . *The EMBO Journal*. 2016;35(3):335-355. doi:10.15252/embj.201593235
103. Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Research*. 2013;23(11):1256-1269. doi:10.1038/cr.2013.110
104. Convertini P, Shen M, Potter PM, et al. Sudemycin e influences alternative splicing and changes chromatin modifications. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(8):4947-4961. doi:10.1093/nar/gku151
105. Naftelberg S, Schor IE, Ast G, Kornblihtt AR. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annual Review of Biochemistry*. 2015;84:165-198. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034242
106. Pacheco TR, Gomes AQ, Barbosa-Morais NL, et al. Diversity of vertebrate splicing factor U2AF35: Identification of alternatively spliced U2AF1 mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(26):27039-27049. doi:10.1074/jbc.M402136200
107. Kralovicova J, Vorechovsky I. Alternative splicing of U2AF1 reveals a shared repression mechanism for duplicated exons. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(1):417-434. doi:10.1093/nar/gkw733
108. Kralovicova J, Knut M, Cross NCP, Vorechovsky I. Identification of U2AF(35)-dependent exons by RNA-Seq reveals a link between 3' splice-site organization and activity of U2AF-related proteins. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(7):3747-3763. doi:10.1093/nar/gkv194
109. Rudner DZ, Kanaar R, Breger KS, Rio DC. *Interaction between Subunits of Heterodimeric Splicing Factor U2AF Is Essential In Vivo*. Vol 18.; 1998.

110. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*. 2012;44(1):53-57. doi:10.1038/ng.1031
111. Wu T, Fu XD. Genomic functions of U2AF in constitutive and regulated splicing. *RNA Biology*. 2015;12(5):479-485. doi:10.1080/15476286.2015.1020272
112. Zhang M, Zamore PD, Carmo-Fonsecat M, Lamondt AI, Green MR. *Cloning and Intracellular Localization of the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Auxiliary Factor Small Subunit (Splicing/Spliceosome/RNA Binding/Arginine, Serine Rich/Cofled Body)*. Vol 89.; 1992.
113. Webb CJ, Wise JA. The Splicing Factor U2AF Small Subunit Is Functionally Conserved between Fission Yeast and Humans. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(10):4229-4240. doi:10.1128/mcb.24.10.4229-4240.2004
114. Yoshida H, Park SY, Oda T, et al. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes and Development*. 2015;29(15):1649-1660. doi:10.1101/gad.267104.115
115. Kielkopf CL, Rodionova NA, Green MR, Burley SK. A Novel Peptide Recognition Mode Revealed by the X-Ray Structure of a Core U2AF35/U2AF65 Heterodimer. *Cell*. 2001;106(5):595-605. doi:10.1016/S0092-8674(01)00480-9
116. Ilagan JO, Ramakrishnan A, Hayes B, et al. U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome Research*. 2015;25(1):14-26. doi:10.1101/gr.181016.114
117. Rudner DZ, Breger KS, Kanaar R, Adams MD, Rio DC. *RNA Binding Activity of Heterodimeric Splicing Factor U2AF: At Least One RS Domain Is Required for High-Affinity Binding*. Vol 18.; 1998.
118. Kielkopf CL, Lücke S, Green MR. *U2AF Homology Motifs: Protein Recognition in the RRM World NIH Public Access*. Vol 18.; 2004.
119. Shen H, Kan JLC, Green MR. *Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly SnRNP 70 KDa (U1 70K) Protein (Hoffman and Grabow-Ski Splicing Is Initiated through Recognition of Several In-Tron-Defining Splice Signals: The 5 Splice Site, Which Is Recognized by U1 SnRNP and Includes a Conserved GU)*. Vol 13. Tacke and Manley; 2004.
120. Li B, Zou D, Yang S, Ouyang G, Mu Q. Prognostic significance of U2AF1 mutations in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Journal of International Medical Research*. 2020;48(3):030006051989101. doi:10.1177/0300060519891013
121. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69. doi:10.1038/nature10496
122. Thol F, Kade S, Schlarman C, et al. MYELOID NEOPLASIA Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. Published online 2012. doi:10.1182/blood-2011
123. Li B, Liu J, Jia Y, et al. Clinical features and biological implications of different U2AF1 mutation types in myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2018;57(2):80-88. doi:10.1002/gcc.22510

Bibliografia

124. Adema V, Hirsch CM, Przychodzen BP, et al. U2AF1 Mutations in S34 and Q157 Create Distinct Molecular and Clinical Contexts. *Blood*. 2016;128(22):3155-3155. doi:10.1182/blood.v128.22.3155.3155
125. Fei DL, Motowski H, Chatrikhi R, et al. Wild-Type U2AF1 Antagonizes the Splicing Program Characteristic of U2AF1-Mutant Tumors and Is Required for Cell Survival. *PLoS Genetics*. 2016;12(10). doi:10.1371/journal.pgen.1006384
126. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012;150(6):1107-1120. doi:10.1016/j.cell.2012.08.029
127. Brooks AN, Choi PS, de Waal L, et al. A pan-cancer analysis of transcriptome changes associated with somatic mutations in U2AF1 reveals commonly altered splicing events. *PLoS ONE*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0087361
128. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-339. doi:10.1038/nature12634
129. Wu SJ, Tang JL, Lin CT, et al. Clinical implications of U2AF1 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression. *American Journal of Hematology*. 2013;88(11). doi:10.1002/ajh.23541
130. Yip BH, Steeples V, Repapi E, et al. The U2AF1S34F mutation induces lineage-specific splicing alterations in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(6):2206-2221. doi:10.1172/JCI91363
131. Taylor J, Lee SC. Mutations in spliceosome genes and therapeutic opportunities in myeloid malignancies. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2019;58(12):889-902. doi:10.1002/gcc.22784
132. Hershberger CE, Moyer DC, Adema V, et al. Complex landscape of alternative splicing in myeloid neoplasms. *Leukemia*. Published online April 1, 2021. doi:10.1038/s41375-020-1002-y
133. Nguyen HD, Leong WY, Li W, et al. Spliceosome mutations induce R loop-associated sensitivity to ATR inhibition in myelodysplastic syndromes. *Cancer Research*. 2018;78(18):5363-5374. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3970
134. Bapat A, Keita N, Martelly W, et al. Myeloid Disease Mutations of Splicing Factor SRSF2 Cause G2-M Arrest and Skewed Differentiation of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*. 2018;36(11):1663-1675. doi:10.1002/stem.2885
135. Wang H, Guo Y, Dong Z, et al. Differential U2AF1 mutation sites, burden and co-mutation genes can predict prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. *Scientific Reports*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-74744-z
136. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia*. 2018;32(10):2274-2278. doi:10.1038/s41375-018-0078-0
137. Alberti MO, Zhu M, Nonavinkere Srivatsan S, et al. Mutant U2AF1S34F and U2AF1Q157P Induce Distinct RNA Splicing and Hematopoietic Phenotypes In Vivo. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):770-770. doi:10.1182/blood-2019-123892

138. Kim SY, Kim K, Hwang B, et al. The high frequency of the U2AF1 S34Y mutation and its association with isolated trisomy 8 in myelodysplastic syndrome in Asians, but not in Caucasians. *Leukemia Research*. 2017;61:96-103. doi:10.1016/j.leukres.2017.09.001
139. Li B, Zou D, Yang S, Ouyang G, Mu Q. Prognostic significance of U2AF1 mutations in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Journal of International Medical Research*. 2019;48(3). doi:10.1177/0300060519891013
140. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(14):3203-3210. doi:10.1182/blood-2011-12-399774
141. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, et al. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: Prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *American Journal of Hematology*. 2013;88(3):201-206. doi:10.1002/ajh.23373
142. Walter MJ, Shen D, Shao J, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(6):1275-1282. doi:10.1038/leu.2013.58
143. Wu L, Song L, Xu L, et al. Genetic landscape of recurrent ASXL1, U2AF1, SF3B1, SRSF2, and EZH2 mutations in 304 Chinese patients with myelodysplastic syndromes. *Tumor Biology*. 2016;37(4):4633-4640. doi:10.1007/s13277-015-4305-2
144. Zhu Y, Song D, Guo J, et al. U2AF1 mutation promotes tumorigenicity through facilitating autophagy flux mediated by FOXO3a activation in myelodysplastic syndromes. *Cell Death and Disease*. 2021;12(7). doi:10.1038/s41419-021-03573-3
145. Wadugu BA, Srivatsan SN, Heard A, et al. U2af1 is a haplo-essential gene required for hematopoietic cancer cell survival in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(21). doi:10.1172/JCI141401
146. Dutta A, Yang Y, Le BT, et al. U2af1 is required for survival and function of hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia*. 2021;35(8):2382-2398. doi:10.1038/s41375-020-01116-x
147. Fei DL, Zhen T, Durham B, et al. Impaired hematopoiesis and leukemia development in mice with a conditional knock-in allele of a mutant splicing factor gene U2af1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(44):E10437-E10446. doi:10.1073/pnas.1812669115
148. Kim SP, Srivatsan SN, Chavez M, et al. Mutant U2AF1-induced alternative splicing of H2afy (macroH2A1) regulates B-lymphopoiesis in mice. *Cell Reports*. 2021;36(9). doi:10.1016/j.celrep.2021.109626
149. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011;146(6):866-872. doi:10.1016/j.cell.2011.08.042
150. Pan F, Wingo TS, Zhao Z, et al. Tet2 loss leads to hypermutagenicity in haematopoietic stem/progenitor cells. *Nature Communications*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms15102
151. Kunimoto H, Nakajima H. TET2: A cornerstone in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Science*. 2021;112(1):31-40. doi:10.1111/cas.14688

Bibliografía

152. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. Published online 2016. doi:10.1101/gad.276568
153. Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*. 2013;493(7433):561-564. doi:10.1038/nature11742
154. Delhommeau F, Dupont S, della Valle V, et al. *Mutation in TET2 in Myeloid Cancers A Bs Tr Ac t*. Vol 360.; 2009.
155. Ito S, D'alesio AC, Taranova O v, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. *Role of Tet Proteins in 5mC to 5hmC Conversion, ES Cell Self-Renewal, and ICM Specification*. Vol 466.; 2010.
156. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):200-213. doi:10.1016/j.stem.2011.01.008
157. Xu C, Bian C, Lam R, Dong A, Min J. The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nature Communications*. 2011;2(1). doi:10.1038/ncomms1237
158. Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research*. 2010;20(12):1390-1393. doi:10.1038/cr.2010.156
159. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144-147. doi:10.1182/blood-2009-03-210039
160. Asmar F, Punj V, Christensen J, et al. Genome-wide profiling identifies a DNA methylation signature that associates with TET2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(12):1912-1920. doi:10.3324/haematol.2013.088740
161. Couronné L, Bastard C, Olivier AB. TET2 and DNMT3A Mutations in Human T-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. Published online 2012.
162. Couronné L, Lippert E, Andrieux J, et al. Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010;24(1):201-203. doi:10.1038/leu.2009.169
163. Abdel-Wahab O, Manshour T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Research*. 2010;70(2):447-452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3783
164. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, et al. Analysis of the Ten-Eleven Translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114(8):1628-1632. doi:10.1182/blood-2009-01-197525
165. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature Genetics*. 2012;44(11):1179-1181. doi:10.1038/ng.2413
166. Hirsch CM, Nazha A, Kneen K, et al. Consequences of mutant TET2 on clonality and subclonal hierarchy. *Leukemia*. 2018;32(8):1751-1761. doi:10.1038/s41375-018-0150-9

167. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu R v., et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403-6410. doi:10.1182/blood-2009-02-205690
168. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*. 2009;41(7):838-842. doi:10.1038/ng.391
169. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009;23(7):1343-1345. doi:10.1038/leu.2009.59
170. Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. In: *Blood*. Vol 118. American Society of Hematology; 2011:4509-4518. doi:10.1182/blood-2010-12-325241
171. Lin Y, Lin Z, Cheng K, et al. *Prognostic Role of TET2 Deficiency in Myelodysplastic Syndromes: A Meta-Analysis.*; 2017. www.impactjournals.com/oncotarget
172. Sato H, Wheat JC, Steidl U, Ito K. DNMT3A and TET2 in the pre-leukemic phase of hematopoietic disorders. *Frontiers in Oncology*. 2016;6(AUG). doi:10.3389/fonc.2016.00187
173. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell*. 2011;20(1):11-24. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001
174. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839-843. doi:10.1038/nature09586
175. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015
176. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010;116(19):3923-3932. doi:10.1182/blood-2010-03-274704
177. Kim M, Yahng SA, Kwon A, et al. Mutation in TET2 or TP53 predicts poor survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving hypomethylating treatment or stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2015;50(8):1132-1134. doi:10.1038/bmt.2015.110
178. Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014;124(17):2705-2712. doi:10.1182/blood-2014-06
179. Patel BJ, Przychodzen B, Thota S, et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(12):2815-2823. doi:10.1038/leu.2017.164

Bibliografia

180. Quivoron C, Couronné L, della Valle V, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25-38. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003
181. Mouly E, Ghamlouch H, Della-Valle V, et al. B-cell tumor development in Tet2-deficient mice. *Blood Advances*. 2018;2(6):703-714. doi:10.1182/bloodadvances.2017014118
182. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-eleven-translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14566-14571. doi:10.1073/pnas.1112317108
183. Ito K, Lee J, Chrysanthou S, et al. Non-catalytic Roles of Tet2 Are Essential to Regulate Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Homeostasis. *Cell Reports*. 2019;28(10):2480-2490.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.094
184. Hirsch CM, Przychodzen BP, Radivoyevitch T, et al. Molecular features of early onset adult myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2017;102(6):1028-1034. doi:10.3324/haematol.2016.159772
185. Kishtagari A, Jha BK, Maciejewski JP. TET2 mutations and clonal dynamics. *Oncotarget*. 2019;10(21):2010-2011. doi:10.18632/oncotarget.26779
186. Kunimoto H, Meydan C, Nazir A, et al. Cooperative Epigenetic Remodeling by TET2 Loss and NRAS Mutation Drives Myeloid Transformation and MEK Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell*. 2018;33(1):44-59.e8. doi:10.1016/j.ccell.2017.11.012
187. Zhang X, Su J, Jeong M, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nature Genetics*. 2016;48(9):1014-1023. doi:10.1038/ng.3610
188. Shih AH, Jiang Y, Meydan C, et al. Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2015;27(4):502-515. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.009
189. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(12):2641-2659. doi:10.1084/jem.20131141
190. Tara S, Isshiki Y, Nakajima-Takagi Y, et al. Bcor insufficiency promotes initiation and progression of myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2018;132(23):2470-2483. doi:10.1182/blood-2018-01-827964
191. Obeng EA, Chappell RJ, Seiler M, et al. Physiologic Expression of Sf3b1K700E Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. *Cancer Cell*. 2016;30(3):404-417. doi:10.1016/j.ccell.2016.08.006
192. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms Key Points. Published online 2015. doi:10.1182/blood-2014-04
193. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. *Nucleotide Sequence of the lap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product*. Vol 169.; 1987.

194. Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. *Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the Archaea Haloforax Mediterranei and Haloforax Volcanii and Could Be Involved in Replicon Partitioning*. Vol 17.; 1995.
195. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;60(2):174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
196. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (1979)*. 2014;346(6213). doi:10.1126/science.1258096
197. González-Romero E, Martínez-Valiente C, García-Ruiz C, Vázquez-Manrique RP, Cervera J, Sanjuan-Pla A. CRISPR to fix bad blood: A new tool in basic and clinical hematology. *Haematologica*. 2019;104(5):881-893. doi:10.3324/haematol.2018.211359
198. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010
199. Gómez-Redondo I, Ramos-Ibeas P, Pericuesta E, Fernández-González R, Laguna-Barraza R, Gutiérrez-Adán A. Minor splicing factors Zrsr1 and Zrsr2 are essential for early embryo development and 2-cell-like conversion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):1-15. doi:10.3390/ijms21114115
200. Marín-Quílez A, García-Tuñón I, Fernández-Infante C, et al. Characterization of the platelet phenotype caused by a germline RUNX1 Variant in a CRISPR/Cas9-generated murine model. *Thrombosis and Haemostasis*. 2021;121(9):1193-1205. doi:10.1055/s-0041-1723987
201. Basheer F, Vassiliou G. Mouse models of myeloid malignancies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2021;11(1):1-26. doi:10.1101/cshperspect.a035535
202. Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-918. doi:10.1016/j.cell.2013.04.025
203. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Biotechnology*. 2014;32(9):941-946. doi:10.1038/nbt.2951
204. Tothova Z, Krill-Burger JM, Popova KD, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Human Hematopoietic Stem Cells Models Clonal Hematopoiesis and Myeloid Neoplasia. *Cell Stem Cell*. 2017;21(4):547-555.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.07.015
205. Ramos-Ibeas P, Calle A, Fernández-González R, et al. Intracytoplasmic sperm injection using DNAFragmented sperm in mice negatively affects embryo-derived embryonic stem cells, reduces the fertility of male offspring and induces heritable changes in epialleles. *PLoS ONE*. 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0095625
206. Pfaffl MW. *A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR*. Vol 29.; 2001.
207. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635

Bibliografía

208. Shen S, Park JW, Lu ZX, et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(51):E5593-E5601. doi:10.1073/pnas.1419161111
209. Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Vol 4.; 2003. <http://dot.ped.med.umich.edu:2000/>
210. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(8). doi:10.1093/nar/gkz114
211. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. 2010;11(10). doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106
212. Galvin A, Weglarz M, Folz-Donahue K, et al. Cell Cycle Analysis of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Multicolor Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. 2019;87(1). doi:10.1002/cpcy.50
213. Rasmussen KD, Berest I, Keßler S, et al. TET2 binding to enhancers facilitates transcription factor recruitment in hematopoietic cells. *Genome Research*. 2019;29(4):564-575. doi:10.1101/gr.239277.118
214. Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible Gene Targeting in Mice. *Science (1979)*. 1995;269(5229):1427-1429. doi:10.1126/science.7660125
215. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015;27(5):617-630. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.006
216. Madan V, Cao Z, Teoh WW, et al. ZRSR1 cooperates with ZRSR2 in regulating splicing of U12-type introns in murine hematopoietic cells. *Haematologica*. Published online March 11, 2021. doi:10.3324/haematol.2020.260562
217. Inoue D, Polaski JT, Taylor J, et al. Minor intron retention drives clonal hematopoietic disorders and diverse cancer predisposition. *Nature Genetics*. 2021;53(5):707-718. doi:10.1038/s41588-021-00828-9
218. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nature Medicine*. 2018;24(7):1015-1023. doi:10.1038/s41591-018-0081-z
219. Abelson S, Collord G, Ng SWK, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018;559(7714):400-404. doi:10.1038/s41586-018-0317-6
220. Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Experimental Hematology*. 2017;55:56-70.e13. doi:10.1016/j.exphem.2017.08.001
221. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124(18):2793-2803. doi:10.1182/blood-2014-04-522136
222. Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, et al. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature*. 2019;574(7777):273-277. doi:10.1038/s41586-019-1618-0

223. Togami K, Chung SS, Madan V, et al. Sex-Biased ZRSR2 Mutations in Myeloid Malignancies Impair Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and Apoptosis. *Cancer Discovery*. 2022;12(2):522-541. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1513
224. Chan YA, Hieter P, Stirling PC. Mechanisms of genome instability induced by RNA-processing defects. *Trends in Genetics*. 2014;30(6):245-253. doi:10.1016/j.tig.2014.03.005
225. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes and Development*. 2014;28(13):1384-1396. doi:10.1101/gad.242990.114
226. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-309.