

## 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<sup>mut/+</sup>*, *Tet2<sup>-/-</sup>* y *U2af1<sup>mut/+</sup> Tet2<sup>-/-</sup>*, 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<sup>mut/+</sup>* 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<sup>-/-</sup>*, observamos un incremento de células mieloides, esplenomegalia, aumento del compartimento LSK (HSPC con inmunofenotipo Linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup>) 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<sup>mut/+</sup> Tet2<sup>-/-</sup>*, no mostró un efecto sinérgico entre ellas. Así pues, se detectaron variaciones en los progenitores mieloeritroides y un aumento significativo

de células mieloides y LSK. No obstante, igual que ocurría con la línea *U2af1<sup>mut/+</sup>*, 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<sup>mut/+</sup>*, *Tet2<sup>-/-</sup>* y *U2af1<sup>mut/+</sup> Tet2<sup>-/-</sup>*. 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<sup>mut/+</sup>*, y el daño al ADN, en las líneas *U2af1<sup>mut/+</sup>* y *U2af1<sup>mut/+</sup> Tet2<sup>-/-</sup>*, 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.