



Universidad
de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**Generación de modelos animales
para el estudio de las mutaciones en
*SF3B1***

Trabajo Fin de Máster

Francisco José Rodríguez Díaz

14 de julio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Hace ya muchos años que empecé esto. Es cierto que con un gran periodo de no dedicación, pero por fin he terminado. Lo que se empieza hay que acabarlo, gracias papa.

A Sharon y a Telmo, gracias por ayudarme a demostrar que las quimeras se pueden conseguir. No hay nada mejor en el mundo que vosotros.

Gracias a mis tutores, la doctora Velasco y el doctor Quesada por ser pacientes conmigo y por hacerme ver qué es importante y qué no. Por ayudarme a mejorar.

Gracias a Carlos por ayudarme a hacer compatible lo incompatible. Por mantener la ilusión día tras día. Somos astronautas reversos.

Gracias a Alicia, por todo.

Gracias a mis amigos del labo, todos lo sois. Nunca sabréis cuanto me habéis ayudado, no puedo expresarlo con palabras, no soy tan locuaz, aunque espero que un buen trozo de celo en la nariz y un guante en la cabeza ayuden.

Gracias Aran y Rebe, buena parte de esto os lo debo a vosotras.

Gracias también a Rosa y a Mayo, amigos de juventud, madurez y, estoy seguro, de vejez. Gracias por el apoyo continuo.

Todos vosotros sois mi familia *outbred*.

ABREVIATURAS

CLL: Leucemia linfática crónica

DIE: Embrión doblemente inyectado

EBs: Cuerpos embrionarios

ES: Célula madre embrionaria

IGVH: Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina

K700E: Cambio de lisina por glutámico en la posición 700

KLHL6: Gen codificante para la proteína 6 con dominio *Kelch*

LIN cells: Células de linaje

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MYD88: Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide

OMG: Organismo Modificado Genéticamente

POT1: Proteína 1 de protección de telómeros

SF3B1: Gen codificante para la subunidad 1 del factor de splicing 3b

SLL: Linfoma linfocítico de célula pequeña

snRNA: Ácido ribonucleico nuclear pequeño

snRNPs: Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

XPO1: Gen codificante para la Exportina 1

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
- Manejo de los animales.....	14
- Cultivo de ES.....	14
- Control de calidad de las ES.....	15
- Superovulación.....	16
- Obtención y cultivo de embriones.....	16
- Microinyección.....	16
- DIE.....	17
- Transferencia embrionaria.....	17
- Formación de cuerpos embrionarios (EBs).....	17
- Generación de teratomas.....	17
- Aislamiento y purificación de células progenitoras hematopoyéticas	18
- Ablación de medula ósea y trasplante.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
- Generación de progenitores hematopoyéticos y trasplante.....	20
- Generación de ratones quiméricos para la mutación K700E de SF3B1.....	22
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

RESUMEN

Las leucemias y los linfomas son los tipos más frecuentes de neoplasias hematológicas, ambas caracterizadas por una proliferación descontrolada de los glóbulos blancos o leucocitos. Entre los distintos tipos de leucemias, destaca la leucemia linfática crónica (CLL, del inglés Chronic Lymphocytic Leukaemia) por ser el tipo más frecuente en individuos adultos.

Debido a su impacto clínico y social y a las lagunas en nuestro conocimiento de sus bases genómicas, la CLL fue incluida entre los tumores elegidos por el Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer para su estudio por secuenciación a gran escala. El estudio de las alteraciones genómicas en CLL con técnicas de secuenciación de nueva generación ofreció, por primera vez, una visión completa del genoma de esta enfermedad y permitió compararlo con el genoma de los tejidos normales del mismo paciente.

Estos trabajos revelaron mutaciones somáticas recurrentes en genes que podrían alterar la función biológica de las proteínas que codifican. Uno de ellos, el gen que codifica SF3B1 (subunidad 1 del factor de splicing 3b) acumula mutaciones somáticas en aproximadamente el 10% de los casos de CLL. La proteína SF3B1 es un componente básico de la U2 snRNP que se une al sitio de ramificación haciendo posible la unión entre el spliceosoma y el pre-mRNA. Todo sugiere que las mutaciones en SF3B1 conducen a errores en el splicing de ciertos transcritos que afectan a la patogénesis de la leucemia linfática crónica.

Con el fin de validar *in vivo* la mutación K700E en SF3B1 y su función en la patogénesis de la CLL nos hemos propuesto generar modelos animales que simulen la enfermedad. Por un lado hemos intentado obtener células progenitoras hematopoyéticas a partir de células ES mutantes y por otro hemos generado ratones quiméricos para esa mutación recurrente de SF3B1.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias y los linfomas son los tipos más frecuentes de neoplasias hematológicas, ambas caracterizadas por una proliferación descontrolada de los glóbulos blancos o leucocitos. La diferencia principal entre ambos es el lugar donde se origina el cáncer. En el caso de las leucemias, el cáncer se origina en la médula ósea y se disemina por el torrente sanguíneo, mientras que los linfomas se originan en el sistema linfático, que incluye los vasos y ganglios linfáticos así como órganos linfoides como el timo y el bazo. Existe una amplia clasificación de las distintas clases de leucemias y linfomas basada en el tipo específico de célula hematológica que origina el cáncer y en su grado de agresividad.

Entre los distintos tipos de leucemias, destaca la leucemia linfática crónica (CLL, del inglés *Chronic Lymphocytic Leukaemia*) por ser el tipo más frecuente en individuos adultos. La leucemia linfática crónica y el linfoma linfocítico de célula pequeña (SLL, del inglés *Small Lymphocytic Lymphoma*) son dos variantes de la misma enfermedad, ya que se trata del mismo tipo de célula tumoral (linfocito de tipo B), que difieren en la localización de la misma. Cuando la mayoría de las células de tumorales se encuentran en el torrente sanguíneo y la médula ósea, la enfermedad se conoce como CLL, aunque los ganglios linfáticos y el bazo a menudo están también afectados. Cuando las células tumorales se encuentran principalmente en los ganglios linfáticos, la enfermedad se denomina SLL.

La CLL/SLL suele ser un cáncer indolente (de crecimiento lento); sin embargo, con el tiempo, puede progresar a un tipo más agresivo de linfoma. Los síntomas comunes de la enfermedad incluyen hinchazón del hígado y del bazo y agrandamiento de los ganglios linfáticos en el cuello, las axilas, el estómago o la ingle. Otros síntomas de la CLL/SLL son la fatiga, la anemia, los hematomas, la sudoración nocturna, la pérdida de peso y las infecciones frecuentes. A menudo, las personas con CLL/SLL no presentan síntomas evidentes de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Aproximadamente un tercio de todos los pacientes de CLL/SLL vive durante años sin síntomas. Por tanto, para la clínica, se pueden establecer dos tipos de CLL:

-Una clase de CLL que se desarrolla muy lentamente y puede transcurrir mucho tiempo antes de que el paciente necesite tratamiento.

-Otro tipo de CLL que se desarrolla más rápido y conlleva una tasa de supervivencia más corta (1,2).

Desde un punto de vista molecular en CLL se pueden encontrar dos principales subtipos que se caracterizan respectivamente por un alto o bajo número de hipermutaciones somáticas en la región variable de la cadena pesada de los genes de inmunoglobulina. Si las células B tumorales presentan hipermutación somática en el centro germinal (IGVH-mutado) los pacientes muestran características clínicas leves y en general alta supervivencia libre de progresión, mientras que los pacientes con CLL con IGVH-no mutado sufren una forma agresiva de la enfermedad que puede ser refractaria al tratamiento (3, 4).

En los últimos años, se han producido grandes avances en el estudio de las bases moleculares que determinan las diferencias en la agresividad y progresión clínica de la CLL, así como de otros tipos de tumores, gracias al proyecto mundial de secuenciación del genoma del cáncer

Puente et al (5) realizaron un análisis exhaustivo de la CLL combinando secuenciación de última generación con características clínicas. Con la secuenciación de todo el genoma de cuatro casos de CLL identificaron 46 mutaciones somáticas que potencialmente podían afectar la función génica. Mediante un análisis más detallado de estas mutaciones en 363 pacientes con CLL identificaron cuatro genes que están mutados de manera recurrente: *NOTCH1*, *XPO1*, *MYD88* y *KLHL6*. Las mutaciones en *MYD88* y *KLHL6* eran predominantes en los casos de CLL con genes de inmunoglobulinas mutadas, mientras que las mutaciones en *NOTCH1* y *XPO1* se detectaban principalmente en pacientes con genes de inmunoglobulinas no mutados. Los patrones de mutación somática, apoyados por los análisis funcionales y clínicos, indican que las mutaciones recurrentes en *NOTCH1*, *MYD88* y *XPO1* son cambios oncogénicos que contribuyen a la evolución clínica de la enfermedad.

Quesada et al. mediante secuenciación de exomas en 105 pacientes no tratados, pusieron de manifiesto que las mutaciones somáticas de genes que codifican componentes esenciales de la maquinaria de splicing de ARN desempeñan un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad. En concreto, el gen *SF3B1*, que codifica la subunidad 1 del factor de splicing 3b, que forma parte de la maquinaria que permite el anclaje del spliceosoma a los precursores de mRNA, se encuentra frecuentemente mutado en pacientes con CLL. En el estudio de Quesada et al., las mutaciones somáticas de *SF3B1* se encontraban en aproximadamente el 10% de los pacientes, haciendo de éste el segundo gen más frecuentemente mutado en la CLL (6) (Fig.1).



Fig1. Genes frecuentemente mutados en CLL. El tamaño de los nombres es proporcional a la frecuencia de mutación. Los genes en rojo están mutados preferentemente en IGVH-no mutado, los genes en azul están mutados en IGVH-mutado y los genes en violeta se encuentran mutados en ambos casos.

La mayoría de los genes eucariotas tienen secuencias codificantes (exones) y no codificantes (intrones). Todas ellas se transcriben inicialmente en forma de un precursor de ARN mensajero (pre-mARN) que incluye todas estas secuencias (7).

El splicing o maduración del pre-mRNA es el proceso por el cual los intrones se escinden y los exones se ligan juntos. En eucariotas superiores, la mayoría de los genes se someten a diferentes patrones de corte y empalme, generando isoformas

alternativas de mRNA que tienen diferentes funciones y que contribuyen a la complejidad biológica. El splicing del pre-mRNA es catalizado por el spliceosoma, una macromolécula compuesta de 5 ARN nucleares pequeños (snARNs) asociados con proteínas para formar partículas denominadas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) (8).

En la mayoría de los eucariotas, incluyendo los seres humanos, hay 2 clases de intrones: el tipo común, U2, que constituye más del 99% de los intrones humanos, y el tipo U12, raro. Ambos difieren en sus secuencias consenso de sitio de splicing. La eliminación de estos 2 tipos de intrones es catalizada por dos spliceosomas diferentes llamados U2-dependiente y U12-dependiente, respectivamente. Los 2 spliceosomas difieren en su composición de snRNAs y comparten la mayoría de las proteínas.

El agrupamiento de las unidades que forman el spliceosoma se produce de *novo* para cada pre-mARN que es necesario madurar, pues éste contiene secuencias específicas que impulsan y regulan este proceso. Las secuencias cruciales son el sitio de donación de splicing 5', el sitio de ramificación, y el aceptor de splicing 3' al final del intrón. En el spliceosoma U2-dependiente, el sitio donante es reconocido por U1 snRNP, mientras que el sitio aceptor es reconocido por U2 snRNP.

Varias proteínas interactúan con los snARNs para formar los snRNPs del spliceosoma (Fig.2). Entre las que interactúan con U1 y U2 durante la primera fase de reconocimiento de intrones y la formación del spliceosoma están SRSF2, U2AF1, ZRSR2, U2AF65, SF1, SF3B1, SF3A1, y PRPF40B.

La proteína SF3B1 es un componente básico de la U2 snRNP que se une al sitio de ramificación haciendo posible la unión entre el spliceosoma y el pre-mRNA.

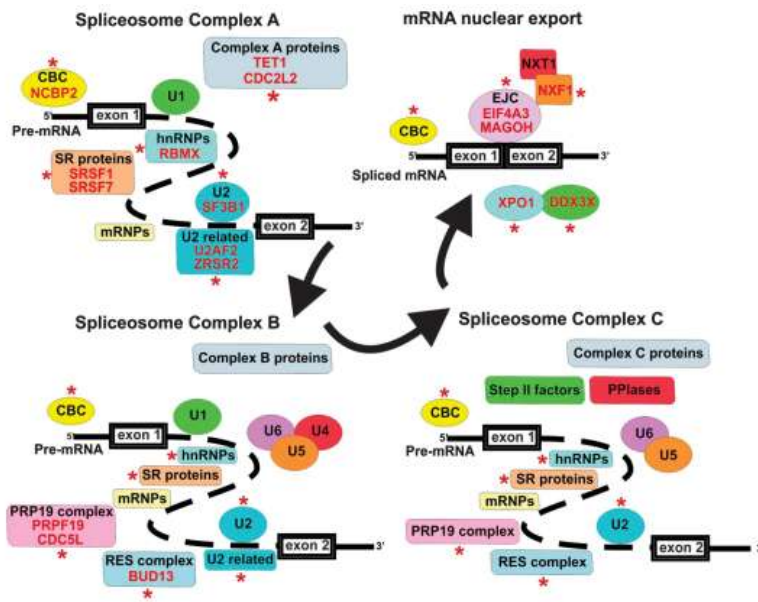


Fig2. Representación esquemática del spliceosoma y sus componentes. Los componentes marcados con un asterisco presentan mutaciones somáticas en CLL (9).

Aunque la transcripción del DNA (libre del nucleosoma) por la RNAPolimerasa II y el splicing del pre-mRNA son considerados tradicionalmente como procesos separados y secuenciales, cada vez más evidencias sugieren que la transcripción y el procesamiento del ARN se acoplan estrechamente *in vivo* (splicing cotranscriptional) y que varios factores de splicing también influyen en la regulación de la transcripción (10, 11).

La mutación en SF3B1 más frecuente encontrada en las muestras de CLL fue K700E (Fig.3), que ocurre en casi la mitad de los casos, seguida por G742D, una mutación que rara vez se encuentra en neoplasias mieloides. En casi todos los casos, las mutaciones de SF3B1 afectan al dominio C-terminal (repetición HEAT) en una región muy concreta de su estructura, lo que sugiere que interrumpen la unión de la proteína a algún cofactor que, a su vez, podría disminuir la fidelidad del splicing en genes específicos.

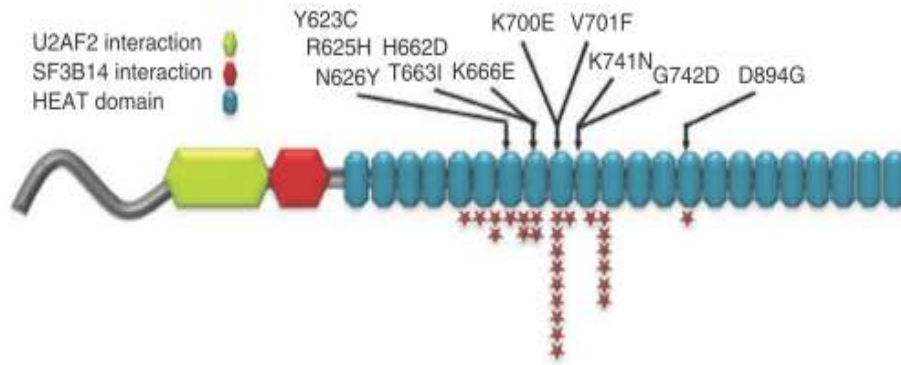


Fig3. Representación esquemática de la proteína SF3B1 con sus dominios estructurales. Aparecen sus mutaciones recurrentes y se indica su frecuencia (6).

Estos datos fueron corroborados por otros trabajos realizados también mediante secuenciación de exomas pero con la objeción de que en este caso, las muestras estudiadas provenían de pacientes tratados con quimioterápicos (12). Por tanto, se puede concluir que las mutaciones recurrentes en *SF3B1* pueden ocurrir en el inicio de la enfermedad y no exclusivamente en etapas posteriores después de iniciar el tratamiento sin ser necesariamente un resultado de la presión selectiva inducida por la quimioterapia (13, 14).

Durante la investigación del genoma de la CLL refractaria a fludarabina, Rossi et al. Encontraron mutaciones recurrentes de *SF3B1*, y en consecuencia realizaron la resecuenciación del gen en 3 cohortes diferentes de pacientes (15).

La incidencia de la mutación *SF3B1* fue del 17% en pacientes fludarabina-refractarios, 5% en los pacientes recién diagnosticados, y del 6% en los pacientes con síndrome de Richter. Estaban disponibles muestras seriadas de pacientes mutados en 3 casos, lo que permitió determinar que la mutación en *SF3B1* se adquirió durante el seguimiento en 2 de ellos. Así mismo, no encontraron mutaciones en *SF3B1* en las neoplasias de células B maduras que no fueran CLL (16).

Por otro lado, otro estudio detectó *SF3B1* mutante en uno de 63 pacientes con clínica de linfocitosis B monoclonal, una condición que podría representar las fases iniciales de la CLL (17).

Varios grupos están evaluando la importancia clínica de mutaciones *SF3B1* en pacientes con CLL. Así, Oscier et al. han evaluado recientemente el efecto de las mutaciones en *NOTCH1* y *SF3B1* en una cohorte de 494 pacientes recién diagnosticados de CLL e insertos al azar en un ensayo de fase 3 con clorambucil comparando distintos tratamientos (fludarabina y ciclofosfamida o fludarabina solamente), (18). En este estudio se han encontrado mutaciones en *NOTCH1* y *SF3B1* en 10% y 17% de los pacientes con CLL no tratados respectivamente y dichas mutaciones se han asociado independientemente con una menor supervivencia en un análisis multivariante (19).

Por tanto, el resultado de estos trabajos indica que entre las neoplasias de células B maduras, las mutaciones de *SF3B1* son específicas para la CLL, tienen una menor incidencia en las primeras etapas de la CLL, ocurren con más frecuencia en enfermedad avanzada, y tienden a estar asociadas con un mal pronóstico.

Tras el hallazgo de que un componente central del spliceosoma, *SF3B1*, estaba mutado en aproximadamente el 10% de los pacientes de CLL se determinó que estas mutaciones no anulaban la función de *SF3B1* sino que modificaban su función alterando el splicing de un pequeño número de genes involucrados en el desarrollo tumoral incluyendo el control del ciclo celular (*p27*, *CCA2*, *STK6* y *MDM2*) (18-19), la angiogénesis, y la apoptosis (20). Además, estos defectos en el procesamiento del RNA pueden influir en la estabilidad genómica y en las modificaciones epigenéticas (12).

Todo sugiere que las mutaciones en *SF3B1* conducen a errores en el splicing de estos transcritos y posiblemente de otros que afectan a la patogénesis de la leucemia linfática crónica. Los estudios en curso se centrarán en la determinación de cómo las mutaciones en *SF3B1* alteran su función en el procesamiento de pre-mRNA críticos para la célula tumoral.

La evaluación del estado de mutación en *SF3B1* puede convertirse en una herramienta innovadora de diagnóstico y pronóstico. Por otra parte la disponibilidad de moduladores del spliceosoma abre nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de este tipo de cáncer.

Varios compuestos pueden modular el procesamiento del pre-mRNA. En un artículo de revisión, Webb et al. examinan este tema exhaustivamente (21). Existen productos naturales como la spliceostatina A, pladienolida, y meayamycina, (22, 23, 24) y pequeñas moléculas sintéticas como la sudemycina (25), que son capaces de modular al factor 3b de splicing. Estos moduladores spliceosomales tienen actividad antitumoral en células y modelos animales y todo indica que la interacción con el factor de splicing 3b es crucial para su actividad citotóxica (26, 27).

Estos compuestos probablemente alteran la interacción entre factor 3b y el pre-ARNm e inducen la transcripción anormal y el splicing alternativo en células de mamífero.

El efecto de los anteriores compuestos sobre un factor 3b anormal aún se desconoce, por tanto, es necesario realizar estudios preclínicos para explorar el efecto de los moduladores del factor de splicing 3b en células con mutaciones de *SF3B1*. La hipótesis de trabajo es que células que albergan una mutación en algún componente de la maquinaria de splicing pueden ser más sensibles a la acción de los moduladores del spliceosoma (28).

También se han encontrado mutaciones somáticas recurrentes de *SF3B1* y otros genes de la maquinaria de splicing de ARN en pacientes con síndrome mielodisplásico. En este caso, las mutaciones en *SF3B1* presentan una frecuencia particularmente alta en los estadios iniciales de la enfermedad caracterizados por la presencia de sideroblastos en anillo, lo cual es consistente con una relación causal (29). Así mismo se detectaron mutantes de *SF3B1* en una frecuencia menor en otros tipos de tumores (30).

En general el cáncer es una enfermedad en la que las células presentan un crecimiento descontrolado acompañado por la invasión de los tejidos adyacentes normales. En etapas posteriores, algunos cánceres hacen metástasis en otros lugares del cuerpo a través de la linfa o la circulación sanguínea. Los estudios sobre los mecanismos

subyacentes han identificado vías clave para el control del crecimiento y muerte celular que a menudo se encuentran en estado defectuoso en las células tumorales (31). Además de estas vías intrínsecas de las células cancerígenas, ciertos factores externos también controlan el crecimiento del tumor y su comportamiento, como por ejemplo la angiogénesis tumoral, la infiltración de células inmunes, y la activación de células mesenquimales (32). Por estas razones, muchos elementos de la biología del cáncer, incluyendo la invasión y la metástasis, sólo pueden ser estudiados adecuadamente en el contexto de organismos intactos. La inyección de líneas celulares de tumores humanos en ratones inmunodeficientes por vía intravenosa o subcutánea y el seguimiento local del tumor generado constituyeron los primeros intentos de modelar el cáncer en animales. Aunque estos modelos de xenoinjertos fueron eficaces para propagar los tumores humanos, no modelan el cáncer esporádico o la tumorigénesis *de novo* en un anfitrión inmunológicamente competente. Con los años, los modelos de ratón se han vuelto mucho más sofisticados, en particular tras la aparición de los modelos de organismos modificados genéticamente (OMG). Hay varios tipos diferentes de OMG, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. En la más avanzada, el OMG generado es capaz de desarrollar *de novo* tumores espontáneos mediante la inducción espacio-temporalmente controlada de mutaciones en células individuales inmersas en su microambiente natural.

Estos OMGs condicionales pueden recapitular la naturaleza estocástica del cáncer esporádico y a menudo desarrollan un tipo de tumor en particular. Estos modelos muestran una reducción de la carga tumoral que prolonga su vida útil en comparación con los OMGs convencionales, y son más adecuados para estudiar la iniciación del tumor, la progresión y la respuesta al tratamiento (33). Por ello, los modelos condicionales de ratón se pueden utilizar para la validación de genes candidatos del cáncer y determinar nuevas dianas de tratamiento.

Desafortunadamente, la dependencia de una logística complicada y las barreras económicas dificultan el uso extensivo de estos modelos en investigación preclínica y traslacional. Por ejemplo, los OMGs condicionales requieren un largo tiempo de generación y validación. Todo el proceso de introducción dirigida de mutaciones en las células madre embrionarias (ES) y la producción de ratones con la mutación, en

cantidad suficiente, es laborioso y caro. A menudo, se requieren múltiples mutaciones condicionales para el desarrollo de un tumor específico, por lo que requiere extensos cruzamientos de cepas de ratones mutantes individuales para producir cepas mutantes del genotipo deseado. Este proceso requiere mucho espacio y consume mucho tiempo (debido a la complejidad que conllevan los esquemas de selección que involucran múltiples cruces), es ineficiente (debido a la generación inevitable de ratones con genotipos no deseados), y caro.

Algunos de los inconvenientes intrínsecos de los OMGs relacionados con línea germinal se pueden superar mediante el uso de los modelos mosaico de ratón, llamados OMGs quiméricos no germinales (34, 35). Estos modelos se pueden subdividir en dos grupos, modelos de trasplante y modelos quiméricos. Los modelos de trasplante se generan mediante la implantación de células madre o progenitoras somáticas en el respectivo tejido adulto de un ratón receptor. Estas células trasplantadas son modificadas *ex vivo* para contener mutaciones iniciadoras del tumor o se derivan de tejidos de ratones propensos a desarrollar el tumor. Este concepto es a menudo utilizado en el sistema hematopoyético, pero también ha sido aplicado para los tumores de otros tejidos, como el de mama, cerebro, y el de hígado (36, 37, 38). Como este enfoque depende de la obtención de las células mutantes del tejido adecuado, la gama de tipos de tumores que pueden ser modelados está limitada por la disponibilidad y accesibilidad a estas células. Los modelos quiméricos no tienen esta limitación, pues se basan en las ES diseñadas genéticamente que llevan las modificaciones esenciales que se necesitan para desarrollar un tipo particular de cáncer. Los ratones quiméricos generados directamente con estas células ES para la inducción del tumor permiten generar una cohorte rápidamente y sin cruzamientos tediosos. Las quimeras tienen una mezcla de células de tipo salvaje procedentes de las células del embrión huésped y células genéticamente modificadas procedentes de las ES modificadas que permiten el desarrollo de tumores en el contexto del tejido normal, recapitulando la tumorigénesis humana. A pesar de las ventajas de este método, las quimeras así generadas necesitan ser validadas para asegurar la funcionalidad de la modificación genética que se introduce y también por su porcentaje de mosaicismo (39).

Centrándose en *SF3B1* y su implicación en CLL, hay varios problemas que dificultan la validación biológica de las mutaciones:

- Hasta el momento no se dispone de un modelo deficiente en la función de *SF3B1* que reproduzca la enfermedad en ratón.
- Los resultados de secuenciación muestran que las mutaciones recurrentes en *SF3B1* implicadas en CLL ocurren en heterocigosis. Si esas mutaciones afectan su función, es probable que la dosis sea fundamental. También es posible que las proteínas mutantes actúen como dominantes negativos, como parece ser el caso de *POT1* (40).

En este proyecto, se plantea la posibilidad de avanzar en la comprensión de los mecanismos que asocian la mutación p.K700E en *SF3B1* con el desarrollo de tumores sanguíneos mediante el desarrollo de ratones quiméricos.

OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes descritos, hemos abordado el objetivo de generar un modelo animal para investigar las funciones de las mutaciones en *SF3B1* en la patogénesis de la CLL. Para ello hemos empleado dos aproximaciones:

1.- De forma preliminar, obtener células progenitoras hematopoyéticas a partir de teratomas generados con células ES con fluorescencia roja y mediante un protocolo de trasplante de dichas células progenitoras, testar la posibilidad de generar, en un futuro, un modelo animal que pueda simular la situación patológica de CLL en humanos.

2.- Generar quimeras en ratón a partir de células ES mutantes para *SF3B1*. En estudios posteriores, la médula mosaico procedente de las quimeras será caracterizada y se aislará para poder trasplantarla a ratones silvestres con el objetivo de obtener un modelo de CLL en esa especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Manejo de los animales.

Todos los procedimientos realizados con los animales han respetado lo establecido en el Real Decreto 53/2013 (relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos) por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia y siguiendo las directrices del Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Oviedo.

Cultivo de ES

Las células ES se cultivaron a 37°C y en presencia de 7% de CO₂ durante una semana, en medio de cultivo 3i, sobre fibroblastos inactivados. Se pasaron cada dos días. Las células ES que se utilizaron en todos los grupos experimentales estaban en las mismas condiciones de confluencia y pase.

El mantenimiento en cultivo de las células ES consiste en su tripsinización y pase cuando alcanzan el 80 % de confluencia. Para ello, se retira el medio, se lavan con PBS y se cubren con Tripsina-EDTA (0,05%, Gibco). A continuación, se incuban a 37°C 5 minutos. Finalmente, se añade medio fresco en un volumen tres veces superior al de la Tripsina-EDTA y las células se pipetea repetidamente hasta conseguir una suspensión unicelular.

Medio de ES 2i y 3i:

KOMEM (Invitrogen) 217ml, FCS (Invitrogen) 25ml, Non Essential Amino Acid (Invitrogen) 2.5ml, Sodium Pyruvate 100mM (Invitrogen) 2.5ml, L-Glu-Penicillin-Streptomycin (Sigma) 2.5ml, 2-mercaptoethanol (Invitrogen) 0.5ml, LIF ESGRO 10⁷ unidades (CHEMICON) 25ul, CHIR99021 1 µM concentración final, inhibidor de MEK 1 µM conc. final (StemGent), PD184352, inhibidor de GSK3 1 µM concentración final (StemGent), para un volumen total de 250ml. Para el medio 3i suplementar con SU5402, inhibidor del receptor de FGF 1 µM concentración final (StemGent).

El control de calidad de las células ES consistió en la realización de un análisis para determinar la presencia de *Mycoplasma sp.* y un cariotipo.

Para los experimentos de generación de cuerpos embrionarios, formación de teratomas y trasplante se utilizaron células ES de la línea JM8A3, transfectantes estables para la proteína roja fluorescente que hemos llamado JM8A3 RED, cultivadas en el medio de cultivo habitual de ES y sobre fibroblastos inactivados. Las células se pasaron cada dos días.

Control de calidad de las ES

Se comprueba en primer lugar la ausencia de *Mycoplasma sp.* en el medio de cultivo mediante una PCR con dos *primers* (MYA: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'

MYB: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3') que amplifican una banda de 464 bp que se corresponde con una zona común de DNA de muchas especies de micoplasma y usando como molde 1 µl de medio de cultivo donde se hayan crecido las células. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 95°C durante 5 minutos

30 ciclos de:

- 94°C, 30 segundos

- 60°C, 1 minutos

- 72°C, 90 segundos

y por último

- 72°C durante 10 minutos

Se separó el producto de la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y marker V

También se realizó un contaje de metafases.

Pasar un número adecuado de células activas a una placa de 35 mm gelatinizada y sin feeders. A las 24 horas añadir la Colcemida 0.1 µg/ml conc. Final (10µg/ml) (Roche). Incubar 60-90 min. a 37°C. Cuanto más tiempo esté actuando la Colcemida más se condensará la cromatina y más cortos serán los cromosomas, por un lado, pero por otro, más células serán sorprendidas en metafase.

Aspirar el medio y lavar con PBS (-Ca, -Mg). Tripsinizar y neutralizar la tripsina con medio de ES. Centrifugar 10 min. a 900 rpm.

Decantar el medio. Romper el pellet y resuspender las células en 1 ml de solución hipotónica (0.56% KCl) añadida en agitación y gota a gota. Completar con más KCl hasta 6 ml.

Dejar reposar a temperatura ambiente 15 min.

Con agitación añadir 8 gotas de fijador frío del -20 (metanol/acético glacial en proporción 3:1 y preparado siempre fresco). Centrifugar 5 min. a 900 rpm.

Decantar dejando 0.5 ml en el tubo. Romper el pellet y añadir, agitando, gota a gota más fijador hasta un total de 6 ml. Mezclar bien invirtiendo el tubo y dejar incubar en hielo 20 min. Repetir 2 veces y en la última resuspender el pellet en 0.5 ml de fijador.

Dejar caer una gota desde unos 10 cm sobre un porta limpio. Dejar secar al aire.

Teñir con DAPI+antifading y ver bajo luz UV.

Superovulación.

Hembras prepúberes de la línea C57BL/6 se inyectaron intraperitonealmente con 5 UI de PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin) . A las 48 horas, las hembras se inyectaron de igual manera con HCG (Human Chorionic Gonadotrophin) y se cruzaron con machos C57BL/6. Al día siguiente se chequeó la presencia de tapón vaginal.

Obtención y cultivo de embriones.

A los 2 días se sacrificaron las hembras que habían tenido tapón vaginal y se extrajeron los oviductos. Mediante *flushing* con medio M2 (Sigma) se obtuvieron los embriones en estadio de mórula (2,5 dpc). El posterior cultivo *in vitro* de embriones se realizó en medio KSOM (Millipore) cubierto con aceite mineral, en un incubador con una atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y a 37°C.

Microinyección.

Se empleó un microscopio Leica DMI6000B con dos micromanipuladores Eppendorf y sendos microinyectores CellTram, Air y Vario, respectivamente, de la misma marca. Las gotas de microinyección estaban formadas por medio M2 (Sigma) suplementado con 4% de medio de ES. Se emplearon agujas comerciales para la inmovilización de los embriones y la microinyección de las células ES (Eppendorf).

Mediante este método se introdujeron 16 células ES en cada embrión en estadio de blastocisto.

DIE

Se trata de una microinyección doble de los embriones. La diferencia con el caso anterior es que primero se microinyectan los embriones en estadio de mórulas con 6 células ES y se cultivan *in vitro* en medio KSOM (Millipore) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo los embriones se vuelven a microinyectar con 10 células ES pero esta vez en estadio de blastocisto.

Transferencia embrionaria

Se anestesia a la hembra aceptora (psudopreñada con el *plug* de los días apropiado) con la dosis habitual de ketamina + Xilacina. Se depila la zona del lomo a la altura de los riñones y se realiza un corte en la piel longitudinal y lateral a la columna vertebral, lo más pequeño posible. Ayudándose de las pinzas se corta la capa muscular y se busca la grasa que recubre el ovario. Se tira de la grasa hacia fuera del cuerpo. De esta manera queda accesible la bursa con el ovario y el infundíbulo. Se pellizca el ámpula para hacer una pequeña incisión con una aguja de 30G para poder introducir nuestra aguja de vidrio con los embriones y depositarlos. Se devuelve el aparato reproductor a su correspondiente zona anatómica, dando un punto de sutura en la capa muscular y a continuación los que sean necesarios en la capa cutánea. Se limpia y desinfecta con Betadine.

Formación de cuerpos embrionarios (EBs)

4×10^6 células ES JM8 RED se cultivaron en medio sin inhibidores y sin LIF durante 6 días en placas de cultivo de 100 mm de poliestireno. En estas condiciones las células ES crecen en suspensión provocando su diferenciación. Transcurrido ese tiempo se forman agregados de células con una cavidad interna. Por su similitud estructural a los embriones en estadio de blastocisto se les ha denominado cuerpos embrionarios (41).

Generación de teratomas

Los cuerpos embrionarios se tripsinizan y se cuentan las células. Con ellas se generan los teratomas.

Procedemos como si fuesen células para microinyectar. Las células se tripsinizan de la forma habitual y se deposita en el mismo pocillo. Se incuban 30 min para eliminar los *feeders*. Se recogen las ES, se cuentan y se resuspenden para que queden a una concentración de $5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$.

Se inyectan 5×10^6 células en $100 \mu\text{l}$ de PBS en los flancos dorsales de dos ratones inmunodeprimidos (Nude). A las 8 semanas los teratomas son evidentes y se pueden observar en el IVIS. Se aíslan, se disgregan y se obtiene una dispersión unicelular.

Aislamiento y purificación de células progenitoras hematopoyéticas

Se extraen los teratomas y se disgregan (primero mecánicamente y después con colagenasa) en HBSS o PBS utilizando 1ml de buffer. Pasar por un cell strainer de $30 \mu\text{m}$. Lisar las células con Buffer de lisis de eritrocitos 1X. Añadir 10 volúmenes con respecto al volumen inicial. Dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugar las muestras a 1200 rpm durante 10 min.

Lavar las células con PBS. Resuspender en el volumen necesario dependiendo de la cantidad de células que se hayan obtenido.

Se parte de 2×10^7 cel/teratoma. Proceder a marcar la muestra con el *Cocktail Lineage Cell Depletion Kit Mouse* (Miltenyi). Las células maduras de la muestra quedarán marcadas mientras que las indiferenciadas se mantendrán sin marcaje.

Después de marcar las células se hacen pasar por el *Automacs Cell Separator* (Miltenyi Biotec) y como decíamos se obtienen dos poblaciones celulares aisladas. En muestras de médula ósea el 95% corresponde a LIN+ (células marcadas: Mac-1 para células mieloides, CD4 y CD8 para linfocitos T, CD19 o B220 para linfocitos B, etc) y el 5% a LIN- (células no marcadas y por tanto Sca1+ y ckit+).

Ablación de médula ósea y trasplante.

Para realizar la ablación de la médula ósea de los ratones huésped se ha utilizado el protocolo habitual mediante tratamiento con Busulfan y Ciclofosfamida durante cinco días. Inyección intraperitoneal de Busulfan $2,5\text{mg/ml}$, $0,1\text{ml}/10\text{g}$ durante cuatro días y el quinto día Ciclofosfamida 20mg/ml en PBS, $0,1\text{ml}/10\text{g}$.

El trasplante se realiza el sexto día, introduciendo las células vía carótida en ratones huésped de la línea C57BL/6 de 8 semanas, previamente ablacionados, utilizando una aguja de 28G.

Se inyectaron $0,5 \times 10^4$ células de la población LIN- (Sca1+ y cKit+) en un volumen de 100 μ l de PBS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de progenitores hematopoyéticos y trasplante

De forma preliminar, para testar la posibilidad de obtener progenitores hematopoyéticos a partir de células ES, hemos utilizado una línea de ES que expresa un marcador fluorescente (Fig.4).

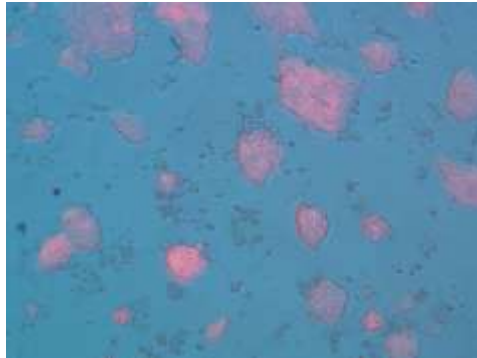


Fig4. Células ES JM8A3 RED en cultivo mostrando la fluorescencia.

Se sembraron 4×10^6 células ES JM8A3 RED en placas de 100 mm de poliestireno en medio sin LIF ni inhibidores. A los seis días aproximadamente el 90% de las células ES se habían diferenciado formando cuerpos embrionarios (EBs) (Fig.5).

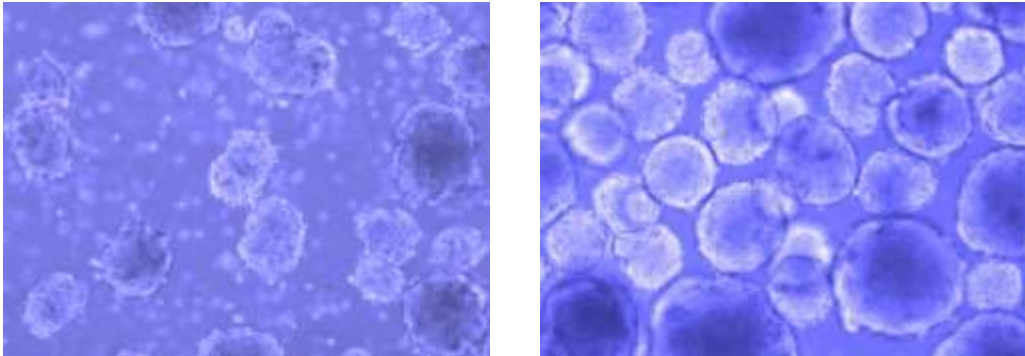


Fig5. Cuerpos embrionarios generados a día 4 y día 6 de diferenciación.

Dichos EBs se recogieron por centrifugación y se tripsinizaron para formar una suspensión celular homogénea que se utilizó para inyectar subcutáneamente dos ratones Nude. A las 8 semanas los teratomas eran evidentes tal y como se muestra en la Fig.6.

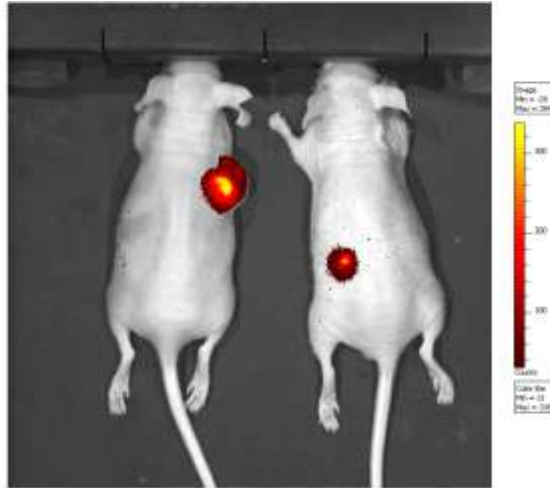


Fig6. Fotografía de IVIS donde se aprecian las masas tumorales correspondientes a los teratomas generados.

De esta forma obtuvimos dos poblaciones celulares: la primera LIN+ (marcadas), mayoritarias y correspondientes a células diferenciadas y la segunda LIN- (no marcada) muy minoritaria y que no presentaba en su superficie marcadores de diferenciación. Tomamos esta última para realizar los trasplantes.

Desafortunadamente se obtuvieron muy pocas células con los marcadores de superficie deseados ($0,5 \times 10^4$ células). De todas formas se intentó el trasplante utilizando ratones huésped de la línea C57BL/6. A los 30 días del trasplante se obtuvo sangre de dichos ratones para tratar de detectar fluorescencia en las células sanguíneas. No se encontró ninguna señal roja que indicase que las células transplantadas habían colonizado la médula ósea de los huéspedes.

Se trata de resultados muy preliminares en los que debido al escaso número de ratones empleados para generar los teratomas se obtuvieron muy pocas células. Sin embargo, las posibilidades que podría abrir este procedimiento llevarán en el futuro a la repetición del experimento con un número mayor de ratones.

Generación de ratones quiméricos para la mutación K700E de *SF3B1*

Las células ES fueron cedidas por el Dr. Seishi Ogawa al Dr. Víctor Quesada en el contexto de una colaboración. Se trata de unas células de la cepa M1 derivadas de una generación F1 (C57BL/6 x 129) (Fig.7).

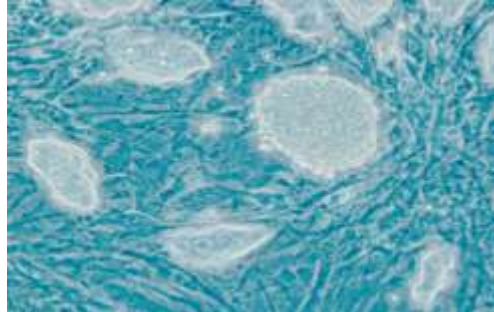


Fig7. Fotografía de las células *SF3B1* K700E en cultivo. Se puede ver la capa de fibroblastos embrionarios y sobre ella los clones de células ES.

Estas células son heterocigotas para la mutación K700E de *SF3B1*, que ha sido introducida mediante una estrategia de *Knock-In* siguiendo el esquema que se muestra a continuación (Fig.8). Tal como se indica, se puede obtener un alelo funcional condicional mediante electroporación con la recombinasa FlpO:

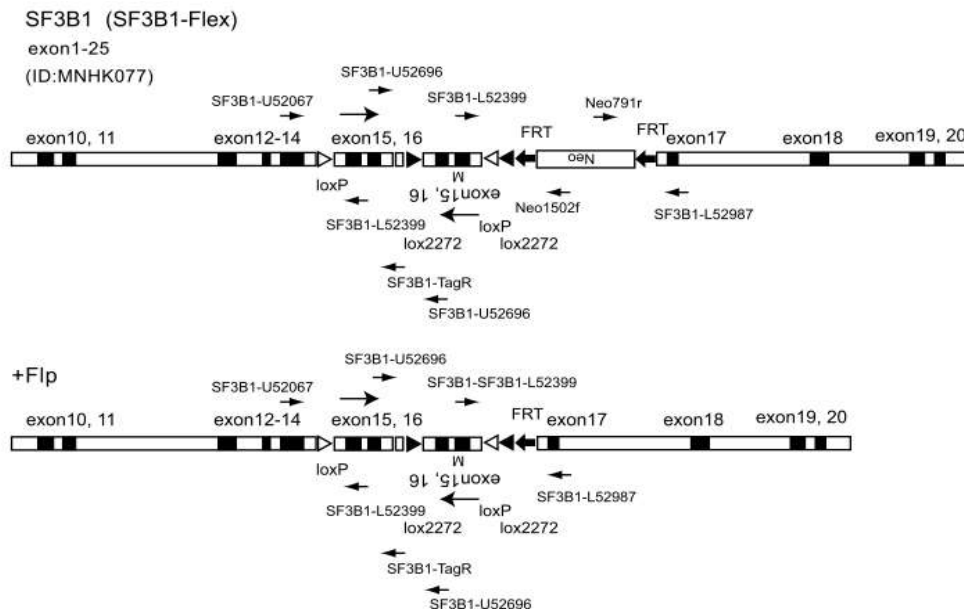


Fig8. Esquema de las modificaciones introducidas en las ES.

Los proyectos de generación de OMGs para algún gen en ratón se basan en la generación de células ES modificadas. En ocasiones, el cultivo no individualizado de esos clones de células hace que su calidad, a nivel de pluripotencia, disminuya. Aunque se ha incrementado mucho nuestra comprensión de los mecanismos moleculares y celulares responsables del mantenimiento de la pluripotencia de las células ES, es necesario realizar sobre ellas controles de calidad basados en cariotipado y en detección de *Mycoplasma sp.* antes de comenzar los experimentos de generación de las quimeras.

En nuestro caso las células ES resultaron estar libres de *Mycoplasma sp.* y el cariotipo arrojó un 50% de euploidia tras un recuento total de 40 metafases. En la figura siguiente (Fig. 9) se muestran ejemplos de metafases en donde se pueden ver metafases normales con 20 cromosomas y metafases aberrantes con cromosomas extranumerarios.



Fig9. Metafases de células ES SF3B1 K700E teñidas con DAPI. Por orden: metafase normal (40 cromosomas) y metafases aneuploides (44 y 23 cromosomas).

En la generación de una quimera de ratón se busca, generalmente, que dicha quimera posea una gran contribución de las células ES. Para aumentar esta contribución se han ido desarrollando nuevas técnicas como el *Velocimouse* y la agregación/microinyección de embriones tetraploides. Además, en algunas ocasiones se microinyectan muchas células con la esperanza de que puedan desplazar a la masa celular interna endógena del embrión huésped. Esta última aproximación es peligrosa pues, en estos casos, la presencia de esas células extra en el embrión rompe el patrón de división normal y se producen embriones inviables (42-43). Encontrar el número correcto de células ES que se deben microinyectar es una cuestión empírica. Ese número debe ser determinado

mediante experimentos de microinyección y depende del fondo genético del embrión huésped, del de las células ES e incluso, para una misma línea de células es diferente dependiendo del subclon microinyectado.

El Dr. Seishi Ogawa tuvo la amabilidad de comunicarnos su creencia de que el estado indiferenciado de las ES mutadas para SF3B1 que compartía con nosotros no era alto pues, en su Unidad de Transgénicos, estaban teniendo dificultades para generar quimeras.

Era objetivo de este trabajo fin de máster la producción de animales quiméricos para SF3B1. Con la sospecha de que la pluripotencia de las células ES era deficiente nos decidimos a utilizar una técnica novedosa de microinyección basada en la microinyección doble de células ES en dos estadios distintos: primero en mórulas 2,5 dpc y después en blastocistos 3,5 dpc . De esta forma el embrión tendría tiempo de asumir el aporte de células ES exógenas más eficientemente. A esta técnica la hemos denominado *Doubly Injected Embryo* (DIE).

Además, para conseguir embriones quiméricos con muy alta contribución de las ES también hemos empleado un nuevo medio de cultivo para las células ES que contiene tres inhibidores de diferenciación (3i). Para testar la contribución de las células ES microinyectadas en los ratones quiméricos se empleó una evaluación por porcentaje del color del pelo.

Se microinyectaron 50 blastocistos con 16 células ES crecidas en medio 2i y 50 embriones se microinyectaron con 16 células ES crecidas en medio 3i. Se utilizó otro grupo de 50 blastocistos sin microinyectar como control.

Los embriones fueron transferidos a hembras pseudopreñadas de la línea CD1 y a los 20 días se produjeron los partos y sólo se obtuvieron crías del grupo control (10 crías) y del grupo 3i (5 crías) pero ninguna del grupo 2i. A los 10 días de edad las crías se evaluaron para cuantificar a simple vista la contribución de las ES al pelaje y se estableció un porcentaje de quimerismo del 80-90%.



Fig10. Quimeras generadas para SF3B1 K700E de 8 días de edad. Puede verse la distinta coloración de la piel entre las 3 quimeras centrales y sus 2 hermanos de camada.

Desde un punto de vista fenotípico estas quimeras no se diferencian de otras generadas por nosotros para otros proyectos y se están desarrollando con normalidad (Fig.10)

De esta forma hemos generado ratones quiméricos para la mutación K700E de *SF3B1* que serán caracterizados en estudios posteriores.

Con estas consideraciones en mente hemos explorado estas dos estrategias para la generación de OMGs con *SF3B1* mutado que cumplan con todos los requisitos para su uso eficiente en la investigación traslacional, a saber: mediante el trasplante de teratomas derivados de ES para generar progenitores hematopoyéticos y mediante la microinyección de ES para la generación de quimeras. Esta última estrategia cumple con los siguientes criterios:

En primer lugar, los modelos de ratón que hemos generado tienen el potencial de representar la enfermedad humana, es decir, el desarrollo del tumor será impulsado por las lesiones genéticas clave inducidas en el contexto del tejido diana huésped de fenotipo salvaje, y creemos que mostrará los estadios clínicos típicos de la progresión del tumor en pacientes.

En segundo lugar, la estrategia debería permitir la rápida generación de cohortes de ratón, lo que resulta en una reducción del coste y del número de animales empleados.

CONCLUSIONES

1.- Hemos tratado de diferenciar *in vivo* las células ES mutantes para *SF3B1* con el fin de obtener precursores hematopoyéticos que consigan repoblar la médula ósea de ratones ablacionados. Aunque conseguimos obtener una población de células precursoras su número no fue el adecuado y el trasplante no fue efectivo.

2.- Hemos generado ratones quiméricos a partir de las células ES mutantes para *SF3B1* utilizando el medio de cultivo 3i para mantener su pluripotencia y utilizando DIE como método de microinyección. Estos ratones se desarrollan con normalidad y serán caracterizados en trabajos posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010, 10:37 – 50.
2. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R: Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012, 122:3432 – 3438.
3. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999, 94:1848 – 1854.
4. Klein U, Dalla-Favera R: Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:22 – 33.
5. Puente, X.S. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011, 475, 101–105.
6. Quesada V1, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubío JM, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia.. *Nat Genet.* 2011 Dec 11;44(1):47-52.
7. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009;136(4):701-718.
8. van der Feltz C, Anthony K, Brilot A, PomeranzKrummel DA. Architecture of the spliceosome. *Biochemistry.* 2012 Apr 24;51(16):3321-33.

9. A J Ramsay, D Rodríguez, N Villamor, A Kwarciak, J R Tejedor, J Valcárcel, A López-Guillermo, A Martínez-Trillos, X S Puente, E Campo, C López-Otín and V Quesada. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2013) 27, 1600–1603.
10. Stilgenbauer S, Busch R, Schnaiter A, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 Trial. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts). 2012; 120(21):Abstract 433.
11. Mario Cazzola, Marianna Rossi, Luca Malcovati. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. [Blood](#). 2013 Jan 10;121(2):260-9.
12. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-2506.
13. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2530
14. The evolutionary biography of chronic lymphocytic leukemia. Xose S Puente & Carlos López-Otín. *Nature Genetics* 2013, 3:229-231
15. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26): 6904-6908.
16. Greco M, Capello D, Bruscaggin A, et al. Analysis of SF3B1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis [published online ahead of print March 29, 2012]. *Hematol Oncol*. doi:10.1002/hon.2013.
17. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 359(6):575-583.
18. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial [published online ahead of print October 18, 2012]. *Blood*. doi:10.1182/blood-2012-05-429282.

19. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-4479.
20. Massiello A, Roesser JR, Chalfant CE. SAP155 binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA. *FASEB J* 2006;20:1680-2.
21. Webb TR, Joyner AS, Potter PM. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer [published online ahead of print August 3, 2012]. *Drug Discov Today*. doi:10.1016/j.drudis.2012.07.013.
22. Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, et al. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol*. 2007;3(9):576-583
23. Kotake Y, Sagane K, Owa T, et al. Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol*. 2007;3(9):570-575.
24. Albert BJ, McPherson PA, O'Brien K, et al. Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(8):2308-2318.
25. Fan L, Lagisetti C, Edwards CC, Webb TR, Potter PM. Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. *ACS Chem Biol*. 2011;6(6):582-589.
26. Corriero A, Miñana B, Valcárcel J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes Dev* 2011;25:445-59.
27. Kotake Y, Sagane K, Owa T, et al. Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol*. 2007;3(9):570-575.
28. Bonnal S, Vigevani L, Valcarcel J: The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11:847 – 859

29. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15): 1384-1395.
30. Furney SJ, Pedersen M, Gentien D, Dumont AG, Rapinat A, Desjardins L, Turajlic S, Piperno-Neumann S, de la Grange P, Roman-Roman S, Stern MH, Marais R. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov*. 2013 Oct;3(10):1122-9.
31. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100: 57–70.
32. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4: 839–49.
33. Singh M, Lima A, Molina R, Hamilton P, et al. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol*, 2010. 28: 585–93.
34. Heyer J, Kwong LN, Lowe SW, Chin L. Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10: 470–80.
35. Zhou Y, Rideout WM 3rd, Zi T, Bressel A, et al. Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family and KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Nat Biotechnol*, 2010. 28:71–8.
36. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, 2002. 1: 269–77.
37. Evers B, Speksnijder EN, Schut E, Ciampricotti M, et al. A tissue reconstitution model to study cancer cell-intrinsic and extrinsic factors in mammary tumorigenesis. *J Pathol*, 2010. 220: 34–44.
38. Zender L, Xue W, Zuber J, Semighini CP, et al. An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell*, 2008. 135: 852–64.
39. Watters JW, Cheng C, Majumder PK, Wang R, et al. De novo discovery of a gamma-secretase inhibitor response signature using a novel in vivo breast tumor model. *Cancer Res*, 2009. 69: 8949–57.
40. Andrew J Ramsay, Víctor Quesada, Miguel Foronda, Laura Conde, Alejandra Martínez-Trillos, Neus Villamor, David Rodríguez, Agnieszka Kwarciak, Cecilia

- Garabaya, Mercedes Gallardo, Mónica López-Guerra, Armando López-Guillermo, Xose S Puente, María A Blasco, Elías Campo & Carlos López-Otín. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013 May;45(5):526-30.
41. Tomohiro Konno, Kunihiko Akita, Kimio Kurita, and Yoshihiro Ito. Formation of Embryoid Bodies by Mouse Embryonic Stem Cells on Plastic Surfaces. *J of Bioscience and Bioengineering*, 2005, vol. 100, nº1, 88-93
 42. Rossant J, P. L. Tam P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 2009; 136:701-713.
 43. Evsikov SV, Vagyna IN, Solomko AP. Mechanisms of Cell Number Regulation in the Peri-Implantation Mouse Blastocyst. *The Journal of Experimental Zoology*, 1996; 276:201-208.