(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 542 866**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009 E 09762718 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2321343**

(54) Título: **Factor inducible por retinoides novedoso y usos del mismo**

(30) Prioridad:

09.06.2008 NO 20082550
23.01.2009 NO 20090358

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2015

(73) Titular/es:

BERGEN TEKNOLOGIOVERFORING AS (100.0%)
Thormohlensgate 51
5006 Bergen, NO

(72) Inventor/es:

LILLEHAUG, JOHAN R. y
PENDINO, FREDERIC

(74) Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

FACTOR INDUCIBLE POR RETINOIDES NOVEDOSO Y USOS DEL MISMO

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* según la reivindicación 1.

Antecedentes de la invención

Los retinoides tienen propiedades anticancerígenas en muchos tejidos humanos. Estos agentes han demostrado particularmente su eficiencia en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (APL), una enfermedad neoplásica que puede usarse como modelo de capacidad de respuesta a estos agentes. De manera importante, aunque se han identificado bien receptores de retinoides (RAR, RXR, PML-RAR) y estudiado extensamente en las dos últimas décadas, aún no se han identificado la mayor parte de sus genes diana responsables de sus propiedades antiproliferativas y anticancerígenas. Mediante un enfoque de microlineamientos, se ha identificado un nuevo gen de retinoides diana, CXXC5, que codifica para un factor nuclear que se ha caracterizado funcionalmente por primera vez y denominado RINF (*Retinoid-Inducible Nuclear Factor*, factor nuclear inducible por retinoides).

Parece requerirse la expresión de RINF para la diferenciación terminal de células leucémicas desencadenada por retinoides. En efecto, la expresión de RINF no sólo se correlaciona con la diferenciación inducida por retinoides de células leucémicas y con mielopoyesis inducida por citocinas de células progenitoras CD34+ normales, sino que además, interferencias de ARN de horquilla corta (ARNhc) sugieren para este gen una función reguladora tanto en mielopoyesis normal como tumoral. Además, RINF podría desempeñar un papel importante en el cáncer. De manera interesante, el gen de RINF se localiza en 5q31.3, una región pequeña delecionada a menudo en la leucemia mieloide (leucemia mieloide aguda [AML]/mielodisplasia [MDS]).

Se conoce CXXC55 / RINF a partir de Katoh Masuko *et al.*, Internat. J. Oncol. vol. 25, 2004, pág. 1193-1199. Este documento menciona que CXXC5 es un parálogo de CXXC4, y perteneciente a una familia de proteínas implicadas en carcinogénesis y diferenciación. Sin embargo, no se da a conocer el uso de CXXC5 en el diagnóstico de cáncer.

También se conocen ejemplos para el uso de un gen marcador de diagnóstico para cáncer. Por ejemplo, Rochefort *et al.*, Cancer Meatastasis, vol. 9, 1990, págs. 321-331 dan a conocer catepsina D como marcador de diagnóstico para cáncer de mama. Sin embargo, de nuevo no se da a conocer el uso de CXXC5 en el diagnóstico de cáncer.

La diferenciación de células madre hematopoyéticas para dar granulocitos terminalmente maduros es un proceso de múltiples fases que requiere la expresión coordinada de genes orquestados por factores de transcripción limitados por linaje. Hasta el momento, se ha demostrado que un número relativamente pequeño de factores de transcripción es esencial para la hematopoyesis. La desregulación o mutaciones de estos factores pueden cambiar el destino celular de diferenciación a proliferación y contribuyen a la leucemia mieloide aguda (ALM), un grupo de hemopatías malignas caracterizadas por una detención de la maduración y una acumulación de blastos inmaduros en la médula ósea, la sangre y otros tejidos.

El subtipo ALM-M3 (según la clasificación franco-americano-británica (FAB)) también conocido como leucemia promielocítica aguda (APL), corresponde a la expansión clonal de blastos leucémicos bloqueados en la fase promielocítica de la diferenciación granulocítica. Esta patología cuyo distintivo genético es la translocación t(15;17), representa el primer cáncer tratado mediante una terapia basada en transcripción que restablece la diferenciación terminal. En efecto, en esta patología, las dosis farmacológicas de ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA) desencadenan la maduración terminal de blastos leucémicos. A nivel molecular, se sabe que ATRA actúa como ligando para receptores del ácido retinoico (RARα, PML-RARα...) en células de APL y regula la activación transcripcional de genes diana posteriores. A pesar de extensos estudios que usan un modelo experimental, la línea celular NB4, sólo unos pocos genes diana que codifican para factores de transcripción han mostrado hasta el momento que son realmente esenciales para la diferenciación inducida por retinoides de células promielocíticas.

Sumario de la invención

Al usar un enfoque de microalineamientos, se han identificado varios genes novedosos inducidos de manera temprana por retinoides en células NB4 y que codifican para factores de transcripción implicados potencialmente en el restablecimiento de la diferenciación terminal por ATRA. Uno de estos genes inducidos mediante tratamiento con retinoides codifica para un factor nuclear que se denominó RINF (factor nuclear inducible por retinoides). La invalidación de RINF mediante interferencia de ARN suprime la acción de diferenciación de ATRA en células NB4 imponiendo un fenotipo de resistencia a retinoides y retarda la diferenciación granulocítica inducida por citocinas de células progenitoras mieloides CD34+ normales, sugiriendo de ese modo un papel regulador general y clave para RINF en la diferenciación mieloide.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento, se describe ácido nucleico de respuesta a retinoides, caracterizado porque comprende la secuencia de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 o un fragmento funcional o variante del mismo, o una secuencia de ADN aislada funcionalmente equivalente que puede hibridarse al mismo, o un ARNm correspondiente del mismo.

Además, se describe una proteína o un derivado de proteína, caracterizado porque comprende la secuencia de SEQ ID NO 3 (CXXC5) o un fragmento funcional o variante del mismo.

Se describe el uso de dicha proteína o una secuencia de proteína, o dicho ácido nucleico, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades.

Además, se describe la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad hematopoyética, o mejora de la diferenciación de una célula hematopoyética en un mamífero. Una realización adicional se refiere al deterioro o bloqueo de la diferenciación y/o a la mejora de la proliferación de una célula hematopoyética *in vitro* o en un mamífero.

La célula hematopoyética puede ser una célula de médula ósea, una célula de sangre periférica, una célula de sangre de cordón umbilical, y la célula puede ser o bien tumoral o bien no tumoral.

Un uso preferido es para restablecer la diferenciación en células, tales como células linfoides o células de leucemia mieloide aguda.

La enfermedad hematopoyética puede ser mielodisplasia (MDS, síndrome mielodisplásico), leucemia mieloide aguda (ALM), leucemia linfoide aguda (LLA), síndrome mieloproliferativo (MPS), leucemia mieloide crónica (CML) o leucemia linfoide crónica (CLL).

Dicho cáncer puede ser uno de los tipos de cáncer seleccionados del grupo que comprende leucemia, (mielodisplasia (MDS, síndrome mielodisplásico), leucemia mieloide aguda (ALM), leucemia linfoide aguda (ALL), síndrome mieloproliferativo (MPS), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfoide crónica (CLL) y tumores sólidos (cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, neuroblastoma y carcinoma renal).

Un aspecto adicional se refiere al uso de un retinoide para activar la expresión de dicho ácido nucleico, y/o para potenciar la expresión de dicha proteína o secuencia de proteína en un mamífero que lo necesita. Una realización preferida es ATRA.

Un aspecto adicional se refiere a un método de regulación de la expresión de CXXC5 mediante vectores retrovirales o lentivirales (sobreexpresión) o mediante moléculas de ARNhc (represión).

La invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad neoplásica o una enfermedad hematopoyética tal como se define en la reivindicación 1. Una realización se refiere al diagnóstico de estas enfermedades, usando un anticuerpo para el diagnóstico.

Definiciones

Hematopoyesis:

Hematopoyesis (del griego antiguo: haima, sangre; poyesis, producir), algunas veces también denominada hemopoyesis, es la formación de componentes celulares de la sangre (eritrocitos, trombocitos, granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), monocitos, macrófagos y linfocitos (B, T y NK). Todos los componentes de la sangre celulares se derivan de células madre hematopoyéticas.

Célula hematopoyética:

Cualquier célula del tejido hematopoyético (incluyendo célula mieloide, linfoide). Esta célula puede ser una célula madre (HSC), una célula progenitora (célula progenitora común para mieloide o linfoide), una célula comprometida o una célula de la sangre terminalmente diferenciada.

Mielopoyesis: Formación de células mieloides a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotentes en la médula ósea a través de células madre mieloides. Mielopoyesis se refiere en general a la producción de leucocitos en la sangre, tales como monocitos y granulocitos. Este proceso también produce células precursoras para macrófagos y células dendríticas que se encuentran en el tejido linfoide. En hematología, el término “célula mieloide” se usa para describir cualquier leucocito que no es un linfocito y entonces también incluye eritrocitos (glóbulos rojos) y trombocitos (plaquetas) además de granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas.

Leucemia mieloide aguda (ALM):

Leucemia mieloide aguda (ALM), también conocida como leucemia mielógena aguda, es un cáncer de la línea mieloide de glóbulos blancos, caracterizado por la rápida proliferación de células anómalas que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de células sanguíneas normales. Los síntomas de ALM están provocados por el reemplazo de médula ósea normal por células leucémicas, dando como resultado una disminución de los glóbulos rojos, las plaquetas y los glóbulos blancos normales. Estos síntomas incluyen fatiga, dificultad para respirar, aparición de hematomas y hemorragias con facilidad y aumento del riesgo de infección. ALM se caracteriza por un reloj de maduración. Según la clasificación franco-americano-británica (FAB), pueden distinguirse 8 subtipos de ALM (desde M0 hasta M7) basados en la fase en la que se bloquea la diferenciación, el compartimiento hematopoyético de que se trate y el grado de madurez de las células leucémicas.

El “estado” de un gen o una proteína significa el análisis de secuencia o el nivel de expresión del gen o la proteína, y el número de copias de un gen y el estado de metilación.

Retinoides: Una clase de compuestos químicos que están relacionados estructural o funcionalmente con la vitamina A. En la presente solicitud, el término retinoide significa cualquier compuesto que puede unirse a y activar receptores del ácido retinoico. Estos receptores se unen a elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE) presentes en los promotores de sus genes diana directos y habitualmente activan su transcripción tras unirse con su ligando (por ejemplo, ácido retinoico).

En el presente documento, una proteína o un gen de respuesta a retinoides, es un gen o una proteína cuyo nivel de expresión se induce tras el tratamiento con un retinoide (como ácido retinoico).

Pronóstico de capacidad de respuesta a retinoides:

Sólo un pequeño porcentaje de células cancerosas o leucémicas responden a la terapia con retinoides. Además, la respuesta clínica a esta terapia requiere habitualmente días o semanas de tratamiento antes de tener algún efecto beneficioso para el paciente. La existencia de un biomarcador de proteína o gen de expresión temprana de capacidad de respuesta a retinoides, que podría predecir este último desenlace del tratamiento de la enfermedad con estos agentes, constituiría un importante indicador de pronóstico que ayudaría a los médicos clínicos a decidir si sus pacientes deben emprender un tratamiento de ese tipo u otro.

Sección experimental

Materiales y métodos

Cultivo celular, tratamientos y preparación de ARN.

Se cultivaron células de carcinoma de mama humano (MCF7) y células mieloides (NB4, NB4-LR1, NB4-LR2, K562, LAMA-84 y HL60) en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (Biochrom AG), L-glutamina 2 mM, 50 unidades/ml de penicilina G y 50 μg/ml de estreptomicina (Invitrogen) y se incubaron a 37ºC en la oscuridad, en una atmosfera humidificada del 5% de CO_2. Para la expansión *in vitro* de células CD34+ primarias de médula ósea humana (StemCell technologies), se complementó el medio anterior con 20 ng/ml de interleucina 3 (IL3), 20 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y 50 ng/ml de factor de células madre (SCF) adquirido de Peprotech. Se evaluó la maduración mediante la morfología con tinción de May-Grünwald-Giemsa (MGG) y mediante el ensayo de reducción con azul de nitrotetrazolio (NBT) tal como se describió previamente en Duprez E, Ruchaud S, Houge G, *et al*. A retinoic acid ’resistant’ t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. Leukemia. 1992; 6:1281-1287. Se determinó la densidad celular usando un contador Coulter (Beckman). Se representó la proliferación celular como duplicaciones de población (PD) calculado mediante la fórmula: PD = Log (N/No)/Log2, en la que N es el número de células contadas y No el número de células sembradas en el día 0. Se recogieron conjuntamente células tratadas o no con ATRA (Sigma) y se almacenaron directamente a -80ºC para la preparación de ARN con Trizol (Invitrogen) o minikit RNeasy (Qiagen). Se evaluaron el rendimiento y la calidad del ARN extraído mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Hibridación de microalineamientos

Se realizaron todos los experimentos con microalineamientos usando el sistema de alineamientos de expresión de Applied Biosystems (AB), que se basa en la detección de quimioluminiscencia. El microalineamiento humano de AB contiene 31.700 sondas de oligonucleótidos (60 meros) que representan 27.868 genes humanos individuales. Antes del marcaje, se verificaron la cantidad y la calidad del ARN extraído mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent technologies). Se convertieron dos μg de ARN total de cada muestra en ARNc marcado con digoxigenina (DIG) (con DIG-dUTP) usando el kit de marcaje de RT-IVT quimioluminiscente de AB versión 2.0 (PN 4363252, Roche). Se controlaron la cantidad (50-70 μg) y la calidad del ARNc marcado con DIG mediante un espectrofotómetro NanoDrop y un bioanalizador Agilent 2100. Se hibridaron veinte μg de ARNc marcado con DIG con el microalineamiento AB Human Genome Survey versión 1.0 según las instrucciones del

fabricante. Se realizaron la detección de señal quimioluminiscente, la adquisición de imágenes y el análisis de imágenes de los microalineamientos en el analizador de microalineamientos quimioluminiscentes AB 1700 (PN 4338036) siguiendo el protocolo del fabricante (PN 4339629). Se autocuadricularon las imágenes y se cuantificaron las señales quimioluminiscentes, corregidas para el fondo, y finalmente, se normalizaron espacialmente y con respecto a las manchas usando el software del analizador de microalineamientos quimioluminiscentes AB 1700, v1.03 (PN 4336391). Se usaron un total de 6 microalineamientos para el análisis. Se generaron dos duplicados (procedimiento de marcaje independiente e hibridación independiente) para muestras de NB4 a las 3 horas. Para la normalización entre alineamientos, se aplicó normalización global por mediana a través de todos los microalineamientos para lograr las mismas medianas de intensidad de señal para cada alineamiento. La documentación conforme a MIAME de los experimentos con microalineamientos se ha depositado en Array Express en el Instituto Europeo de Bioinformática (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) con el número de registro E-BASE-7.

Análisis de datos de microalineamientos y clasificación de genes

Se usó el software del sistema de expresión de Applied Biosystems para extraer señales y razones señal/ruido (S/N). Se incluyeron sólo los microalineamientos que muestran una intensidad de señal normalizada promedio por superior a 5.000 y una mediana de fondo inferior a 600 en el estudio. Se importaron las intensidades de señal al software J-Express Pro V2.7 (MolMine, Bergen, Noruega) de acuerdo con Dysvik B, Jonassen I. J-Express: exploring gene expression data using Java. Bioinformatics. 2001;17:369-370., en el que se realizó normalización intercuartílica de alineamientos con el fin de minimizar el efecto de variables externas introducidas en los datos. Cuando fue relevante, se realizó filtrado de calidad de manchas no fiables (S/N<3) antes de la normalización. Se clasificaron todos los genes identificados usando PANTHER™ (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*, análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas) y Gene Ontology™ (GO).

RT-PCR cuantitativa

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc de primera hebra (RT) partiendo de ARN total (de 0,1 a 1 μg) en un volumen de 20 μl usando cebadores de oligo-dT con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron PCR cuantitativas usando el kit de detección de SYBRgreen en una máquina Light Cycler 480 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Para cada gen (cxxc5, cd34, gcsfr y cd11b), se normalizaron las expresiones relativas de ARNm con respecto a la expresión del gen rpP2. Los cebadores para la detección de *cxxc5* (5'-*tccgctgctctggagaag*-3' y 5'-*cacacgagcagtgacattgc*-3'), *rpP2* (5'-atgcgctacgtcgcc-3' y 5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3'), cd34 (5'-*cagctggagccccacag*-3' y 5'-*gaggtcccaggtcctgagc*-3'), gcsfr (5'-*gtgcccacaatcatggaggag*-3' y 5'-*catcctcctccagcactgtg*-3') y cd11b (5'-*ctgctcctggccctcatc*-3' y 5'-*gacccccttcactcatcatgtc*-3') se diseñaron todos para usarse en las mismas condiciones de amplificación por PCR en tiempo real: desnaturalización a 95ºC, 10 segundos; hibridación a 58ºC, 10 segundos; elongación a 72ºC, 12 segundos.

Para los resultados facilitados en las figuras 12, 13 y 14, la RT-PCR cuantitativa usa materiales de pacientes.

Se recogieron una serie de 105 muestras de médula ósea o sangre de 94 pacientes que presentan diversas hemopatías y 13 donantes sanos. Se clasificaron las diversas patologías según las clasificaciones franco-americano-británica (FAB. Bennet *et al*. 1982) y de la OMS (Vardiman *et al*. 2002) tal como sigue: 5 MDS con deleción del cromosoma 5q, 14 MDS sin deleción del cromosoma 5q, 20 ALM (muestras de médula ósea) y 37 ALM (muestras de sangre), 14 ALL B (sangre) y 2 ALL T (sangre). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

RT-PCR cuantitativa de RINF en muestras de pacientes (figuras 12, 13 y 14)

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc de primera hebra (RT) partiendo de ARN total (de 0,1 a 1 μg) en un volumen de 20 μl usando cebadores de oligo-dT y cebadores de hexámeros al azar con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche - 05 531 287 001) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron PCR cuantitativas usando sondas de hibridación específicas que seleccionan como diana el gen CXXC5 en una máquina Light Cycler 480 (Roche) según las instrucciones del fabricante del kit Lightcycler® 480 ProbesMaster (04 707 494 001). Se normalizaron las expresiones relativas de ARNm con respecto a expresión del gen rpP2. Los cebadores para la detección de *cxxc5* (5'-*tccgctgctctggagaag*-3', 5'-*cacacgagcagtgacattgc*-3' y 6FAM-AACCCAAAgCTgCCCTCTCC-BBQ), *rpP2* (5'-atgcgctacgtcgcc-3', 5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3' y Cy5-AgCTgAAT-ggAAAAAACATTgAAgACgTC-BBQ), se diseñaron todos para usarse en las mismas condiciones de amplificación por PCR en tiempo real tras una desnaturalización inicial a 95ºC durante 5 min, y entonces se procedió durante 44 ciclos tal como sigue: desnaturalización durante 10 segundos a 95ºC; y elongación a 55ºC durante 20 segundos.

Secuenciación de CXXC5

Antes de la secuenciación, se sometieron los productos de PCR a purificación usando el kit ExoSAP - IT (GE healthcare - 78201) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la secuenciación usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye® v3.1 (ABI - 4337456) con cebadores de secuenciación específicos directo (5'-gcacaaaagtggtgctgtg-3') e inverso - (5'-gcgtggtgcaggagcat-3') en un volumen total de 10 μl con las siguientes

condiciones de reacción: desnaturalización a 96ºC, 10 segundos; hibridación a 50ºC, 5 segundos; elongación a 60ºC, 4 minutos y pase por 25 ciclos.

Tumores sólidos

Con respecto a los tumores sólidos, se ha investigado el nivel de expresión de ARNm de RINF en 35 muestras de pacientes que presentan cáncer de mama (y 7 controles sanos), 40 muestras de pacientes que presentan melanoma metastásico (y 8 controles con nevus sanos) y 28 muestras de cáncer de tiroides que contienen par de coincidencia tanto de tumor como benigno.

Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina

Se reticularon veinte millones de células NB4 con formaldehído (al 1% v/v) en medio RPMI (Invitrogen) durante 10 minutos a 37ºC, se enjuagaron dos veces con PBS enfriado con hielo, se resuspendieron en tampón de lisis celular hipotónico (Triton X-100 al 0,25%, Na-EDTA 10 mM, Na-EGTA 0,5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, y cóctel de inhibidores de proteasa). Se rompieron las membranas plasmáticas usando un homogeneizador Dounce (20 sacudidas) y se recogieron los núcleos (centrifugación durante 5 minutos a 650 g, 4ºC) se resuspendieron en 1200 µl de tampón ChIP (SDS al 0,1%, desoxicolato de Na al 0,1%, Triton x-100 al 1%, EDTA 1 mM, NaCl 140 mM, Tris 10 mM pH 8 y cóctel de inhibidores de proteasa), y entonces se sonicaron para obtener fragmentos de ADN de 500-1000 pb de longitud. Para cada IP, se recogieron 200 µl del producto de sonicación y se diluyeron 10 veces en el tampón de dilución (Tris 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Triton x-100 al 1%). Para reducir la unión no específica, se realizó una etapa de aclarado previo antes de la hibridación añadiendo 70 µl de suspensión espesa de ADN de esperma de salmón/proteína A-agarosa al 50% (Upstate) durante 2 h a 4ºC sobre una placa giratoria. Se realizó la hibridación (durante la noche a 4ºC) añadiendo 4 µg de un anticuerpo anti-RARα (Abcam-H1920) o anticuerpo anti-PML (Santa Cruz, sc-966) a la mezcla de cromatina fragmentada para inmunoprecipitación (IP). Se realizó la inmunoprecipitación añadiendo 70 µl de suspensión espesa de ADN de esperma de salmón/proteína A-agarosa al 50% (Upstate) durante 4 h a 4ºC sobre una placa giratoria. Se recuperó el inmunocomplejo mediante centrifugación y se eluyó en 200 µl de tampón de elución (SDS al 1%, $NaHCO_3$ 100 mM) tras lavado extenso. Para retirar las reticulaciones de ADN-proteína, se añadieron 8 µl de NaCl 5 M a los eluatos, seguido por calentamiento a 65ºC durante la noche. Entonces se trataron las fracciones con ARNasa A (10 µg/ml) y proteinasa K a 42ºC durante 2 h. Se purificó el ADN resultante de cada IP mediante extracción con fenol/cloroformo y se resuspendió en 40 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0). Para la fracción de entrada, se guardaron 20 µl de la cromatina reticulada tras la etapa de aclarado previo, se diluyó 10 veces en H_2O y se sometió a las mismas etapas para retirar las reticulaciones de ADN-proteínas. Se analizaron las fracciones de entrada, IP y No Ab mediante PCR usando pares de cebadores que abarcan los elementos de respuesta a ácido retinoico ubicados en regiones promotoras de *RINF* o *RARb2*. Cebadores para el promotor de *RINF* (105 pb) 5'-*gcagtctgagatggttcccagg*-3'/5'-tgcatgtaccattccctctgcc-3' y para el promotor de *RARb2* (247 pb) 5'-*tcctgggagttggtgatgtcag*-3'/5'-*aaaccctgctcggatcgctc*-3'.

Preparación de fracciones citoplasmáticas y nucleares.

Se realizó fraccionamiento celular a 4ºC. Se recogieron las células NB4 mediante centrifugación a 200 g, se lavaron dos veces con PBS, se suspendieron en el tampón de lisis hipotónico que contenía inhibidores de fosfatasas y proteasas (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaF 12,5 mM, ortovanadato de sodio 0,2 mM, cóctel de inhibidores de proteasa al 1%, Sigma P8340) y se dejó que se hincharan durante 40 minutos. Se rompieron las membranas plasmáticas mediante homogeneización de la suspensión celular con una mano de almirez cónica en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf). Se añadió Triton-X 100 a una concentración final del 0,1% justo antes de la centrifugación a 1.000 g durante 3 minutos. Se separa el sobrenadante que consiste en la fracción citoplasmática, del sedimento que consiste en los núcleos. Se lavaron los núcleos dos veces con el tampón de lisis que contenía inhibidores de fosfatasas y proteasas, se recuperaron mediante centrifugación a 1.000 g y se extrajeron con tampón de muestra 4x (Laëmmli 1970) durante 8 minutos a 100ºC.

Inmunotransferencia de tipo Western.

Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió previamente por Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, *et al*. Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths. J Cell Sci. 2006;119:2797-2806.

Se produjo anticuerpo específico de péptido policlonal de conejo personalizado contra RINF por Biogenes GmBH. El péptido inmunógeno corresponde a los aminoácidos 45-58 de la proteína RINF. Se confirmó la especificidad del anticuerpo mediante inhibición competitiva de la señal de inmunotransferencia de tipo Western mediante la adición del péptido inmunógeno a la disolución de anticuerpo primario. Brevemente, se incubaron inmunotransferencias con anticuerpo primario contra RINF (anticuerpo policlonal), PARP (IgG de ratón monoclonal, Calbiochem, n.º AM30) o actina (IgG de conejo policlonal, Sigma, n.º A2066) y entonces con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa apropiado. Se realizó la detección de proteínas usando un sistema de detección quimioluminiscente

(Amersham Pharmacia Biotech). Se adquirió inmunotransferencia con extractos de tejido humano de Millipore (TB300).

Preparación de fracciones citoplasmáticas y nucleares.

Se realizó fraccionamiento celular a 4ºC. Se recogieron las células NB4 mediante centrifugación a 200 g, se lavaron dos veces con PBS, se suspendieron en el tampón de lisis hipotónico que contenían inhibidores de fosfatasas y proteasas (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaF 12,5 mM, ortovanadato de sodio 0,2 mM, cóctel de inhibidores de proteasa al 1%, Sigma P8340) y se dejó que se hincharan durante 40 minutos. Se rompieron las membranas plasmáticas mediante homogeneización de la suspensión celular con una mano de almirez cónica en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf). Se añadió Triton-X 100 a una concentración final del 0,1% justo antes de la centrifugación a 1.000 g durante 3 minutos. Se separa el sobrenadante que consiste en la fracción citoplasmática, del sedimento que consiste en los núcleos. Se lavaron los núcleos dos veces con el tampón de lisis que contenía inhibidores de fosfatasas y proteasas, se recuperaron mediante centrifugación a 1.000 g y se extrajeron con tampón de muestra 4x (Laëmmli 1970) durante 8 minutos a 100ºC.

Inmunofluorescencia.

Se construyó un plásmido que codifica para RINF etiquetado con FLAG a partir de ADNc de células NB4. Se insertaron los productos de PCR en el vector de expresión pFLAG-CMV-4 (Sigma). Se hicieron crecer células MCF7 sobre cubreobjetos y se transfectaron con constructos de RNIF etiquetado con FLAG según el protocolo del fabricante de Fugene HD (Roche). Dos días tras la transfección, se lavaron las células una vez en PBS y se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído al 2%. Se lavaron tres veces en PBS las células fijadas, se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos y entonces se incubaron en tampón de bloqueo (PBS, BSA al 2%) durante 30 minutos. Entonces se incubaron las células durante la noche con el anticuerpo primario (anticuerpo anti-Flag M2 policlonal de conejo, Sigma) diluido 1:3.000 en tampón de bloqueo (PBS, BSA al 2%), se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa-488 de Molecular Probes, Invitrogen) diluido 1:1.000 (PBS, BSA al 2%), durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las células tres veces en PBS y se montaron en medio de montaje Vectashield con 4',6-diaminidin-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories) para la contratinción de los núcleos. Se adquirieron imágenes inmunofluorescentes mediante microscopía confocal en un microscopio láser confocal LSM510 META de Zeiss con un objetivo de inmersión en aceite Plan Apochromat 63X N.A.1.4 usando el software LSM510 v4.0 (Zeiss).

Plásmidos para infecciones lentivirales.

Se adquirieron los plásmidos lentivirales (pLKO.1/shRNA/RINF) que seleccionan como diana la expresión de *RINF* de Sigma (MISSION® disolución madre en glicerol de ARNhc bacteriano) y los vectores control (controles pLKO.1/TRC y pLKO.1/shRNA/scramble) los proporcionaron amablemente David Root y David M. Sabatini a través de un acuerdo de transferencia de materiales (plásmidos de Addgene 10879 y 1864). Brevemente, se realizaron la producción de partículas lentivirales mediante cotransfección transitoria (Fugene HD, Roche) de células HEK 293T con el sistema de empaquetamiento de 2º generación (por ejemplo, plásmido de empaquetamiento psPAX2 y plásmido de la envuelta pMD2.G) desarrollado por Trono's lab (plásmidos de Addgene 12260 y 12259). Se recogieron los sobrenadantes virales y se filtraron dos días tras la transfección y entonces se aplicaron a células en crecimiento para infección por centrifugación (2400 rpm, 1 h a temperatura ambiente), que se llevó a cabo en presencia de sulfato de proteamina (5μg/ml). Dos días tras la infección, se seleccionaron las células NB4 durante al menos 2 días con puromicina (Sigma) a 1 μg/ml.

Plásmidos e infecciones retrovirales

El vector retroviral del virus de células madre murino Mig-R1, que contiene la secuencia de entrada al ribosoma interna del virus de la encefalomiocarditis y la proteína fluorescente verde (GFP) como gen indicador, lo proporcionó amablemente W. S. Pear (Universidad de Pensilvania, Filadelfia, PA). Se insertó RINF en Mig-R1 de modo que el promotor con repeticiones terminales largas (LTR) viral en 5' dirige su expresión. Se transfectaron los constructos Mig-R1 (Mig-R1/empty y Mig-R1/RINF) en la línea celular de empaquetamiento retroviral Phoenix para producir sobrenadantes virales (pseudotipado VSV-G) que se recogieron 2 días tras las transfecciones. Entonces se llevaron a cabo infecciones en presencia de 4 μg/ml de sulfato de proteamina. Se clasificaron las células infectadas nueve días tras la infección para la fluorescencia de GFP.

URL

Se realizaron la organización genómica y estructura exón-intrón de gen Cxxc[delta] usando fast DB (www.fastdb.com) de acuerdo con la Grange P, Dutertre M, Martin N, Auboeuf D. FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. Nucleic Acids Res. 2005; 33:4276-4284. Se calculó la masa molecular teórica de la proteína RINF en el sitio web del servidor proteómico ExPASy (sistema experto de análisis de proteínas) (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Se realizó un análisis *in silico* del supuesto motivo NLS usando PredictNLS (cubic.bioc.columbia. edu/predictNLS/).

Resultados

A continuación se describirán adicionalmente los resultados de los experimentos, con referencia a las siguientes figuras:

La figura 1 muestra que *CXXC5* (*RINF*) es una diana directa del ácido retinoico. (A). Se midieron los niveles de expresión de ARNm de RINF mediante RT-PCR cuantitativa tras 4 h de tratamiento con ATRA (1 μM). La inhibición de la traducción con cicloheximida (CHX) usada a 10 μg/ml no bloqueó el aumento inducido por ATRA en el nivel de ARNm de RINF, demostrando que este proceso no requiere síntesis *de novo* de la proteína, y sugiere fuertemente que *Rinf* es una diana primaria del ácido retinoico. El histograma representa las medias de dos tratamientos de cultivo celular independientes (+/- e.e.m). (B). Unión *in vivo* de RARα y PML-RARα al promotor de *RINF* en células NB4. Se preparó cromatina reticulada a partir de células NB4 tratadas o no con ATRA 1 μM durante 3 h y se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-RARα o anti-PML. Se sometieron los precipitados a análisis de PCR usando pares de cebadores que abarcan los promotores del gen *RINF* o *RARb2* humano. Se diseñaron los cebadores para abarcar el supuesto elemento de respuesta a retinoides encontrado en el promotor de *RINF* (*gg**agttca**tg**aggtga**gc*) o EL RARE bien establecido (***ggttca**ccgaa**agttca***) en el promotor de *RARb2* (usado en el presente documento como control positivo). Entrada: PCR realizadas con cromatina total a partir de células NB4 antes de IP. No Ab (sin control de anticuerpo): PCR realizadas con la muestra obtenida tras IP con un anticuerpo irrelevante o sin ningún anticuerpo.

La figura 2 muestra la estructura del gen *Cxxc5* y el producto de proteína (RINF). (A) El gen *Cxxc5* (*Rinf*) se localiza en el cromosoma 5q31.3. El gen empieza 139.008.130 pb desde *pter* y termina 139.043.651 pb desde *pter*. Está orientado en el sentido de la hebra positiva y tiene 35.522 kpb de largo. (B) Organización genómica del gen *Cxxc5* (*Rinf*). El gen está organizado en 4 exones y el 95% del marco de lectura abierto está ubicado en el exón 3. Un supuesto elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE) de tipo de repetición directa 2 (DR2) está situado a -3116 pb en el sentido de 5' del sitio de inicio de la transcripción del exón 1. (C) Secuencia de aminoácidos predicha de RINF según una representación de aminoácidos de una letra. El marco de lectura abierto predice una secuencia de proteína de 322 residuos de aminoácido y un peso molecular teórico de 32,98 kDa (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). El dominio de dedo de zinc está subrayado. (D) Excepto el dominio de dedo de zinc de CXXC, no se encontró ningún dominio estructural conservado. Se presenta una alineación del motivo CXXC de la proteína RINF con sus parálogos humanos. Los aminoácidos que son invariantes entre motivos CXXC están en color gris y los residuos de cisteína conservados están en color rojo. La secuencia consenso para el dedo de zinc de tipo CXXC puede definirse mediante *Cx2Cx2Cx4-5Cx2Cx2C9-15Cx2Cx4C*.

La figura 3 muestra la expresión de RINF y la localización subcelular en células NB4 y otros tejidos y líneas celulares mieloides. (A) Expresión relativa de niveles de ARNm de RINF (medidos mediante RT-PCR cuantitativa) durante el tratamiento con ATRA (1 μM) de células NB4. (B) Expresión de proteína RINF en extractos totales de células NB4 tratadas o no con ATRA (1 μM). Se detectó RINF con anticuerpo de conejo policlonal personalizado (véase Métodos) que detecta una banda específica a 33 kDa. Se usó actina como control de carga. (C) Expresión de proteína RINF en fracciones citosólicas y nucleares de células NB4 tratadas o no con ATRA (1 μM). Se detectó RINF con el anticuerpo policlonal. En este experimento, se usaron PARP y actina como controles para evaluar la calidad, pureza y carga de los extractos nucleares y citosólicos. (D) RINF etiquetado con FLAG (verde; anticuerpo monoclonal anti-FLAG conjugado con Alexa Fluor 488) se localiza en el núcleo (teñido de azul con DAPI) de células MCF7 analizadas mediante microscopía confocal y de contraste por interferencia diferencial (DIC). Barra de escala, 10 μm. (E) Expresión de ARNm de RINF en diversas líneas celulares mieloides medida mediante RT-PCR cuantitativa con o sin ATRA a las 4 h de tratamiento (véase Métodos). Expresión de proteína RINF en diversas líneas celulares mieloides (F) tratadas o no con ATRA (1 μM, durante 4 h), y en diversos tejidos humanos (G). Se cargaron las mismas cantidades de proteína (determinadas con la prueba de ensayo BCA) para cada una de la línea celular mieloide (20 μg) y extractos de tejido humano (65 μg, véase Métodos). Se usó actina como control de carga.

La figura 4 muestra que el silenciamiento mediado por ARNhc de *Rinf* confiere resistencia a la diferenciación terminal inducida por ATRA de células NB4. (A) Vectores de ARNhc lentivirales y sus secuencias diana de ARNm usadas para silenciar la expresión de *Rinf*. Tras la infección y selección de células NB4 (véase Métodos) con los constructos de vector lentiviral, se monitorizaron sus eficiencias para seleccionar como diana la expresión de Rinf basal mediante RT-PCR cuantitativa midiendo los niveles de expresión de ARNm de *RINF* basal (indicados en % de control simulado, el vector pLKO.1/Empty). Se obtuvieron los silenciamientos más eficaces con los constructos shRNA/RINF-3 y shRNA/RINF-4 (el 61% y el 85% respectivamente, en ausencia de ATRA). (B) Crecimiento celular (duplicaciones de población) de células NB4, que expresan de manera estable los constructos de ARNhc, en presencia de ATRA (1 μM). El experimento cinético presentado (en este caso durante 12 días de tratamiento con ATRA) es representativo de tres experimentos independientes (realizados a partir de diferentes grupos de infecciones). La muerte celular tras maduración de células control se indica mediante una †. (C) Expresión de ARNm de *RINF* evaluada mediante RT-PCR cuantitativa (% de control simulado no tratado a las 12 horas de cultivo) y diferenciación terminal evaluada mediante la morfología celular en el día 4 (barra de escala, 25 μm) y ensayo de reducción con NBT en el día 2 (barra de escala, 25 μm) de células NB4 infectadas con vectores Empty,

shRNA/Scramble, shRNA/RINF-3 y shRNA/RINF-4. Se trataron o no células con ATRA (1 μM) durante cuatro días (primera tanda de ATRA, d0-4, panel izquierdo). Tras 2 semanas más de cultivo en ausencia de ATRA, shRNA/RINF-3 y shRNA/RINF-4, se trataron de nuevo las células que escaparon a la primera tanda de ATRA (segunda tanda de ATRA, días 20 a 24, panel derecho) durante cuatro días con ATRA (1 μM).

La figura 5 muestra la expresión de RINF durante mielopoyesis normal. (A) Diferenciación granulocítica inducida por citocinas (IL3 y G-CSF a 20 ng/ml, SCF a 50 ng/ml) de células CD34+ mieloides (de un donante sano). Para la morfología celular (barra de escala, 25 μm), se propagaron células sobre un portaobjetos de vidrio mediante la centrífuga Cytospin, se secaron al aire y se tiñeron con tinción de May-Grünwald Giemsa (MGG) en diferentes puntos de tiempo de cultivo (desde el día 2 hasta el día 10). Para cada día de cultivo registrado, se indica las fases principales de la mielopoyesis observadas. En el día 10, se diferenciaron terminalmente la mayor parte de las células para dar granulocitos neutrófilos polinucleares. En las condiciones experimentales, también se observaron unas pocas células monocíticas (no mostradas). (B) Expresión relativa de ARNm de diversos genes (medida mediante RT-PCR cuantitativa) durante diferenciación granulocítica inducida por citocinas de células progenitoras CD34+ (+/- e.e.m).

La figura 6 muestra la implicación funcional de RINF durante mielopoyesis normal. Se infectaron células progenitoras mieloides CD34+ de tres donantes sanos (A, B y C) con constructos de ARNhc lentivirales que seleccionan como diana la expresión de RINF (shRNA/RINF-3 y -4) o vectores control (empty y shRNA/scramble) y se trataron con citocinas (IL3 y G-CSF a 20 ng/ml, SCF a 50 ng/ml) para dirigirlos a granulocitos. Para cada donante, se evaluó la diferenciación mieloide cada dos-tres días de cultivo mediante análisis de morfología celular tras someterse a la centrífuga Cytospin y tinción con MGG (barra de escala, 25 μm). Diferenciación celular de células progenitoras cultivadas desarrolladas con diferentes cinéticas. La figura muestra la morfología de las poblaciones celulares tras 14, 30 y 18 días, respectivamente. Obsérvese que los cultivos celulares infectados con los constructos ShRNA-RINF-3 o shRNA-RINF-4 presentan más células inmaduras en la fase promielocítica/mielocítica (indicados mediante las flechas) que los controles (cultivos celulares infectados con vectores empty o scramble). Para el donante A, la cinética de la diferenciación granulocítica fue rápida (hasta el día 10) y sólo unos pocos macrófagos/monocitos adherentes persistieron en los cultivo control en el día 14.

La figura 7 muestra la expresión de proteína RINF en extractos totales de células NB4, NB4-LR1 y NB4-LR2 tratadas con ATRA (1 μM). Se detectó RINF con el anticuerpo de conejo policlonal personalizado (véase Métodos) que revela una banda específica a 33 kDa. Se usó actina como control de carga. La expresión de RINF fue más pronunciada en células NB4, que en los dos subclones resistentes NB4-LR1 y NB4-LR2.

La figura 8 muestra la expresión de ARNm de *Cxxc5* en blastos derivados de tres pacientes con APL (positivos para PML-RARa). Se trataron o no células con ATRA (1 μM) durante 4 h. Se han extraído datos de la base de datos disponible para el público Arrayexpress (E-MEXP-149). Se realizaron experimentos con microalineamientos por Meani *et al.* según Affymetrix Gene-Chip Human Genome HG-U133A y HG-U133B (2 hibridaciones representadas para cada muestra). El tipo de cuantificación usado para la medición del valor de expresión es *affymetrix:CHPSignal*. Las 3 sondas que seleccionan como diana la expresión de *Cxxc5* eran la sonda a (222996_s_at), b(224516_s_at) y c (233955_x_at). Las dos líneas de puntos indican medias de grupos no tratados y tratados con ATRA. Se aplicó la prueba de la t de Student para datos emparejados para mostrar que los valores para estos dos grupos eran significativamente diferentes (valor de $p < 0,05$).

La figura 9 muestra que el silenciamiento mediado por ARNhc de *Rinf* retarda la diferenciación terminal inducida por ATRA de células HL60. Se infectaron células HL60 con los vectores lentivirales Empty, shRNA/Scramble, shRNA/RINF-3 o shRNA/RINF-4 y se seleccionaron. Entonces se trataron o no células con ATRA (1 μM). Se evaluó la expresión de ARNm de *RINF* mediante RT-PCR cuantitativa (% de control simulado no tratado a las 6 horas de cultivo). Se evaluó la diferenciación terminal mediante el ensayo de reducción con NBT en el día 2 y mediante la morfología celular en el día 6 y (barras de escala, 25 μm).

La figura 10 muestra que la sobreexpresión de RINF no es suficiente para inducir la diferenciación de las líneas celulares NB4 y HL60. (A) Se usó un sistema retroviral derivado del virus de células madres murino (MSCV) para sobreexpresar RINF en las dos líneas celulares. Se infectaron las células y se clasificaron 9 días tras infección para la expresión de GFP. (B) Para las dos líneas celulares, se midió la expresión de ARNm de RINF (en este caso en el día 10) mediante RT-PCR cuantitativa y se representó en el % de su control simulado respectivo (+/- e.e.m). (C) Se sometieron las células a la centrífuga Cytospin y se tiñeron con MGG para el análisis de la morfología celular en este caso visualizadas a dos magnitudes diferentes (barras de escala, 25 μm). No se observó ninguna señal de diferenciación ni siquiera tras 10 días de sobreexpresión de RINF. Se observó de manera sistemática un pequeño porcentaje de muerte celular (aproximadamente el 10% del total) en cultivos celulares que sobreexpresan RINF.

La figura 11 muestra la expresión de ARNm de *Cxxc5* en células CD34+ derivadas de 55 pacientes que presentan mielodisplasia (MDS). Se han extraído datos de las bases de datos disponibles para el público Arrayexpress (E-GEO-4619) y Gene Expression Omnibus (GDS2118). Se realizaron experimentos con microalineamientos por Pellagatti *et al.* de acuerdo con los microalineamientos GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Cada

punto representa 1 paciente con MDS o un individuo sano. Las tres líneas de puntos indican las medias de grupo (998,1, 512,2 y 985,9) para donantes sanos normales (n=11), MDS con deleción 5q (n=20) o MDS sin del 5q (n=35). Los valores para normal y MDS con del(5q) fueron significativamente diferentes según la prueba de Wilcoxon para dos muestras (p<0,003). URL: http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/ (ArrayExpress) y http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (Gene Expression Omnibus)

La figura 12 muestra la expresión de ARNm de RINF detectada mediante RQ-PCR en células de la médula ósea de pacientes con diversas hemopatías

La figura 13 muestra la expresión de ARNm detectada mediante RQ-PCR en células sanguíneas de pacientes con diversas hemopatías.

La figura 14 muestra la expresión de RINF en tumores sólidos

La figura 15 muestra la expresión de RINF en tumor frente a benigno de muestras coincidentes de pacientes con cáncer de tiroides.

Resultados experimentales

Identificación de *Cxxc5*, un gen inducido de manera temprana mediante ácido retinoico en la línea celular NB4

En esta búsqueda de nuevos genes diana de ácido retinoico en APL, se realizaron experimentos con microalineamientos usando células NB4 tratadas durante cortos periodos de tiempo (90 minutos y 3 horas) con ATRA (1 μM). Los análisis de expresión de microalineamientos permitió identificar 35 genes regulados por incremento de manera sistemática a los 90 minutos de tratamiento, con al menos una inducción doble en comparación con control no tratado, y que permaneció regulada por incremento tras 3 horas (tabla 1). Tras el análisis y la clasificación cuidadosos de estos 35 genes, se identificaron nueve genes que codifican para factores de transcripción supuestos o bien conocidos. Los demás 26 genes no cumplieron con los criterios para ser supuestos factores de transcripción según la ontología génica y/o el análisis de secuencia. Siete de los nueve genes candidatos codifican para factores de transcripción bien caracterizados, que se sabe que se expresan en el tejido mieloide durante la diferenciación granulocítica o monocítica. De manera importante, seis de estos genes se han identificado previamente como inducidos de manera temprana por ácido retinoico en células NB4, siendo cinco dianas directas. Estas observaciones confirmaron y validaron la precisión de la selección con microalineamientos.

Tabla 1 Resultados de microalineamientos y procedimiento de selección para identificar genes diana de expresión temprana de ácido retinoico en células NB4.

	Número de sondas				Genes	Factores nucleares
	detectado*		regulado por incremento†	regulado por incremento en común‡	regulado por incremento en común§	conocido o potencial [ ]
Tratamiento con células NB4	Control	ATRA (1μM)				
90 min.	15853	16299	96			
3 h	16062	14464	313	40	35	9
3 h	16869	16166	240			

* Número de sondas con una señal fiable detectadas de las 31.700 sondas presentes en el alineamiento.

† Número de sondas con una señal aumentada en al menos dos veces tras tratamiento con ATRA (en comparación con el control no tratado correspondiente). ‡ Tras la normalización (véase métodos), 40 sondas presentaron una señal fiable regulada por incremento de manera sistemática tan pronto como a los 90 minutos y que aún estaban reguladas por incremento de manera sistemática a las 3 horas (se han realizado experimentos con microalineamientos por duplicado en ese tiempo). § Tras el filtrado de los genes redundantes y las manchas no fiables (si señal/ruido < 3 en los 6 alineamientos), se identificaron más de 35 genes como regulados por incremento en estas condiciones. || A partir de esta lista de 35 genes candidatos, se clasificaron 9 como genes que codifican para “factores de transcripción potenciales o conocidos”

Esto se refiere a Cxxc5, una secuencia genómica hasta el momento no sometida a ninguna caracterización funcional.

Se realizó la elección tras dos hallazgos experimentales decisivos. En primer lugar, el análisis de RT-PCR cuantitativa (figura 1A) confirmó de manera exquisita la inducción por ATRA de la expresión de ARNm de Cxxc5 (en este caso observada a las 4 horas de tratamiento con ácido retinoico). En segundo lugar, el pretratamiento de células NB4 con el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida, 30 minutos antes de la adición de retinoides y que se continuó durante 4 horas, no bloqueó la regulación por incremento de ARNm de CXXC5 por ATRA (figura 1A). Estos experimentos indican que la transcripción de Cxxc5 mediada por ATRA no requiere síntesis de novo de la proteína y sugieren que Cxxc5 es una diana primaria del ácido retinoico. Esto se ha confirmado mediante experimentos de ChIP (figura 1B) que demostraron una unión directa de receptores de retinoides (RAR y/o PML-RARα al promotor del gen Cxxc5 en células NB4.

Caracterización *in silico* del gen *Cxxc5*

En la figura 2, se resumen brevemente las principales características genómicas de Cxxc5 (ENSG00000171604) disponibles de bases de datos. El gen *Cxxc5* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 5, en 5q31.3 (figura 2A). El gen abarca 35,5 kpb y está organizado en 4 exones (figura 2B). La región promotora en el sentido de 5' de este gen aún no se ha analizado funcionalmente, pero de manera relevante para este estudio, contiene un posible elemento de respuesta a retinoides a -3116 pb del sitio de inicio de la transcripción. A pesar de la existencia de dos posibles sitios de inicio de la transcripción alternativos, uno en el exón 1 y el otro en el exón 2, las dos secuencias de ARNm revelan el mismo marco de lectura abierto con el codón de iniciación en el exón 3. La traducción conceptual predice una proteína de 322 aminoácidos (figura 2C) y un peso molecular teórico de 32,98 kDa. El análisis de secuencia de proteína reveló un único dominio conservado, un motivo de dedo de zinc CXXC típico (*$Cx_2Cx_2Cx_{4-5}Cx_2Cx_2C_{9-15}Cx_2Cx_4C$*) entre los aminoácidos 257 y 302, en las proximidades del extremo C-terminal. Este motivo que se sabe que contiene ocho residuos de cisteína conservados coordinando dos iones zinc se encuentra en otras once proteínas (a menudo proteínas asociadas con cromatina) y se supone que reconocen CpG no metilado. La figura 2D presenta una alineación de todos los miembros conocidos de la familia de proteínas que portan este motivo.

Perfil de expresión génica de *Cxxc5* en células promielocíticas tratadas con retinoides

De acuerdo con estos datos de microalineamientos, el análisis del transcurso temporal de los niveles de ARNm de CXXC5 (mediante RT-PCR cuantitativa) demostró una inducción doble tan pronto como a los 90 minutos de tratamiento con ATRA (figura 3A). El nivel de transcripto de *Cxxc5* alcanzó su mayor nivel a las 12 horas de tratamiento (aproximadamente seis veces el nivel de expresión observado en el control no tratado). Entonces, su nivel permaneció regulado por incremento de manera estable durante al menos 48 horas (figura 3A). Para corroborar la expresión de *Cxxc5* y la inducción a nivel de proteína, se personalizó un anticuerpo policlonal dirigido contra los aminoácidos 45-58 de la cadena polipeptídica de CXXC5 predicha (véase Métodos). El nivel de expresión basal de la proteína CXXC5 fue muy bajo en extractos de células NB4 no tratados (figura 3B) pero apareció una banda intensa, específica para la proteína CXXC5 (verificada mediante competencia con el péptido inmunógeno, no mostrado), en el peso molecular esperado de 33 kDa en el plazo de 4 horas tras el comienzo del tratamiento con ATRA. La cinética de inducción de la proteína CXXC5 está de acuerdo con la inducción observada a nivel de ARNm. De manera interesante, en comparación con células NB4, se observó sólo una inducción muy débil de la proteína CXXC5 tras el tratamiento con ATRA de los subclones resistentes a la maduración NB4-LR1 y NB4-LR2 (figura 7). Estas observaciones eran compatibles con una posible participación de CXXC5 durante la maduración terminal de células de APL. Además, los datos extraídos de las bases de datos de microalineamientos disponibles para el público (figura 8), confirmaron la inducción temprana de ARNm de *Cxxc5* por ATRA en células primarias de pacientes con APL, validando los datos obtenidos con la línea celular NB4.

Localización subcelular del *factor nuclear inducible por retinoides*, RINF (CXXC5)

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de fracciones nucleares y citoplasmáticas de células NB4 tratadas con ATRA detectó claramente la expresión de CXXC5 en los extractos nucleares (figura 3C). Este nivel de expresión aumentado duró al menos 48 horas. Debido a que el anticuerpo policlonal apenas detectó el epítopo relevante (aminoácidos 45-58) de la proteína nativa plegada, se generó un plásmido que codifica para un CXXC5 etiquetado con FLAG para experimentos inmunoquímicos *in situ*. El análisis confocal *in situ* de células MCF7 transfectadas de manera transitoria con este constructo mostró una fuerte tinción nuclear (figura 3D) y confirmó el patrón de localización nuclear de la proteína CXXC5. De manera importante, de una célula a otra y según el nivel de sobreexpresión, el patrón de fluorescencia se asoció parcialmente a una matriz de cromatina fina, nucleoplasma y/o estructuras puntuales diferenciadas en el núcleo. Sin embargo, no se detectó ninguna señal fluorescente en la membrana nuclear o en los nucléolos.

Basándose en estas evidencias experimentales, se propuso renombrar CXXC5 como RINF, para *Retinoid-Inducible Nuclear Factor,* factor nuclear inducible por retinoides. De acuerdo con este nombre propuesto, un análisis detallado de la secuencia de RINF (CXXC5) reveló una supuesta señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*) entre los residuos de aminoácido 257 y 262 (KKKRKR), ubicados en la base N-terminal del dominio de dedo de zinc.

Patrones de expresión de RINF en diferentes líneas celulares mieloides y diversos tejidos humanos

También se evaluaron los niveles de expresión basal del gen *Rinf* en otras líneas celulares mieloides (figuras 3E-F) y en diversos tejidos humanos (figura 3G) así como su posible regulación por retinoides. Las líneas celulares más inmaduras sometidas a prueba, células K562 y LAMA-84 mostraron los mayores niveles de ARNm de *RINF* (16 y 12 veces el nivel basal de células NB4, respectivamente) y también la mayor expresión de proteína RINF. Ni los niveles de ARNm de *RINF* ni los de proteínas parecían estar regulados por incremento tras tratamiento con ATRA en estas líneas celulares (figuras 3E-F). En comparación, las líneas celulares HL60 (subtipo M2) y NB4 (subtipo M3) albergan ambas bajos niveles basales de ARNm de *RINF* y proteína. De manera importante, el tratamiento de estas últimas líneas celulares con ATRA indicó que las células HL60 (que se sabe que se embarcan en diferenciación terminal tras un tratamiento de ese tipo) se comportan de manera similar a las células NB4 con respecto a la inducción de RINF (en este caso observada a las 4 horas), tanto en el nivel de ARNm como de proteína. De manera importante, esta inducción en HL60, una línea celular que carece de la expresión del receptor quimérico PML-RARα demuestra que no se requiere PML-RARα para la inducción de RINF por ATRA. De acuerdo con esta observación, se observó que ATRA también induce la expresión de ARNm de *RINF* en dos otras líneas celulares con un nivel de expresión basal similar al de las células NB4 (datos no mostrados), el carcinoma de pulmón A549 (un aumento de tres veces) y las células de cáncer de cuello uterino HeLa (un aumento de dos veces). Finalmente, para sustanciar el hecho de que no se limitó la expresión de RINF a tejido mieloide, se ha realizado un análisis de inmunotransferencia de tipo western con diversos extractos de proteína de diferentes órganos (figura 3G). La proteína RINF mostró diferentes niveles de expresión en los tejidos humanos sometidos a prueba, el mayor nivel de expresión fue en la placenta y el menor en el cerebro. Conjuntamente, estos datos indican que la expresión regulada y la supuesta función de RINF no dependen de la expresión de PML-RARα y abarca un campo de interés mucho más amplio que la patología APL.

Se requiere expresión de RINF para la diferenciación de células de leucemia promielocítica

Con el fin de investigar la posible implicación de RINF en la diferenciación terminal de células NB4 tras tratamiento con ATRA, se realizó un enfoque de interferencia de ARN usando ARNhc administrados ,mediante vectores lentivirales (figura 4A). Tras la infección y selección de células NB4 que expresan de manera estable cada uno de los 5 diferentes constructos de ARNhc dirigidos contra ARNm de *RINF*, se comparó su eficiencia (con respecto al nivel de expresión de ARNm de *RINF* basal diana) con vectores control, uno que expresa ARNhc desordenado (*scrambled*) y uno que es el vector vacío (*empty*). Se observaron las dos mejores eficiencias de silenciamiento con shRNA/RINF-3 (61%) y shRNA/RINF-4 (85%) con los que no se observaron cambios de proliferación ni alteraciones morfológicas en células NB4 en ausencia de retinoide. Con tal eficiencia de silenciamiento (figura 4A), podría esperarse de manera razonable el bloqueo de manera eficiente de la inducción de ARNm de *RINF* por ATRA en una importante proporción de las células, y de esta manera, evaluar la consecuencia del fenotipo celular tras tratamiento con ATRA.

De manera sorprendente, la expresión de estos dos constructos de ARNhc proporciona a la población de células NB4 la capacidad de proliferar en presencia de doses farmacológicas de ATRA (figura 4B). De hecho, mientras que las células que expresan vectores control se diferenciaron de manera ineludible y murieron en el plazo de una semana tras tratamiento con ATRA, ambos cultivos celulares infectados con los vectores lentivirales o bien shRNA/RINF-4 o bien shRNA/RINF-3 sortearon la detención del crecimiento (figura 4B) y el proceso de diferenciación terminal (figura 4C). Se evaluó la eficiencia de la estrategia de interferencia de ARN para bloquear la expresión de ARNm de *RINF* inducida por ATRA mediante RT-PCR cuantitativa (figura 4C) a las 12 horas de tratamiento, un tiempo en el que la expresión de ARNm de *RINF* fue máxima (véase también la figura 3A). De manera importante, los niveles de silenciamiento obtenidos con shRNA/RINF-3 (aproximadamente el 50%) y shRNA/RINF-4 (60%) en comparación con vectores control tratados con ATRA, eran suficientes para rescatar aproximadamente el 30%-50% de las células NB4 de la diferenciación terminal tal como se evalúa mediante la reducción de NBT y el análisis morfológico (figura 4C, panel izquierdo).

Cabe destacar que estas células (shRNA/RINF-3 y -4) continuaron proliferando en presencia de retinoides e, incluso tras dos semanas de cultivo sin ATRA (desde el día 6 hasta el 20), se confirmó su resistencia a ATRA, y permaneció estrechamente asociada con un bloqueo eficiente en la expresión de ARNm de *RINF* (figura 4C, panel derecho). Conjuntamente, estos resultados demuestran que el silenciamiento de *RINF* mediado por ARNhc confiere diferenciación terminal inducida por ATRA de células de leucemia promielocítica y sugieren fuertemente que se requiere la expresión de RINF para la maduración terminal inducida por retinoides de células NB4.

Entonces se evaluó la contribución de RINF en la línea celular HL60 comprometida en la ruta de diferenciación granulocítica con dosis farmacológicas de ATRA (figura 9). Tal como se observa con células NB4, los dos ARNhc seleccionan como diana de manera eficiente la expresión de RINF (figura 9) y retardan el proceso de maduración evaluado mediante NBT y análisis morfológico, respaldando la implicación funcional de RINF durante la diferenciación granulocítica. Sin embargo, a diferencia de células NB4-shRNA/RINF que continuaron creciendo en presencia de retinoides, las células HL60-shRNA/RINF tratadas con ATRA declinaron de manera inevitable y murieron en el plazo de 12 días.

Finalmente, se cuestionó si la sobreexpresión de RINF sería suficiente para inducir la maduración granulocítica de

células NB4 o HL60 en ausencia de ATRA (figura 10). Los datos indican que la expresión de RINF ectópica (figura 10 B) es necesaria pero no suficiente para desencadenar la diferenciación granulocítica de células leucémicas. En efecto, incluso tras 10 días de sobreexpresión de RINF, no se observó ningún signo de diferenciación ni a nivel morfológico (figura 10, panel C), ni a nivel molecular (usando el marcador de superficie anti-CD11b, datos no mostrados).

Función y expresión de RINF durante mielopoyesis dirigida por citocinas de células progenitoras CD34+ normales

Los hallazgos anteriores indican claramente un amplio espectro de expresión de RINF en tejidos hematopoyéticos y otros tejidos humanos. Estos datos indicaron que aunque inducible mediante concentraciones farmacológicas de ATRA y requerida para la diferenciación de algunas células de leucemia mieloide, la expresión de RINF puede regularse bien fisiológicamente mediante citocinas durante la mielopoyesis de células progenitoras normales. En este caso, su expresión regulada podría representar un acontecimiento más general que también se produce durante el desarrollo normal a lo largo del linaje granulocítico.

Para someter a prueba esta hipótesis, se examinó la expresión de *RINF* durante la diferenciación granulocítica inducida por citocinas de células CD34+ aisladas de médula ósea de un donante adulto sano. Se evaluó la diferenciación mediante cambios morfológicos (figura 5A) y análisis de expresión de *CD34*, *CD11b* y G-CSFR de manera comparativa con *RINF* (figura 5B). Se determinó el perfil de expresión de transcurso temporal de los niveles de ARNm de *RINF* mediante análisis de RT-PCR cuantitativa. Tras una disminución inicial (desde el día 2 hasta el 4), el nivel de ARNm de *RINF* alcanzó su expresión mínima entre el día 4 y 6, un tiempo en el que la mayor parte de las células en cultivo estaban en la fase blástica y promielocítica. Más tarde, entre el día 6 y 8, la expresión de ARNm de *RINF* aumentó aproximadamente 3,5 veces desde su nivel mínimo, de manera concomitante con respecto a la maduración celular terminal para dar mielocitos, metamielocitos, y en última instancia, para dar neutrófilos polinucleares de corta vida (figuras 5A-B). La detección de ARNm de *RINF* en células progenitoras CD34+ y en células hematopoyéticas normales durante la diferenciación dirigida por citocinas confirma que su expresión no se limita a células de APL (y, por tanto, no depende de la expresión de PML-RARα) y, de la manera más importante, que su inducción no se limita a señalización farmacológica de ATRA. Estos datos concuerdan con su posible papel durante la mielopoyesis normal.

Con el fin de evaluar la relevancia funcional de la expresión de RINF durante la mielopoyesis normal, se infectaron células progenitoras CD34+ dirigidas hacia el linaje granulocítico mediante tratamiento con citocinas, con los constructos de ARNhc lentivirales para silenciar la expresión de RINF. Como las células no infectadas, la mayor parte de las células infectadas con vectores control (shRNA/scramble y control simulado) maduraron para dar granulocitos polinucleares (figuras 5A y 6) antes de morir y se disgregaron progresivamente en cultivos celulares (no mostrado). En los tres cultivos celulares sometidos a prueba de donantes diferentes, se produjo diferenciación granulocítica con diferentes cinéticas (véase la figura 6), acabando todos los cultivos con maduración celular para dar neutrófilos polinucleares que murieron rápidamente. Sólo unos pocos monocitos y macrófagos adherentes al plástico, que se sabe que tienen una vida mucho más larga, persistieron en los cultivos. De manera importante, las poblaciones celulares infectadas en las mismas condiciones con shRNA/RINF-3 y shRNA/RINF-4 (figura 6) mostraron una acumulación significativa de células inmaduras (promielocitos y mielocitos). Esta diferencia en la maduración granulocítica, observada con los dos ARNhc en comparación con los cultivos control, reflejaron de manera sorprendente los resultados obtenidos con las líneas celulares leucémicas tratadas con ATRA, NB4 y HL60, y sugiere un papel similar de RINF durante la mielopoyesis normal.

Discusión

El proceso de múltiples fases de diferenciación de células hemopoyéticas ha servido durante mucho tiempo como estudio modelo para el entendimiento de la etilogía tumoral y para el diseño de estrategias terapéuticas. Las molestias en los programas de desarrollo que rigen la producción de células funcionales maduras resultan con frecuencia de alteraciones genéticas o epigenéticas (deleciones génicas, mutaciones, metilación, etc.) en un número limitado de genes reguladores clave, cuyas funciones predilectas son transducción de señales y/o control de la transcripción génica. En el caso particular de tumores malignos hemopoyéticos, esta última década ha traído grandes avances en el hallazgo de estos genes reguladores clave pero sigue existiendo incertidumbre acerca de su jerarquía funcional.

En el presente estudio, se ha identificado y caracterizado un miembro novedoso de la familia del dedo de zinc, CXXC5 (RINF), y se ha mostrado su implicación durante la diferenciación terminal inducida por retinoides de células de leucemia mielocítica, pero también durante la mielopoyesis normal dirigida por citocinas. Las proteínas que contienen dedo de zinc constituyen una de las superfamilias de proteínas más grandes en el genoma de mamíferos y pueden clasificarse en familias de proteínas evolutivas y funcionalmente divergentes, con dominios conservados estructuralmente diferentes que interaccionan con ADN, ARN, lípidos u otras proteínas. El dedo de zinc de tipo CXXC se encuentra en un pequeño subconjunto de proteínas (figura 2) implicado en la remodelación de cromatina a través de sus actividades histona metiltransferasa (MLL, MLL2), histona desmetilasa (FBXL-10, -11, -19), ADN-metil-transferasa (DNMT1) o de unión a CpG (CGBP, MBD1). Se ha mostrado que los dominios de CXXC de MLL, CGBP y MBD1 se unen a CpG no metilado y el motivo KFGG conservado (en el segundo ligador del dedo de zinc) es

esencial para este reconocimiento. Se espera que los parálogos que carecen del motivo KFGG (CXXC-4, -5, -6 y -10, figura 2) no compartan esta última propiedad y uno de los desafíos futuros será identificar la(s) diana(s) molecular(es) reconocida(s) por este subconjunto específico de proteínas con dominios de CXXC conservados pero que carecen del motivo KFGG. De manera interesante, se han implicado anteriormente tres miembros de la familia tipo CXXC (que contienen o no el motivo KFGG), *MLL*, *MLL2* y *LCX*, en leucemogénesis a través de translocaciones cromosómicas o reordenamientos internos. *MLL* es uno de los genes más frecuentemente translocados en leucemia y a pesar de más de 30 componentes de fusión diferentes que se han descrito, el dominio de CXXC se retiene en todas las proteínas de fusión de MLL conocidas y el dominio parece ser esencial para la transformación mieloide, respaldando la importancia biológica de este subtipo de dedo de zinc incluso si el mecanismo de acción está aún por dilucidar.

La expresión y los componentes de inducción del gen *Cxxc5* (*Rinf*) notificados en el presente documento soportaron una implicación funcional de RINF tanto en mielopoyesis normal como tumoral, al menos en las últimas fases del proceso de maduración (promielocito, mielocito). Los experimentos de silenciamiento, usando direccionamiento de ARNi específico, demostraron adicionalmente que la expresión de *RINF* era necesaria para el proceso de diferenciación terminal de células de leucemia promielocítica. Sin embargo, y de manera importante, este estudio apoya claramente la idea de que la fisiopatología de *Rinf* no se limita a APL, sino que puede tener una implicación más amplia en otros tumores malignos hemopoyéticos y la hemopoyesis normal. Por tanto, el estado de *Rinf* (tal como mutaciones, expresión/inducción aberrante) puede tener valor predictivo para la capacidad de respuesta a ATRA, y por tanto ser una importante herramienta para la toma de decisiones sobre regímenes terapéuticos para pacientes con ALM.

En el contexto clínico, una perspectiva interesante referente a la biología de *Cxxc5* (*Rinf*) será evaluar si su expresión desregulada podría contribuir a la etiología de algunas enfermedades hematológicas. En efecto, la deleción intersticial o la pérdida completa del brazo largo del cromosoma 5 son anomalías cromosómicas recurrentes en trastornos mieloides malignos caracterizados por mielopoyesis anómala y un exceso de blastos en la médula ósea, como mielodisplasia (MDS, a menudo descrita como trastorno preleucémico) y leucemia mieloide aguda (ALM). A pesar de estudios extensos que han delineado la principal región delecionada comúnmente (CDR) para la banda cromosómica 5q31, aún no se han identificado los genes supresores de tumores candidatos que se supone que contribuyen a la leucemogénesis en esta región de 4 Mpb de tamaño. Es importante observar que, dentro de ese segmento, *Rinf* se localiza a menos de 20 kpb del marcador distal D5S594 que delinea la menor CDR (menos de 1 Mpb) descrita en su fecha. De manera sorprendente, el gen *Rinf* se ha escapado hasta el momento a la investigación funcional y genética, probablemente debido a que se ha considerado que el gen se localiza fuera de la CDR. Aún así, la estrecha proximidad de *Rinf* con la CDR puede afectar a la expresión de *Rinf* debido a la pérdida de secuencias reguladoras en el sentido de 5' del gen identificado, así como a deleciones más distantes dentro de 5q31. Estos hallazgos combinados con datos en la bibliografía llevaron a los solicitantes a considerar que *Rinf* es un fuerte candidato de gen supresor de tumores de transformación de células mieloides. De manera interesante, la exploración de bases de datos de microalineamientos disponibles para el público para patologías mieloides, ha traído a luz una menor expresión de ARNm de *RINF* en células CD34+ de pacientes mielodisplásicos con deleción 5q en comparación con donantes sanos normales (figura 11). Esta observación es compatible con un supuesto mecanismo de haploinsuficiencia y será importante evaluar la contribución genuina de la desregulación de *rinf* en estas hemopatías, como se ha descrito recientemente para el gen ribosómico *rpS14* (ubicado en 5q32 en una CDR distinta) en otro subgrupo de MDS con anemia que no responde al tratamiento, el síndrome del 5q.

Puesto que la expresión de *Rinf* no se limita a tejido mieloide, este gen también puede estar implicado en el desarrollo y/o la homeostasis de otros tejidos. Su inducción directa por retinoides, que no requiere síntesis *de novo* de un regulador proteico intermedio, sugiere que *Rinf* podría mediar, al menos en parte, en algunos de los efectos pleiotrópicos de los retinoides, por ejemplo tales como su acción antiproliferativa en diversos tumores sólidos, incluso independientemente de cualquier diferenciación. Tomados en conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis que la expresión de *Rinf*, inducible farmacológicamente por retinoides en diferentes tejidos, pueden tener un gran interés debido a su probable implicación en varias patologías y procedimientos de desarrollo.

SEQ ID NO 1 - 5 274097 295972

Organización solicitante:

Calle:
Ciudad:
Estado:
País:
Código postal:
Número de teléfono:
Número de fax:
Dirección de correo electrónico:

<110> Nombre de la organización: Bergen Teknologioverføring AS

Proyecto de solicitud

<120> Título: Factor inducible por retinoides novedoso y usos del mismo
<130> Referencia de expediente de sol.: P11828NO01
<140> Número de sol. actual:
<141> Fecha de presentación actual: __-_-_

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*
<400> Cadena de secuencia pre.:

```
gttttgccgg cagcccccgg gcagcgttca tagctcctgc ccgggcgggc gcgcggcggc      60
ggcggcagag gcggctgagc ctgagcgggg atgtagaggc ggcggcagca gaggcggcac     120
tggcggcaag agcagacgcc cgagccgagc gagaagagcg gcagagcctt atcccctgaa     180
gccgggcccc gcgtcccagc cctgcccagc ccgcgcccag ccatgcgcgc cgcctgctga     240
gtccgggcgc cgcacgctga gccctccgcc cgcgagccgc gctcagctcg ggggtgatta     300
gttgcttttt gttgtttttt aatttgggcc gcggggaggg ggaggagggg caggtgctgc     360
aggctccccc ccctccccgc ctcgggccag ccgcggcggc gcgactcggg ctccggaccc     420
gggcactgct ggcggctgga gcggagcgca ccgcggcggt ggtgcccaga gcggagcgca     480
gctccctgcc ccgcccctcc ccctcggcct cgcggcgacg gcggcggtgg cggcttggac     540
gactcggaga gccggttcgg tgcgcggccg gggccggagt tcgctgcaag tcggcggaaa     600
gtttggctgc gcgggttccc ccgaagttca gagtgaagac atttccacct ggacacctga     660
ccatgtgcct gccctgagca gcgaggccca ccaggcatct ctgttgtggg cagcagggcc     720
aggtcctggt ctgtggaccc tcggcagttg gcaggctccc tctgcagtgg ggtctgggcc     780
tcggccccac catgtcgagc ctcggcggtg gctcccagga tgccggcggc agtagcagca     840
gcagcaccaa tggcagcggt ggcagtggca gcagtggccc aaaggcagga gcagcagaca     900
agagtgcagt ggtggctgcc gccgcaccag cctcagtggc agatgacaca ccacccccg      960
agcgtcggaa caagagcggt atcatcagtg agcccctcaa caagagcctg cgccgctccc    1020
gcccgctctc ccactactct tcttttggca gcagtggtgg tagtggcggt ggcagcatga    1080
tgggcggaga gtctgctgac aaggccactg cggctgcagc cgctgcctcc ctgttggcca    1140
atgggcatga cctggcggcg gccatggcgg tggacaaaag caaccctacc tcaaagcaca    1200
aaagtggtgc tgtggccagc ctgctgagca aggcagagcg ggccacggag ctggcagccg    1260
agggacagct gacgctgcag cagtttgcgc agtccacaga gatgctgaag cgcgtggtgc    1320
aggagcatct cccgctgatg agcgaggcgg gtgctggcct gcctgacatg gaggctgtgg    1380
```

caggtgccga agccctcaat ggccagtccg acttccccta cctgggcgct ttccccatca 1440
acccaggcct cttcattatg accccggcag gtgtgttcct ggccgagagc gcgctgcaca 1500
tggcgggcct ggctgagtac cccatgcagg gagagctggc ctctgccatc agctccggca 1560
agaagaagcg gaaacgctgc ggcatgtgcg cgccctgccg gcggcgcatc aactgcgagc 1620
agtgcagcag ttgtaggaat cgaaagactg gccatcagat ttgcaaattc agaaaatgtg 1680
aggaactcaa aaagaagcct tccgctgctc tggagaaggt gatgcttccg acgggagccg 1740
ccttccggtg gtttcagtga cggcggcgga acccaaagct gccctctccg tgcaatgtca 1800
ctgctcgtgt ggtctccagc aagggattcg ggcgaagaca aacggatgca cccgtcttta 1860
gaaccaaaaa tattctctca cagatttcat tcctgttttt atatatatat tttttgttgt 1920
cgttttaaca tctccacgtc cctagcataa aaagaaaaag aaaaaaattt aaactgcttt 1980
ttcggaagaa caacaacaaa aaagaggtaa agacgaatct ataaagtacc gagacttcct 2040
gggcaaagaa tggacaatca gtttccttcc tgtgtcgatg tcgatgttgt ctgtgcagga 2100
gatgcagttt ttgtgtagag aatgtaaatt ttctgtaacc ttttgaaatc tagttactaa 2160
taagcactac tgtaatttag cacagtttaa ctccaccctc atttaaactt cctttgattc 2220
tttccgacca tgaaatagtg catagtttgc ctggagaatc cactcacgtt cataaagaga 2280
atgttgatgg cgccgtgtag aagccgctct gtatccatcc acgcgtgcag agctgccagc 2340
agggagctca cagaagggga gggagcacca ggccagctga gctgcaccca cagtcccgag 2400
actgggatcc cccaccccaa cagtgatttt ggaaaaaaaa atgaaagttc tgttcgttta 2460
tccattgcga tctggggagc cccatctcga tatttccaat cctggctact tttcttagag 2520
aaaataagtc ctttttttct ggccttgcta atggcaacag aagaaagggc ttctttgcgt 2580
ggtcccctgc tggtgggggt gggtccccag ggggcccccc gcggcctggg ccccccctgcc 2640
cacggccagc ttcctgctga tgaacatgct gtttgtattg ttttaggaaa ccaggctgtt 2700
ttgtgaataa aacgaatgca tgtttgtgtc acgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760
aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2778

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 2778
Nombre de secuencia: rinf1
Descripción de secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*
<400> Cadena de secuencia pre.:

```
atgtcgagcc tcggcggtgg ctcccaggat gccggcggca gtagcagcag cagcaccaat      60
ggcagcggtg gcagtggcag cagtggccca aaggcaggag cagcagacaa gagtgcagtg     120
gtggctgccg ccgcaccagc ctcagtggca gatgacacac cacccccga gcgtcggaac      180
aagagcggta tcatcagtga gcccctcaac aagagcctgc gccgctcccg cccgctctcc     240
cactactctt cttttggcag cagtggtggt agtggcggtg gcagcatgat gggcggagag     300
tctgctgaca aggccactgc ggctgcagcc gctgcctccc tgttggccaa tgggcatgac     360

ctggcggcgg ccatggcggt ggacaaaagc aaccctacct caaagcacaa aagtggtgct     420
gtggccagcc tgctgagcaa ggcagagcgg gccacggagc tggcagccga gggacagctg     480
acgctgcagc agtttgcgca gtccacagag atgctgaagc gcgtggtgca ggagcatctc     540
ccgctgatga gcgaggcggg tgctggcctg cctgacatgg aggctgtggc aggtgccgaa     600
gccctcaatg gccagtccga cttcccctac ctgggcgctt tccccatcaa cccaggcctc     660
ttcattatga ccccggcagg tgtgttcctg gccgagagcg cgctgcacat ggcgggcctg     720
gctgagtacc ccatgcaggg agagctggcc tctgccatca gctccggcaa gaagaagcgg     780
aaacgctgcg gcatgtgcgc gccctgccgg cggcgcatca actgcgagca gtgcagcagt     840
tgtaggaatc gaaagactgg ccatcagatt tgcaaattca gaaaatgtga ggaactcaaa     900
aagaagcctt ccgctgctct ggagaaggtg atgcttccga cgggagccgc cttccggtgg     960
tttcagtga                                                            969
```

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 969
Nombre de secuencia: rinf2
Descripción de secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*
<400> Cadena de secuencia pre.:

```
MSSLGGGSQD AGGSSSSSTN GSGGSGSSGP KAGAADKSAV VAAAAPASVA DDTPPPERRN      60
KSGIISEPLN KSLRRSRPLS HYSSFGSSGG SGGGSMMGGE SADKATAAAA AASLLANGHD     120
LAAAMAVDKS NPTSKHKSGA VASLLSKAER ATELAAEGQL TLQQFAQSTE MLKRVVQEHL     180
PLMSEAGAGL PDMEAVAGAE ALNGQSDFPY LGAFPINPGL FIMTPAGVFL AESALHMAGL     240
AEYPMQGELA SAISSGKKKR KRCGMCAPCR RRINCEQCSS CRNRKTGHQI CKFRKCEELK     300
KKPSAALEKV MLPTGAAFRW FQ                                              322
```

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 322
Nombre de secuencia: RINF
Descripción de secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*
<400> Cadena de secuencia pre.:

cgagttcatg aggtgagc 18

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 18
Nombre de secuencia: RARE
Descripción de secuencia:

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*
<400> Cadena de secuencia pre.:

```
ccccaagcac tgtctgagca ccccattcct tggagtctga agggaagggc agagtagggg      60
gtggtagctg gggtcttggg gccccaggtc tgaagagaaa gaggctgggc cattttcgga     120
agtctcagtg cgggccattt ctgaccctgc actgccctcc aggaccagat ttgtagagag     180
gaggctgagc cccaccctgc ctcctccagc aggcctcccc cacaccacca caccctagcc     240
```

```
ttcaggcttt gggtcgggca gggcactttc agggcaggct ggcttctcct gcccagggca   300
cccctcctcc aggtgcaggg ctccagattg ggacactgtg cctctgcctc ccctaaggcc   360
ccattcagtt acctccccac ctctcagcaa tgctctccct ccctcttcct gaagtgtggc   420
agggaggctg gagccacagc tttggcctct gggagcactc agtcccactc ccataggaca   480
gagttgaacc atgattgtgt ctagagaagc caagggttat tgtcaggggc acaacagccc   540
ccaaactgtc cctctcccca tcaatatccc atatacaggc tgagttccct gtgcctcact   600
gagaacaggg ctgtatctgg ttgtctatgg cgtgtatgta gctgtgcctg ggcaatggga   660
aatatagctt gcttcctgct ttctctcagc ctctgtcccc agagtcattt tgttctggga   720
ctggagtctt ccttctgtcc tcatcccttc ccctctgttt acacaggtca aggccaggca   780
ttggccacca aactgacttc tcaggaatgg gcaagcctgg gttacttgag agacttggct   840
ttttgaattt tcatttcaca gctctctgct ccttcagacg tcatgggggt ggggtgggga   900
ggacctaaag tccagtggtc agtgcgtgag ggcccagacc caaaggcccg gggccacagt   960
ctggtgcggt taggctcctc cctgcctctg cccgtgtttg caccccccagg cctgccctgg  1020
gattttggct gaggtcacag tccagcatga ccccactgaa cactatcctg tgccctgccc  1080
cagcaggcag ggtttcaaat gcctttgctc ccatcctttg tgatacaggt gacagaactg  1140
gggcccaaag aagggtaaac cttagactga gttccaaatt ggccatcttt attggagatc  1200
ctaactccca cactcctctc catgtggcca tttccagtca ctggatgttt aatcaatgac  1260
agatattagc agataaatgg cagtcatgga aaatgcctca gacaaggcat ggattgaaat  1320
cctggttttg ctactttgta acctcacaca ggtgtccaag cctgtggatt taataagcct  1380
atgttcaaaa agcaattagc atggtccctg acaagcaaga gctcagaaag attctggcta  1440
caattgttat tactggtacc tctttggagg ccaagcttcg ggcccaaggc aggtagggga  1500
ctcctcctta ccttcaaaga attttcatgg cgggaggtgg tggcgagggg acaagtagtg  1560
agatgagcaa ataaaagcta tttctgtgca ttgtggtcac tgtggccata ggaggggtcc  1620
caaagccaga tgaaggaccc aaagccaggc cacagagtac atctgtcctg tgcatgcact  1680
gcaaaaaggc acctagcaaa gggagctagg aagctgaaag gcagtctgtg acctccttca  1740
tggtttcctg tatctgccaa aagtgggtac ctttttctga tttgcacaaa ggctagtggt  1800
ggccctgtag gtatggccca aactcaggct ggaagtggca gtctgagatg gttcccaggt  1860
gatatgtgct cctggtcttc catgaggagt tcatgaggtg agcttgatga ggcctatctt  1920
ggcagaggga atggtacatg caaagctctg gaaatctgga gaggagtctt ggggtgtcag  1980
agggaactgc cagtgttaga tggcattggt cagcagggcc tggcagggaa gagagtcagt  2040
tagggaagcc aggctgagta gggtagtctg tgaggaacca ctgcaggatg tgaagcagat  2100
gagcctcact ggaggctgtg gaaagcctcc ctagaatagc acatggcctc aggggtttga  2160
gaacagctct gatgccaatc tcatttcagt ttcctcatct gaataatggg gatgacatta  2220
ttgcaggggc tgctataagg gctaaataag ataatgtacc ttaactgttt agcacaatgc  2280
```

cctgctcagg gtaagggctg cacaaatacc agccatgggt attatcagca ggatccagga 2340
gagcacactc cagggtcccg ggtggacgca cccctcccta gaagacaagg ctggtgatgc 2400
aggggccatc tcccccagcg gtgctggaga ctgaaggagc ttcttcctga cttgaaggct 2460
gattggttca aaaaactcag caaaaagttt aatagcaagg tgagacttca attctccttt 2520
ttgaggtagg cagaggtggg agaatagtga accaagcttc ccttcttctt ggggaagggg 2580
gctgtggtgg ggacagtctc acccaagggc agagatcctc accccatcct tcctggatgt 2640
cccccgcttg tctcattggc atctgtggtg gagagttctt tgtggatggc ttgcacatga 2700
cattttctgt ttctgtaaca ctttctgtgt ggacaattct gtccttttcc tctgtggctc 2760
ccatatgggt tggataggtg acagtctagg tctccctccc aaggtgttaa tttccagcaa 2820
gggaaaactc caagatccac cccctaaact gggccagaca agtcaacacc ccttccctga 2880
ggaagccatc accactggga ccacctggcc ttcctccatt gcagcctgtg gatccctggc 2940
ctcccgcctg agttgggggt gggggtggag gcataagtct gaaaaaaaag tgggtaatag 3000
tcagcagttc cctaaagtag aattactacc caccctctgc catggacccc agcataaagc 3060
tttttgtggg gcgtgcatga cctgactctg tactggcgtt aggcttcagg agatctgtgg 3120
aatagagttt gacttcatgg atcctaaccc tctgagacct gctgctgact cccagggagc 3180
aggtcctccc tcacagtctg tgcctcagct tccccagaaa aggtagatgg aggtgagtta 3240
aatgcttgga gatcctacac ctgggctttt gcttcctttt tccttgcacg gtcagtgccc 3300
aacacagtgc ctgacattca cactgaggcc cagcatacct atctttaagc agtttggaag 3360
tgatcttctg ggggtgatgg gcgtcttaaa acggtttcca tagcaagcac cttacttta 3420
ctcacatggg atgtttgttt ggaggggggc attaaaagga ctgctggcaa ggaggagaga 3480
gactaaacgc ctccccaagg gagccatttc ttggcatagt agttaaggga gaccacttct 3540
cagcattcgg aaggaactgg ttgggagcag gtgtccacga tgtctgggga ggggtcactt 3600
cgtgtggtct tggatatcag gagtggcaga gaggcaacac attccagatg agctctgccc 3660
tttgacacct ccccccaccc caccccggct gggtcaaggc cccaaggcca catatagaag 3720
gcgtggaagg tgggcaccag ctgctgctgc caggagatcc atgctccata agccctcgcg 3780
ccagcctcgg agacagccag gctgcgcaga gcagaggaga ggaagcagcg aggtgggaga 3840
cagtttcgct tctcccaccg aggccgcgcc tgtggctgca ggcgcccgga tcgccacagt 3900
taactccctg ttatctgggc cccaatcgat ctcaggctgt aacgtttaac cctaggctga 3960
cttccccaac cgccctcccc ctctccctcc cctgcttggg tctggggact gcgttttctt 4020
cgcctcgcag aggaaggtcg gccttgcaca aatccgcccc cacgaatccc aaagaattgg 4080
agaaaacttc cactttggga ttatatgcag ttgggattat atgagcccgg ggcttgcacc 4140
atgggtacgt gaggtgaaga catctgcagc agcaggatta attagcctaa gatgggcata 4200
tggaggccac tgatggagtg aaagcgggat atgcgggccc aactctgtcc ccactgggcg 4260
cctactctgg caaggctgag ttttccttct gtctttcaat cagtacctat tgagcgctgc 4320

```
tgttccaagc attgtttcgg gttttgagtg cgtaggccat ggtctcaggg caccaaatgt      4380
acgtagtcgt tttagccccg ggactcaaga gttgaggctg atgcctgcct gagagataaa      4440
atatcctttc tcggatcagt ttcctcacct gagaaatggg aacgggaatc tccgcccctt      4500
ttctcccggg gccctagtgc ccactgaatc cattaaggag ctcttggaag ggtggggtct      4560
tggaacacgc gtctacctcc caggaccctc gactaggaat ctctggcccg ccgcgcacct      4620
gagctggggg gcgcggccaa attctccctc ccggtcctcg aagcttctgg ccccgctcta      4680
gaggggggcag aaagatagca gatttccccg gaggtgcgtc tctaaaccca gaccgcctca      4740
ccaaagcggg gaggtcgtcc ttttttttt tttttgtaa agttgcggga aataggcgaa      4800
gacggggcgc gcaagggagc tgagcctggg tggaccgcgt cagggcgcgg ggagctcgag      4860
gcgcagcggc tgcagctccg gcctcagagc ccgcggcgtc caagtggccc gagctgcgct      4920
gggagggagg cggcgggagg agggagggga gccgaggtgg agggggttgg ggggaggagg      4980
gagcggcgag tccggtccgg                                                 5000
```

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 5000
Nombre de secuencia: Promotor
Descripción de secuencia:

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de mielodisplasia del 5q (MDS), leucemia mieloide aguda (ALM), cáncer de mama y melanoma, que comprende la etapa de detección del nivel de expresión de un ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 o el nivel de expresión para una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO 3.

2. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión de dicha proteína mediante el uso de un anticuerpo.

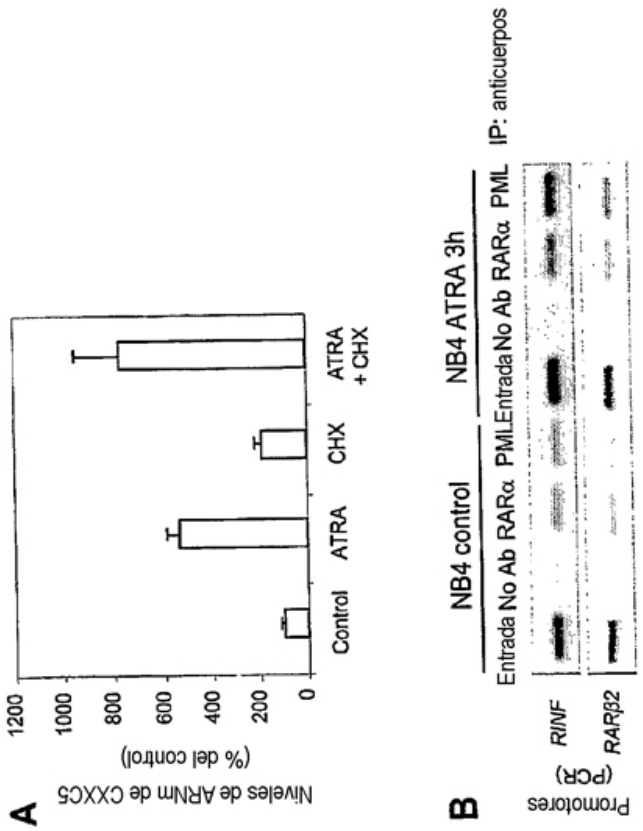

A
Niveles de ARNm de CXXC5 (% del control)
1200
1000
800
600
400
200
0
Control
ATRA
CHX
ATRA + CHX
B
NB4 control
NB4 ATRA 3h
Entrada
No Ab
RARα
PML
Entrada
No Ab
RARα
PML
IP: anticuerpos
Promotores (PCR)
RINF
RARβ2

Figura 1

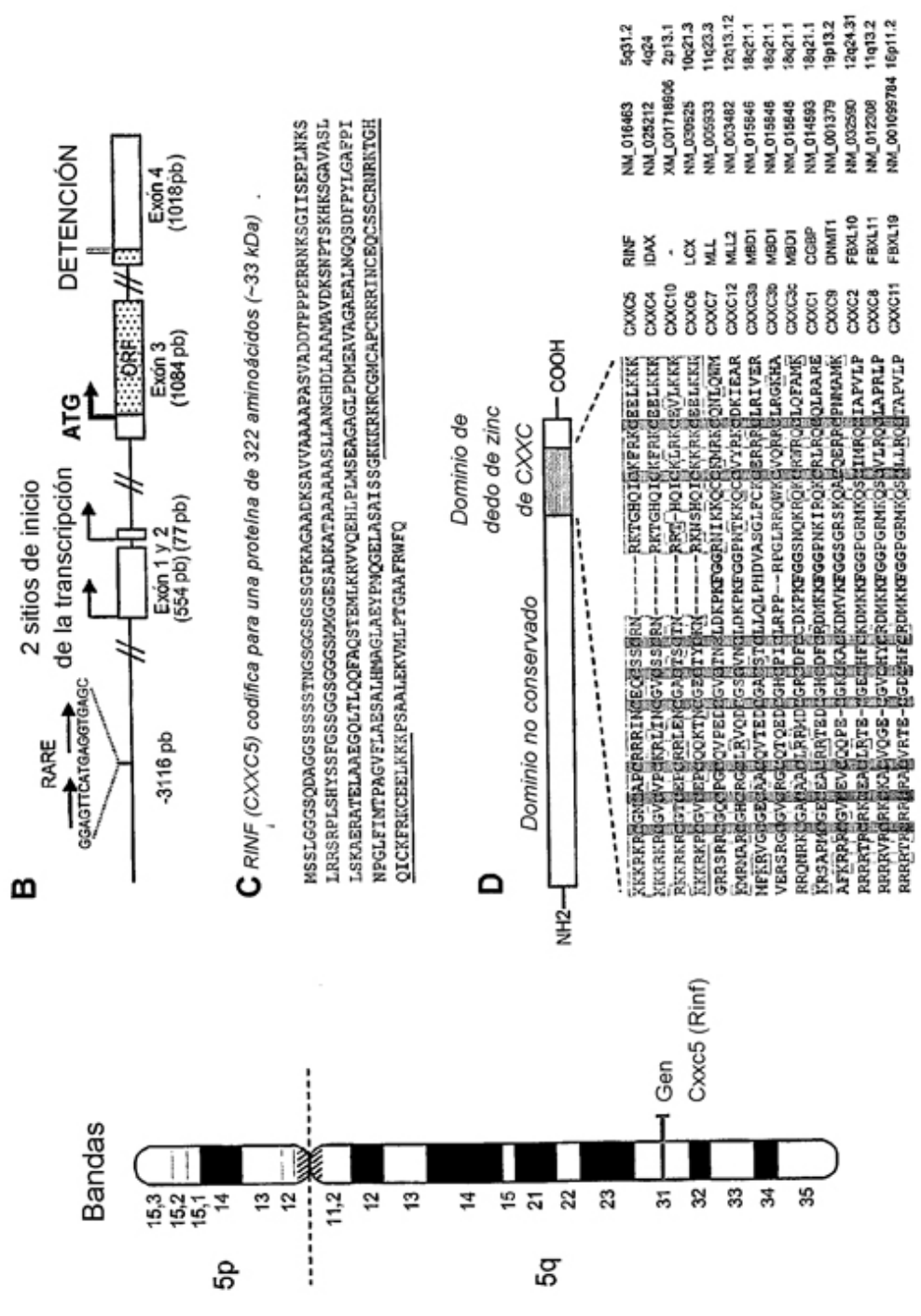

A
Bandas
5p
5q
Gen
Cxxc5 (Rinf)
B
2 sitios de inicio
de la transcripción
RARE
GGAGTTCATGAGGTGAGC
-3116 pb
Exón 1 y 2
(554 pb) (77 pb)
ATG
ORF
Exón 3
(1084 pb)
DETENCIÓN
Exón 4
(1018pb)
C RINF (CXXC5) codifica para una proteína de 322 aminoácidos (~33 kDa) .
MSSLGGGSQDAGGSSSSSTNGSGCGSGSGSGPKAGAADKSAVVAAAAPASVADDTPPPERRNKSGITSEPLNKS
LRRSRPLSHYSSPGSSGSGGSGGGSMGGESADKATAAAAAASLLANGHDLAAAMAVDKSNPTSKHKSGAVASL
LSKAERATELAAEGQLTLQQFAQSTEMLKHVVQEHLPLMSEAGAGLPDMSAVAGAEALNGQSDFPYLGAFPI
NPGLFIMTPAGVTLAESALHWAGLAEYPMQGELASAISSGKKKRKRCGMCAPCRRRINCEQCSSCRNMKTGH
QICKFRKCEELKKKPSAALEKVMLPTGAAFRWFQ
D
Dominio no conservado
Dominio de
dedo de zinc
de CXXC
NH2
COOH
CXXC5 RINF NM_016463 5q31.2
CXXC4 IDAX NM_025212 4q24
CXXC10 - XM_001716906 2p13.1
CXXC6 LCX NM_030625 10q21.3
CXXC7 MLL NM_005933 11q23.3
CXXC12 MLL2 NM_003482 12q13.12
CXXC3a MBD1 NM_015846 18q21.1
CXXC3b MBD1 NM_015846 18q21.1
CXXC3c MBD1 NM_015846 18q21.1
CXXC1 CGBP NM_014593 18q21.1
CXXC9 DNMT1 NM_001379 19p13.2
CXXC2 FBXL10 NM_032590 12q24.31
CXXC8 FBXL11 NM_012308 11q13.2
CXXC11 FBXL19 NM_001099784 16p11.2

Figura 2

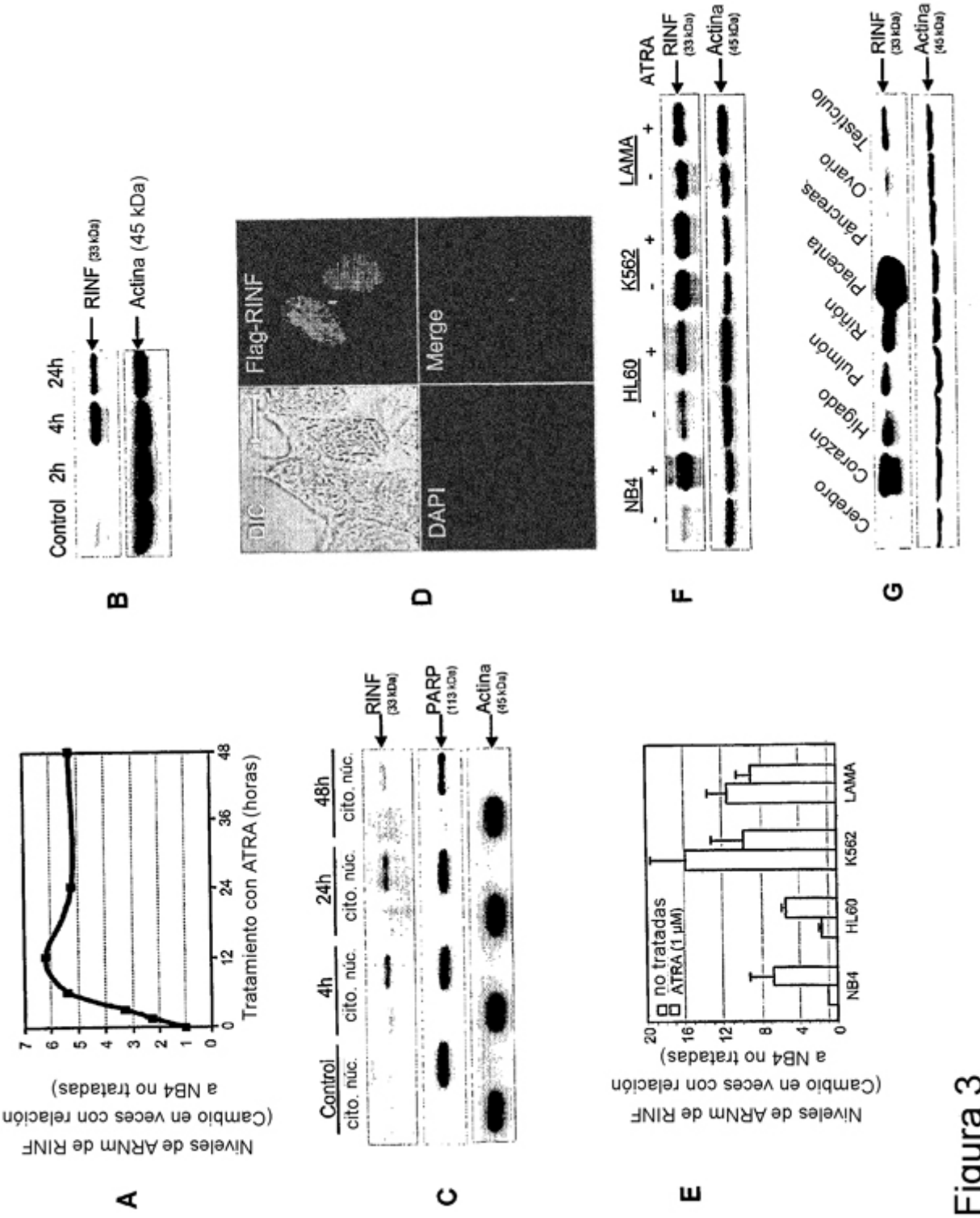

A
Niveles de ARNm de RINF
(Cambio en veces con relación
a NB4 no tratadas)
Tratamiento con ATRA (horas)
B
Control 2h 4h 24h
RINF (33 kDa)
Actina (45 kDa)
C
Control
cito. núc.
4h
24h
48h
RINF (33 kDa)
PARP (113 kDa)
Actina (45 kDa)
D
DIC
Flag-RINF
DAPI
Merge
E
Niveles de ARNm de RINF
(Cambio en veces con relación
a NB4 no tratadas)
no tratadas
ATRA (1 μM)
NB4
HL60
K562
LAMA
F
NB4
HL60
K562
LAMA
ATRA
RINF (33 kDa)
Actina (45 kDa)
G
Cerebro
Corazón
Hígado
Pulmón
Riñón
Placenta
Páncreas
Ovario
Testículo
RINF (33 kDa)
Actina (45 kDa)

Figura 3

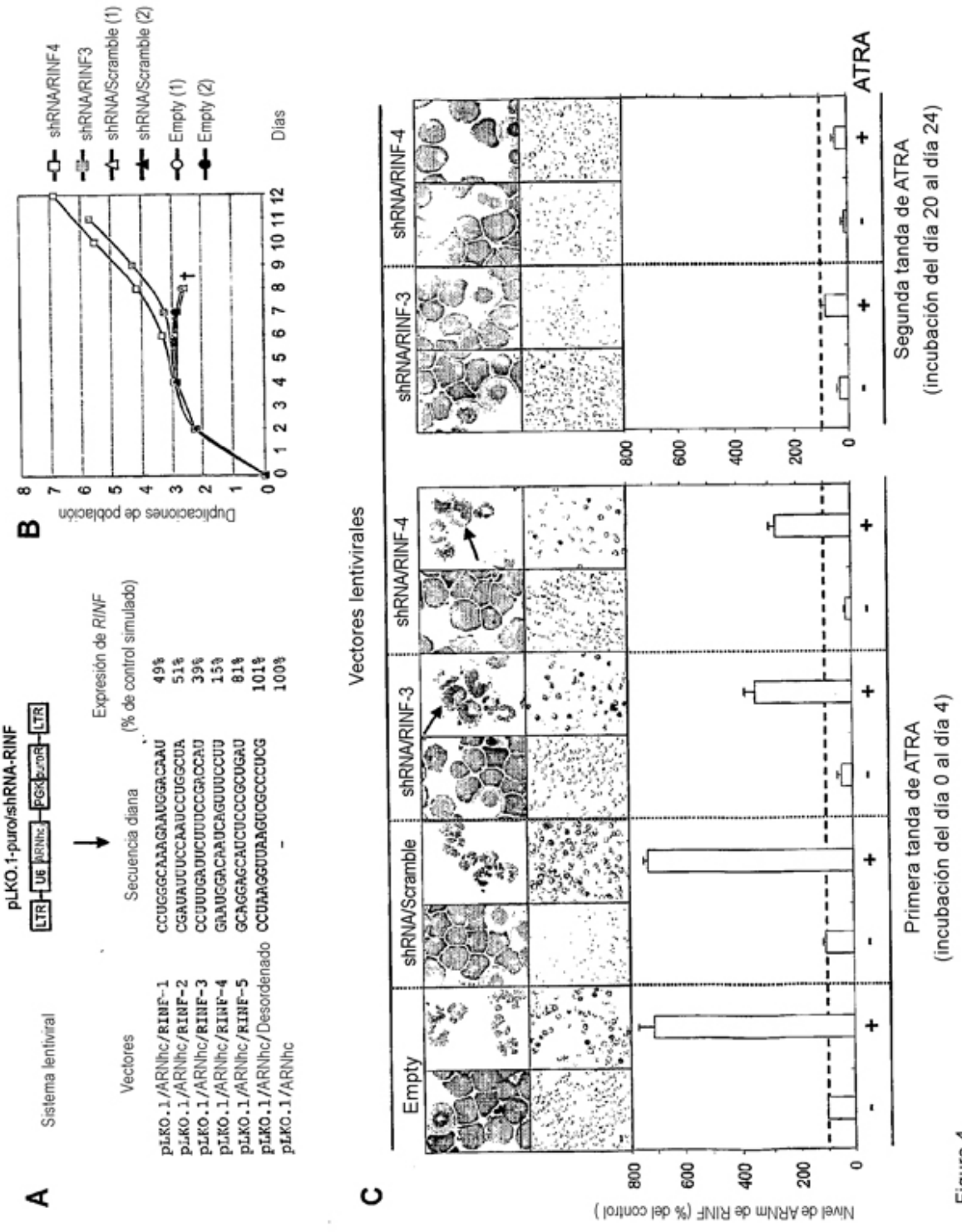

A
Sistema lentiviral
pLKO.1-puro/shRNA-RINF
LTR
U6
shRNAc
PGK
puroR
LTR
Vectores
Secuencia diana
Expresión de RINF
(% de control simulado)
pLKO.1/ARNhc/RINF-1 CCUCGGCAAAGGAAUGGACAAU 49%
pLKO.1/ARNhc/RINF-2 CGAUAUUCUCCAAUCCUGGCUA 51%
pLKO.1/ARNhc/RINF-3 CCUUUGAUUCUUUCCGACCAU 39%
pLKO.1/ARNhc/RINF-4 GAAUCGACAAUCAGUUUCCUU 15%
pLKO.1/ARNhc/RINF-5 GCAGGAGCAUCUCCCGCUGAU 81%
pLKO.1/ARNhc/Desordenado CCUAAGGUUAAGUCGCCCUCG 101%
pLKO.1/ARNhc - 100%
B
Duplicaciones de población
Días
shRNA/RINF4
shRNA/RINF3
shRNA/Scramble (1)
shRNA/Scramble (2)
Empty (1)
Empty (2)
C
Vectores lentivirales
Empty
shRNA/Scramble
shRNA/RINF-3
shRNA/RINF-4
Nivel de ARNm de RINF (% del control)
Primera tanda de ATRA
(incubación del día 0 al día 4)
Segunda tanda de ATRA
(incubación del día 20 al día 24)
ATRA

Figura 4

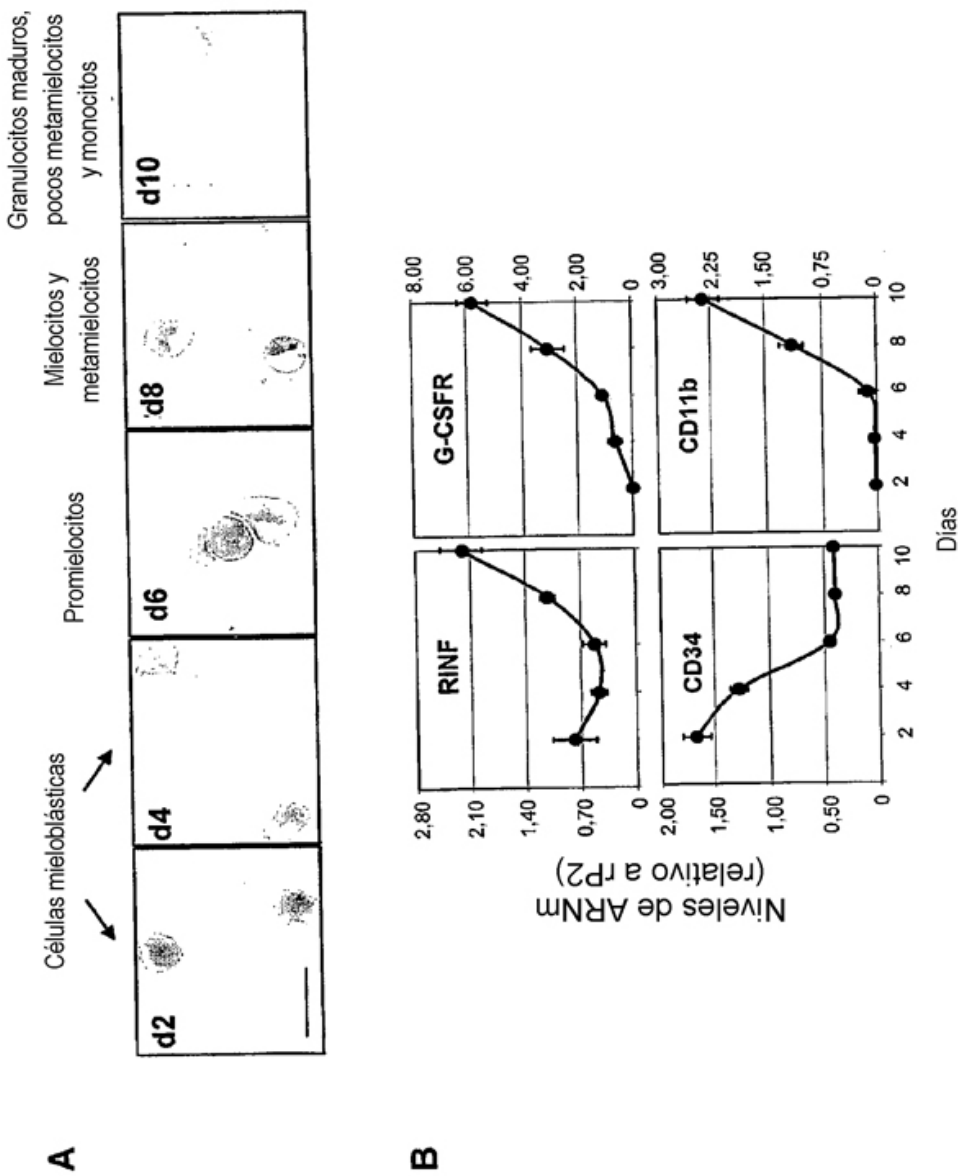

A
Células mieloblásticas
Promielocitos
Mielocitos y metamielocitos
Granulocitos maduros, pocos metamielocitos y monocitos
d2
d4
d6
d8
d10
B
Niveles de ARNm (relativo a rP2)
RINF
G-CSFR
CD34
CD11b
Días

Figura 5

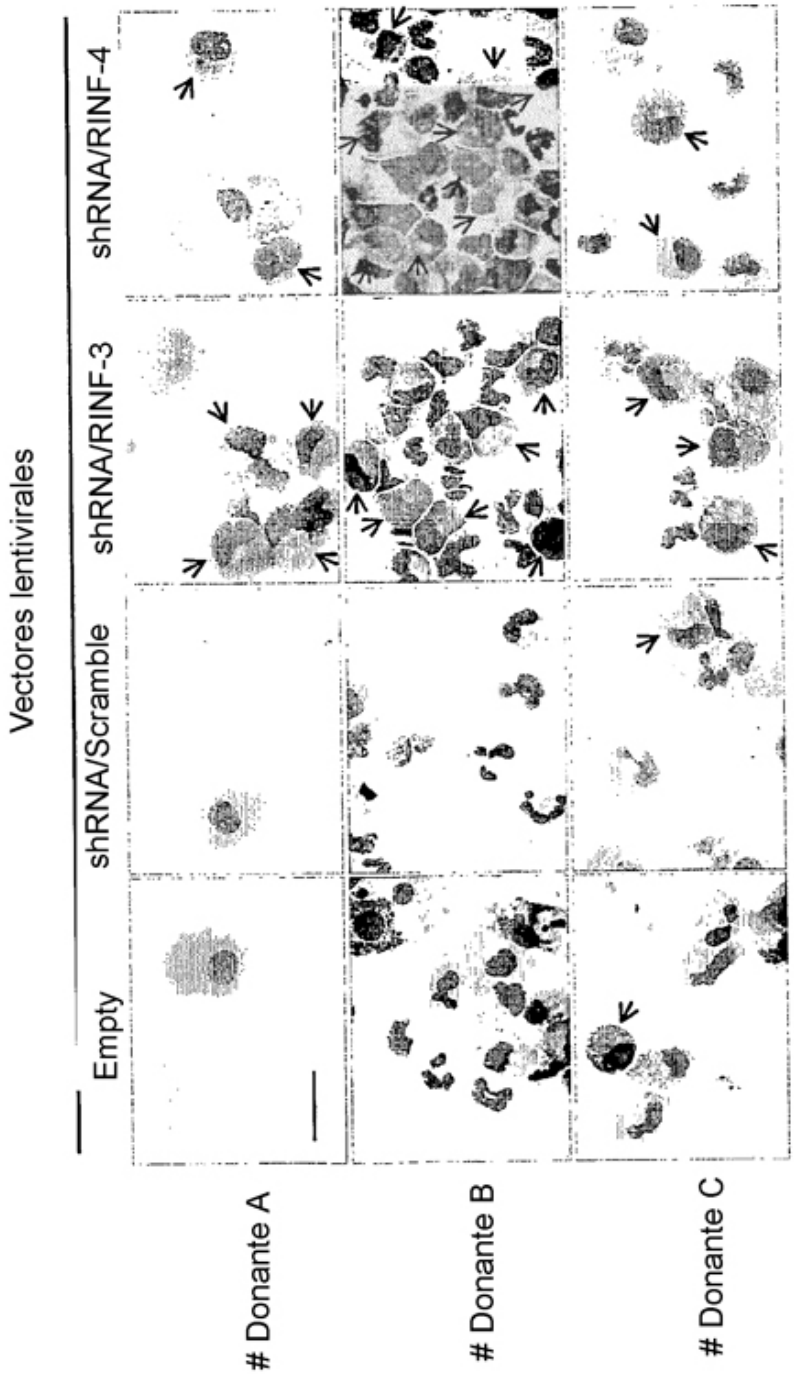

Vectores lentivirales
Empty
shRNA/Scramble
shRNA/RINF-3
shRNA/RINF-4
Donante A
Donante B
Donante C

Figura 6

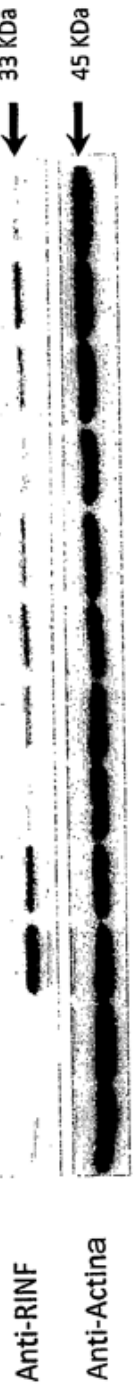
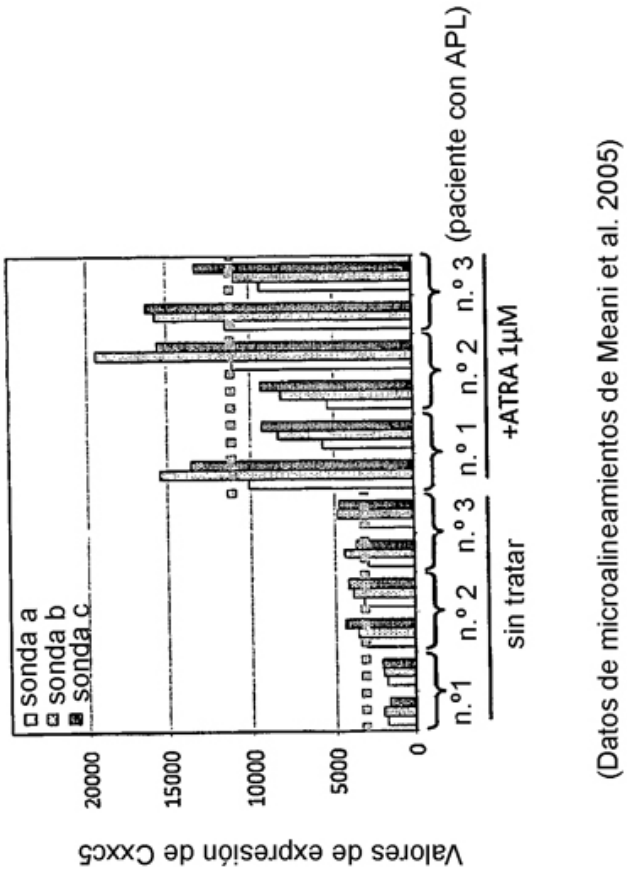

NB4
NB4-LR1
NB4-LR2
0h
2h
4h
24h
0h
2h
4h
24h
0h
2h
4h
24h
ATRA (1µM)
33 KDa
45 KDa
Anti-RINF
Anti-Actina

Figura 7



(Datos de microalineamientos de Meani et al. 2005)

Figura 8

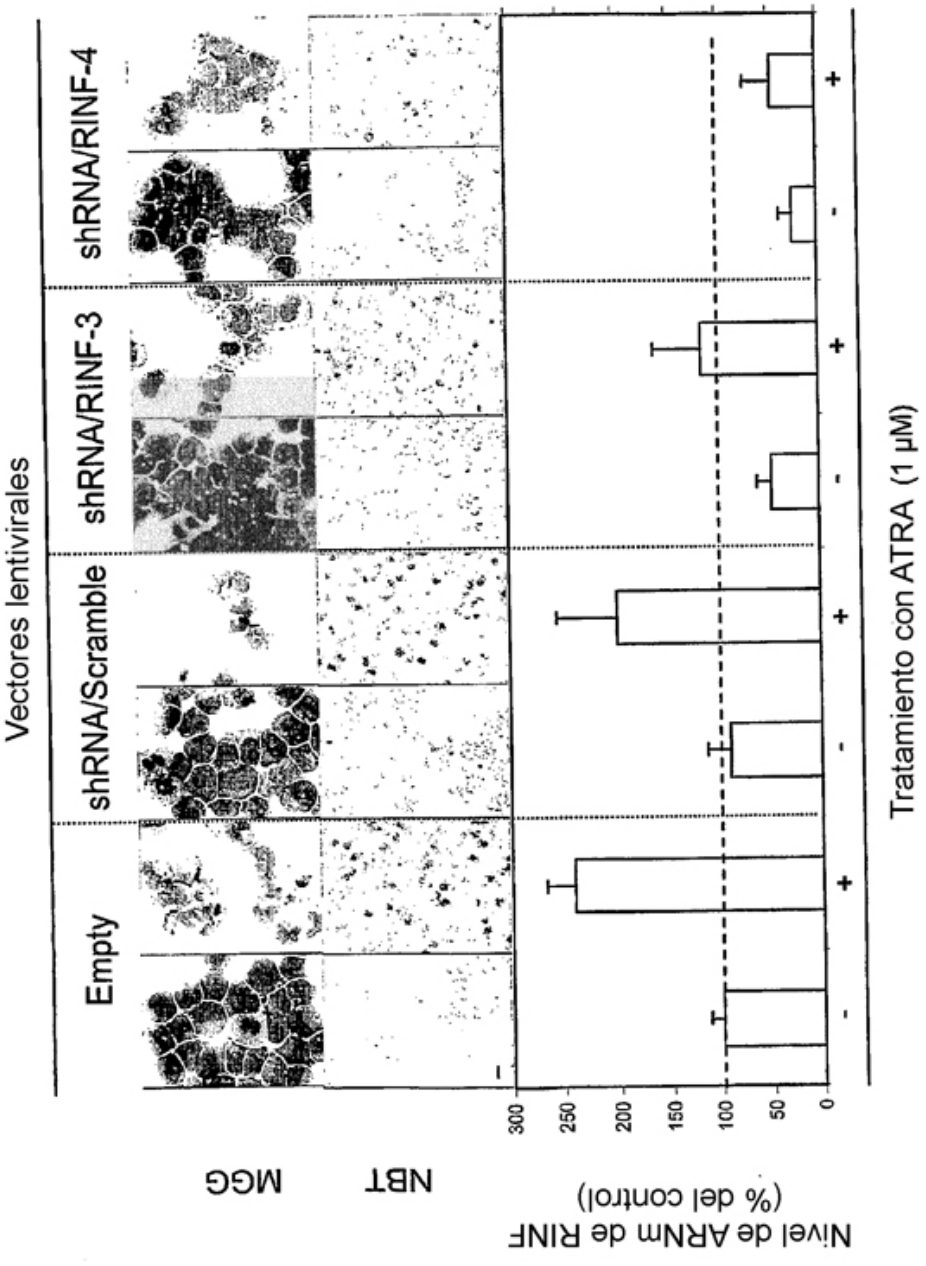

Vectores lentivirales
Empty
shRNA/Scramble
shRNA/RINF-3
shRNA/RINF-4
MGG
NBT
Nivel de ARNm de RINF
(% del control)
300
250
200
150
100
50
0
Tratamiento con ATRA (1 µM)
-
+
-
+
-
+
-
+

Figura 9

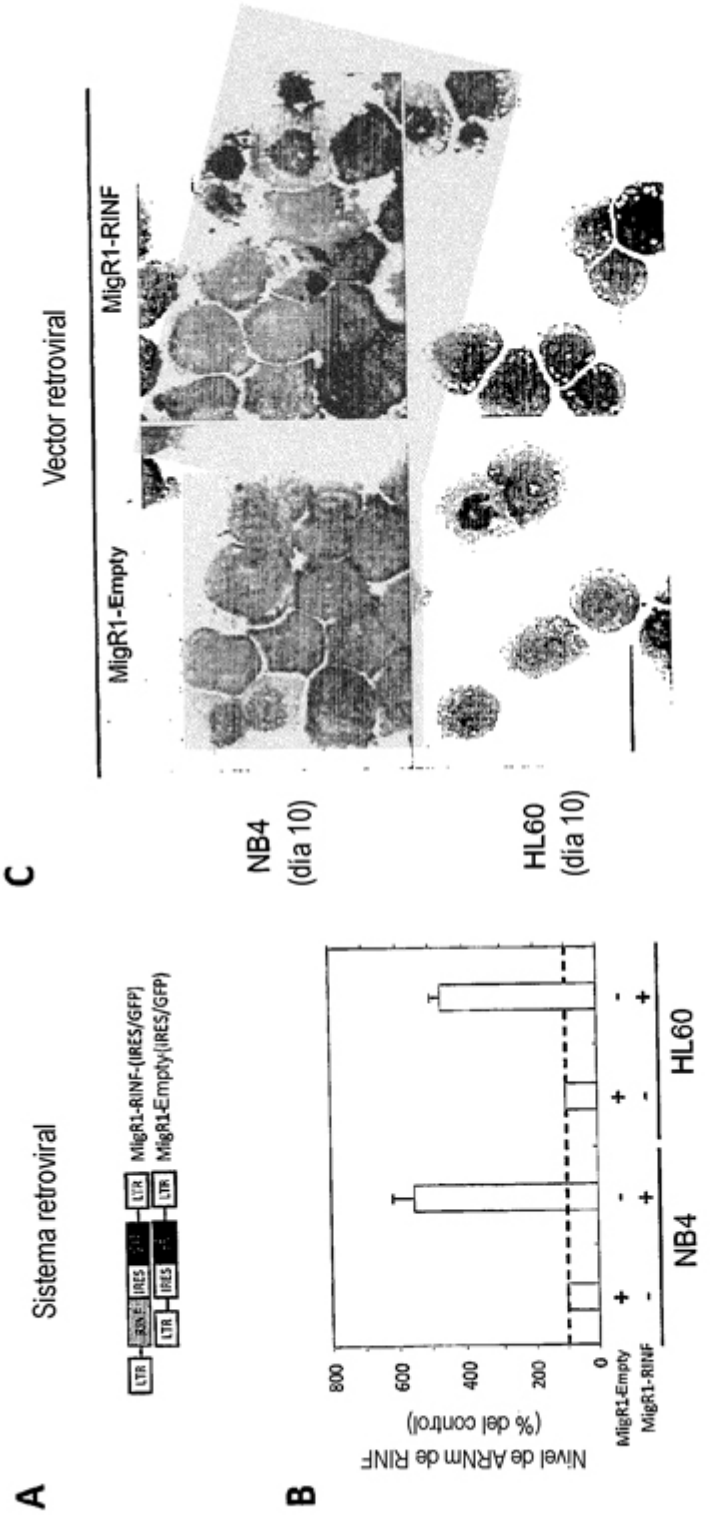
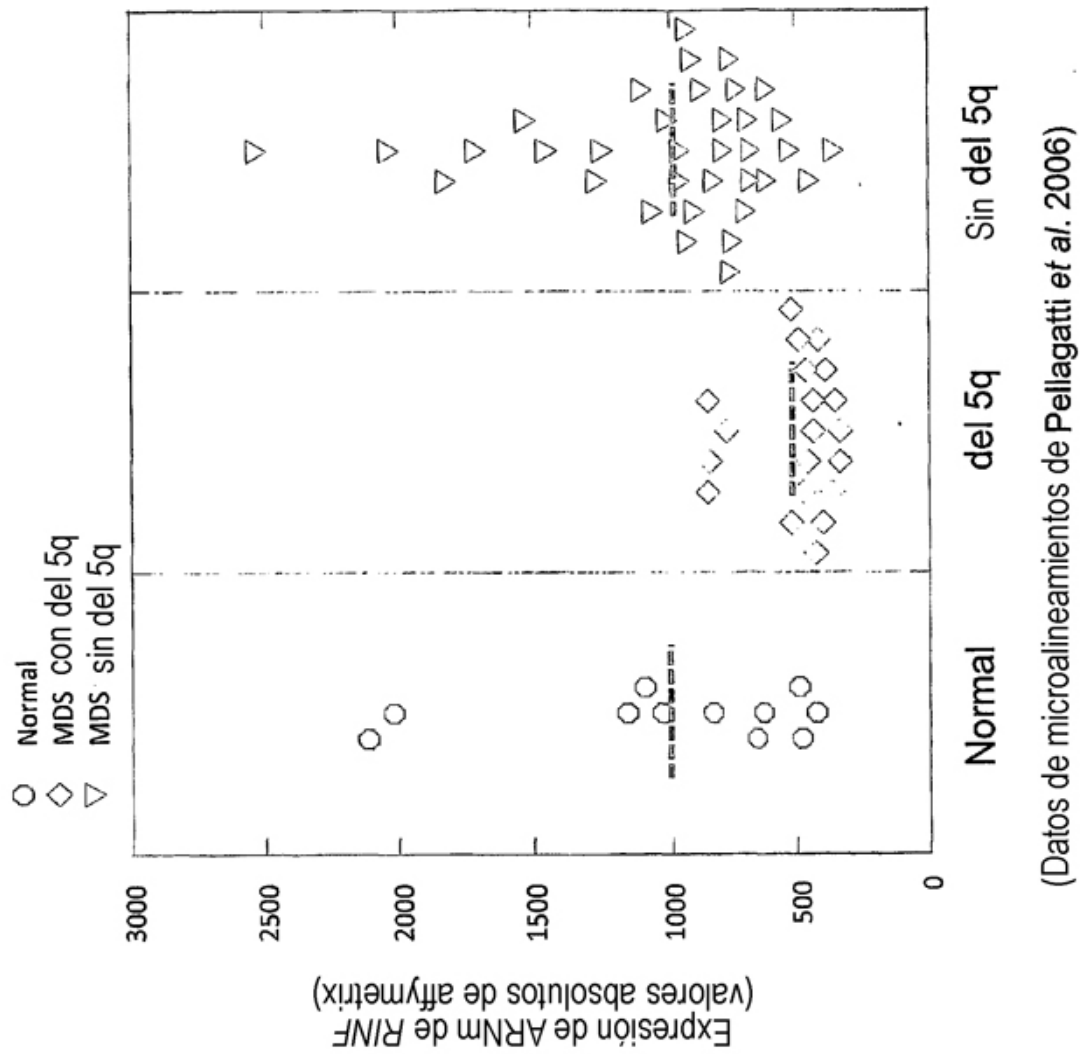

A
Sistema retroviral
LTR
IRES
LTR
MigR1-RINF-(IRES/GFP)
MigR1-Empty-(IRES/GFP)
B
Nivel de ARNm de RINF
(% del control)
800
600
400
200
0
MigR1-Empty
MigR1-RINF
NB4
HL60
C
Vector retroviral
MigR1-Empty
MigR1-RINF
NB4
(dia 10)
HL60
(dia 10)

Figura 10



(Datos de microalineamientos de Pellagatti *et al.* 2006)

Figura 11

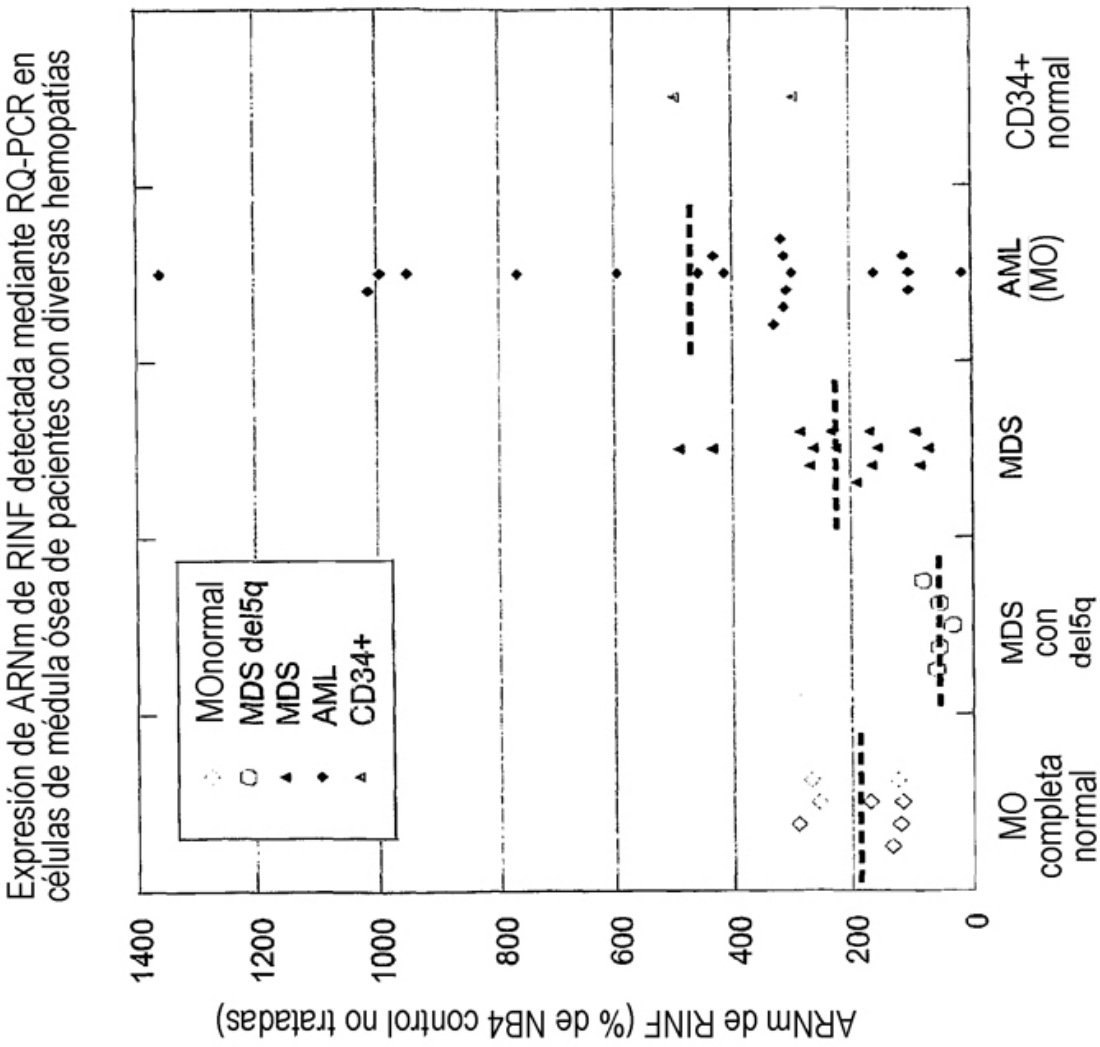

Expresión de ARNm de RINF detectada mediante RQ-PCR en células de médula ósea de pacientes con diversas hemopatías
ARNm de RINF (% de NB4 control no tratadas)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MOnormal
MDS del5q
MDS
AML
CD34+
MO completa normal
MDS con del5q
MDS
AML (MO)
CD34+ normal

Figura 12

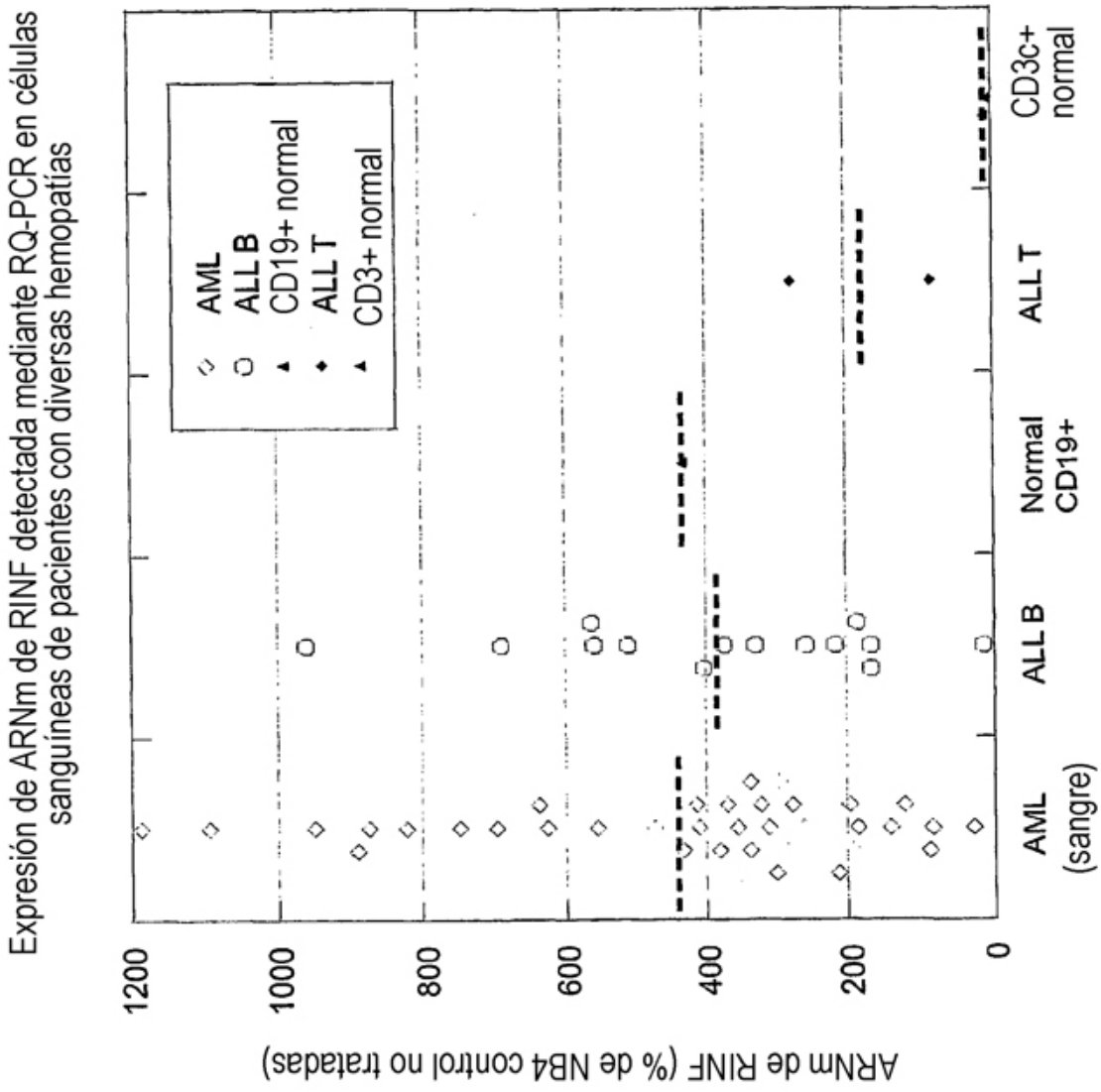

Expresión de ARNm de RINF detectada mediante RQ-PCR en células sanguíneas de pacientes con diversas hemopatías
ARNm de RINF (% de NB4 control no tratadas)
1200
1000
800
600
400
200
0
AML
ALL B
CD19+ normal
ALL T
CD3+ normal
AML (sangre)
ALL B
Normal CD19+
ALL T
CD3c+ normal

Figura 13

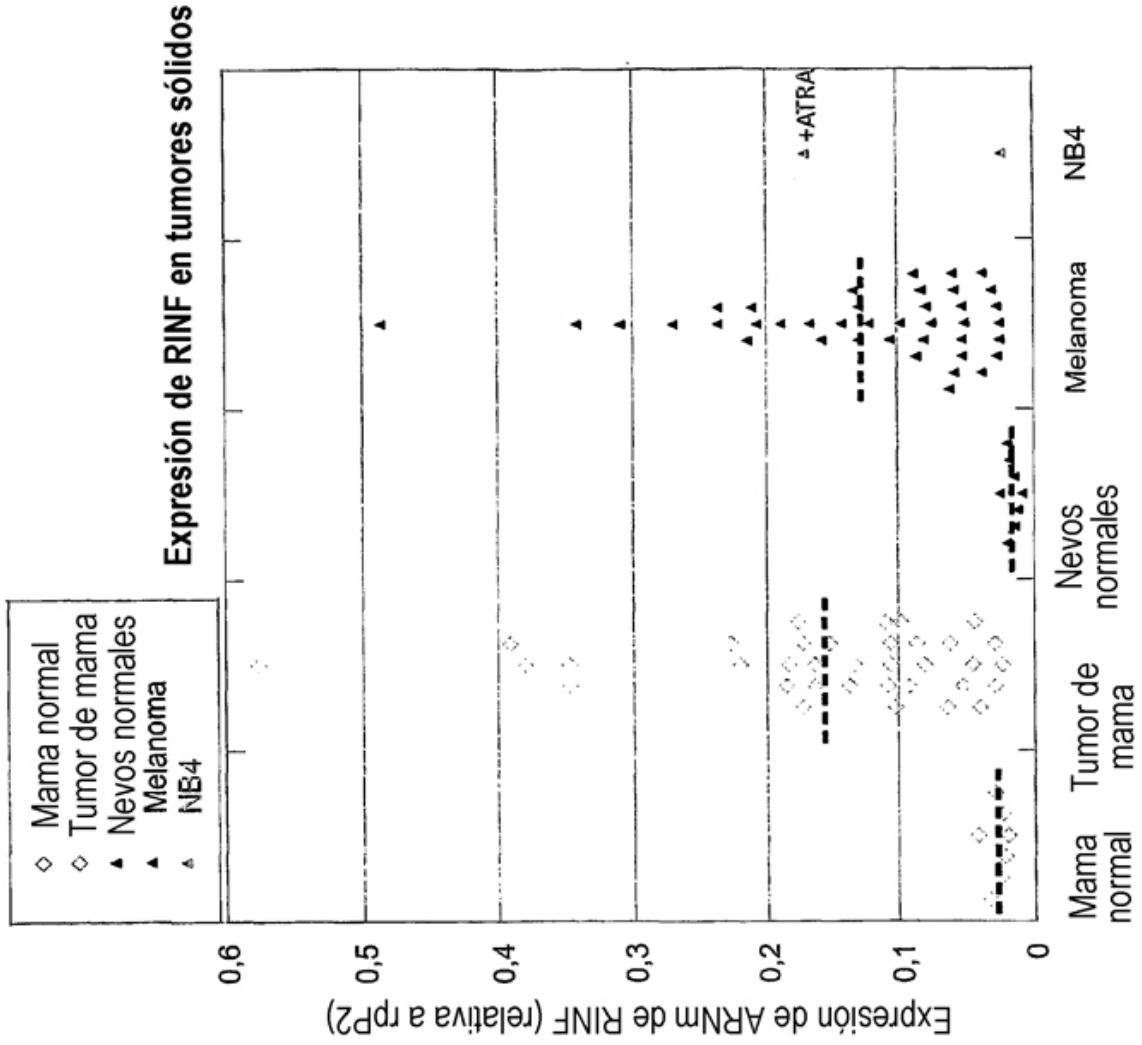

Expresión de RINF en tumores sólidos
Mama normal
Tumor de mama
Nevos normales
Melanoma
NB4
+ATRA
Expresión de ARNm de RINF (relativa a rpP2)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Mama normal
Tumor de mama
Nevos normales
Melanoma
NB4

Figura 14

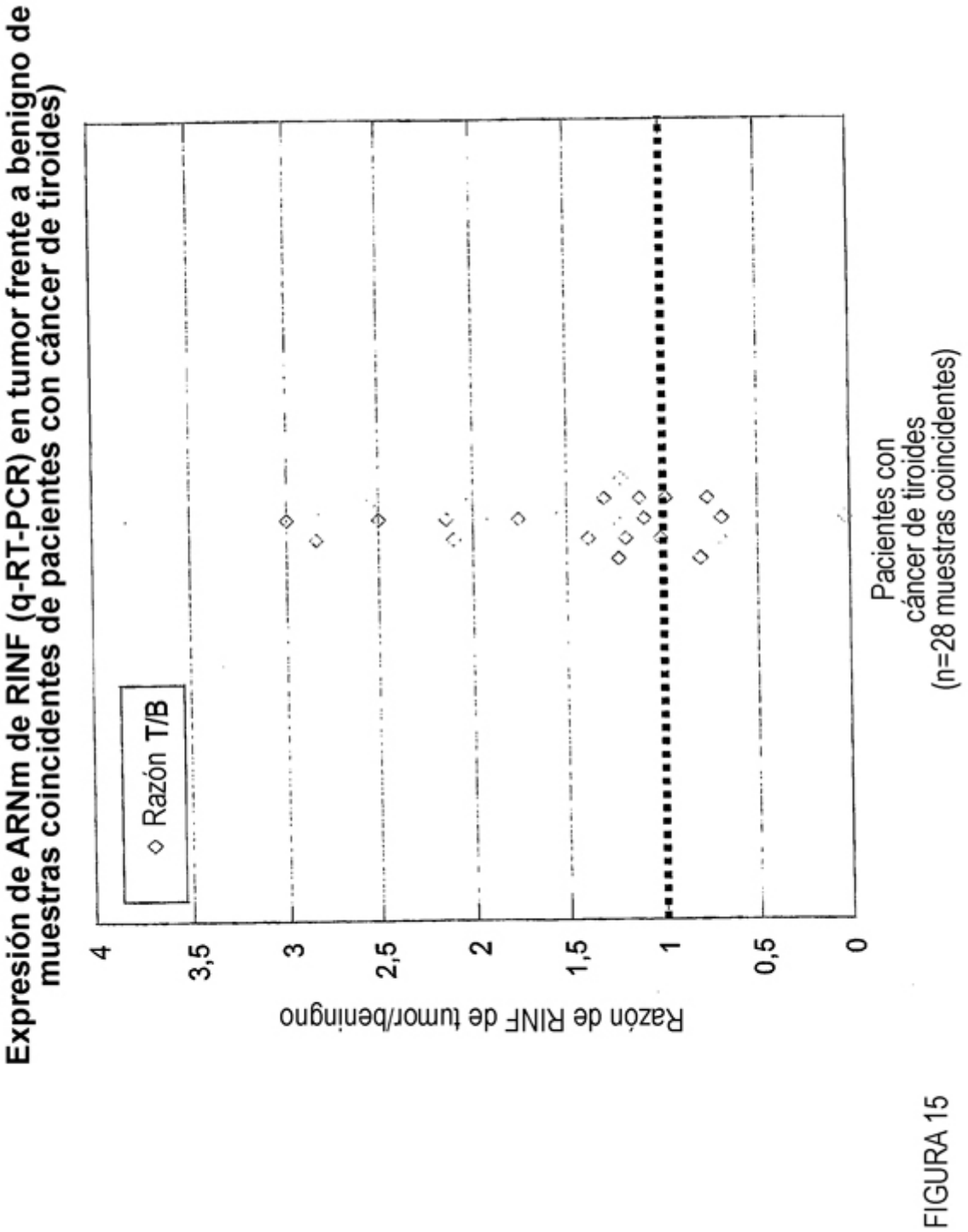

Expresión de ARNm de RINF (q-RT-PCR) en tumor frente a benigno de muestras coincidentes de pacientes con cáncer de tiroides)
◇ Razón T/B
Razón de RINF de tumor/benigno
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Pacientes con cáncer de tiroides (n=28 muestras coincidentes)

FIGURA 15