



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 213 429**

② Número de solicitud: 200102306

⑤ Int. Cl. 7: **A61K 31/7088**
A61K 38/17

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **19.10.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.08.2004

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Salamanca (O.T.R.I.)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑦ Inventor/es: **Sánchez García, Isidro y
Pérez Losada, Jesús**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Empleo del gen Slug como marcador genético de funciones mediadas por SCF (stem cell factor) y aplicaciones.**

⑦ Resumen:

Empleo del gen Slug como marcador genético de funciones mediadas por SCF (stem cell factor) y aplicaciones. El gen Slug media las funciones del ligando SCF y su receptor c-kit, por lo que puede ser utilizado tanto el gen Slug, el ADNc de dicho gen, la proteína Slug como drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, como agente terapéutico en la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, en la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, y/o en el tratamiento de problemas de esterilidad masculina.

ES 2 213 429 A1

DESCRIPCIÓN

Empleo del gen slug como marcador genético de funciones mediadas por scf (stem cell factor) y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con el empleo del gen Slug como marcador genético de funciones mediadas por SCF (stem cell factor) y como agente terapéutico, tanto del gen Slug, el ADNc de dicho gen, la proteína Slug como de drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, en la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, en la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, y/o en el tratamiento de problemas de esterilidad masculina.

Antecedentes de la invención

15 La hematopoyesis es un proceso que produce la reposición tanto de las células progenitoras hematopoyéticas como de las células sanguíneas maduras a partir de una reserva de células stem pluripotentes. La producción diaria de células sanguíneas en un adulto normal está regulada con precisión, implicando en parte, una interacción compleja entre citocinas estimulantes e inhibitoras, solubles y unidas a membrana, y sus correspondientes receptores. La donación molecular de estos factores de crecimiento hematopoyéticos y de sus receptores ha constituido un instrumento eficaz para trazar las rutas que conducen desde una única célula stem hematopoyética hasta diversas células terminalmente diferenciadas en el sistema hematopoyético.

Aunque numerosas citocinas tienen efectos sobre las células progenitoras y stem, *in vivo* o *in vitro*, una citocina descubierta a principios de los 90, identificada como c-kit, parece tener actividades únicas y no redundantes sobre células primitivas/progenitoras (Witte, 1990, Cell, 63:5-6). Las funciones *in vivo* de c-kit se entienden bien debido a la existencia de ratones mutantes en los que el código genético del receptor (c-kit) y/o de su respectivo ligando (SCF) son defectuosos. Las mutaciones en el receptor c-kit y en su ligando (SCF) están bien representadas por la existencia de numerosos alelos mutantes con manchas blancas (W) y Steel (S1), respectivamente.

30 Los ratones aquejados de mutaciones en el *locus* W fueron originalmente identificados por la presencia de manchas blancas sobre ratones pigmentados (Silvers, 1979, "Dominant spotting, patch, and rump-white", en Silvers WK (eds): The coat colors of mice: a model for mammalian gene action and interaction. New York, NY, Springer-Verlag, p 206). El examen detallado de los ratones puso de manifiesto que la mutación era pleiotrópica. Los ratones W sufrían también defectos en el desarrollo de las células germinales y en la hematopoyesis (caracterizada por anemia macrocítica). Posteriormente, se demostró que el *locus* W codificaba un receptor de tirosina kinasa conocido como c-kit (Nature, 1988, 335:88; Cell, 1988, 55:185).

40 Antes del descubrimiento del *locus* W, se identificó una mutación (S1) en ratones que tenían un fenotipo prácticamente idéntico al de los ratones W (Sarvella y Russell, 1956, J. Hered. 47:123). Puesto que las mutaciones en dos cromosomas diferentes tenían el mismo fenotipo complejo, que afectaba a la pigmentación, a las células germinales y a la hematopoyesis, se planteó la hipótesis de que debería existir alguna relación entre las proteínas codificadas en esos dos *loci*. En 1990, la proteína codificada en el *locus* S1 fue identificada y denominada como factor de crecimiento de mastocitos, factor de células stem (SCF), y ligando de c-kit (Cell, 1990, 63:203; Cell, 1990, 63:167; Cell, 1990, 63:175; Cell, 1990, 63:213).

45 Aunque la función primaria del SCF en la hematopoyesis temprana podría ser la de inducir el crecimiento de las células progenitoras/stem inactivas a través de interacciones sinérgicas con otras citocinas de actuación temprana, también hay una amplia evidencia de que SCF, en ausencia de otras citocinas, estimula de forma selectiva la viabilidad antes que la proliferación de células progenitoras murinas. Aunque la ruta migratoria SCF/c-kit y el desarrollo están bien documentados, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares que proporcionan especificidad biológica a la ruta de señalización SCF/c-kit en la formación y migración de las diversas células desde la médula ósea.

55 Los acontecimientos biológicos controlados por la ruta de señalización SCF/c-kit recuerdan a aquéllos que tienen lugar en las transiciones epiteliales-mesenquimales (EMT) en el desarrollo de mamíferos. De hecho, el proceso de formación del mesodermo implica la adquisición de propiedades migratorias y la determinación del destino de las células. Estas EMT están controladas por una familia conservada de proteínas del tipo "dedos de zinc", la familia Snail, de hecho, el gen Snail de *Drosophila* es vital para la formación del mesodermo y el destino de la migración celular. Los genes murinos relacionados (Snail y Slug) han sido presentados también como participantes en la formación del mesodermo y la migración celular.

60 El empleo de SCF en la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, y/o en la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas posee importantes efectos secundarios y se ha visto limitado por sus propiedades activantes de mastocitos.

65 Ahora se ha descubierto que la ruta de señalización SCF/c-kit induce específicamente a la expresión de un miembro de la familia génica Snail, el gen Slug, tanto en células c-kit⁺ naturales como en células creadas artificialmente.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de encontrar un método alternativo para la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, y/o en la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, que carezca de los inconvenientes previamente mencionados en relación con el empleo de SCF.

La solución proporcionada por esta invención se basa en la identificación del gen *Slug* como responsable de las funciones del receptor *c-kit* y de su ligando SCF. Efectivamente, ahora se ha descubierto que la ruta de señalización SCF/*c-kit* induce específicamente a la expresión del gen *Slug*, un miembro de la familia génica *Snail*, tanto en células *c-kit*⁺ naturales como en las células creadas artificialmente. Como consecuencia de la identificación del gen *Slug* como el gen que media las funciones del ligando SCF y su receptor *c-kit*, dicho gen *Slug* puede reemplazar al SCF en sus funciones y aplicaciones con la salvedad de que carece de los efectos secundarios de SCF derivados de la activación de mastocitos.

Por tanto, a la vista de las aplicaciones de SCF, un objeto de esta invención lo constituye el empleo del gen *Slug*, el ADNc de dicho gen, la proteína *Slug* o sustancias que activen la expresión del gen *Slug*, en la elaboración de una composición farmacéutica para la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo del gen *Slug* en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de problemas de esterilidad masculina.

La composición farmacéutica que comprende el gen *Slug*, el ADNc de dicho gen, la proteína *Slug* o sustancias que activen la expresión del gen *Slug* constituye un objeto adicional de esta invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el hecho de que la activación del receptor *c-kit* por SCF específicamente induce la expresión de *Slug*. La expresión de *Slug* y *Snail* fue analizada por RT-PCR en células LAMA 84 (paneles A y B) y en células Ba/F3 diseñadas para poder expresar *c-kit* (paneles C y D) en ausencia y en presencia de SCF. Los productos de la PCR fueron transferidos a una membrana de nylon y analizados por hibridación con sondas de oligonucleótidos internos, marcadas en los extremos, específicas para cada gen (se usó β -actina para verificar la integridad y carga de cDNA).

La Figura 2 muestra los defectos en la pigmentación v en los testículos de ratones *Slug*-deficientes. La Figura 2A es una fotografía de un ratón mutante homocigótico para *Slug* con la característica marca de una guía blanca en la frente. La Figura 2B muestra los resultados del análisis histológico de los testículos de ratones tipo salvaje y ratones con la mutación *Slug*. Las secciones emparejadas de testículos de ratones tipo salvaje de 6 semanas (*Slug* +/+), ratones heterocigóticos (*Slug* +/-), ratones homocigóticos *Slug* (-/-), ratones mutantes Steel (*S1/S1*) y ratones mutantes W (*W/W^v*) fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Existe una reducción generalizada en el tamaño de los canalículos seminíferos en ratones *Slug* -/-, una característica que también puede verificarse en ratones *Slug* +/- (*Slug* +/- centro frente a *Slug* +/- derecha). En el espacio intersticial de ratones *Slug* -/- existe una cantidad reducida de células de Leydig. Por el contrario, el espacio intersticial en los testículos de los ratones *W/W^v* y *S1/S1* se incrementa de forma desproporcional y se rellena de células de Leydig.

La Figura 3 muestra los defectos de desarrollo de eritroides en ratones *Slug*-deficientes. La Figura 3A muestra el resultado del examen histológico de los bazo de ratones no preñados frente a los bazo de ratones control preñados de 12 días (*Slug* +/+), ratones *Slug* heterocigóticos (*Slug* +/-) y ratones *Slug* homocigóticos (*Slug* -/-). La tinción con H&E evidenció, durante la gestación, un incremento enorme en la pulpa roja del bazo de ratones *Slug* +/+, en los cuales la pulpa blanca del bazo, marcada con flechas blancas, estaba muy reducida. El aumento de pulpa roja del bazo era mucho menos evidente en los ratones *Slug* +/- y -/-. La Figura 3B muestra el resultado del análisis representativo de las células *c-kit*⁺ presentes en la médula ósea (BM) y en el bazo de ratones después de la inducción de anemia hemolítica con fenilhidrazina. Las células aisladas de un ratón control tipo salvaje (*Slug* +/+), un ratón mutante heterocigótico (*Slug* +/-), un ratón mutante homocigótico (*Slug* -/-), un ratón mutante Steel (*S1/S1^d*) y un ratón mutante W (*W/W^v*) fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal PE-CD 117 y analizadas por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células *c-kit*⁺.

La Figura 4 ilustra el desarrollo deficitario de células T y la apoptosis en el timo de ratones *Slug*-deficientes. Se realizó un examen histológico en secciones del timo de ratones, de 4 semanas, mutantes Steel (*S1/S1^d*), mutantes W (*W/W^v*), tipo salvaje (control) y ratones mutantes homocigóticos (ratones *Slug* -/-). Todas las secciones fueron teñidas con H&E. Las secciones emparejadas de ratones *Slug* -/- fueron sometidas a verificación DAPI o de TUNEL. El aumento de apoptosis en animales *Slug*-deficientes se correlacionaba con atrofia del timo. A la izquierda se muestra un análisis representativo de las células presentes en el timo de estos ratones. Células aisladas de un ratón tipo salvaje (control), un ratón mutante heterocigótico (*Slug* +/-), un ratón mutante homocigótico (*Slug* -/-), un ratón mutante Steel (*S1/S1*) y un ratón mutante W (*W/W^v*) se tiñeron con anticuerpos monoclonales v se analizaron por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células.

La Figura 5 ilustra el desarrollo de células B, mieloides y mastocitos en ratones Slug-mutantes. Se muestran los resultados del análisis representativo de las células B y mieloides presentes en el bazo (Figura 5A) y en la médula ósea (BM) (Figura 5B), respectivamente. Células aisladas de un ratón tipo salvaje (control), un ratón mutante heterocigótico (Slug +/-), un ratón mutante homocigótico (Slug -/-), un ratón mutante Steel (S1/S1) y un ratón mutante W (W/W^v) fueron teñidas con los anticuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células. En la Figura 5C se muestran los resultados del examen histológico realizado en secciones de oreja de ratones de 4 semanas del tipo mutante homocigótico (Slug -/-) y mutante W (c-kit -/-). Todas las secciones fueron teñidas con Giemsa. Las flechas indican la presencia de mastocitos en ratones Slug-mutantes -/- pero no en ratones mutantes W.

La Figura 6 muestra que el defecto en ratones Slug-mutantes es intrínseco a la célula stem. La Figura 6A muestra el resultado de inmunoprecipitaciones de kit a partir de mastocitos aislados sondeados para kit y re-sondeados para fosfotirosina. Slug +/-: ratones heterocigóticos, Slug -/-: ratones homocigóticos, Slug +/+, ratones tipo salvaje. La Figura 6B muestra el resultado del análisis del sistema hematopoyético en ratones receptores normales reconstituido con Slug -/- HSC por FACS. Las muestras de médula, bazo y timo fueron teñidas con los anti-cuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo. La composición hematopoyética es similar a la de ratones Slug -/-. A la izquierda se ve una representación de las células c-kit presentes en la médula ósea (BM) y en el bazo de ratones receptores normales reconstituidos con Slug -/- HSC después de inducción de anemia hemolítica con fenilhidrazina.

La Figura 7 ilustra la ruta de señalización de SCF/c-kit en el desarrollo. La Figura 7A muestra las células c-kit⁺ presentes en la médula ósea (BM) y en el bazo de ratones tipo salvaje (control), ratones mutantes Steel (S1/S1^d) y ratones mutantes W (W/W^v) después de la inducción de anemia hemolítica con fenilhidrazina. Para la separación y clasificación de las células, éstas se incubaron con células c-kit-PE y las células c-kit⁺ fueron clasificadas por activación fluorescente (FACS) (FACStar, Becton Dickinson). Las células clasificadas fueron nuevamente analizadas para determinar su grado de pureza con el citómetro, obteniéndose un grado de pureza $\geq 95\%$. La Figura 7B muestra el resultado de la expresión de Slug, analizada por RT-PCR, en las células c-kit⁺ purificadas de médula ósea y de bazo de ratones control, S1/S1 y W/W^v. Los productos de la PCR fueron transferidos a una membrana de nylon y analizados por hibridación con una sonda de oligonucleótidos interna, marcada en el extremo, específica para el gen Slug (panel superior). Se utilizó β -actina para verificar la integridad y la carga del cDNA (panel inferior). La Figura 7C es un esquema ilustrativo del modelo de la función de ruta de señalización SCF/ c-kit en el desarrollo. La ruta de señalización SCF/c-kit afecta al desarrollo de tres poblaciones de células: melanoblastos, células stem hematopoyéticas y células germinales. Los datos mostrados indican que Slug media las funciones del receptor c-kit y de su ligando en melanoblastos y en células hematopoyéticas. Dentro de las células germinales, la función SCF/c-kit está mediada tanto por Slug como por PI3-quinasa.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere, en general, al empleo del gen Slug como marcador genético de funciones mediadas por SCF y como agente terapéutico del gen Slug, el ADN complementario (ADNc) al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen Slug (en adelante, ADNc de dicho gen Slug), el producto de expresión y traducción del gen Slug (en adelante, proteína Slug) y drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, en la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, en la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, y/o en el tratamiento de problemas de esterilidad masculina.

El gen Slug es un gen presente en los vertebrados que codifica un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” implicado en las transiciones epiteliales-mesenquimales (Nieto et al., Science 264:835-849 (1994)). Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que el gen Slug es el responsable de las funciones del receptor c-kit y de su ligando SCF y, consecuentemente, dicho gen Slug, así como el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug y drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, pueden utilizarse en las mismas aplicaciones que SCF con la salvedad de que carecen de los efectos secundarios de SCF derivados de la activación de mastocitos.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares que proporcionan especificidad biológica a la ruta de señalización SCF/c-kit en la formación y migración de las diversas células desde la médula ósea, se ha investigado la relación entre la ruta de señalización SCF/c-kit y la familia de proteínas Snail, descubriéndose, sorprendentemente, que la ruta de señalización SCF/c-kit induce específicamente a la expresión del gen Slug, tanto en células c-kit⁺ naturales como en células creadas artificialmente. El análisis de una mutación nula dirigida que eliminaba todas las secuencias codificantes de Slug reveló que los ratones Slug-mutantes, así como los ratones c-kit y SCF defectivos, tienen un fenotipo complejo que incluye defectos de pigmentación, gonadales y hematopoyéticos.

En el sentido utilizado en esta descripción el término “ratones Slug-mutantes” se refiere a ratones con un fenotipo distinto del original (tipo salvaje, Slug +/+) debido a una mutación en el gen Slug, e incluye tanto a ratones mutantes heterocigóticos (Slug +/-) como a ratones mutantes homocigóticos (Slug -/-).

Los experimentos de trasplantes a largo plazo demostraron que el efecto en ratones Slug-mutantes, en los cuales las células c-kit⁺ de ratones Slug -/- tienen una ruta de señalización SCF/c-kit funcional, presentaban defectos migratorios similares a los de las células c-kit⁺ en ratones S1/S1 y W/W^v, y es intrínseco a la célula. Ya que las mutaciones en el SCF, en el receptor c-kit y en el gen Slug tienen un fenotipo pleyotrópico similar que afecta a la pigmentación, a las células germinales, y a la hematopoyesis, se estableció la hipótesis de que habría alguna relación entre ellos. De hecho, dos datos diferentes demostraban la relación: en primer lugar, las células primarias c-kit⁺ purificadas a partir

de los ratones de control expresan Slug; y en segundo lugar, el Slug no se expresa en las células c-kit⁺ primarias derivadas de ratones W/W^v y S1/S1. Estos dos resultados juntos identifican al gen Slug como el objetivo molecular que proporciona especificidad biológica a la ruta de señalización SCF/c-kit.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug y/o una o más drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug y la proteína Slug pueden obtenerse por técnicas convencionales de ingeniería genética [véase el Ejemplo 1]. Las drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug pueden obtenerse por técnicas convencionales que comprenden, por ejemplo, la preparación de construcciones de ADN que comprenden el gen Slug o el ADNc de dicho gen Slug y un gen delator que cuando se pone en contacto con la droga o sustancia a ensayar permite determinar si dicha droga o sustancia activa la expresión del gen Slug. A modo ilustrativo, dicho gen delator puede ser el gen que codifica para una proteína para la que se dispone de anticuerpos específicos, o una proteína con actividad enzimática, por ejemplo, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, GFP, etc., detectándose dicha actividad mediante la adición del sustrato o sistema de revelado correspondiente.

15 Los excipientes que pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otras cosas, de la forma de administración de dicha composición farmacéutica. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

20 Cuando la composición farmacéutica de la invención contiene el gen Slug o el ADNc de dicho gen Slug, la composición farmacéutica comprenderá unos vectores o sistemas que ayuden al proceso de transferencia de un gen exógeno a una célula, facilitando la entrega y biodisponibilidad intracelular del mismo de tal modo que éste pueda funcionar correctamente. A modo ilustrativo, dichos vectores pueden ser vectores virales, por ejemplo, basados en retrovirus, adenovirus, etc., o no virales tales como los complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)].

30 Como es conocido, tanto el trasplante de médula ósea como estrategias de terapia génica usan como células diana las células stem hematopoyéticas. El número de células stem hematopoyéticas en sangre periférica es limitado por lo que se necesita movilizar células stem hematopoyéticas de la médula ósea a la sangre periférica con diferentes fines, tales como trasplante de médula ósea, terapia génica, manipulación *ex vivo* de las células stem hematopoyéticas, etc. Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que el gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug pueden efectuar dicha movilización de células stem hematopoyéticas.

35 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al empleo del gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug en la elaboración de una composición farmacéutica para la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica. La movilización de dichas células stem hematopoyéticas se realiza en el receptor del trasplante o en el paciente sometido a terapia génica.

40 El gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug pueden permitir la supervivencia *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, lo que favorece su mantenimiento y manipulación.

45 Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un método para la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas que comprende el empleo del gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug. De forma más concreta, dicho método comprende la administración a un cultivo de células stem hematopoyéticas de una cantidad eficaz del gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, o de una composición que contiene dichos productos.

50 Por otra parte, como es conocido, la disminución de células de Leydig genera problemas de fertilidad, en particular, de esterilidad masculina. Ahora se ha observado, sorprendentemente, que el gen Slug favorece la migración y/o supervivencia de células de Leydig, por lo que la administración a un paciente masculino afectado de esterilidad, en necesidad de tratamiento, de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención que comprende el gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, puede solucionar determinados problemas de esterilidad masculina.

60 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, y/o drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de problemas de esterilidad masculina, en particular, para el tratamiento de la esterilidad masculina debida a una disminución de células de Leydig.

A continuación se ilustrará la invención mediante un ensayo que ilustra la inducción de la expresión de Slug por la activación del receptor c-kit por SCF.

65

Ejemplo 1

Inducción de la expresión de Slug por la activación del receptor c-kit por SCF

5 I. Materiales y Métodos

Cultivo celular

Las líneas de células utilizadas incluyen células LAMA-84 y Ba/F3. Las células se mantuvieron en un medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS). Cuando fue necesario, se añadió como fuente de interleucina 3 (IL-3) un medio condicionado WEHI-3B. Las células Ba/F3 que expresan el tipo salvaje de c-kit se obtuvieron como se indica a continuación. El plásmido PECE-kit, que contiene la secuencia codificante completa del cDNA de c-kit de ratón (donado por el Dr. D. Martín-Zanca), se utilizó para transfectar la línea de células pro-B IL-3-dependiente. La co-transfección con un plásmido resistente a la neomicina (MCI-neo) y la selección primaria con el análogo de neomicina G418 generó una línea celular estable Ba/F3 que expresa c-kit (Ba/F3+c-kit). Las poblaciones de células Ba/F3 se tiñeron anticuerpo monoclonal CD117 específico de c-kit.

Ratones

Los animales se enjaularon en condiciones no estériles en una instalación animal convencional. Los ratones heterocigóticos y homocigóticos para la mutación Slugh^{Δ1} generados por supresión de las secuencias genómicas de toda la región codificante de la proteína Slugh (ratones mutantes Slugh^{Δ1}) han sido descritos previamente (Jiang et al., 1998, *Developmental Biology* 198:277-285). Los ratones W/W^v y S1/S1 y las parejas de cría se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). En los ratones experimentales, se inyectó intraperitonealmente fenilhidracina (PHZ; 60 mg/kg de peso corporal; Sigma Chem) durante dos días consecutivos (Broudy et al., 1996, *Blood* 88:75-81). En cada uno de los tres días posteriores a la segunda inyección de PHZ, 5 ratones murieron por dislocación cervical, y se retiraron los huesos y los bazo (bajo condiciones de esterilidad) para análisis posterior más profundo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité institucional de cuidado animal.

30 *Análisis fenotípico de las células*

La morfología celular se analizó de acuerdo a los criterios estándar. Las suspensiones unicelulares se prepararon a partir de tejidos individuales, incluyendo médula ósea, bazo, timo y sangre periférica por procedimientos estándar (García-Hernández et al., 1997, PNAS). Para la mayoría de las funciones se utilizaron aproximadamente 1×10^6 células. Los fenotipos de las células se inmunizaron con los anticuerpos siguientes: ficoeritrina conjugada (PE)-TER1 19 [Ly-76, un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno expresado en células eritroides desde los eritroblastos hasta los eritrocitos]: PE-CD4, PE-Gr-1, PE-CD117; PE-CD19: PE-B220, fluoresceína conjugada (FITC)-CD8, FITC-IgM, FITC-Mac1 (todos de Pharmingen). Células, suspendidas en una disolución salina tampón de fosfato (PBS), sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ con un aporte de suero bovino fetal al 1% (v/v), se marcaron con cada anticuerpo (aproximadamente $1 \mu\text{g}/10^6$ células) durante 30 minutos en hielo. La fluorescencia celular se analizó con el flujo citométrico FACScan (Becton Dickison). Las células incubadas con controles isotópicos adecuadamente marcadas (Pharmingen) se utilizaron para evitar la salida de señales de fluorescencia no específicas. Antes del análisis, las células rojas maduras se redujeron mediante rotura hipotónica (cloruro amónico al 0,38% durante 15 minutos en hielo). Los controles de fondo se trataron de manera idéntica, con la excepción de que los anticuerpos primarios se omitieron. Inicialmente, las células fueron analizadas por tamaño y por dispersión para identificar las células vivas. En algunos experimentos, la viabilidad celular se valoró por exclusión con yoduro de propidio (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) (en citometría de flujo).

Purificación celular

Las suspensiones mononucleares del bazo se prepararon cortando los bazos en pequeños fragmentos en 5 ml de disolución PBS, sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, conteniendo 10% de FBS (v/v) y pasando la suspensión celular a través de agujas progresivamente más pequeñas. Las células de la médula ósea se retiraron de los fémures con una jeringuilla conteniendo 2 ml de PBS con 10% de FBS. Las células mononucleares de baja densidad de la médula y del bazo se aislaron someténdolas a centrifugación sobre Ficoll-Paque (P = 1,077 g/ml) a 800 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para la clasificación de las células, éstas se incubaron con c-kit-PE y las células c-kit⁺ se clasificaron mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) (FACstar; Becton Dickinson). Las células clasificadas se volvieron a analizar con el citómetro para determinar la pureza.

Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa PCR (RT-PCR)

Para analizar la expresión de Slug y Snail en las líneas celulares y en las células c-kit⁺ purificadas se realizó una RT, según el protocolo del fabricante en un volumen de reacción de 20 μl conteniendo 50 ng de hexámeros aleatorios, 3 μg de RNA total, y 200 unidades de transcriptasa inversa Superscript II Rnasa H (GIBCO/BRL). Los parámetros del termociclado para las reacciones PCR y las secuencias de los iniciadores específicos fueron las siguientes: mSlug, 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos, iniciador directo (sentido): 5'-GCCTCCAAAAGCCAACTA-3' (SEC. ID. N°: 1) e iniciador inverso (antisentido): 5'-CAGTGATGGGGCTGTATG-3' (SEC. ID. N°: 2); mSnail, 30 ciclos a 95°C durante 2 minutos, 60°C durante 2 minutos, y 72°C durante 2 minutos, iniciador directo (sentido): 5'-CAGCTGGCCAGGCTCTCGGT-3' (SEC. ID. N°:

ES 2 213 429 A1

3) e iniciador inverso (antisentido): 5'-GCGAGGGCCTCCGGAGCA-3' (SEC. ID. N°: 4). La amplificación del mRNA de β -actina sirvió como control para valorar la calidad de cada muestra de RNA. Las secuencias de las sondas internas fueron las siguientes: mSlug, 5'-GACACACATACAGTGATTATTTCC-3' (SEC. ID. N°: 5) y mSnail, 5'-TGCAACCGTGTTTTGCTGACCGCTCCAAC-3' (SEC. ID. N°: 6).

5

Transplante de médula ósea (BMT) y toma de muestras

Los ratones receptores hembras C57 BL/6J (de 8-12 semanas de edad) se irradiaron con dos dosis divididas de 600 cGy separadas por dos horas. Esta dosis es suficiente para eliminar completamente la hematopoyesis endógena. Se inyectaron células de BM en la vena de la cola de los ratones irradiados a $2-4 \times 10^6$ células por ratón para una reconstrucción a largo plazo. Todos los receptores se mantuvieron en jaulas microaislantes con alimento esterilizado y agua estéril acidificada. Los animales se sacrificaron y los tejidos hematopoyéticos se recogieron para realizar análisis FACS.

Ensayos de colonias hematopoyéticas

Las células de médula ósea ($0,25-1,0 \times 10^5$ células/placa) y las células del bazo (10^4-10^5 células por placa) aisladas de los ratones normales y Slug-mutantes se sembraron en placas de cultivo semisólidas exentas de FBS (Stem Cell Technology). El crecimiento de la colonia se estimuló con las siguientes combinaciones de factores de crecimiento recombinante: factor de célula stem de rata (100 ng/ml; SIGMA), IL-3 de ratón (10 ng/ml, SIGMA), y eritropoyetina humana (hEPO) (2 U/ml; ROCHE) para el crecimiento de la unidad formadora de ramificación de eritroide (BFU-E). El crecimiento de las colonias derivadas de la unidad formadora de colonias de eritroide (CFU-E) se estimuló únicamente con EPO (2 U/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO₂ en el aire y se observaron los resultados a 3 días (para colonias derivadas de CFU-E) o a los 7 días (para colonias derivadas de BFU-E) después de la iniciación del cultivo. La frecuencia de BFU-E y de CFU-E se determinó en los cultivos por triplicado.

25

Aislamiento de los mastocitos primarios derivados de la médula ósea, inmunoprecipitación y western-blotting

Las células de médula ósea se recogieron por irrigación de la cavidad de la médula del fémur, y los mastocitos se derivaron por crecimiento selectivo en un medio que contenía IL-3 durante 6 semanas (Opti-Mem I, GIBCOBRL, 10% de suero bovino fetal, 0,5 ng/ml de IL-3 murina recombinante, R&D Systems Inc.). El medio se renovaba cada día y las células se transferían a nuevas placas para eliminar las células adheridas, incluyendo macrófagos y megacariocitos. Los ensayos de inmunoprecipitación y de western blotting se realizaron usando extractos de 1×10^7 mastocitos por banda. En resumen, se privó de alimento a las células durante 12 horas en medio Opti-Mem I sin IL-3 y que contenía sólo 0,5 % de suero, antes de estimularlas con 100 ng/ml de SCF murino (R&D Systems Inc.) durante 10 minutos a 37°C, como se ha indicado. Kit se detectó utilizando un anti-suero de cabra purificado por afinidad frente al extremo C-terminal del receptor kit murino, M-14 (Santa Cruz). El anticuerpo monoclonal 4G10 (UBI) se usó para detectar fosfotirosina.

40

Análisis histológico

Las muestras de tejidos se fijaron durante la noche en 10% de formalina, y a continuación se procesaron, se embebieron en parafina y secciones de 6 μ m se tiñeron con hematoxilina y eosina, se examinaron histológicamente y se fotografiaron. Todas las secciones se tomaron de porciones homogéneas y viables de los tejidos cortados. Los mastocitos se tiñeron con Giemsa. Se determinó el número de mastocitos por milímetro cuadrado.

Ensayo TUNEL

El marcaje del extremo de la mella terminal con dUTP-biotina mediado por desoxinucleotidiltransferasa (TUNEL) [del inglés "Terminal Deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin" Nick End Labeling] se realizó utilizando el kit de detección de célula muerta *in situ* (Boehringer Mannheim), siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante aunque con pequeñas modificaciones dependiendo del tipo de preparación. Brevemente, con posterioridad se fijaron secciones durante 15 minutos en paraformaldehído al 4%, se lavaron dos veces con PBS, y se incubaron en una mezcla 2:1 de etanol y ácido acético durante 5 minutos a -20°C. Después de dos lavados en PBS, las secciones se sometieron a digestión en proteinasa K (10 μ g/ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0 y EDTA 1 mM), se lavaron dos veces con PBS y se contracoloraron con verde de metilo.

55

II. Resultados

60

Inducción de la expresión de Slug por la activación del receptor c-kit por SCF

La capacidad del receptor c-kit para estimular la expresión de los miembros de la familia Snail se ensayó principalmente en células c-kit⁺ expresadas de forma natural, utilizando la línea celular LAMA 84 (Figura 1A). Como se muestra en la Figura 1B, la expresión de Slug aumentaba rápidamente en las células LAMA 84 tratadas con SCF. Sin embargo, el nivel de expresión de Snail no se modificó en presencia de SCF. En cierta medida, estos datos previos indican la capacidad de las células LAMA 84 tratadas con SCF para activar específicamente la expresión del gen Slug. Las células Ba/F3 que carecen de c-kit endógeno (Palacios y Steinmetz, 1985, Ceil 41:727) fueron manipuladas para

65

expresar un receptor c-kit de tipo salvaje y longitud completa (Ba/F3 + c-kit) (Figura 1C). Las células c-kit-transfectadas expresaban específicamente Slug con la estimulación por SCF (Figura 1D). Sin embargo, el gen Snail se expresaba a niveles similares en células Ba/F3+c-kit no estimuladas por SCF y en células Ba/F3+c-kit estimuladas por SCF. Estos experimentos demuestran que la activación de c-kit induce específicamente la expresión de Slug, indicando así una clara relación entre la activación de c-kit/SCF y la expresión de Slug. Debido a que las mutaciones en dos genes diferentes, el receptor c-kit y su ligando (SCF), tienen el mismo fenotipo complejo que afecta a la pigmentación, a las células germinales y a la hematopoyesis, se analizaron minuciosamente los ratones que carecían del gen Slug para determinar si las funciones de la ruta c-kit/SCF *in vivo* eran mediadas por Slug.

10 *Los defectos de pigmentación, gonadales y hematopoyéticos en ratones Slug-mutantes*

El fenotipo más evidente de los mutantes S1 y W *in vivo* es la presencia de enanismo severo, que se observa poco después del nacimiento. Esta característica también se observa en ratones que portan una mutación nula del gen Slug (ratones mutantes homocigóticos Slugh^{Δ1}) que aparecían considerablemente menores que sus compañeros de camada (Jiang et al., 1998, *Developmental Biology* 198277-285). Como en los ratones c-kit y SCF defectivos, el retraso en el crecimiento de los ratones mutantes homocigóticos Slugh^{Δ1} sucedía en las tres primeras semanas de vida. Por consiguiente, a continuación, se estudió si el gen Slug, como el receptor c-kit y su ligando (SCF), son también importantes en el desarrollo dérmico, gonadal y hematopoyético.

20 *1. Deficiencias de pigmentación*

Los melanoblastos se originan en la cresta neural pluripotente y emigran a lo largo de unos caminos característicos. Tanto para su supervivencia como para su migración dependen de numerosos sistemas de señalización (Ling et al., 2000, *Development* 127:5379-5389). Los ratones mutantes heterocigóticos (W/+ ó S1/+) tienen una característica mancha blanca en la frente y áreas adicionales de despigmentación en la zona ventral, cola y patas. Los ratones mutantes homocigóticos (W/W^v ó S1/S1) están mucho más afectados y carecen completamente de pigmentación de la piel y pelo, cuyos melanocitos derivan de la cresta neural.

Los ratones heterocigóticos para Slug no presentaban alteraciones de pigmentación. Sin embargo, los ratones mutantes homocigóticos para Slug tenían un pelaje diluido con áreas adicionales de despigmentación en colas y patas, y la característica mancha blanca de la frente (Figura 2A). Estos defectos dérmicos en los ratones Slug -/- consistían en varios grados de despigmentación.

No obstante, la retina y la capa interna del iris, cuyos melanocitos procedían del hueco óptico y son independientes del camino de señalización SCF/c-kit, están sistemáticamente pigmentados en los ratones Slug -/-. Estos defectos dérmicos observados en los ratones Slug -/- son similares al fenotipo dérmico observado en los ratones W/+ y SU+ y sugieren una función del gen Slug en el desarrollo de los melanocitos procedentes de la cresta neural.

40 *2. Deficiencias gonadales*

Las hembras Slug-deficientes eran fértiles y los ovarios aparecían normales. La mayoría de los machos Slug -/- también eran fértiles. Aunque parecían copular con normalidad, tal como indicaba la formación de tapones vaginales, más del 15% no lograba inducir la preñez en sus compañeras. Aquellos ratones Slug -/- capaces de procrear producían camadas pequeñas (3-6 crías a diferencia de una camada normal de 10-12 crías). El tamaño y peso de los testículos de los mutantes -/- se reducía aproximadamente un 40% en comparación con los compañeros de la camada de tipo salvaje. Las secciones histológicas de testículos de ratones de 6 semanas Slug-deficientes revelaron que la atrofia testicular provenía de una reducción global del tamaño de los tubos seminales, característica que puede observarse también en algunos ratones heterocigóticos para Slug (Figura 2B). No obstante, los espermatozoides se visualizaban en la lumina, de acuerdo con el hecho de que la fertilidad no estaba comprometida gravemente en estos animales. El análisis histológico también reveló un número reducido de células de Leydig en el espacio intersticial de los ratones Slug-deficientes (Figura 2B). Por el contrario, el espacio intersticial de los testículos de los ratones W/W^v y S1/S1 está desproporcionadamente aumentado y lleno de células de Leydig. Por tanto, el gen Slug tiene una función en el desarrollo de las células germinales de los machos pero su pérdida es insuficiente para comprometer por completo la producción de células de esperma.

55 *3. Deficiencias hematopoyéticas*

Los ratones con mutación nula SCF y c-kit tienen severas deficiencias hematopoyéticas. El SCF actúa en las células progenitoras hematopoyéticas, donde se ha observado un aumento en la supervivencia más que reclutamiento dentro del ciclo celular. Por consiguiente, se analizó la función del Slug en la hematopoyesis normal.

3.1 Anemia macrocítica en ratones Slug -/-

La anemia es la anomalía fenotípica hematopoyética más destacada observada en mutantes S1 y W *in vivo* y es responsable del retraso de crecimiento durante las primeras semanas de vida, característica compartida con los ratones Slug-deficientes. Por tanto, a continuación, se examinaron los parámetros sanguíneos en los ratones mutantes Slug -/-. Los parámetros hematológicos examinados, en particular, hemoglobina (HGB), volumen corpuscular medio (MCV) y concentración media de la hemoglobina corpuscular (MCHC), definen una anemia macrocítica (Tabla I), un aspecto

ES 2 213 429 A1

de los ratones S1 y W, y de los fenotipos humanos de piebaldismo (“piebald”), que se deben a mutaciones de pérdida de función que ocurren de manera natural en el receptor c-kit o en su ligando SCF, respectivamente.

TABLA I

Parámetros hematológicos de la sangre periférica de ratones Slug +/+, +/- y -/-

	Genotipo		
	-/-	+/-	+/+
RBC (x 10 ⁶ /μl)	8,3 ± 1,1	9,15 ± 1,0	10,2 ± 0,6
HGB (g/dl)	11,9 ± 1,6	14,8 ± 1,4	15,2 ± 0,9
HCT (%)	37 ± 3,7	48,3 ± 4,1	48,3 ± 3,4
MCV (fl)	55,5 ± 4,1	48,2 ± 3,1	49,3 ± 2,9
MCH (pg)	19,4 ± 1,4	18,3 ± 1,2	18,5 ± 1,1
MCHC (g/dl)34,9	38,9 ± 3,5	36,7 ± 3,3	35,6 ± 3,2
RDW (%)	15,2 ± 1,3	12,2 ± 0,9	12,4 ± 1,1
Plaq (x10 ³ /μl)	422 ± 24,5	437 ± 30,8	445 ± 34,4
MPV (fl)	5,2 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,4 ± 0,4
WBC (x10 ³ /μl)	8,4 ± 1,0	9,07 ± 1,2	11,5 ± 1,4
Neu (%N)	64,6 ± 3,9	65,9 ± 4,3	66,2 ± 4,7
Lym (%L)	35,4 ± 2,2	33,6 ± 2,9	33,8 ± 2,8
Mono (%M)	N.D.	N.D.	N.D.
Eos (%E)	N.D.	0,5	N.D.
Baso (%B)	N.D.	N.D.	N.D.

Valor medio ± SEM (desviación estándar de la muestra, para n=10); RBC: eritrocitos; HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: volumen medio de eritrocitos; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de la hemoglobina corpuscular; RDW: amplitud de la distribución de eritrocitos; Plaq: plaquetas; MPV: volumen medio de plaquetas; WBC: leucocitos; Neu: neutrófilos; Lym: linfocitos; Mono: monocitos; Eos: eosinófilos; Baso: basófilos; N.D.: no detectado.

A continuación, se analizó la capacidad de expansión de la eritropoyesis en ratones Slug-mutantes bajo estrés hematopoyético. La vasta expansión de la eritropoyesis que tiene lugar en el bazo de los ratones en respuesta a la anemia hemolítica u otras situaciones de estrés hematopoyéticas (durante la gestación) se debe a la migración de BFU-E desde la médula hacia el bazo. Por tanto, en primer lugar, se examinaron los efectos sobre la eritropoyesis en la pulpa roja esplénica de los ratones Slug-mutantes durante la gestación. La gestación de ratones se caracteriza por una esplenomegalia transitoria a media gestación debido a un gran incremento del número de eritoblastos. Esta anemia asociada a la gestación es la razón principal del gran cambio de tamaño y contenido celular de bazo materno (Tabla II). Por el contrario, los bazos de los ratones Slug-mutantes con una gestación de 12 días son más pequeños que los de los ratones de control (Tabla II).

TABLA II

Pesos (gramos) de los bazos de ratones Slug +/+, +/- y -/- preñados

	Genotipo		
	+/+	+/-	-/-
No preñado	0,0726 ± 0,0033	0,0697 ± 0,0048	0,0706 ± 0,0029
Preñado	0,1379 ± 0,0075	0,0864 ± 0,0039	0,0771 ± 0,0029

El examen histológico de los bazos evidenció que el incremento de la pulpa roja esplénica era mucho menos evidente tanto en ratones Slug +/- como en ratones -/- (Figura 3A). Los resultados de la citometría de flujo del análisis de la expresión del marcador eritroideo (TER-119) en células de la médula ósea y el bazo de ratones normales y de ratones Slug-mutantes se muestran en la Tabla III.

ES 2 213 429 A1

TABLA III

Frecuencia (en porcentaje) de células TER-119⁺ en la médula y en el bazo de ratones Slug +/+, +/- y -/-, y en ratones recuperados de la anemia inducida por la gestación

5

	<u>Médula ósea</u>	<u>Bazo</u>
+/+	7,7 ± 1,5	1,2 ± 0,9
+/+ durante la gestación	19,1 ± 2,1	18,3 ± 2,9
+/-	7,5 ± 1,7	1,1 ± 0,8
+/- durante la gestación	12 ± 2,2	6,0 ± 1,5
-/-	7,9 ± 1,1	1,3 ± 0,7
-/- durante la gestación	10 ± 2,1	4,9 ± 1,6

15

La frecuencia de las células TER-119⁺ se incrementó tanto en la médula como en el bazo durante la recuperación de la anemia provocada en la gestación en los ratones de control. Por el contrario, el incremento de las células TER-119⁺ resultó afectado en los ratones Slug-mutantes tanto en la médula como en el bazo. Estos resultados muestran la escasa recuperación de la anemia por gestación en ratones Slug-mutantes, indicando un defecto en la generación y/o migración de células eritroides progenitoras de los ratones Slug-mutantes. Por tanto, a continuación, se procedió a cuantificar el número de BFU-E, que es la célula progenitor eritroide más primitiva, y de CFU-E, que son las células progenitoras más diferenciadas, mediante ensayos de formación de colonias hematopoyéticas tanto en médula ósea y bazo de ratones control como en ratones Slug-mutantes bajo condiciones fisiológicas (sin estrés eritroide). El número de BFU-E y CFU-E en ratones heterocigóticos para Slug era similar al de los ratones de control. Sin embargo, el número de BFU-E en médula ósea y el número de CFU-E en el bazo se había reducido en ratones homocigóticos para Slug en comparación con los ratones de control. El conjunto de estos resultados muestra un defecto basal eritroide a nivel de BFU-E en ratones Slug -/-. No obstante, el desarrollo basal eritroide aparece normal en los ratones Slug -/-, aunque el estrés hematopoyético (gestación) evidenciaba poca recuperación de la anemia.

30

Seguidamente se procedió a cuantificar el número de BFU-E y CFU-E en los ratones Slug-mutantes en los que se había inducido previamente una anemia hemolítica con fenilhidracina (PHZ). La inyección de PHZ causa una grave destrucción de glóbulos rojos seguida de una expansión de la eritropoyesis. Por consiguiente, ratones de la misma edad fueron inyectados con PHZ y su efecto se observó sistemáticamente alrededor del día 3 en los ratones a los que se suministró PHZ produciéndose una rápida reducción en el hematocrito y un incremento en el número de reticulocitos (datos no mostrados). En los ratones Slug +/- con anemia hemolítica inducida por la PHZ, el número de CFU-E se redujo en BM en comparación con los ratones de control y la expansión del número de BFU-E y CFU-E en el bazo resultó afectada (Tabla IV). La inducción de anemia hemolítica con PHZ en los ratones Slug -/- dio como resultado un incremento de la eritropoyesis de médula, pero el incremento esperado en la eritropoyesis esplénica no fue completamente bloqueado (Tabla IV). Estos resultados demuestran que la respuesta a la demanda eritropoyética aguda tiene como resultado la expansión de eritropoyesis principalmente a nivel de BFU-E en ratones Slug-mutantes. Un fenotipo similar se observa en ratones W/W^v. Aunque la eritropoyesis medular aumenta alrededor del día 3 en los ratones W/W^v que se les suministra PHZ, el incremento esperado en la eritropoyesis esplénica no se produce en el día 3. Los resultados de la citometría de flujo de los análisis de expresión del marcador de c-kit (CD 117) en las células de médula ósea y de bazo de control, de ratones Slug-mutantes, mutantes S1 y mutantes W después de la inducción de la anemia hemolítica con PHZ muestra que el incremento de células c-kit en el bazo de ratones Slug-mutantes, S1/S1 y W/W^v fue bloqueado en comparación con los ratones de control (Figura 3B). Estos resultados muestran que las células c-kit⁺ Slug deficientes se comportan como células S1- y W-c-kit⁺ y el defecto en el desarrollo eritroide es similar en ratones Slug-mutantes, W/W^v y S1/S1.

50

TABLA IV

Expansión de los números de BFU-E y CFU-E en la médula ósea (BM) y en el bazo de ratones tratados con fenilhidrazina (PHZ)

55

	Nº de CFU-E (x10 ⁴)		Nº de BFU-E (x10 ⁻³)	
	BM	Bazo	BM	Bazo
(+/+)	4,3 ± 0,6	6,6 ± 1,5	4,2 ± 0,5	1,3 ± 0,4
PHZ-(+/+)	16,2 ± 1,1	256 ± 29	4,4 ± 0,4	25 ± 2,4
(+/-)	3,9 ± 1,3	4,1 ± 0,8	4,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2
PHZ-(+/-)	4,1 ± 0,9	23 ± 3	4,9 ± 0,6	11 ± 0,8
(-/-)	4,0 ± 1,3	2,4 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2
PHZ-(-/-)	4,1 ± 1,4	2,0 ± 0,4	4,6 ± 0,3	1,7 ± 9,4

65

Los números de BFU-E y CFU-E en la médula ósea y en el bazo de ratones tratados con PHZ y sacrificados el día 3 fueron cuantificados mediante ensayos de formación de colonias hematopoyéticas. Los valores indicados representan la media ± SEM de 5 ratones en cada grupo.

3.2 Células T en ratones *Slug*-mutantes

En los ratones que carecen de expresión funcional *Slug*, los números de células T en sangre periférica son normales, aunque el análisis de la composición del timo de ratones de 4 semanas de edad muestra una reducción en la producción de células y diferenciación hacia las células CD4⁺ CD8⁺ que era similar a los ratones mutantes W y S1 (Figura 4). Este bloqueo específico de diferenciación de células T también se observó en ratones +/- . El timo de ratones *Slug* -/- era pequeño y se estudió en secciones histológicas. Se detectaron diferencias morfológicas entre timos de animales -/- y +/+ de la misma camada, siendo la apariencia histológica similar a los timos de ratones mutantes S1 y W (Figura 4). En secciones de timo de ratones *Slug* deficientes, se observaron muchas células en el nivel cortical que parecían corresponder a cuerpos apoptóticos que no se ven frecuentemente en secciones de timo procedentes de ratones tipo salvaje (Figura 4). De acuerdo con esta interpretación, se detectó un incremento significativo en células TUNEL-positivas en secciones de timo de ratones *Slug*-deficientes. El aumento de la apoptosis en animales *Slug*-deficientes estaba correlacionada con la atrofia del timo. Estos resultados son coherentes con la idea de que el SCF estimula el crecimiento de timocitos CD4⁺ CD8⁻ del ratón primitivo pero no de las células CD4⁺ CD8⁺ o células individuales CD4⁺ o CD8⁺ (J.Immunol 152:4783, 1994; Cell Immunol. 157:118, 1994).

3.3 El desarrollo de células B, células mieloides y mastocitos parece normal en ratones *Slug*-mutantes

Aunque la interacción entre c-kit y SCF no es necesaria para el desarrollo de células B y mieloides *in vivo*, se realizó un extenso análisis de expresión mediante citometría de flujo de los marcadores de diferenciación de la superficie celular en células de bazo y de médula ósea de ratones de 5 semanas de tipo salvaje, mutantes S1 y W, y ratones *Slug*-mutantes. No se observó ninguna reducción en las células de las líneas mieloides y de células B en los ratones *Slug*-mutantes (Figuras 5A-B). Por tanto, a diferencia de la importante función del gen *Slug*, como la interacción c-kit/SCF, en la generación de líneas eritroides y de células T, el gen *Slug*, no parece ser necesario para el desarrollo normal de células B y mieloides en ratones adultos.

Como es conocido, la ruta de señalización SCF/c-kit es necesaria para el desarrollo de mastocitos. Por tanto, se examinaron los mastocitos de ratones *Slug*-mutantes de 4 y 8 semanas de edad en secciones histológicas de diferentes tejidos. No se pudo detectar ninguna diferencia morfológica entre los mastocitos de animales -/- y +/+ de la misma camada (Figura 5C). Además, el número de mastocitos en el oído, órgano conocido por ser rico en mastocitos era equivalente en animales -/- y +/+. Por consiguiente, el desarrollo y diferenciación de mastocitos no parece haber sido afectado por la ausencia de un gen *Slug* funcional.

*El defecto en ratones *Slug*-mutantes es intrínseco a la célula stem*

Ya que la señalización del receptor depende de la interacción con el ligando, no sorprende que las formas mutantes del receptor c-kit y su ligando produzcan defectos de desarrollo casi idénticos. Sin embargo, los experimentos de trasplante revelan una importante diferencia entre dos mutaciones: las células stem hematopoyéticas de los ratones. Si funcionan con normalidad en receptores de tipo salvaje, mientras que no ocurre igual en las de los mutantes W. Consiguientemente, como la ausencia del gen *Slug* afecta al desarrollo de tres poblaciones de células stem: melanoblastos, células stem hematopoyéticas y células germinales (como en las mutaciones tanto W como S1), primero se analizó si los ratones *Slug*-mutantes tenían una ruta de señalización SCF/c-kit normal. Para asegurar que se disponía de un receptor normal de tirosina quinasa transmembrana codificado por c-kit para el SCF (c-kit/SCF-R), se examinaron los mastocitos primarios de la médula ósea de ratones de la misma edad +/+, +/- y -/-. El par c-kit/SCF-R de ratones -/-, +/- y de los ratones de control era del mismo tamaño y se expresaba a niveles comparables (Figura 6A). El par c-kit/SCF-R era también quinasa activo y autofosforilaba restos de tirosina tras estimulación con SCF (Figura 6A).

Para definir si la naturaleza del defecto era extrínseca o intrínseca a la célula stem, se analizó la capacidad de las células stem hematopoyéticas de ratones *Slug*-mutantes para reconstituir una hematopoyesis en huéspedes irradiados. El injerto de las células de la médula ósea de un donante normal cura el fenotipo hematopoyético observado en ratones *Slug* -/-. Por otro lado, los receptores de tipo salvaje letalmente irradiados y reconstituidos con células stem hematopoyéticas de ratones *Slug* -/- presentaban anemia macrocítica y la composición del sistema hematopoyético era similar a la de los ratones *Slug* -/- (Figura 6B). Estos ratones tenían un desarrollo normal de células B y mieloides, un bloqueo en la diferenciación de células T hacia las células CD4⁺ CD8⁺, y al tratarlos con PHZ las células c-kit⁺ no podían migrar hacia el bazo. Estos resultados indican que el defecto en los ratones *Slug*-mutantes es intrínseco a la célula stem.

*Las células primarias c-kit⁺ no expresan *Slug* en los ratones mutantes W o S1*

El gen *Slug* favorece las funciones fundamentales para promocionar el desarrollo, supervivencia y proliferación de las células stem hematopoyéticas, las derivadas de la cresta neural, y las células germinales, función bien ilustrada por la reducción de precursores eritroides y anemia macrocítica asociada, defectos gonadales e hipopigmentación manifestada en ratones *Slug*-deficientes. Los descubrimientos de que la activación del receptor c-kit induce específicamente la expresión de ratones *Slug* y ratones *Slug*-deficientes tienen un fenotipo similar al de los ratones mutantes S1 y W, llevó a los inventores a comprobar si los niveles de expresión del gen *Slug* se regulan como consecuencia de la activación SCF/c-kit en células control frente a las células c-kit⁺ primarias de S1 y W. Por tanto, se indujo una anemia hemolítica con fenilhidrazina (PHZ) en ratones de control y en ratones mutantes S1 y W. El día 3, las células c-kit de la médula ósea y del bazo fueron purificadas clasificándolas en ratones control y mutantes S1 y W (Figura 7A). Después

se comprobó si la expresión del gen *Slug* estaba también presente en las células *c-kit*⁺ de los ratones de control. El examen de la expresión del gen *Slug* mediante RT-PCR reveló que el gen *Slug* estaba presente en las células *c-kit*⁺ primarias derivadas de la médula ósea y del bazo de los ratones de control (Figura 7B). La expresión de β -actina se usó para valorar la integridad y carga de cada reacción RT-PCR (Figura 7B, sección inferior). La expresión del gen *Slug* era más alta en el interior de las células migratorias observadas en el bazo que en las células *c-kit*⁺ que quedaban en la médula ósea. Por el contrario, utilizando las mismas condiciones empíricas, no se pudo detectar la expresión del gen *Slug* en células *c-kit*⁺ primarias purificadas de la médula ósea de ratones mutantes *W* y *S1*. Sólo se observó expresión del gen *Slug* en las células *c-kit*⁺ primarias procedentes del bazo (células migratorias) de mutantes *W*. Estos resultados, junto con el descubrimiento de que la activación del receptor *c-kit* induce específicamente la expresión del gen *Slug* y de que los ratones *Slug*-deficientes tienen un fenotipo similar al de los ratones mutantes *S1* y *W*, indican que el gen *Slug* es el objetivo molecular que proporciona especificidad biológica a la ruta de señalización SCF/*c-kit*.

III. Discusión

15 *Defectos en el desarrollo de la ruta de señalización SCF/c-kit mediada por Slug*

Desde 1990 se conoce bien el camino migratorio SCF/*c-kit* *in vivo* y los destinos del desarrollo, debido a la existencia de ratones mutantes en los cuales tanto los genes de codificación del receptor como los de su respectivo ligando son defectuosos (Nature 335, 88, 1988; Cell 55:185, 1988; Cell 63:225, 1990; Cell 63:203, 1990; Cell 63:167, 1990; Cell 63: 75, 1990; Cell 63:213, 1990). Sin embargo, es mucho menos conocido el mecanismo que proporciona especificidad biológica a la ruta de señalización SCF/*c-kit* en la formación y migración de las células *c-kit*⁺. Un aspecto clave es la identificación de los objetivos de señalización del *c-kit* que refuerza el comportamiento migratorio de las células *c-kit*⁺. A este respecto, los sucesos biológicos controlados por la ruta de señalización de *c-kit* son similares a aquéllos que tienen lugar en transiciones epiteliales-mesenquimales (EMT) durante el desarrollo de los mamíferos y que se controlan por factores de transición de tipo “dedos de zinc” de la familia *Snail* (Nieto et al., 1994, Science 264:835-849; Cano et al., 2000, Nature Cell Biology 2:76-83). Estas proteínas, que comparten un papel de conservación evolutivo tanto en los vertebrados como en los invertebrados, están implicadas en la generación y migración tanto de las células del mesodermo como de la cresta neural en varias especies de vertebrados. Ahora se ha investigado si las funciones biológicas gobernadas por la ruta de señalización SCF/*c-kit* están mediadas por la familia de proteínas *Snail*. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la activación del receptor *c-kit* por su ligando SCF induce específicamente la expresión de *Slug*, un miembro específico de la familia *Snail*, indicando una clara relación entre la activación SCF/*c-kit* y la expresión del gen *Slug*.

Debido a que los ratones con mutaciones en el receptor *c-kit* y su ligando (SCF) tienen el mismo fenotipo complejo que afecta a la pigmentación, células germinales y hematopoyesis, se analizaron ratones sin el gen *Slug* con el fin de observar *in vivo* si el gen *Slug* mediaba algunas funciones de la ruta *c-kit*/SCF. Se han generado ratones que experimentan mutaciones con pérdidas de función en el lugar del *Slug*. El patrón de expresión del gen *Slug* sugirió que este gen tenía una función en el desarrollo del sistema nervioso. Consecuentemente, el análisis de los ratones mutantes se enfocó en este sistema. En la actualidad, el análisis de los ratones mutantes se centra en aquellos aspectos del desarrollo que dependen de la ruta SCF/*c-kit*. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de defectos en el desarrollo dermatológico, gonadal y hematopoyético en ratones *Slug*-mutantes.

Sólo los ratones *Slug* *-/-* mostraron alteraciones en la pigmentación, lo que indica que la ausencia de *Slug* únicamente afecta la migración y/o supervivencia de células pigmentadas stem derivadas de la cresta neural, de tal forma que se producen fallos de los melanoblastos en posiciones lejanas a la cresta neural, es decir, en la frente y en las extremidades. Esta función del *Slug* es coherente con el hecho de que el gen *Slug* de ratón no se exprese en células premigratorias de la cresta neural pero sí lo haga en células migratorias de la cresta neural. Estas alteraciones observadas en la pigmentación de ratones *Slug* *-/-* son similares a las alteraciones descritas en ratones mutantes *W* y *S1*, explicando por qué algunas áreas en ratones mutantes heterocigóticos *W* y *S1* y en individuos con fenotipo de piebaldismo están completamente despigmentadas mientras que otras permanecen normales. Estos datos también indican que la señalización intracelular mediada por *c-kit* debe superar un umbral crítico con el fin de que el *Slug* llegue a activarse y los melanoblastos migren y sobrevivan. Los ratones heterocigóticos *S1* y *W* parece que no alcanzan este umbral. De hecho, los melanoblastos que migran hacia la frente y otras áreas afectadas pueden estar en el extremo bajo de valores de gradiente de SCF (Development 109, 911-923, 1990).

Además de esta deficiencia de melanocitos, los ratones mutantes homocigóticos para *Slug* evidenciaban defectos en los testículos. Estos defectos implican tanto espermatogonia y células de Leydig. Se conoce bien el defecto de espermatogonia en ratones homocigóticos *W* y *S1* los cuales son estériles y está específicamente controlado por activación con la PI 3-kinasa mediada por *kit* (Blume-Jensen et al., 2000, Nature Genetics, 24:157-162; Kissel et al., 2000, EMBO J. 19:1312-1326). Sin embargo, el espacio intersticial en ratones homocigóticos *W* y *S1* y en los testículos de *Kit*^{Y719F}/*Kit*^{Y719F} ha aumentado desproporcionadamente y se han llenado de células de Leydig. Una posible explicación de estas observaciones es que existen mecanismos de equilibrio dentro de la línea Leydig, tales como FSH y factor-1 de crecimiento tipo insulina, que tratan de compensar las deficiencias en los compartimentos de las células germinales primitivas en ratones mutantes *W*, *S1* y *Kit*^{Y719F}/*Kit*^{Y719F}, estimulando la proliferación o la supervivencia de las células de Leydig. Por el contrario, en ratones *Slug* *-/-* el principal problema puede residir en el compartimento de las células de Leydig, que derivaban de las crestas neuronales y son *c-kit*⁺. Este deterioro del desarrollo de las células de Leydig podría, como efecto secundario, afectar a la maduración de las células germinales. Por tanto, la ruta de señalización SCF/*c-kit* tendría una doble función en el testículo: en el desarrollo de las células germinales controladas por la activa-

ción por la PI 3-quinasa mediada por kit y en el desarrollo células de Leydig controlado por el gen Slug (Figura 7C). El análisis del desarrollo hematopoyético en ratones Slug-mutantes evidenció un fenotipo similar al de los ratones defectivos W y S1. Los ratones mutantes homocigóticos S1, W y Slug presentaron anemia macrocítica. Estas mutaciones deterioraron la capacidad de desarrollo de las células del progenitor de las líneas de células eritroides y T y tienen un desarrollo normal en las células B y mieloides. El defecto en el desarrollo de las células hematopoyéticas en ratones Slug-mutantes fue intrínseco a la célula. Los ratones Slug-mutantes presentan fenotipos iguales, independientemente de si las células hematopoyéticas se aislaron directamente de los ratones mutantes o si se recuperaron de los receptores del trasplante. Por tanto, el fenotipo de los ratones Slug-mutantes no se debe a insuficiencias en el microambiente (como en los ratones mutantes S1) sino que es debido a defectos intrínsecos de las células hematopoyética del progenitor (como en los ratones mutantes W).

Otras líneas que expresan kit, tales como los mastocitos y la mayoría de los melanoblastos, no muestran fenotipos obvios en los ratones Slug-mutantes, lo que sugiere que el contexto celular es de gran importancia para la interpretación de la señal SCF/c-kit. En este tipo de células, la función Slug o no se requiere o se puede compensar a través de su efecto sinérgico con otros miembros de la familia Snail. Otra cuestión trata de por qué la pérdida de función del Slug de los heterocigotos produce anomalías fenotípicas. Esto viene a indicar que una pérdida de la función de mutación en un alelo no puede compensarse con el resto de los alelos de tipo salvaje del mismo gen, definiendo el Slug como un gen semidominante.

Las mutaciones S1, W o en Slug afectan al desarrollo de tres poblaciones de células stem: melanoblastos, células stem hematopoyéticas y células germinales. Por tanto, Slug está presente en las células migratorias c-kit⁺ y no está presente en células c-kit⁺ en la médula ósea de los homocigotos S1 y W, lo que pone de manifiesto el papel del gen Slug en la adquisición de la capacidad de migración de las células c-kit⁺. Estos resultados son coherentes con el modelo en el que las células stem que contienen el receptor c-kit expresarían el gen Slug, provocando la supervivencia de la célula con independencia de la señal externa requerida (SCF) y permitiendo que las células migren hacia fuera de su ambiente normal. Si esto no se consigue en un periodo de tiempo determinado, podrían experimentar apoptosis ya que han sido privadas de señales externas para retener la expresión del gen Slug. Esto evitaría la entrada de células migratorias en territorios inadecuados a su estado de especificación. Estos datos indican que las señales que regulan el destino de la célula (o la muerte de la célula) juegan un papel importante en el mantenimiento de los patrones de la especificación y diferenciación celular.

Estos resultados identifican al gen Slug como un factor de transcripción que controla la migración y supervivencia de las células c-kit⁺. En este sentido, se sabe que la deficiencia de p53 rescata la androsterilidad de ratones W, pero no afecta a la supervivencia de melanocitos y de células ematopoyéticas. Por tanto, la apoptosis de células germinales masculinas en ausencia de kit es dependiente de p53 (Dev. Biol. 1999, 215: 78-90). Los resultados ahora obtenidos muestran que Slug es el factor de supervivencia en las líneas de los melanocitos y de las células hematopoyéticas. La proteína Slug normalmente actúa como un represor (Dev. Biol. 2000, 221: 195-205). Por tanto, Slug podría regular los genes cuya expresión necesita ser excluida de las células c-kit⁺ para migrar.

Slug es un gen candidato del piebaldismo y anemias hereditarias en humanos

Los desórdenes en el desarrollo de melanocitos se caracterizan por una distribución heterogénea de la pigmentación, denominada "moteado blanco", tipificada por piebaldismo y por el síndrome de Waardenburg. En la actualidad está claro que estos desórdenes en el desarrollo del pigmento de la célula representen un subgrupo de las neurocristopatías, que implican defectos de varias líneas celulares de la cresta neural que incluyen melanocitos. Los resultados ahora obtenidos implican al Slug como la causa del rasgo de piebaldismo. La alteración en el gen Slug puede ser responsable para el fenotipo de piebaldismo en algunos semejantes. Por tanto, en algunos pacientes el rasgo de piebaldismo se puede comprobar que resulta de deleciones en este gen, más que de mutaciones en el gen del receptor c-kit.

Otra característica de los ratones Slug-mutantes es la anemia. Las anemias humanas congénitas, tales como la anemia Diamond-Blackfan (DBA), que se caracterizan por una disminución de los progenitores de los eritroides en la médula, se parecen en algunos aspectos a la anemia de los ratones Slug-mutantes. Así, las alteraciones en el gen Slug pueden ser responsables de la anemia en algunos pacientes. Sin embargo, previamente se ha observado que los humanos con mutaciones patológicas del gen KIT no presentan anemia (Spritz, 1992, Blood 79:2497). Ahora es viable una prueba directa de esta hipótesis.

SCF/c-Kit/Slug en transformación

El receptor c-kit está implicado tanto en leucemias como en tumores sólidos. Mutaciones que dan como resultado la activación constitutiva de c-kit se han descrito en leucemias agudas mieloides, en cánceres de células pulmonares pequeñas, en tumores ginecológicos, en carcinomas de mama y en tumores de colon derivados de las células intersticiales de Cajal (un tipo de célula que es dependiente del SCF). Sin embargo, el potencial oncológico supuestamente conferido a las alteraciones en la actividad de c-kit en la malignidad es incierto. Los resultados obtenidos muestran que Slug confiere propiedades migratorias y de supervivencia a las células c-kit⁺. Por tanto, la activación constitutiva de c-kit podría conferir propiedades invasivas a las células del tumor. En este contexto, Slug puede representar también un evento molecular relevante en la transformación de células. Descubrimientos recientes muestran que Slug también se expresa en células leucémicas t(17;19) y en células de rhabdomiosarcoma que expresan la traslocación PAX3-FKHR.

ES 2 213 429 A1

Por tanto, Slug puede ser un componente de invasión en la biología del cáncer.

Usos potenciales del Slug

5 La movilización de las células stem hematopoyéticas es importante en trasplantes clínicos, terapia génica, y en
la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas, así como en la esterilidad masculina. Sin embargo, estas y
otras aplicaciones de SCF han estado limitadas por las propiedades activantes de los mastocitos (Broudy, 1997, Blood
90:1345-1364). Los resultados proporcionados por esta invención identifican a Slug como la molécula que media en
10 la función de la ruta de señalización SCF/c-kit, sugiriendo que Slug podría tener las mismas aplicaciones clínicas que
SCF, con la ventaja de que Slug no activaría los mastocitos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición farmacéutica que comprende un producto seleccionado del grupo formado por el gen Slug, el ADN complementario al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen Slug (ADNc de dicho gen Slug), la proteína Slug, una o más drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, y sus mezclas, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende el gen Slug o el ADNc de dicho gen Slug en un vector viral o no viral.

15 3. Empleo de un producto seleccionado del grupo formado por el gen Slug, el ADN complementario al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen Slug (ADNc de dicho gen Slug), la proteína Slug, una o más drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, y sus mezclas, en la elaboración de una composición farmacéutica para la movilización de células stem hematopoyéticas para trasplante o terapia génica.

20 4. Un método para la expansión *ex vivo* de células stem hematopoyéticas que comprende el empleo de un producto seleccionado del grupo formado por el gen Slug, el ADN complementario al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen Slug (ADNc de dicho gen Slug), la proteína Slug, una o más drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, y sus mezclas.

25 5. Método según la reivindicación 4, que comprende la administración a un cultivo de células stem hematopoyéticas de una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo formado por el gen Slug, el ADNc de dicho gen Slug, la proteína Slug, una o más drogas o sustancias que activen la expresión del gen Slug, y sus mezclas, o de una composición que contiene dichos productos.

30

35

40

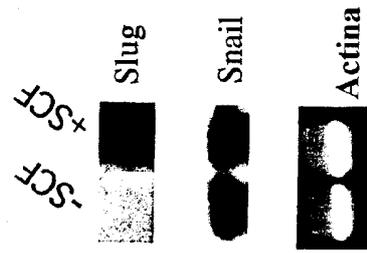
45

50

55

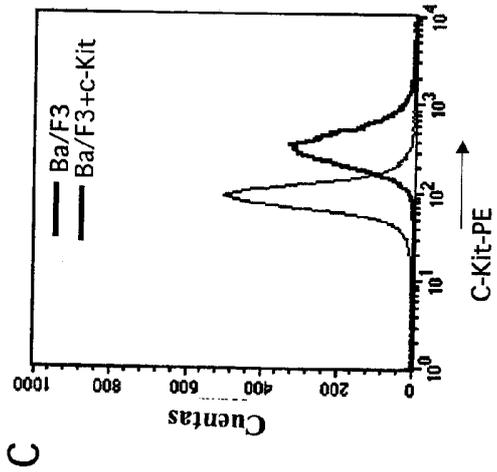
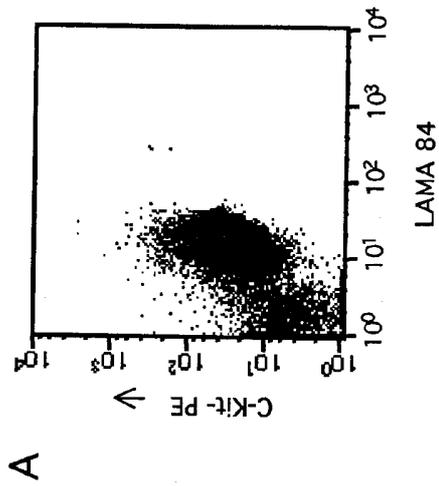
60

65



B

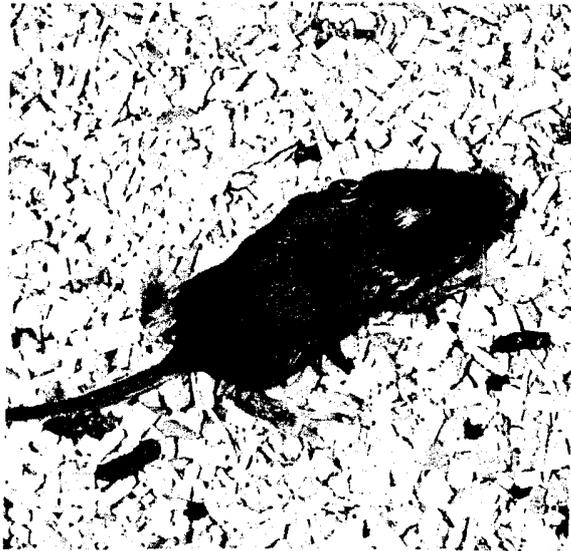
D



A

C

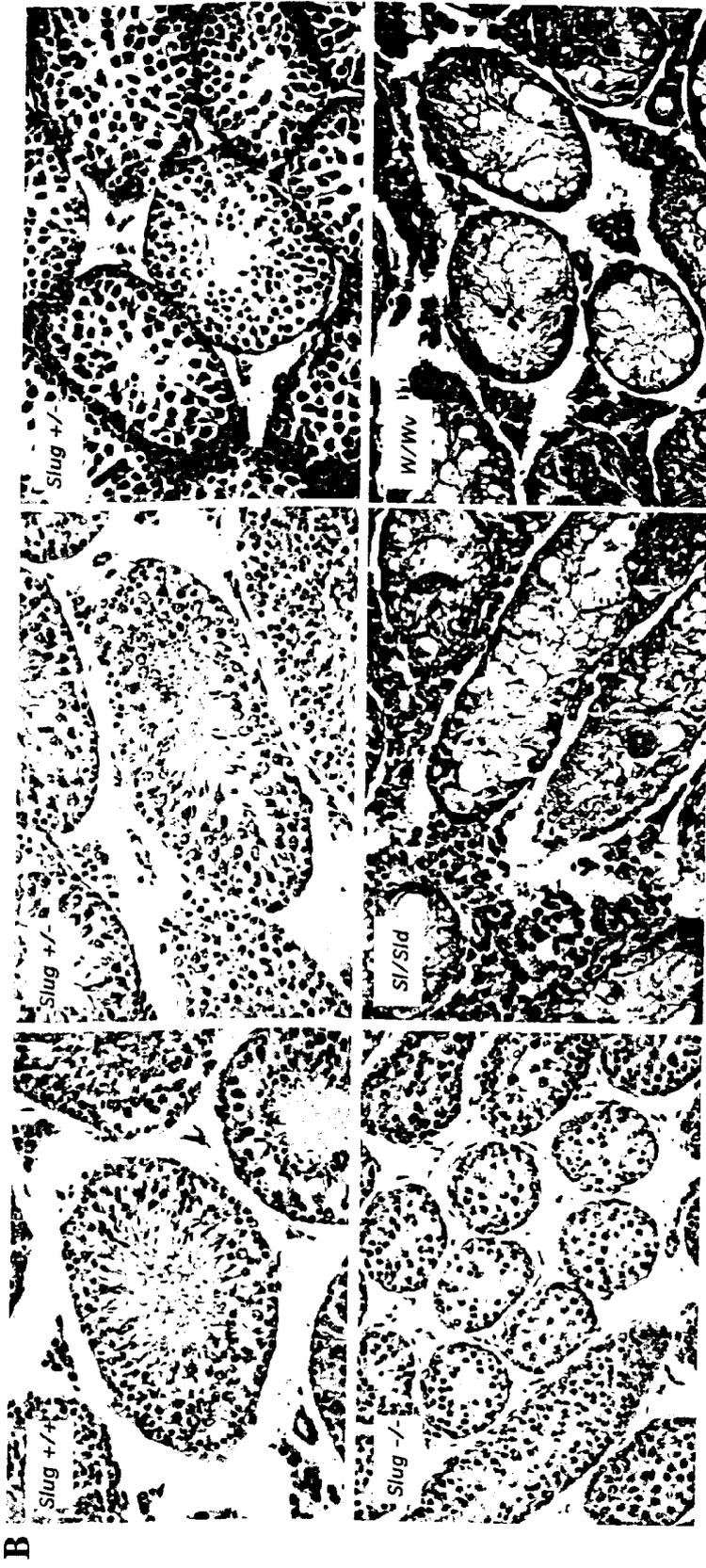
Figura 1



A

Figura 2A

Figura 2

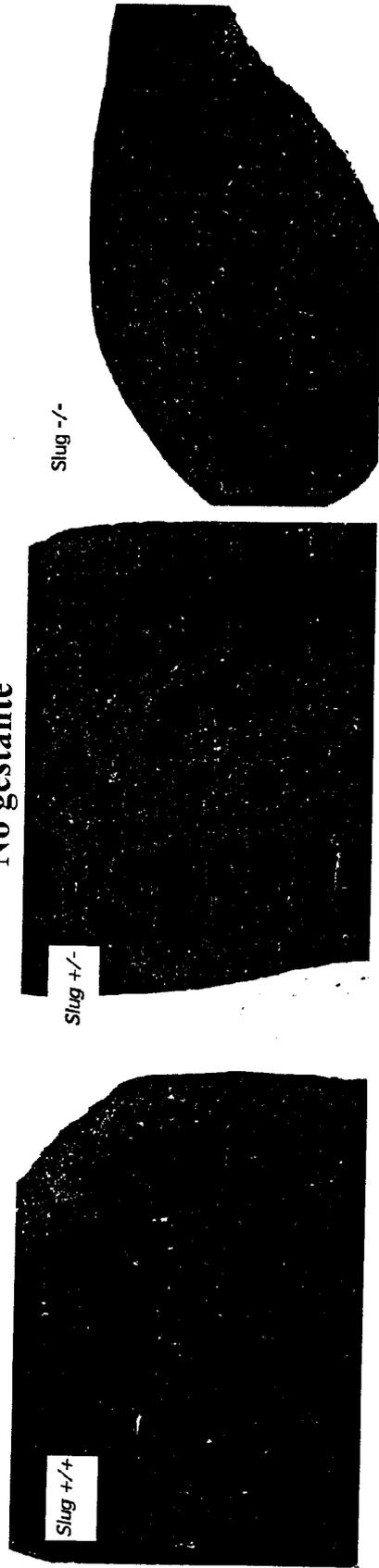


B

Figure 2B

Figure 2 (Cont.)

Figura 3A



Gestante

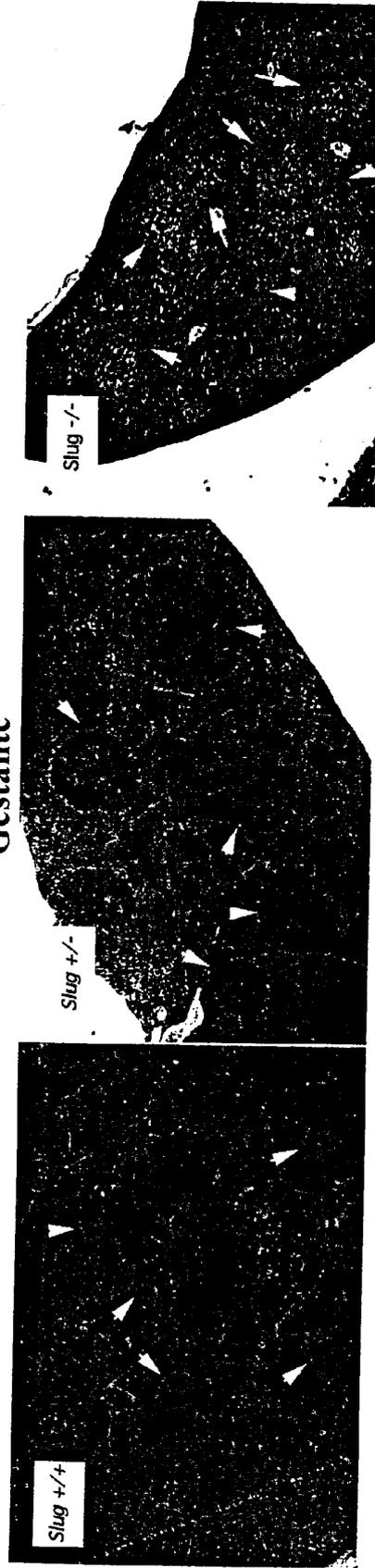


Figura 3

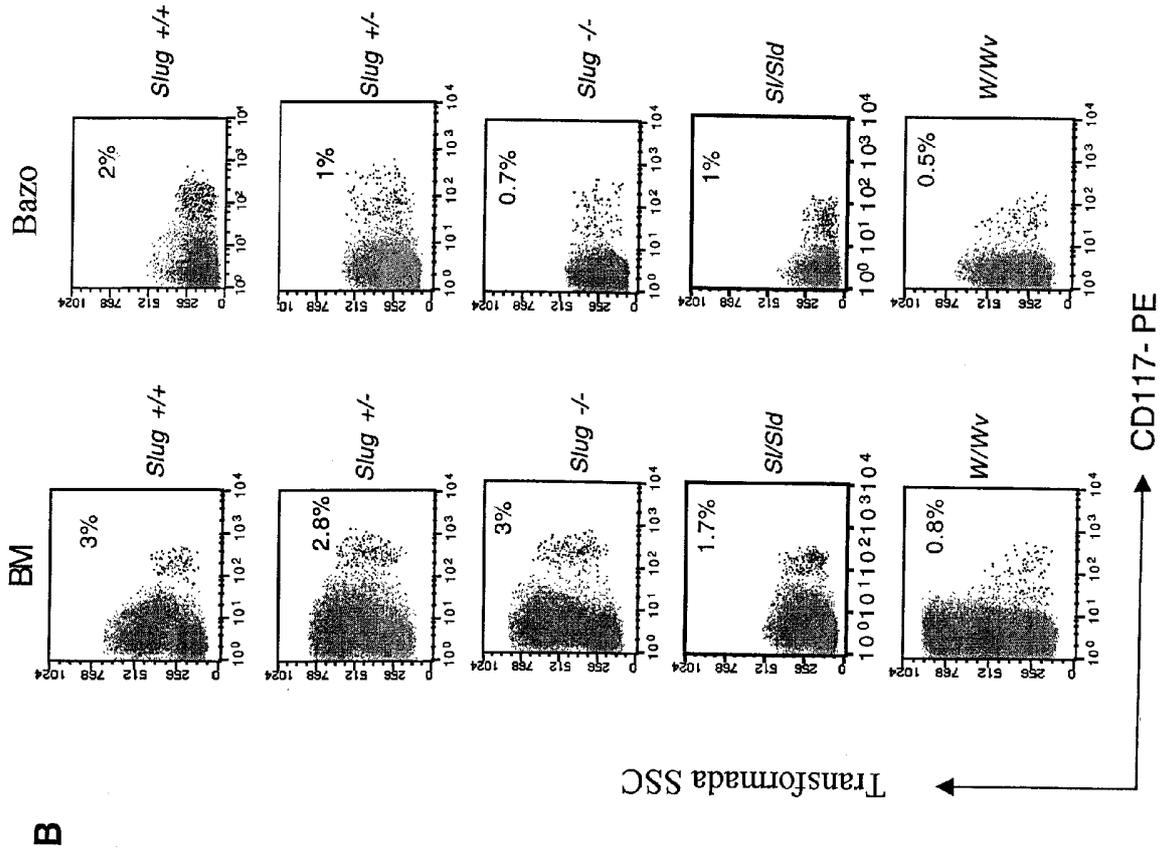


Figura 3B

Figura 3 (Cont.)

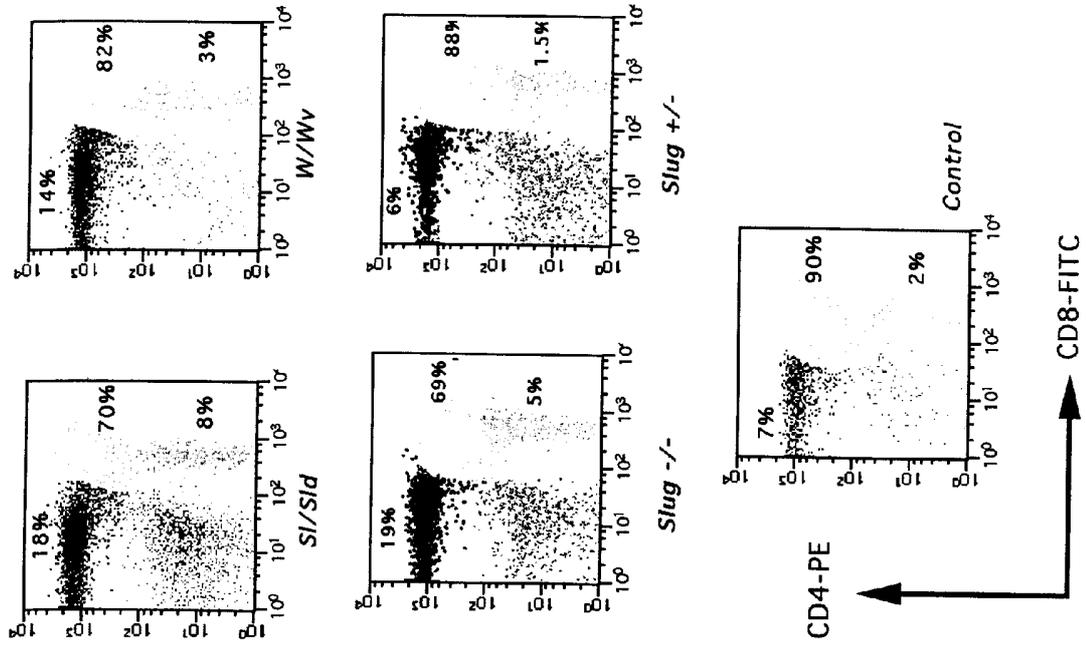
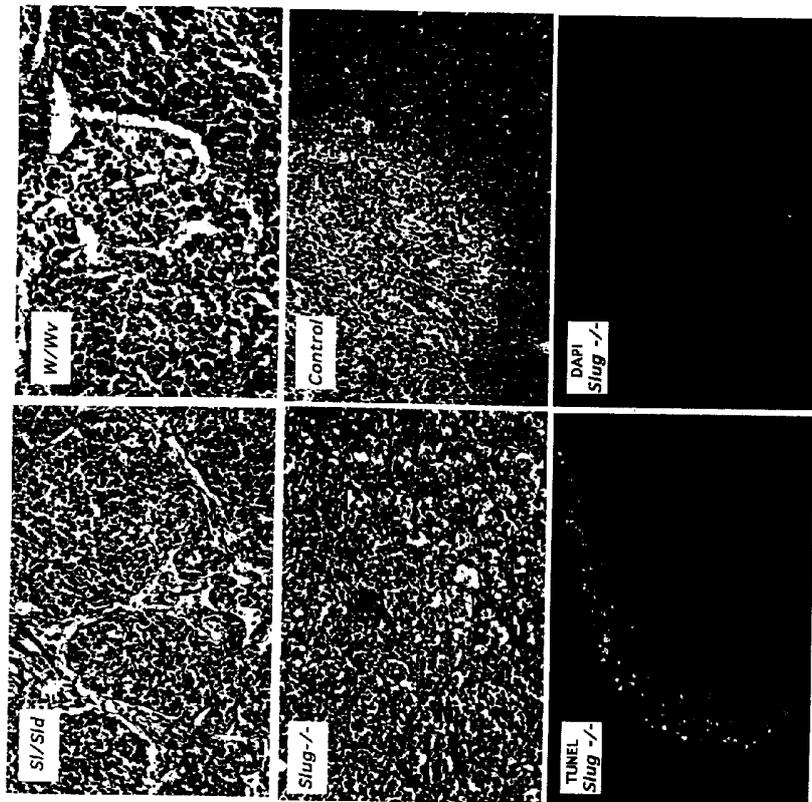
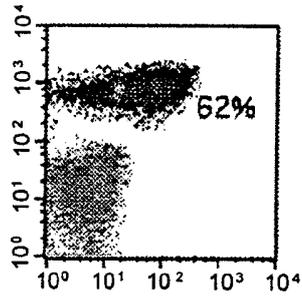
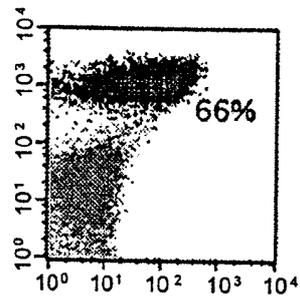


Figura 4

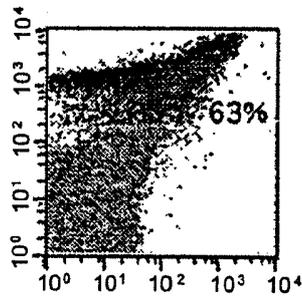




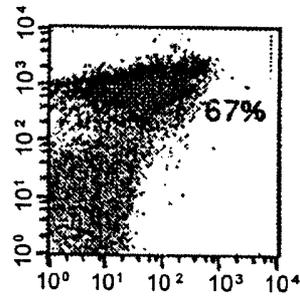
W/Wv Bazo



SI/Sld Bazo



Slug -/- Bazo



Slug +/- Bazo

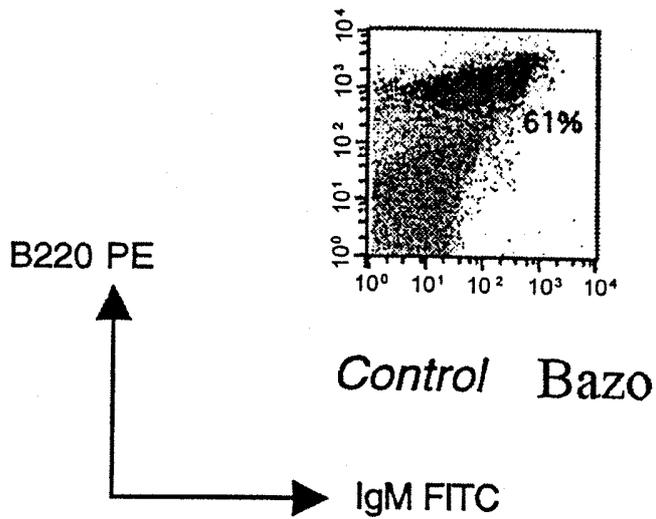


FIG.-5A

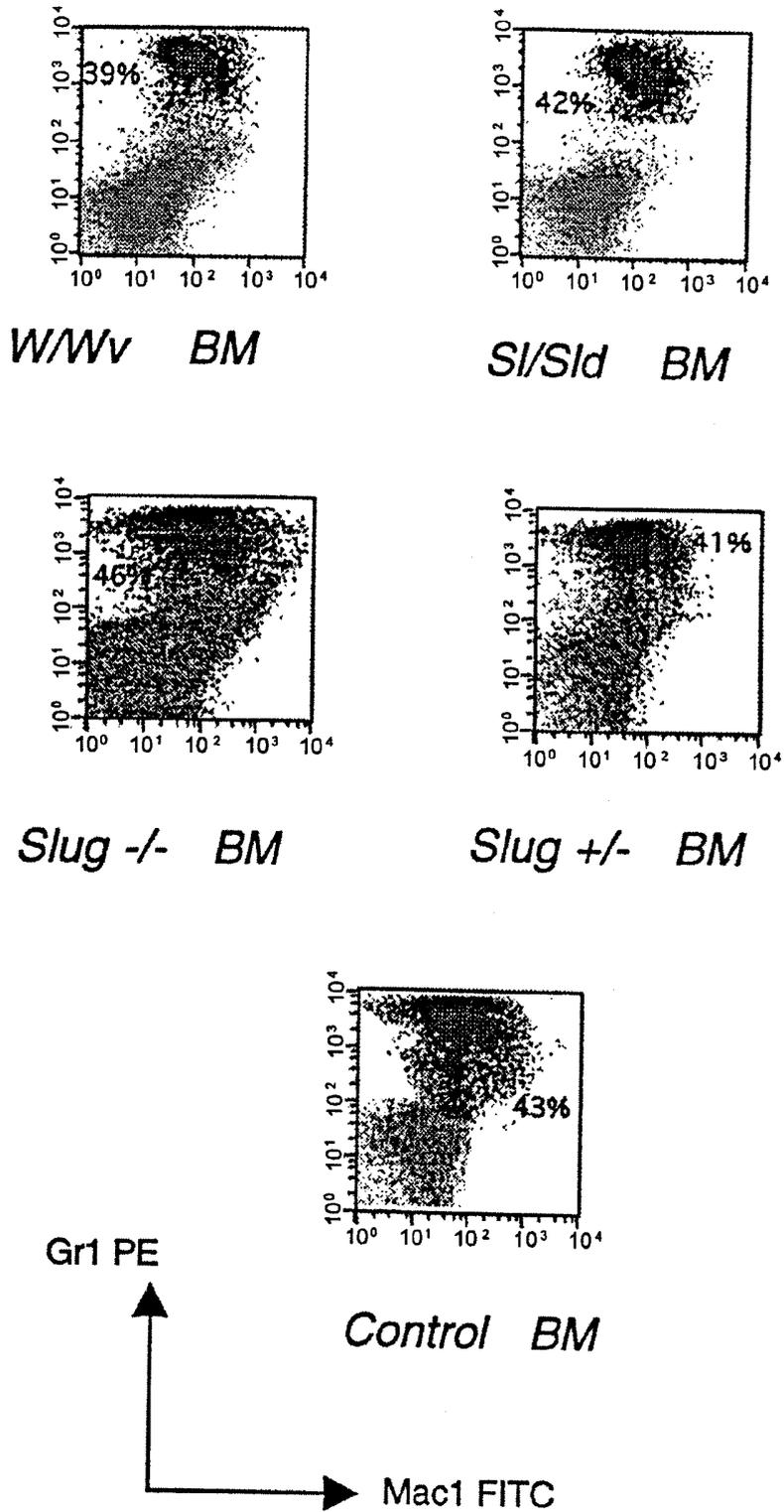


FIG.-5B



Figura 5C

Figura 5 (Cont.)

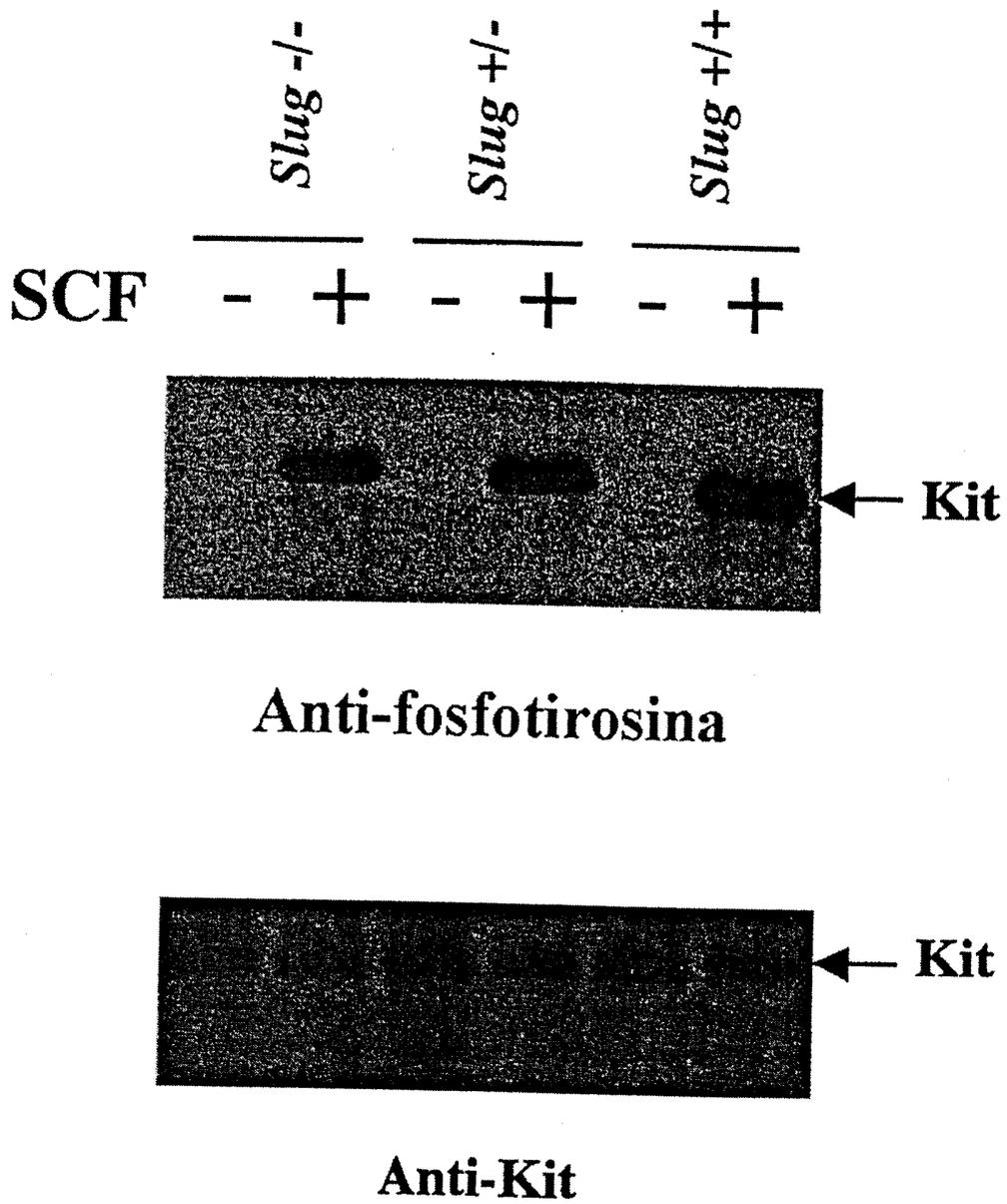


FIG.-6A

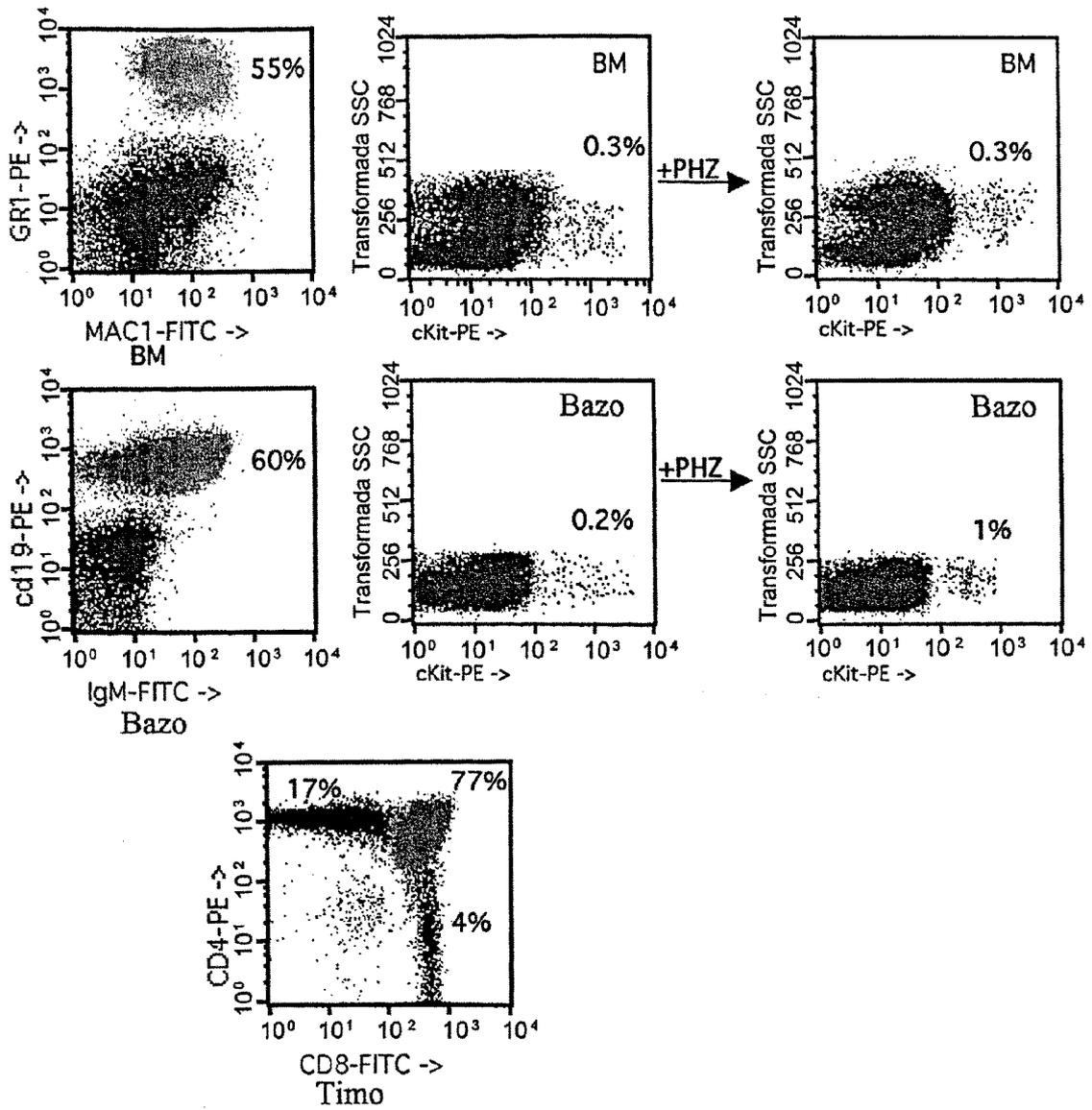


FIG.-6B

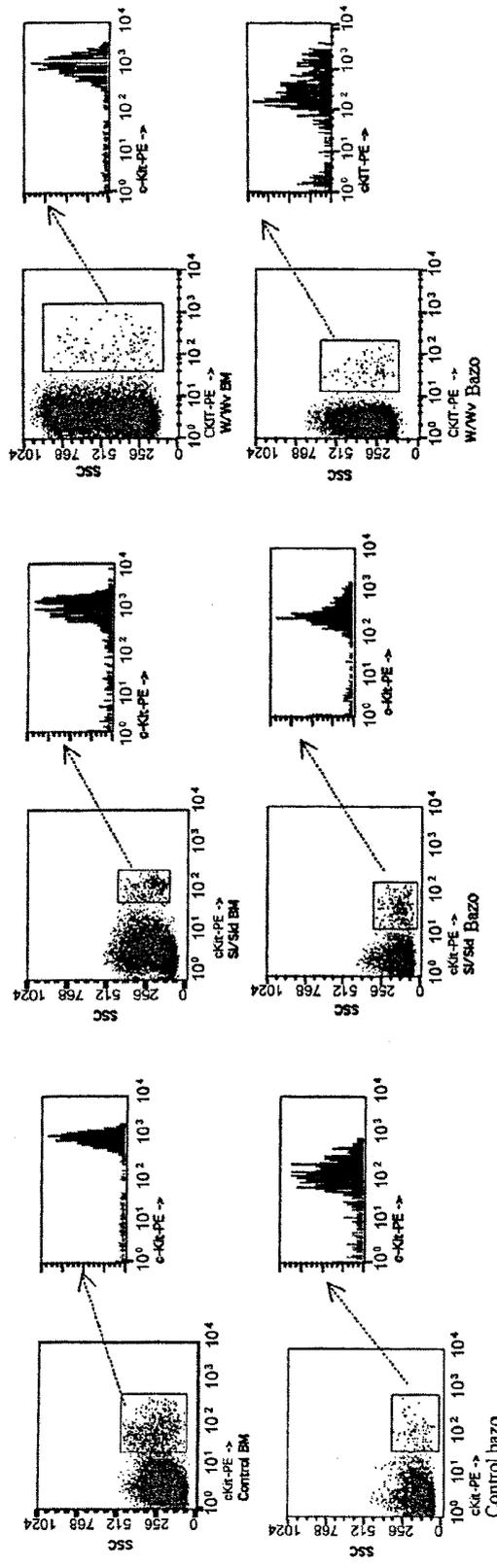


FIG.-7A

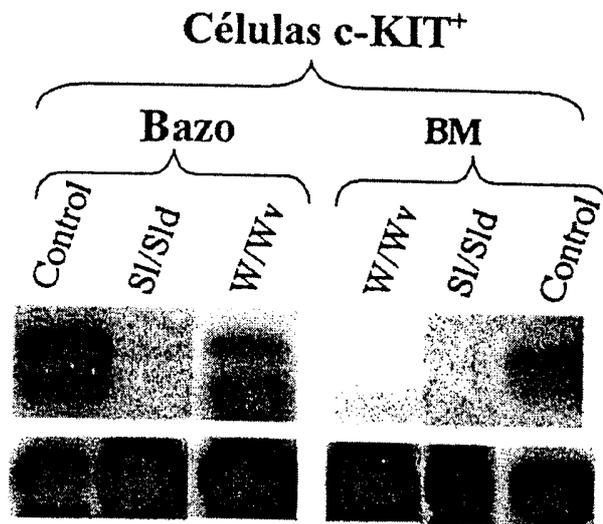


FIG.-7B

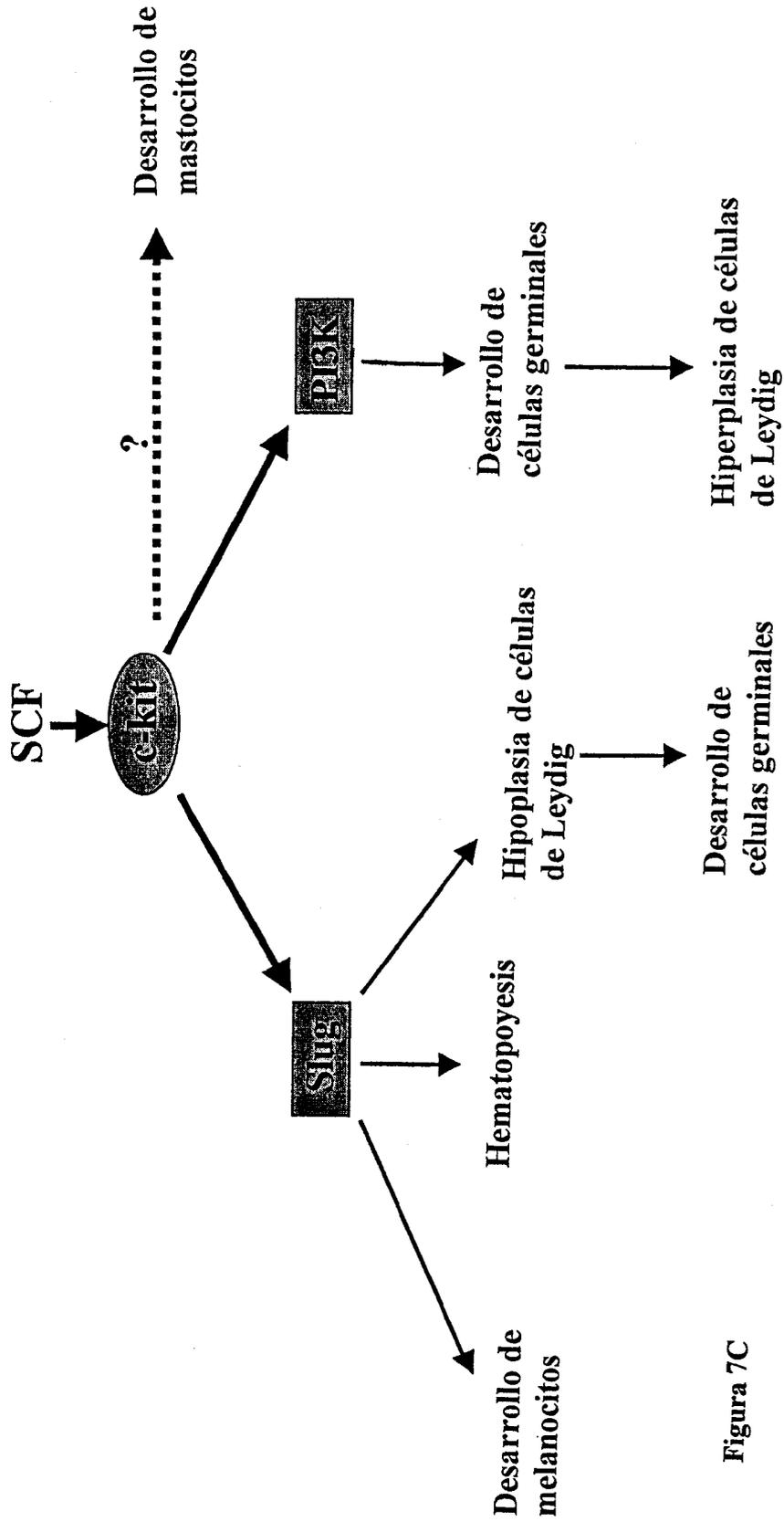


Figura 7C

Figura 7 (Cont.)

ES 2 213 429 A1

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS <110> UNIVERSIDAD DE SALAMANCA	
10	<120> EMPLEO DEL GEN SLUG COMO MARCADOR GENÉTICO DE FUNCIONES MEDIADAS POR SCF (STEM CELL FACTOR) Y APLICACIONES	
	<160> 6 <170> PatentIn version 2.1	
15	<210> 1 <211> 20 <212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido iniciador directo <400> 1 gcctcaaaa agccaaacta	20
25	<210> 2 <211> 20 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido iniciador inverso <400> 2 cacagtgatg gggctgtatg	20
35	<210> 3 <211> 20 <212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido iniciador directo <400> 3 cagctggcca ggctctcgtt	20
45	<210> 4 <211> 18 <212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido iniciador inverso <400> 4 gcgagggcct ccggagca	18
55	<210> 5 <211> 24 <212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial <223> Sonda interna <400> 5 gacacacata cagtgattat ttcc	24
65	<210> 6	

ES 2 213 429 A1

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <223> Sonda interna

<400> 6

tgcaaccgtg tttgctgac cgctccaac

29

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 213 429

② Nº de solicitud: 200102306

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 31/7088, 38/17

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	COHEN, M.E. et al. "Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q", GENOMICS, 1998, Vol. 51, Nº 3, páginas 468-471. Todo el documento.	1-2
X	HEMAVATHY, K. et al. "Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription", MOL. CELL. BIOL., 2000, Vol. 20, Nº 14, páginas 5087-5095. Todo el documento.	1-2
X	HEMAVATHY, K. et al. "Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer", GENE, 2000, Vol. 257, Nº 1, páginas 1-12. Todo el documento.	1-2
A	TAKEDA, S. et al. "Interactions between c-kit and stem cell factor are not required for B-cell development in vivo", BLOOD, 1997, Vol. 89, Nº 2, páginas 518-525. Todo el documento.	1-12
A	BEAUVAIS-JOUNEAU, A. et al. "A novel model to study the dorsolateral migration of melanoblasts", MECH. DEV., 1999, Vol. 89, Nº 1-2, páginas 3-14.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.07.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1