



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

**TRABAJO FIN DE
GRADO**

PAPEL DE LOS GENES DE LA RED MYC-MXD EN LA

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES

EMBRIONARIAS

ROLE OF MYC-MXD NETWORK GENES IN EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION

Autor: Dña. Julia García Espeso

Director: D. Javier León Serrano

Santander, junio 2016

- **ÍNDICE.**

Resumen/Summary.

Introducción.

Objetivos.

Discusión.

1. Proteínas MYC, MAX, MXD.
 - 1.1. Estructura y expresión.
 - 1.2. Regulación.
 - 1.3. MYC como factor de transcripción.
 - 1.4. Red MYC-MAX-MXD.
 - 1.5. Funciones biológicas de MYC.
2. MYC inhibe la diferenciación celular.
 - 2.1. Relación entre diferenciación y cáncer.
 - 2.2. ¿Cómo inhibe MYC la diferenciación?
3. Células troncales embrionarias (ESC).
4. Células pluripotentes inducidas (iPSC).
5. MYC inhibe la diferenciación de células troncales embrionarias.

Bibliografía.

- RESUMEN.

MYC (c-MYC) es un factor de transcripción oncogénico de la familia básico-hélice-lazo-hélice (bHLH), siendo uno de los oncogenes más frecuentemente activados en cáncer humano. Mientras que los mecanismos por los cuales MYC estimula la proliferación han sido estudiados con cierto detalle, los mecanismos por los que MYC bloquea la diferenciación se conocen peor. Se ha visto que MYC bloquea la diferenciación no promoviendo la proliferación, sino reprimiendo genes que inducen la diferenciación. Además, se ha publicado que MYC reprime la expresión de genes de diferenciación en células madre y también su implicación en la reprogramación de células madre pluripotentes, siendo uno de los cuatro factores necesarios para la creación de estas. Por otra parte, no hay nada publicado sobre la expresión de ninguno de los genes de la familia MXD en el control de la pluripotencia. Sin embargo, su implicación es muy probable, ya que se les considera antagonistas de la función de MYC en la transcripción génica. Además, la mayoría de los genes MXD no se expresan en células proliferantes, pero si en diferenciadas. La desregulación de MYC presente en una gran cantidad de cánceres humanos, aumenta la necesidad de conocer a fondo sus funciones y su mecanismo de acción, ya que podría ser diana en terapias anticancerígenas.

Palabras clave: MYC, Diferenciación, Célula madre, MXD.

-SUMMARY.

MYC (c-MYC) is an oncogenic transcription factor of the bHLH family and it is one of the most frequently activated oncogenes in human cancer. Whereas the mechanisms by which MYC stimulates proliferation have been studied in some detail, the mechanisms by which MYC blocks differentiation are much less known. It has been seen that MYC blocks differentiation not by promoting proliferation but by repressing genes that drive cell differentiation. Moreover, it is reported that MYC represses differentiation-associated genes in stem cells and also its involvement in the reprogramming of induced pluripotent stem cells, it is one of the four factors necessary for the creation of these cells. On the other hand, nothing is reported on the expression of MXD family genes in the pluripotency control. However, their involvement is very likely, as they are considered MYC function antagonists in gene transcription. In addition, most MXD genes are not expressed in proliferating cells but yes in differentiated. MYC's deregulation present in a large number of human cancers, increases the need to know thoroughly their roles and their mechanism of action, as that could be a target for anti-cancer therapies.

Key words: MYC, Differentiation, Stem cell, MXD.

- INTRODUCCIÓN.

La familia del oncogén MYC (que comprende c-MYC, N-MYC, y L- MYC) se encuentra dentro del grupo de genes más estudiados de la biología. La profunda implicación de estos genes desregulados en una amplia gama de cánceres humanos ha impulsado gran parte de esta investigación. c-MYC (MYC a partir de ahora, siguiendo la nomenclatura HUGO) es el más expresado de los tres y el más frecuentemente activado en cáncer humano.

Proliferación e indiferenciación, dos de las características fenotípicas de las células cancerígenas, se encuentran entre las múltiples funciones de MYC. De aquí surge la gran trascendencia médica de este gen y la importancia de conocer a fondo su funcionamiento.

-OBJETIVOS.

1. Conocer la estructura de los genes de la red MYC-MAX-MXD y la importancia de sus dominios estructurales, así como las interacciones entre ellos. Con respecto a MYC, conocer su importante papel como factor de transcripción, así como su regulación y sus principales funciones biológicas.
2. Conocer la implicación de MYC en la inhibición de la diferenciación celular y la importancia de esta en la carcinogénesis.
3. Conocer qué son las células troncales embrionarias (ESC).
4. Conocer qué son las células pluripotentes inducidas (iPSC).
5. Conocer la implicación de MYC en la pluripotencia celular.

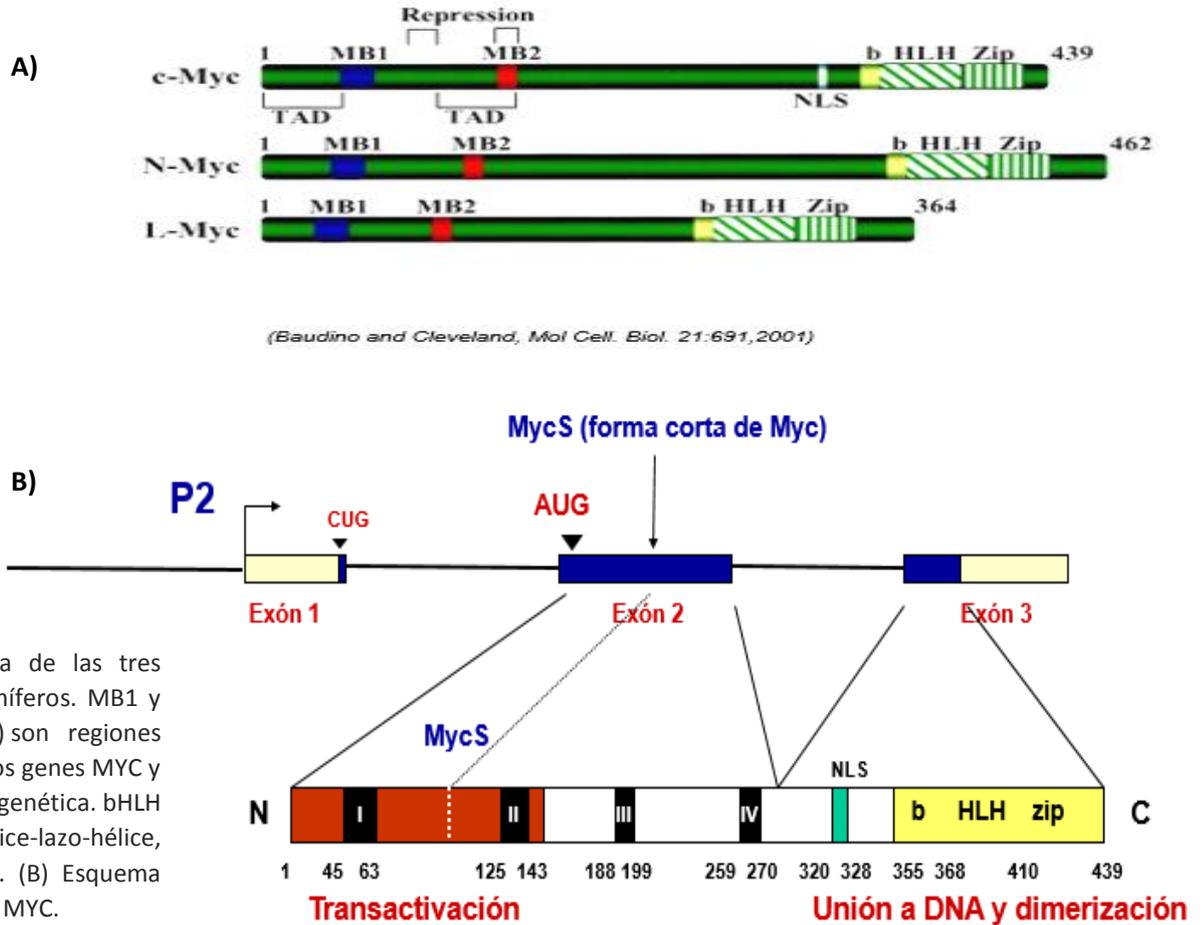
-DISCUSIÓN.

1. PROTEÍNAS MYC, MAX, MXD.

1.1. Estructura y expresión.

El gen MYC tiene 3 exones separados por 2 intrones y está sujeto a una compleja regulación. Tiene varios promotores, de los cuales usa preferentemente el denominado P2, y posee 2 sitios de iniciación de la transcripción. El exón 1 no es codificante, la proteína MYC-S es una forma natural, troncada y poco abundante. Los exones 2 y 3 codifican para una proteína de 439 aminoácidos (Figura 1A). En el extremo N-terminal, formado por 140 aminoácidos y denominado dominio de activación transcripcional (TAD), de la proteína c-MYC residen las funciones de transactivación. En el extremo C-terminal, formado por 90 aminoácidos, existe un dominio hélice-lazo-hélice (HLH) de unión al ADN, con una zona de carácter básico y una cremallera de leucinas (Zip), de interacción con otras proteínas. Este dominio HLH/LZ permite la dimerización con otras proteínas HLH/LZ, como ocurre con la heterodimerización con la proteína MAX y con la unión al ADN en una secuencia específica E-box (CACGTG); la alteración de este dominio destruye la actividad biológica de la proteína, indicando que la unión al ADN es esencial

para su función. Hay cuatro regiones de la proteína muy conservadas en toda la escala filogenética y en todos los genes MYC: MBI, MBII, MBIII y MBIV. Las regiones MBI y MBII son importantes para la transactivación y transrepresión, mientras que MBIII tiene función de resistencia a apoptosis (1,3) (Figura 1B).



1.2. Regulación.

La regulación del promotor de MYC es compleja, conociéndose mejor su inducción que su represión. Su transcripción es inducida por factores de crecimiento y reprimida por TGF-beta/SMAD3 y FOXO a través de factores de transcripción. La proteína MYC es de vida media corta y su degradación también está regulada. Hay ligasas de ubiquitina que la destruyen. La GSK3 fosforila la Thr-58 haciendo inestable MYC y favoreciendo su degradación por el proteasoma. Mutaciones en Thr-58, frecuentes en los linfomas de Burkitt, hacen a la proteína resistente a la degradación. Cuando hay activación del oncogén RAS, la ERK fosforila la Ser62 aumentando la estabilidad de MYC, es decir, contribuye a su sobre-expresión (1,3).

1.3. MYC como factor de transcripción.

Se han descrito cerca de 1000 genes regulados por MYC en el genoma humano. Es difícil distinguir entre genes diana directos de MYC y otros que se inducen indirectamente como resultado de las acciones biológicas de este. El 5-15% de los promotores humanos presentan sitios de unión de la proteína MYC, y el 90% de ellos se encuentra formando heterodímeros con MAX. MYC se une al 50-60% de las secuencias E, situadas mayoritariamente en genes activos; sin embargo, sólo el 10% de los genes con MYC unido al promotor son regulados en respuesta a MYC. De los genes regulados por MYC, un 60% son activados, mientras que el 40% restante es reprimido (1,3) (Figura 2A, 2B).

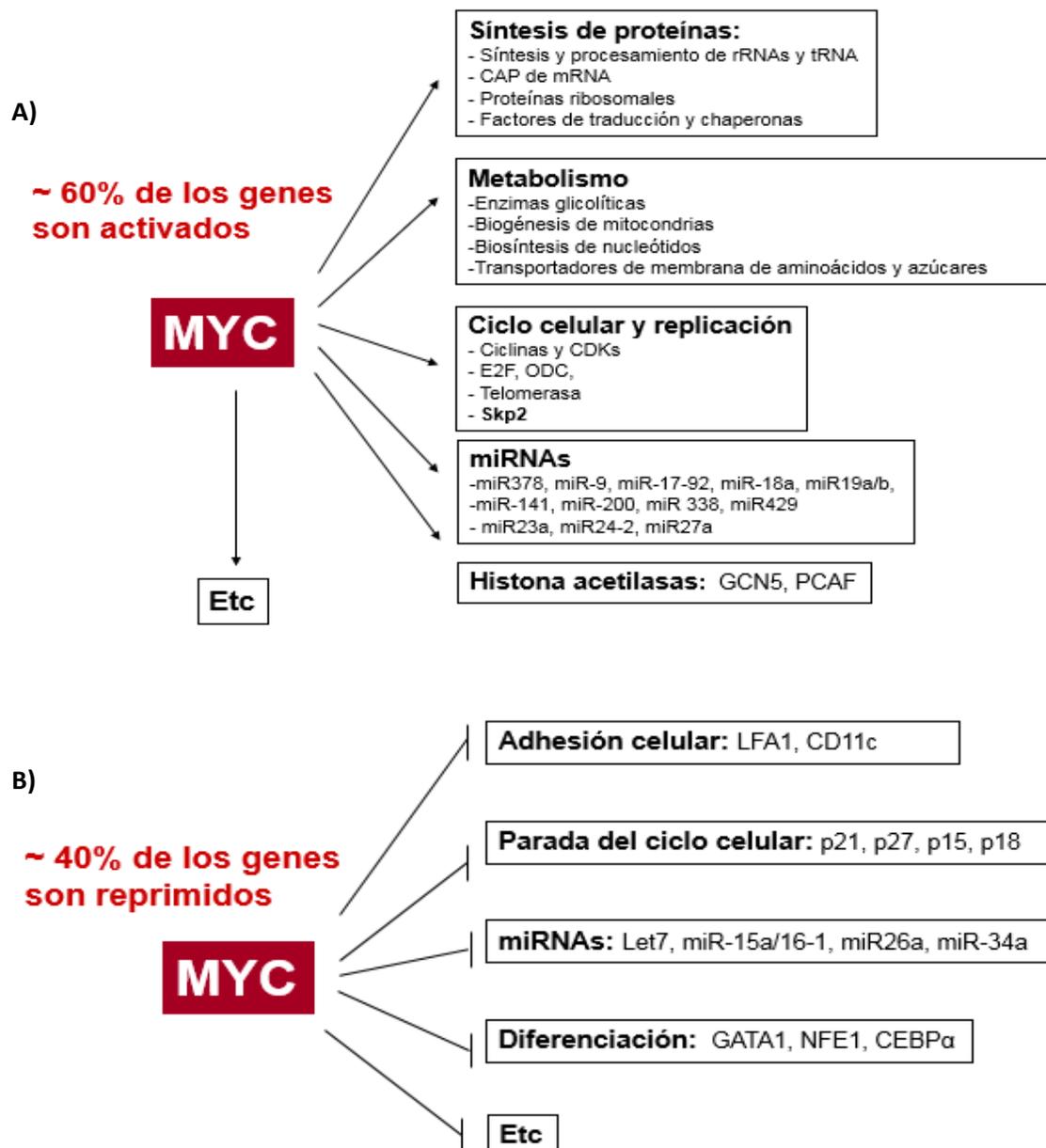


Figura 2: (A) Distintas implicaciones en el funcionamiento celular de los genes activados por MYC. (B) Distintas implicaciones en el funcionamiento celular de los genes reprimidos por MYC.

La proteína MAX interacciona con la proteína MYC para formar un heterodímero MYC-MAX, complejo que se une luego al ADN (Figura 3). La proteína MYC tiene una vida media corta, mientras que la de la proteína MAX es mayor; por ello, en muchos sistemas, la proteína MYC es el componente limitante del heterodímero, lo cual es clave en la regulación de la transcripción génica en diversos mecanismos. La activación de la expresión génica por MYC-MAX se lleva a cabo tras la unión del dímero a las E-box, y el reclutamiento de proteínas que acetilarán las histonas, activando así la expresión. Por lo tanto, MYC es a la vez un factor de transcripción y un regulador del estado de la cromatina. Por otro lado, no está claro como MYC causa represión transcripcional. Al parecer, lo hace uniéndose a otros factores transcripcionales y no a su E-Box. Se postulan Smad2, Miz1 y NF-Y como los co-factores represores transcripcionales (1,2,4).

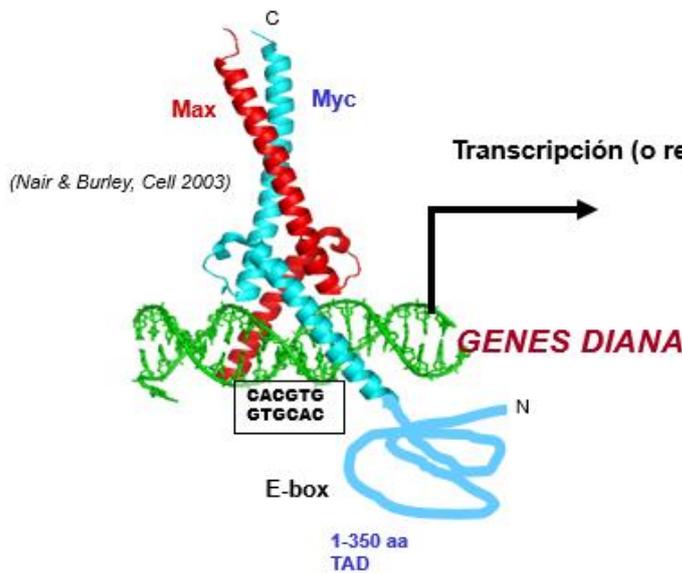


Figura 3: estructura tridimensional de las proteínas MYC y MAX y su unión a la región bHLHZ del ADN. No se conoce la estructura de la parte N-terminal de MYC (unos 350 aminoácidos).

1.4. Red MYC-MAX-MXD.

Esta red de factores de transcripción comprende: la familia de proto-oncoproteínas MYC, MAX y la familia de proteínas MXD (anteriormente conocidas como MAD). Esta última está formada por MAD1, MXI1, MAD3, MAD4 y MNT. Todas ellas contienen en el extremo N-terminal un dominio de interacción Sin3 (SID), gracias al cual llevarán a cabo sus funciones (2) (Figura 4A).

Estas proteínas constituyen un subgrupo de la familia de reguladores transcripcionales con el dominio bHLHZ y pueden formar múltiples combinaciones de dímeros gracias a interacciones por medio de este. MAX dimeriza alternativamente con MYC o MXD y dichos dímeros se unen al ADN en las secuencias E-box, esta dimerización es esencial para que las proteínas puedan llevar a cabo su función. MAX también puede dimerizar consigo mismo, pero su unión al ADN carece de efecto (1,2).

Es así como las proteínas MXD antagonizan la función de MYC, al competir con este por la disposición de MAX y con los dímeros MYC-MAX por los sitios de unión disponibles, restringiendo el acceso funcional de MYC al ADN. Mientras que las proteínas MYC promueven el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas y la transcripción génica,

las proteínas MXD reprimen dicha actividad mediante el reclutamiento de deacetilasas de histonas. Es por esto que se piensa que funcionan como antagonistas. El balance entre estas dos familias de proteínas es un determinante esencial en la proliferación celular (1,2,4) (Figura 4B).

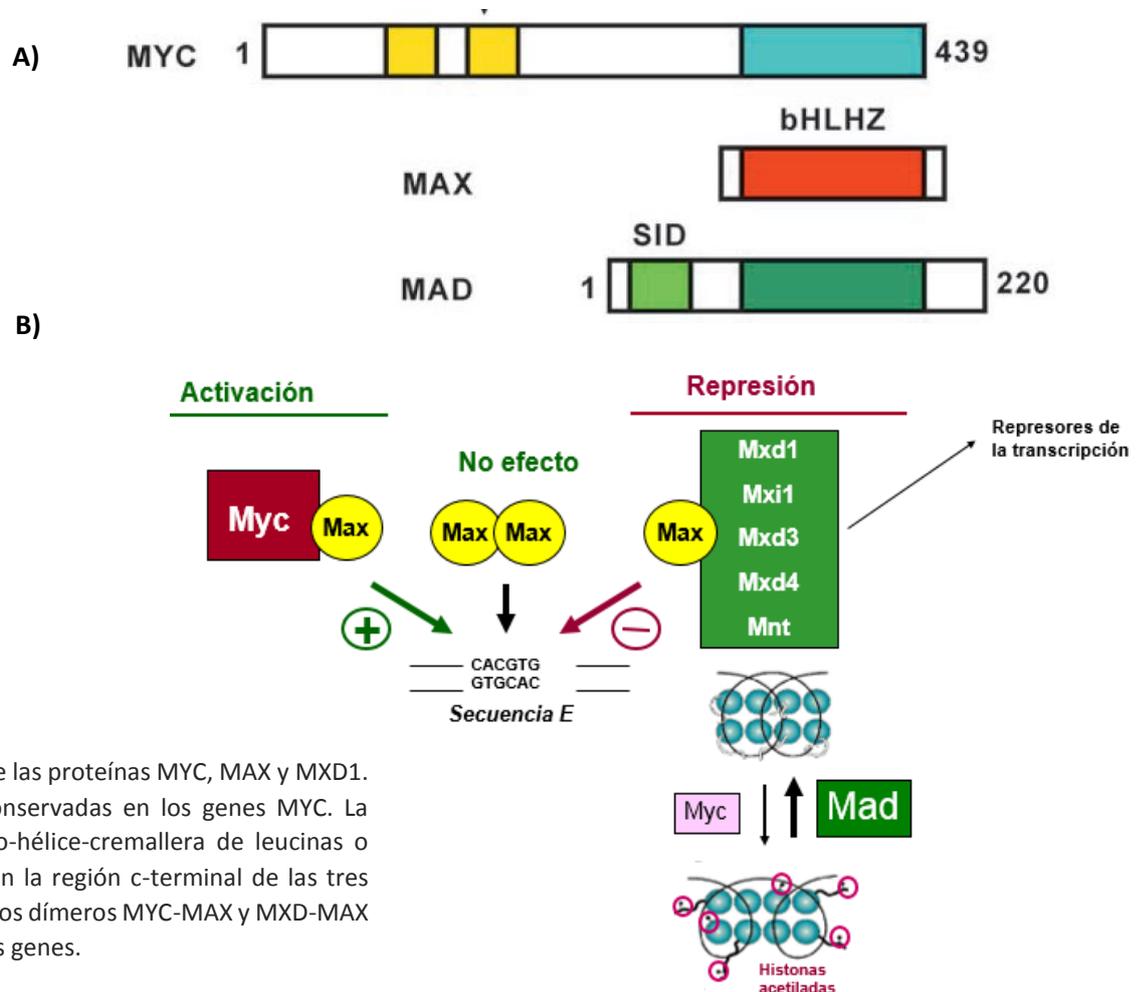


Figura 4: (A) Esquema de las proteínas MYC, MAX y MXD1. En amarillo regiones conservadas en los genes MYC. La región básica-hélice-lazo-hélice-cremallera de leucinas o bHLHZ está coloreada en la región c-terminal de las tres proteínas. (B) Efecto de los dímeros MYC-MAX y MXD-MAX sobre la expresión de los genes.

1.5. Funciones biológicas de MYC.

El proto-oncogén MYC participa en varios procesos celulares (Figura 5):

Progresión del ciclo celular y replicación: MYC promueve la progresión del ciclo celular y la replicación, puede inducir proliferación de células quiescentes. Los genes de la Ciclina D2, Ciclina E, E2F, CDK4 y SKP2, importantes en la progresión del ciclo celular, son inducidos por MYC. En cambio, los genes p27, p21 y p15 que inhiben el ciclo celular son inhibidos por MYC.

Glucolisis y génesis de mitocondrias: MYC estimula las enzimas glucolíticas, en las células que expresan altos niveles de MYC la LDH está activada y el piruvato tiende a producir lactato. De hecho, MYC parece ser el principal responsable del efecto Warburg en los tumores con desregulación de MYC. También estimula la glutaminasa y el transportador de glutamina, aumentando la síntesis de glutamato, a su vez es un intermediario del ciclo de Krebs y del metabolismo biosintético.

Síntesis de proteínas y tamaño celular: MYC aumenta la síntesis de proteínas. Las proteínas mitocondriales y los genes de los ARNr, así como los de muchas proteínas del ribosoma, son genes dianas del MYC.

Inestabilidad genómica: MYC induce endorreplicación y síntesis “ilegítima” de ADN (es decir, en ausencia de división celular), también induce inestabilidad cariotípica y aneuploidía e inhibe el arresto G2 tras la irradiación de la célula.

Inmortalización: MYC favorece la inmortalización de las células tumorales. El gen de la telomerasa es un gen diana del MYC, y este parece ser uno de los principales mecanismos de este efecto de MYC.

Angiogénesis: MYC reprime genes implicados en la adhesión célula-célula y célula sustrato, aumenta la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y reprime la trombospondina (una proteína de matriz extracelular que bloquea la angiogénesis).

Inhibición de la diferenciación: la sobre-expresión de MYC anula la diferenciación que normalmente induciría un agente diferenciador. MYC, junto con otros tres factores de transcripción, es capaz de reprogramar células diferenciadas a un estado de célula pluripotencial para generar las “induced pluripotent stem cell” (iPSC). En este trabajo nos centraremos en esta importante función de MYC.

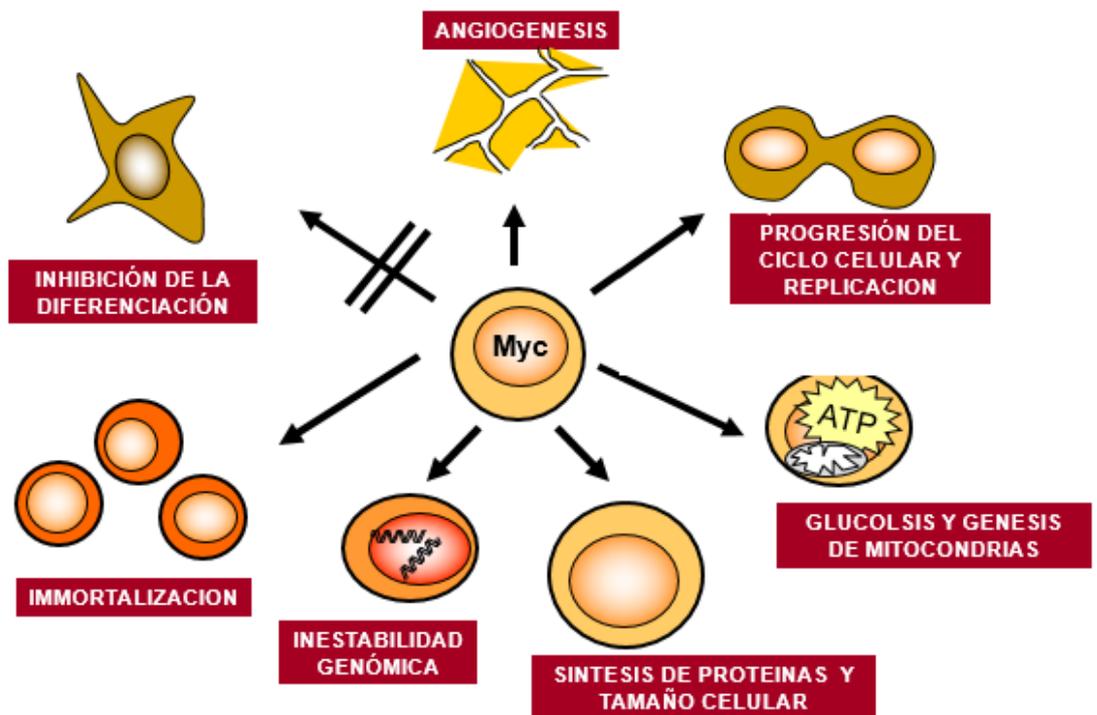


Figura 5: diferentes funciones biológicas de MYC. Todas ellas son estimuladas por la acción de esta proteína, excepto la diferenciación, la cual inhibe.

2. MYC INHIBE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

La diferenciación de una célula animal consiste en la reprogramación genética de una célula troncal, y supone la activación y represión de miles de genes en un proceso secuencial (ordenado en tiempo y espacio), hasta dar una célula totalmente diferenciada (10).

La diferenciación depende de factores de transcripción que mantienen las células precursoras en un estado indiferenciado. Para que la renovación de un tejido tenga lugar, es necesario que las células madre del mismo, o células precursoras que aún no están terminalmente diferenciadas, se dividan para dar otra célula precursora y una célula más diferenciada o comprometida hacia la diferenciación. Aunque esto está controlado genéticamente, poco se sabe de los mecanismos que controlan esta división asimétrica (10).

La inhibición de la diferenciación celular fue uno de los primeros efectos biológicos que se describió de MYC (10). Sin embargo, su papel en este proceso sigue siendo a día de hoy un tema en discusión. Estudios demuestran que la expresión ectópica de MYC bloquea la diferenciación en una amplia variedad de tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* (8).

MYC y MAX disminuyen durante la diferenciación de varias líneas celulares; sugiriendo que la actividad de MYC se disminuye por la disminución de sus niveles de expresión, así como por la ausencia de su compañero de dimerización (11) (Figura 6). MYC también desciende a niveles muy bajos durante la salida del ciclo celular (9). Las proteínas MXD típicamente aumentan cuando MYC baja. Tienen un papel importante en la diferenciación celular antagonizando a MYC. Probablemente inician o refuerzan la salida del ciclo celular, asociada con la diferenciación terminal. Las células diferenciadas presentan altos niveles de estas proteínas. Se ha visto que, en ausencia de MXD1, la diferenciación *in vitro* de granulocitos se retrasa y estas células permanecen dentro del ciclo celular llevando a cabo divisiones adicionales (9).

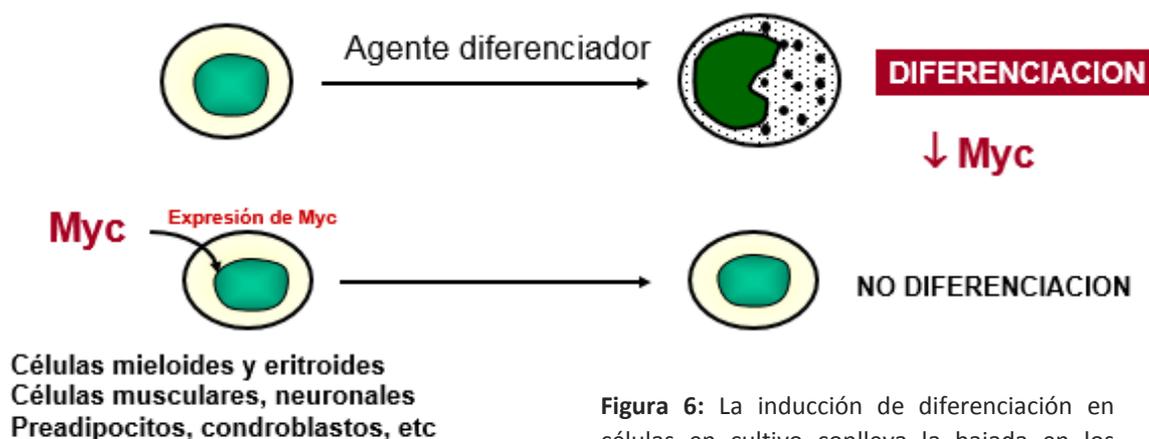


Figura 6: La inducción de diferenciación en células en cultivo conlleva la bajada en los niveles de MYC. Sin embargo, aquellas células en las que se provoca una alta expresión de MYC permanecen en estado indiferenciado.

A pesar de lo dicho anteriormente, *in vivo*, MYC parece tener el paradójico efecto de aumentar la diferenciación de algunos tejidos, como el epitelial o el linfoide (10).

MYC induce la diferenciación prematura de los queratinocitos, puede estimular tanto la proliferación como la diferenciación terminal. Se ha propuesto que el hecho de que MYC induzca la diferenciación, sea un dispositivo a prueba de fallos que protege a los queratinocitos de la proliferación incontrolada. Este dispositivo protegería a la epidermis de los potenciales efectos oncogénicos de la activación sostenida de MYC (6).

La sobreexpresión de MYC induce el engrosamiento de la epidermis (hiperplasia) y la acumulación de células cornificadas y anucleadas en el estadio final de la diferenciación terminal (hiperqueratosis). Se cree que MYC estimula la diferenciación de queratinocitos reduciendo la adhesión celular y movilizándolo a las células progenitoras (7).

2.1. Relación entre diferenciación y cáncer.

Se tiende a creer que la estimulación de la proliferación causada por MYC es la única responsable de su efecto oncogénico. Sin embargo, la importancia de la inhibición de la diferenciación como mecanismo oncogénico de MYC viene ilustrado por los experimentos en ratones transgénicos con genes MYC inducible por tetraciclina o activable con tamoxifeno. Dependiendo del promotor proximal usado el MYC se puede expresar en distintos tejidos y así se obtienen linfomas, hepatomas, osteosarcomas, leucemias mieloides y papilomas/hiperplasia de piel. Cuando se inactiva o silencia MYC estos tumores remiten, y esta remisión en una mayoría de tumores se debe a la re-diferenciación de las células previamente indiferenciadas y con altos niveles de MYC (6) (Figura 7).

En el cáncer se ve alterado no sólo el control de la proliferación sino también el de la diferenciación (10).

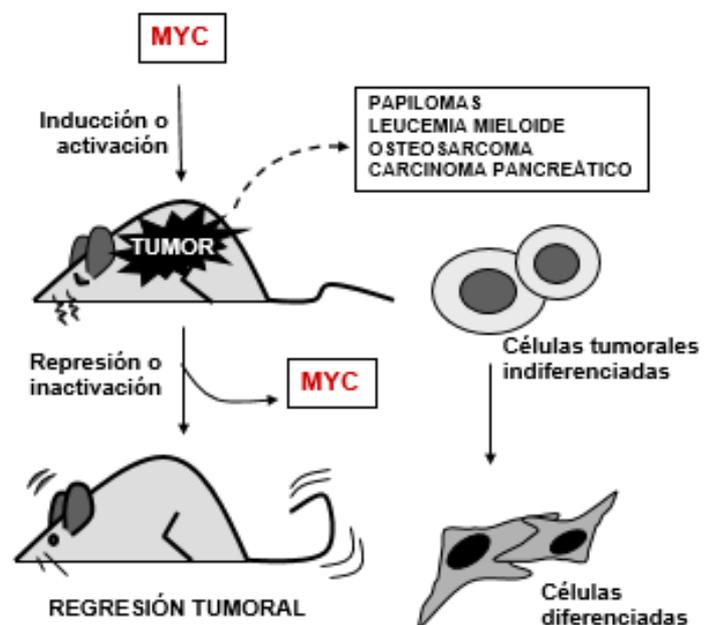


Figura 7: En los ratones en los que se lleva a cabo la activación de MYC se forman tumores a expensas de células tumorales indiferenciadas. Estas células se reconvierten en células diferenciadas al inactivar MYC, consiguiéndose así una regresión tumoral.

(Leon et al., Cell Cycle, 2009)

2.2. ¿Cómo inhibe MYC la diferenciación?

En contraste con los muchos estudios existentes sobre otras funciones biológicas de MYC, los mecanismos mediante los que inhibe la diferenciación no han sido muy estudiados. Las células diferenciadas terminalmente en tejidos adultos han perdido el potencial proliferativo. La diferenciación terminal suele ir de la mano de la salida permanente del ciclo celular. Consecuentemente, se ha argumentado que MYC inhibe la diferenciación previniendo la salida del ciclo celular y manteniendo a las células en su estado proliferativo. Un gran número de genes inducidos por MYC son reguladores positivos del ciclo celular (ciclina D2, ciclina E1, CDK4), mientras que inhibidores del ciclo celular como p15^{INK4B}, p21^{WAF1} y p27^{KIP1} son reprimidos. Además, MYC regula positivamente muchos genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, biogénesis y mitocondrias, ARNts, ribosomas y síntesis de proteínas. Finalmente, MYC también es responsable de la replicación de ADN. Así, una célula con altos niveles de MYC estará preparada para la activación de la proliferación (11).

Sin embargo, a pesar de estos hechos, la probabilidad de que MYC ejerza la inhibición de la diferenciación mediante mecanismos ajenos al ciclo celular ha recibido poca atención (11).

Estudios en modelos de células eritroides han demostrado que MYC inhibe la diferenciación inducida por p27, sin embargo, no puede abolir la parada de la proliferación que este produce. De esto se deduce que MYC inhibe la diferenciación por mecanismos independientes de la parada de la proliferación inducida por p27. Por lo que, sus efectos sobre la diferenciación, no están asociados a sus efectos sobre la progresión del ciclo celular (9).

MYC podría bloquear la diferenciación mediante la regulación de múltiples genes, aumentando los genes requeridos para mantener el estado indiferenciado y reprimiendo los genes que llevan a la diferenciación. Sin embargo, la mayoría de estos mecanismos siguen siendo desconocidos (11).

Otro mecanismo por el que MYC podría inhibir la diferenciación es antagonizando la actividad transcripcional de las proteínas MXD (activadoras de diferenciación). Compitiendo por la unión a los sitios E-box o disminuyendo sus niveles (11).

3. CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (Embryonic Stem Cells, ESC).

Se define como células troncales embrionarias (o células madre embrionarias) aquellas que:

- a) Tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin diferenciarse, conservando un cariotipo normal.
- b) Conservan la propiedad estable de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo), aún después de un prolongado periodo de cultivo.

Las células pluripotentes de la masa interna de un blastocito obtenido por técnicas de fecundación *in vitro* se consideran troncales y son las que se usan como tales en investigación (12).

Para la obtención de las ESC, la membrana exterior del trofoectodermo del blastocisto se separa selectivamente del resto de células mediante anticuerpos específicos, de tal forma que las células de la masa interna se pueden aislar y colocar sobre un plato de cultivo cubierto con una lámina de fibroblastos embrionarios de ratón previamente inactivados. Las células de la periferia de las colonias celulares que se forman en el plato de cultivo se aíslan y se cultivan de nuevo en placas hasta lograr obtener un cultivo homogéneo de células. Estas células se seleccionan una a una y se cultivan de nuevo hasta formar colonias de líneas celulares individuales. Esas células constituyen lo que se conoce como células troncales embrionarias (12) (Figura 8).

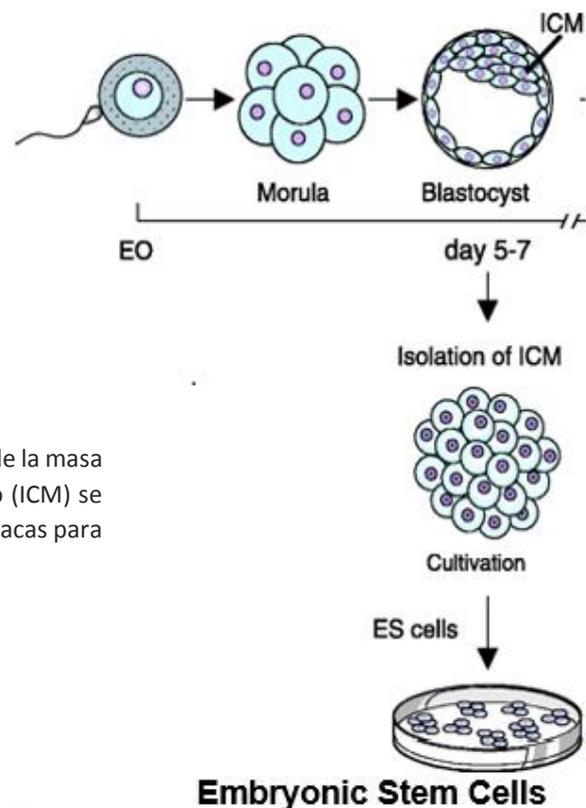


Figura 8: Las células de la masa interna del blastocito (ICM) se aíslan y cultivan en placas para la obtención de ESC.

Hasta hace unos años, todos los estudios habían sido llevados a cabo en células troncales embrionarias murinas (mESC). Más, recientemente se han conseguido cultivar células humanas. Sólo las derivadas de embriones producidos por fecundación *in vitro* parecieran mantener la mayoría de las propiedades pluripotenciales establecidas para las células madre embrionarias de ratón. Estas células humanas son denominadas comúnmente células madre embrionarias humanas, aunque por razones éticas su capacidad para reingresar a la embriogénesis y/o colonizar la línea germinal no ha sido probada. Por tanto, en rigor se las debería denominar “células humanas parecidas a las células madre embrionarias” (hES like cells) (13).

4. CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSC).

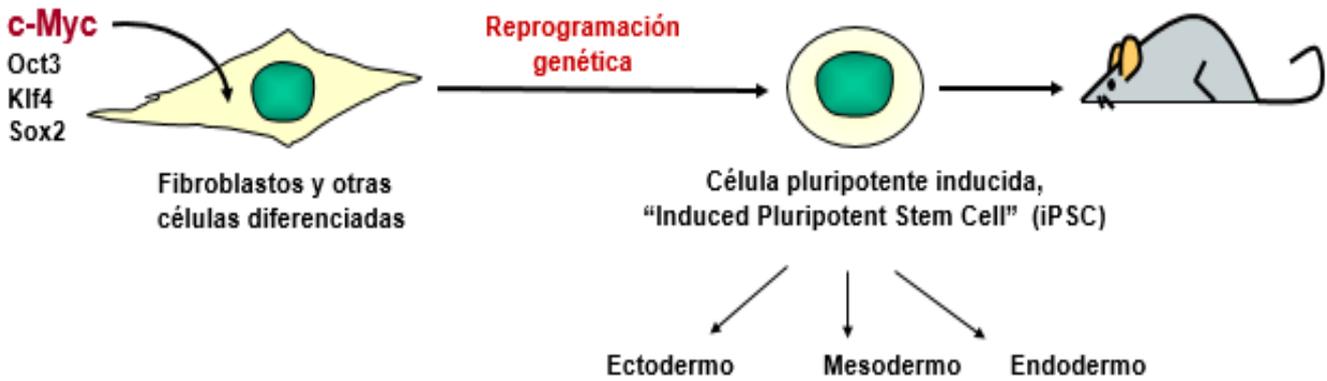


Figura 9: MYC, OCT3, KLF4 y SOX2 son los cuatro factores de transcripción necesarios para que una célula diferenciada sufra una reprogramación genética y vuelva al estado pluripotencial (iPSC). Estas células son capaces de diferenciarse en células procedentes de las tres capas germinales embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), de formar teratomas y ratones quimera.

Hasta hace unos años, el desarrollo era considerado un proceso irreversible, se pensaba que las células diferenciadas no podían volver al estado pluripotencial. Sin embargo, en 2006, los estudios de Yamanaka (15) demostraron que es posible reprogramar una célula madura y hacer que vuelva a ser pluripotente. Estos se llevaron a cabo con fibroblastos de ratón y usando retrovirus como vectores de expresión que vehiculizaban e inducían la expresión de 24 genes exógenos, se encontró que cuatro de ellos (codificadores de factores de transcripción) eran esenciales y suficientes para reprogramar estas células: OCT3/4, SOX2, KLF4 y MYC (OSKM). A las células obtenidas se las denominó células pluripotentes inducidas o “induced pluripotent stem cells” (iPSC). Un año más tarde, se consiguieron generar iPSC humanas usando la misma combinación de factores de transcripción (14) (Figura 9).

La proteína MYC tiene muchas dianas que favorecen la proliferación y transformación, muchas de las cuales tienen un papel importante en la generación de iPSC. Entre otros efectos, MYC provoca una reorganización de la cromatina, con acetilación de las histonas, lo que permite a los factores OCT3/4 y SOX2 su unión con el ADN (15).

Estas células reprogramadas tienen las mismas características que las ESC en términos de perfiles de expresión y perfiles epigenéticos. Además, estas células son capaces de diferenciarse en células procedentes de las tres capas germinales embrionarias, de formar teratomas y ratones quimera. Son igual de competentes que las ESC en cuanto a diferenciación se refiere (14, 16).

La tecnología de las iPSC ha abierto un nuevo camino en la investigación de la curación de enfermedades. Desde su descubrimiento, el estudio de estas células ha mostrado un gran progreso. Estas pueden ser usadas de dos maneras: en ensayos de medicina regenerativa, en estudios farmacológicos y para conocer los mecanismos moleculares de la pluripotencia y de la diferenciación celular (14).

5. MYC INHIBE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS.

MYC está implicado en la diferenciación celular y, también se sabe que es un potente oncogén con papel en la regulación transcripcional del metabolismo, la diferenciación, el control del tamaño y el ciclo celular. Todas estas funciones son relevantes para el mantenimiento y la estabilización de las células troncales pluripotenciales. Sin embargo, a pesar de tener clara la implicación de MYC en este proceso, el mecanismo por el cual lleva a cabo estas funciones no está claro. A continuación, repasaremos los datos que demuestran la implicación de MYC en la diferenciación y el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células troncales (20).

1. La pérdida de MYC y N-MYC interrumpe la pluripotencialidad de las ESC y desencadena la diferenciación hacia los distintos linajes celulares. Uno de los experimentos llevados a cabo para analizar la función de MYC en las ESC, consistió en crear líneas de mESC sin expresión de MYC y N-MYC. En estas líneas se apreció una eliminación de la auto-renovación y una marcada pérdida de la pluripotencia, así como una inhibición del crecimiento celular. La pérdida de estos dos genes, al tiempo, también conduce a una rápida diferenciación de estas células en los derivados de las tres capas germinales (mesodermo, ectodermo, endodermo). Consistentemente la pérdida de MYC conduce a la expresión de genes asociados a diferenciación y, por el contrario, los marcadores de pluripotencialidad disminuyen. Este descenso es gradual en los primeros estadios de la diferenciación, en los que ambos marcadores se ven co-expresados. La mayoría de las células expresan marcadores de diferenciación temprana, como son BMP4 o GATA6, mientras que, los marcadores de diferenciación tardía no se ven expresados. Todos estos datos sugieren que la función predominante de MYC en las ESC es la supresión de los primeros estadios de la diferenciación (17).

2. MYC y N-MYC no sólo son esenciales para el desarrollo celular tardío, también lo son para el desarrollo temprano embrionario. Los embriones formados a partir de las mESC en las cuales se han eliminado los genes MYC muestran graves fallos durante el desarrollo. Si consiguen desarrollarse y llegar a la gestación media, son anormales y con grandes defectos (17).

Es importante matizar que en los embriones en los que se ha eliminado sólo uno de los genes MYC (ya sea MYC o N-MYC) no se aprecian estas alteraciones del desarrollo temprano, lo que nos lleva a pensar en la alta redundancia funcional existente entre los miembros de esta familia durante esta fase (17). Sin embargo, a medida que el desarrollo avanza, este solapamiento desaparece y se observan defectos específicos de tejido con la eliminación de MYC o N-MYC. Estos datos apuntan la posibilidad de que los dos miembros de la familia no tengan funciones equivalentes (20).

3. Las células madre hematopoyéticas (“hematopoietic stem cells”, HSC) expresan iguales niveles de MYC y N-MYC y la eliminación de ambos resulta en pancitopenia y rápida letalidad. La eliminación específica de MYC causa letalidad embrionaria y graves defectos a nivel hematológico y vascular, las células madre hematopoyéticas

defectuosas se acumulan debido a defectos de diferenciación nicho-dependientes (18). La eliminación de N-MYC en las células troncales neuronales (NSC) lleva a un crecimiento cerebral desorganizado, atribuible en parte a la alteración en el ciclo celular de estas (17).

4. Los genes que disminuyen por la pérdida de MYC nos sugieren el importante papel de este en el metabolismo celular, la arquitectura de la cromatina y la señalización por el factor LIF (empleado para el cultivo de las mESC). Las ESC pueden mantenerse como poblaciones pluripotentes y auto-renovables gracias a la señal del factor LIF/STAT3, que regula la expresión de MYC. La retirada de este factor hace que las proteínas MYC sean fosforiladas y degradadas. Sin embargo, la expresión forzada de MYC permite la auto-renovación y el mantenimiento de la pluripotencialidad independientemente del factor LIF (18). Otros genes disminuidos por la pérdida de MYC incluyen aquellos envueltos en múltiples aspectos del metabolismo celular sugiriendo un papel clave en el mantenimiento de un estado metabólico activo que puede ser esencial para la auto-renovación de las ESC. También interacciona con deacetilasas, encargadas de regular la eucromatina, sugiriendo un papel de MYC en el remodelado de la arquitectura de la cromatina (17) (Figura 10).

(Chapell & Dalton, Cold Spring Harb Perspect Med, 2013)

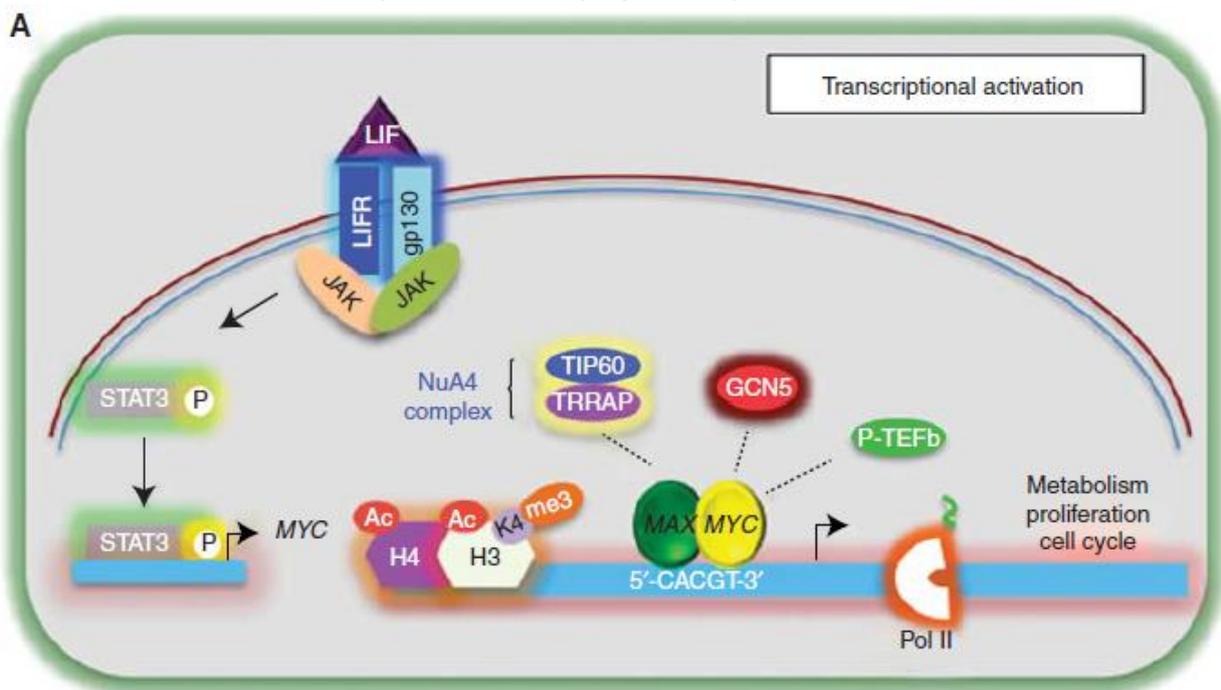


Figura 10: La señal de LIF/STAT3 estimula la transcripción de MYC, el cual heterodimeriza con MAX y amplifica la transcripción de los genes diana. MYC promueve la elongación transcripcional poniendo a la ARN polimerasa II en los sitios de inicio de transcripción. También promueve la accesibilidad de la cromatina mediante el reclutamiento de componentes del complejo MLL histona metiltransferasas, como GCN5, e interaccionando con deacetilasas, como el complejo NuA4.

5. MYC regula la auto-renovación de ESC mediante la promoción de la progresión en la fase S. Los genes MYC tienen papeles bien caracterizados en el control del ciclo celular en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo las células madre. La pérdida de MYC lleva a un considerable descenso en la población de células en fase S con un concomitante incremento de la población de células en fase G_0-G_1 (17).

Las mESC pueden entrar en un estado de quiescencia donde la expresión de MYC es baja. Esta parada del ciclo celular no afecta a la pluripotencia de la célula. A su vez, el silenciamiento de MYC hace que las mESC entren en parada del ciclo celular, con un incremento en la duración de la fase G_0 del ciclo celular. La quiescencia inducida por la falta de MYC puede ser revertida con la re-expresión del gen. Estas células reanudan la proliferación y son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales, es decir, son totalmente pluripotentes (Figura 11). El conjunto de los datos publicados sugiere que el mantenimiento de la pluripotencia es MYC-independiente y puede ser desacoplado de la proliferación celular y la auto-renovación MYC-dependientes (19).

(Shu & Pei, Cell, 2016)

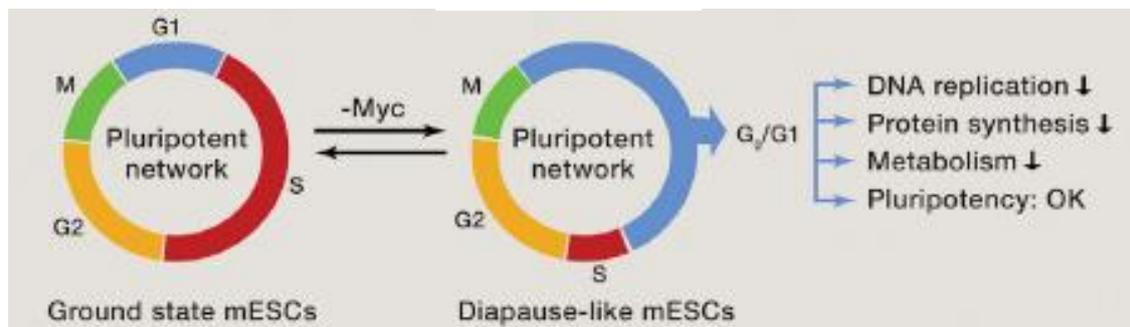


Figura 11: Las ESC tienen un rápido ciclo celular con una fase G_1 corta, sin embargo, pueden entrar en parada G_0 tras la depleción de la actividad de MYC.

Este estado quiescente temporal y reversible ha sido comparado con una respuesta protectora a condiciones ambientales desfavorables. Los embriones en estado de quiescencia y las mESC con la expresión de MYC disminuida muestran una quiescencia biosintética y los perfiles de transcripción son comparables. En resumen, el déficit de MYC induce en las mESC un estado mecánico y funcionalmente similar a la quiescencia en los embriones, así que estas podrían servir como un modelo *in vitro* para estudiar los mecanismos moleculares de inducción, mantenimiento o salida del estado de quiescencia (19).

Aún no está claro si otras células madre pluripotentes entran en estados de quiescencia similares dependientes de MYC como respuesta a situaciones desfavorables ambientales. La eliminación de MYC en tejidos específicos en ratones genéticamente modificados, indican que esta familia de genes está en general implicada en supervivencia de células madre, proliferación, diferenciación y homeostasis de tejidos. En el sistema hematopoyético la pérdida de MYC induce una rápida apoptosis de las células troncales hematopoyéticas (HSC), mientras que las HSC “dormidas” se ven

menos afectadas. Por esto, es posible que en otras células madre o incluso en las células madre cancerígenas este estado de quiescencia con baja actividad de MYC juegue también un papel protector ante situaciones de estrés (19).

Dado que MYC es un oncogén humano muy prevalente, su posible papel protector en las células madre cancerígenas es especialmente interesante y necesita de una mayor investigación. MYC ha sido ampliamente explorado como potencial terapia anticancerígena. Mientras que en muchos casos estas terapias son efectivas e inducen apoptosis y regresión tumoral, no se conoce como la inhibición de MYC puede inducir que una fracción de células tumorales entren en estado de quiescencia similar al de las mESC “dormidas”. Las células en este estado serían más resistentes al tratamiento terapéutico y podrían volver rápidamente a su actividad tumoral después de la retirada de los agentes terapéuticos. Todos estos hechos necesitan de un mayor estudio, dada su posible aplicación en el tratamiento contra el cáncer (19).

6. La pérdida de MYC resulta en un modesto incremento de la apoptosis en ESC. Esto demuestra su papel como factor de supervivencia en estas células (17).

7. MYC también regula los microARN, que se sabe que tienen diversos papeles incluyendo la regulación de la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. En las ESC hay microARN que controlan la progresión del ciclo celular, la diferenciación y la determinación de linaje. Recientes estudios sugieren que MYC regula la expresión de muchos microARN y que influye en la biología de las ESC en parte a través de la regulación de estos (17).

8. Como se ha descrito arriba (sección 4), MYC es uno de los cuatro factores de transcripción necesarios para crear iPSC. Múltiples estudios han demostrado que la reprogramación también ocurre en ausencia de MYC. Sin embargo, el proceso es mucho más lento y menos eficiente en comparación con aquellos que sí contienen los cuatro factores. MYC es el factor que tiene un efecto más potente en la expresión de genes y parece que ejerce su acción en el inicio del proceso de reprogramación. Parece que sirve como potenciador del resto de factores, ya que se une a la cromatina inaccesible y recluta deacetilasas para la formación de eucromatina, facilitando así la unión al ADN de los demás (20) (Figura 12).

(Chapell & Dalton, Cold Spring Harb Perspect Med, 2013)

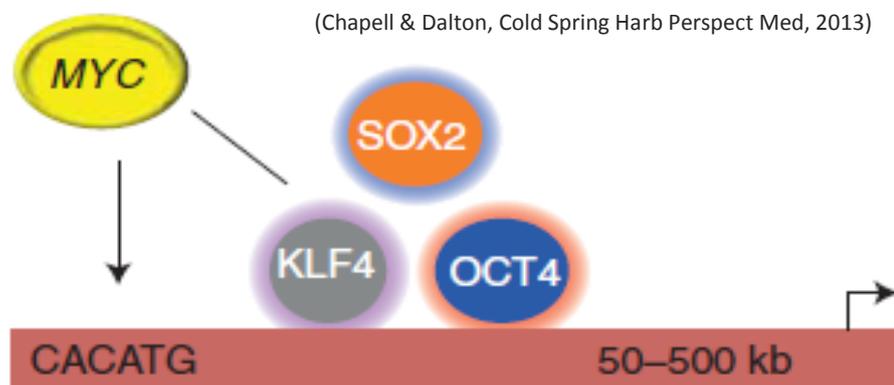


Figura 12: MYC favorece la unión de los otros tres factores al ADN estimulando la formación de eucromatina mediante el reclutamiento de deacetilasas.

La auto-renovación y la pluripotencialidad de las mESC, así como las células pluripotentes en el desarrollo temprano dependen críticamente de la expresión de MYC. Estos descubrimientos tienen importantes implicaciones para la biología de las ESC y las iPSC y la regulación de la embriogénesis temprana, pero también para las células madre cancerígenas (17).

Por otra parte, no hay nada descrito sobre la expresión de ninguno de los genes de la familia MXD en el control de la pluripotencia. Es probable que estén implicadas, ya que se considera a las proteínas MXD como antagonistas de las funciones de MYC en la transcripción génica.

- BIBLIOGRAFÍA.

1. Nair, S. K.; Burley, S. K., Structural Aspects of Interactions Within the Myc/Max/Mad Network. *CTMI*, 2006, 302: 123–143.
2. Zhou, Zi-Qiang; Hurlin, Peter. J., The interplay between Mad and Myc in proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11 (11): 10-14.
3. Eilers, M.; Eisenman, R.N. Myc's broad reach. *Genes & Development*, 2008, 22: 2755-2766.
4. Grinberg, Asya. V.; Hu, Chang-Deng; Kerppola, Tom. K., Visualization of Myc/Max/Mad Family Dimers and the Competition for Dimerization in Living Cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (10): 4294–4308.
5. Hooker, C. W.; Hurlin, P. J., Of Myc and Mnt. *Journal of Cell Science*, 2006, 119: 208-216.
6. Queva, C.; Hurlin, P. J.; Foley, K. P.; Eisenman, R. N., Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene*, 1998, 16: 967-977.
7. Watt, F. M.; Frye, M.; Benitah; S. A., Myc in mammalian epidermis, how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(3): 234–242.
8. Ryan, K. M.; Birnie, G. D., Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.*, 1996, 314: 713–721.
9. Acosta, J. C.; Ferrandez, N.; Bretones, G.; Torrano, V.; Blanco, R.; Richard, C.; O'Connell, B.; Sedivy, J.; Delgado, M. D.; Leon, J., Myc inhibits p27-induced erythroid differentiation of leukemia cells by repressing erythroid master genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 2008, 28(24):7286-95.
10. Leon, J., Control transcripcional de la diferenciacion celular.

11. León, J.; Ferrandiz, N.; Acosta, J. C.; Delgado, M. D., Inhibition of cell differentiation, a critical mechanism for MYC-mediated carcinogenesis? *Cell Cycle*, 2009, 8 (8): 1148-1157.
12. Alonso Bedate, C., Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales.
13. Arias, M. E.; Felmer, R., Biology of embryonic stem cells (ES cells) in different species: potential applications in biomedicine. *Arch Med Vet*, 2009, 41: 185-195.
14. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 2007, 131 (5): 861-872.
15. Takahashi K.; Yamanaka S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, 126 (4):663-76.
16. Takahashi, K.; Yamanaka S., A developmental framework for induced pluripotency. *Development*. 2015, 142 (19): 3274-85.
17. Varlakhanova, N. V.; Cotterman, R. F.; deVries, W. N.; Morgan, J.; Donahue, L. R.; Murray, S.; Knowles, B. B.; Knoepfler, P. S., myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation*. 2010, 80 (1): 9-19.
18. Albiñ, A.; Johnsen, J. I.; Henriksson, M. A., MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res*. 2010, 107: 163-224.
19. Shu, X.; Pei, D., Pluripotency without Proliferation. *Cell*. 2016, 164 (4): 595-7.
20. Chappell, J.; Dalton, S., Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013, 3 (12).
21. Baudino, T. A.; Cleveland, J. L., The Max network gone mad. *Mol Cell Biol*. 2001, 21 (3): 691-702.
22. Nair, S. K.; Burley, S. K., X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*. 2003, 112 (2): 193-205.