

María José Fernández-Nestosa<sup>1</sup>

Dora B. Krimer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Computación Científica y Aplicada,  
Facultad Politécnica,  
Universidad Nacional de Asunción (FP-UNA)

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular de los Cromosomas,  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC),  
Madrid

Rev UN Med 2012 1(1): 43-66

# Las células Friend como modelo para el estudio de la reprogramación de la diferenciación en células leucémicas

---

## ABSTRACT

Friend erythroleukemia-derived (Friend or MEL) cell lines have been used as a model to investigate the molecular events that occur during red cell differentiation as well as to study multiple aspects of leukemia progression. MEL cell lines possess molecular characteristics similar to tumoral cells grown in the hematopoietic organs and express large amounts of PU.1 and other oncogenic proteins related to the proliferative state. An extremely useful attribute of this *in vitro* model relies in the capability of MEL cells to reenter the differentiation program upon the use of chemical inducers such as hexamethylene-bisacetamide (HMBA). Although widely used for the analysis of cell differentiation in basic research and in clinical trials as putative agents in differentiation therapy, the mode of action of the inducers is still unknown. The constitutive up-regulation of PU.1 is thought to be the main cause for a blockage in the differentiation process of the affected erythroblasts. However, recent studies demonstrate that the model of PU.1–GATA-1 antagonism needs to be replaced by a complex network of specific and non-specific transcription factors operating in a delicate balance to activate or repress the erythroid differentiation program.

**Keywords:** Erythroleukemia; Friend cells; PU.1; GATA-1; SFFV.

## RESUMEN

Las líneas celulares derivadas de células eritroleucémicas Friend (células Friend o células MEL) se han venido utilizando como un modelo *in vitro* para investigar los eventos moleculares que tienen lugar durante la diferenciación de los eritrocitos, así como para el estudio de distintos aspectos en el desarrollo de leucemias. Las líneas celulares MEL poseen características moleculares similares a las de las células tumorales que crecen en los distintos órganos hematopoyéticos y expresan niveles altos de PU.1 y otras proteínas oncogénicas relacionadas con estadios proliferativos. Un atributo extremadamente útil de este modelo *in vitro* se basa en la capacidad de las células MEL para retomar el programa de diferenciación mediante la utilización de inductores químicos tales como el hexametileno-bisacetamida (HMBA). A pesar del amplio uso en el análisis de la diferenciación celular en investigación básica o en ensayos clínicos como posibles agentes en terapias de diferenciación, el modo de acción de los diferentes inductores químicos es aún desconocido. Se ha sugerido que la activación constitutiva de PU.1 es la causa principal del bloqueo de la diferenciación en los eritroblastos afectados. Sin embargo, estudios recientes demuestran que el modelo del antagonismo PU.1-GATA-1 necesita ser reemplazado por una compleja red de factores de transcripción específicos y no específicos que funcionan en un delicado equilibrio para activar o reprimir el programa de diferenciación eritroide.

**Palabras clave:** Eritroleucemia; células Friend; PU.1; GATA-1; SFFV.

---

## INTRODUCCIÓN

La diferenciación de las células troncales pluripotentes hematopoyéticas (HSCs, de *hematopoietic stem cells*) hacia los distintos linajes hematopoyéticos requiere una serie de determinaciones generalmente reguladas por factores de transcripción en respuesta a estímulos externos. La regulación de la expresión génica y las interacciones proteína-proteína, junto a las modificaciones que se producen a nivel de la cromatina garantizan la fidelidad de este proceso. En este contexto, el factor de transcripción GATA-1 es indispensable para el desarrollo eritroide y megacariocítico mientras que el factor de transcripción PU.1 es necesario para el desarrollo mielóide y linfóide [1–3]. PU.1 y GATA-1 activan sus propios promotores y zonas reguladoras como parte de un mecanismo autorregulador que establece la determinación de linaje; la mutua inhibición entre PU.1 y GATA-1 a través de una interacción directa asegura además que las células continúen su maduración por la ruta determinada [4–6]. Cuando cualquiera de estos mecanismos se altera puede dar paso a un proceso tumoral en donde se distinguen dos características fundamentales: el bloqueo de la diferenciación y la proliferación celular descontrolada.

Las eritroleucemias inducidas en animales por la acción de retrovirus proporcionan un valioso modelo para estudiar los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación eritropoyética y los procesos hematopoyéticos malignos. En numerosas ocasiones los retrovirus se integran eficientemente en el genoma de las células y activan proto-oncogenes adyacentes al lugar de integración [7,8]. En el año 1966, Charlotte Friend y colaboradores establecieron cultivos celulares derivados de tumores subcutáneos del bazo de ratones infectados con un complejo vírico denominado complejo Friend [9]. Cuando se cultivaron las células tumorales en un medio semisólido se observó al cabo de un tiempo la presencia de colonias formadas por eritroblastos en diferenciación, lo que sugería la potencialidad inherente de las células MEL (de *murine erythro-leukemia*) hacia la diferenciación eritroblástica. Posteriormente, estos datos fueron confirmados por varios laboratorios [10–11]. En el año 1971, intentando transfectar células MEL, Friend observó que el dimetilsulfóxido (DMSO) era capaz de inducir la reactivación del programa de diferenciación eritroide [12]. Este hallazgo fue crucial y supuso el reconocimiento del sistema de diferenciación *in vitro* de las células MEL, conocidas también como células Friend en honor a su descubridora, como modelo de estudio de la diferenciación. A partir de ese momento un gran número de compuestos polares han sido utilizados para inducir la diferenciación de las células MEL, entre los que destacan el HMBA y el DMSO. Algunos de estos agentes como el ácido retinoico, el HMBA y los ácidos hidroxámicos han sido utilizados en pacientes que padecían determinados tipos

de leucemias [13,14]. Aunque han transcurrido más de cuarenta años desde el descubrimiento del sistema de diferenciación inducida de las células Friend, se desconoce aún el mecanismo utilizado por los distintos agentes inductores para reactivar el programa de diferenciación.

## EL COMPLEJO FRIEND

Las líneas celulares derivadas de células eritroleucémicas Friend (células Friend o células MEL) están transformadas por el **SFFV** (*Spleen Focus Forming Virus*), un virus deficiente en replicación, responsable de la transformación de los progenitores eritroides [15] y por el F-MuLV (*Friend Murine Leukemia Virus*), que contiene los componentes necesarios para la replicación del SFFV [16]. A diferencia de otros retrovirus oncogénicos, el SFFV no expresa una forma mutante y constitutivamente activa de un gen del huésped. En su lugar, codifica para una glicoproteína, la gp55, que es capaz de reconocer y unirse al receptor de eritropoyetina (Epo-R).

El proceso de transformación de los progenitores eritroides infectados con el complejo Friend puede dividirse en dos fases [17]. La etapa inicial, conocida como fase pre-leucémica, se produce en las primeras horas después de la infección y se caracteriza por la activación constitutiva del receptor de eritropoyetina (Epo-R) debido a la unión de la glicoproteína gp55 del SFFV (Figura 1) [18,19]. Como consecuencia de la activación del receptor de eritropoyetina (Epo-R) se produce una expansión policlonal de progenitores eritroides, principalmente de los compartimentos BFU-E y CFU-E, lo que resulta en una esplenomegalia e hiperplasia masiva [20,21].

La segunda etapa, conocida como fase leucémica, es un proceso lento, ocurre al cabo de 6-12 semanas después de la infección y se caracteriza por la aparición de algunos clones de células malignas que, a diferencia de los progenitores de la primera fase, han perdido la capacidad de diferenciarse en respuesta a Epo [22]. Se ha demostrado que en el 95% de las eritroleucemias inducidas por el complejo vírico Friend el SFFV se integra en el locus del gen *Sfpi-1/PU.1* (*SFFV Proviral Integration site-1/ Purine Rich*) que codifica para la proteína PU.1, un factor de transcripción específico del sistema hematopoyético perteneciente a la familia Ets. El provirus se integra generalmente en dirección contraria a la orientación transcripcional del gen, dentro de una región de alrededor de 10 kb que se localiza corriente arriba del primer exón del gen (Figura 2), y provoca la activación constitutiva del gen *Sfpi-1/PU.1* a través del LTR del SFFV [23–26].

En la mayoría de los clones leucémicos se produce además una inactivación de p53, ya sea debido a un silenciamiento del gen que codifica para el su-

presor tumoral o a la expresión de una proteína mutada [27,28]. Las líneas celulares eritroleucémicas presentan características propias del estadio de proeritoblasto y pueden proliferar indefinidamente *in vitro*. Sin embargo, bajo la acción de agentes inductores de la diferenciación, las células MEL son capaces de diferenciarse hasta un estadio equivalente al de normoblasto ortocromatofílico en ausencia de Epo [29].

## ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN INDUCIDA DE LAS CÉLULAS MEL

Cuando se trata un cultivo de células MEL con un agente inductor se producen una serie de cambios complejos que conducen a las células de manera irreversible a la diferenciación hacia el linaje eritroide (Figura 3). Inicialmente, las células tratadas con HMBA atraviesan un período de latencia (12-24 horas) denominado pre-determinación, caracterizado por una represión general de la expresión génica en donde, eliminando el agente inductor, las células vuelven al estado inicial. A partir de ese momento, comienza la etapa de determinación en donde las células adquieren la capacidad irreversible de cesar la división celular y expresar las características del estado diferenciado, aún en ausencia del agente inductor. A partir de las 72 horas de tratamiento se observa un porcentaje importante de células que expresan marcadores eritropoyéticos y a las 96 horas más del 90% de las células están ya diferenciadas (Figura 4) [30].

La inducción de la diferenciación de las células MEL va acompañada de numerosos cambios que también son característicos de la diferenciación de células eritroides en su entorno natural. Entre ellos se destacan la inducción de la expresión de marcadores eritroides como las  $\alpha$  y  $\beta$  globinas, los grupos heme, la anhidrina carbónica, los receptores de la espectrina y de la transferrina, entre otros. Se producen también cambios morfológicos característicos de la diferenciación eritroide: la relación de volumen entre citoplasma y núcleo decrece, la cromatina se condensa y el tamaño celular disminuye. Aunque en condiciones normales de cultivo las células no llegan a perder el núcleo, se ha demostrado que en presencia de fibronectina las células pueden eliminar el núcleo alcanzando la etapa de reticulocitos [31]. La diferenciación culmina con el cese de la división celular y la pérdida de la tumorigenicidad [32,33].

## INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN: RESPUESTA AL HMBA

Aunque han transcurrido casi cuarenta años desde el descubrimiento del sistema de diferenciación inducida de las células Friend, se desconoce aún el

mecanismo utilizado por los distintos agentes inductores para reactivar el programa de diferenciación. Una de las hipótesis más aceptadas es que los inductores activan diversas rutas de señalización de forma similar a como ocurre en la eritropoyesis. Se sabe que en la hematopoyesis normal los distintos factores de crecimiento interactúan con los receptores de membranas de las células precursoras activando rutas de señalización que provocan una activación/represión selectiva de genes que controlan a su vez los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis celular [34].

La diferenciación de las células MEL en respuesta al tratamiento con HMBA se desarrolla en varias fases. En etapas tempranas, previas a la determinación celular, el inductor provoca una serie de cambios metabólicos entre los que se incluyen una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática debida a cambios en el flujo de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  [35,36], un aumento transitorio en la concentración celular de AMP cíclico, una rápida translocación de PKC  $\sigma$  y  $\epsilon$  del citosol a la membrana y la aparición de una forma de PKC independiente de los niveles de  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos [37,38]. Dado que no se han indentificado receptores celulares para el HMBA u otros compuestos polares, se ha postulado que los cambios en el potencial de la membrana plasmática serían la vía para activar directa o indirectamente una o más rutas de señalización [39]. Dentro de las vías de señalización específicas se ha observado que el HMBA, al igual que Epo, activa la fosforilación de JAK2 y STAT5 en células Friend. La activación de la fosforilación se inicia a partir de las 12 horas de tratamiento con el inductor, alcanzando un pico a las 24 horas, que se mantiene hasta las 96 horas. De manera consistente, se comprobó que la estimulación con HMBA resulta en un incremento de la unión de STAT5 al DNA [40]. Otros agentes inductores de la diferenciación, como el DMSO y el butirato de sodio, también activan la ruta JAK2/STAT5. Se ha demostrado que la sobreexpresión de un dominante negativo de STAT5 en la línea celular T3C1-2, transformada con el complejo Friend, inhibe la capacidad del HMBA para inducir diferenciación [41]. Este dato podría estar en conjunción con un trabajo de Nishigaki y colaboradores en donde se demuestra que el bloqueo de otro miembro de la familia STAT, STAT1, juega un papel clave en el proceso de transformación de las células MEL [42].

Finalmente, las vías de señalización activadas por el HMBA se transmiten al núcleo donde se traducen en cambios selectivos de la expresión génica. Existen evidencias de que otros eventos mediados por el inductor, como las roturas de simple cadena o los cambios en la configuración de la estructura de la cromatina, también podrían estar involucrados en la inducción de la diferenciación de las células MEL [43-45].

## DESBLOQUEO DE LA DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS MEL: CAMBIOS A NIVEL MOLECULAR

Durante el desarrollo normal de las células hematopoyéticas existe una correlación inversa entre la proliferación y la diferenciación celular. El hecho de que en la mayoría de las células tumorales se observe una pérdida de los controles de la proliferación junto con la aparición de características propias de células inmaduras refuerza la existencia de una relación inversa entre ambos procesos. Después del tratamiento con un agente inductor de la diferenciación como el HMBA, las células MEL se dividen un máximo de 4-5 veces más, dejan de proliferar y se acumulan en la fase G1/G0 del ciclo celular [46]. Estudios previos han puesto de manifiesto que la diferenciación de las células MEL va acompañada de cambios específicos en la expresión de factores relacionados con la regulación de la proliferación celular. Entre los reguladores positivos de la división celular, cuyos niveles de expresión descienden en respuesta a los agentes inductores, se encuentran los protooncogenes *c-myc*, *c-myb* y *c-jun* y las ciclinas dependientes de quinasas (cdks), específicamente *cdk6* y *cdk4* [47,48]. Paralelamente, se produce una activación de la expresión de genes que codifican para inhibidores del ciclo celular como *p21CIP1/WAF1*, *p27 KIP* y *mad1* [49,50].

Un hecho mayormente aceptado es que el cese de la división celular y la activación de marcadores específicos del estadio diferenciado constituyen dos eventos independientes [32]. Sin embargo, en ocasiones se ha puesto de manifiesto la existencia de reguladores duales capaces de controlar tanto la proliferación como la diferenciación celular [51]. En este sentido, Rylski y colaboradores demostraron que el factor de transcripción GATA-1 es capaz de inhibir la proliferación celular reprimiendo directamente la expresión de *c-myc* [52]. Esto no impide que lleve a cabo su tradicional función como activador de la expresión de genes marcadores de estadios diferenciados. Asimismo, se ha comprobado que algunos factores involucrados en la regulación del ciclo celular como *p21CIP1/WAF1*, *p27KIP* y *Mad1* son capaces de inducir un desbloqueo de la diferenciación celular [53,54]. Matushansky y colaboradores demostraron que la expresión de *Cdk6*, cuyos niveles disminuyen rápidamente en respuesta a los agentes inductores de la diferenciación, es capaz de inhibir la diferenciación de células eritroleucémicas [48]. En un trabajo más reciente el mismo laboratorio demostró que PU.1 regula directamente la expresión génica de *cdk6*, vinculando los programas proliferación y diferenciación en células eritroides [55]. Todos estos resultados apoyan la teoría sobre la existencia de una coordinación exquisita entre proliferación y diferenciación celular.

## REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA ERITROPOYESIS

Durante la última década los esfuerzos por comprender las bases moleculares de la diferenciación eritropoyética llevaron a la identificación de varios factores de transcripción linaje-específicos que incluyen a GATA-1, SCL/TAL-1, EKLF, LMO2/RBTN2, p45 NF-E2, entre otros (revisado en [56,57]). El factor de transcripción GATA-1 es un mediador central de la diferenciación eritroide que regula, además de su propia transcripción, la expresión de las globinas, las enzimas involucradas en la síntesis de los grupos heme (ALAS-S, ALA-D, PBG-D), el inhibidor de apoptosis Bcl-X<sub>L</sub>, GATA-2, NF-E2 y algunos factores involucrados en proliferación celular, como *c-Myc*, *c-Myb* y *Cdk6* [58]. Los experimentos realizados con células madres demostraron que aquellas que no expresan GATA-1 son capaces de diferenciarse y dar lugar a los diferentes tejidos de ratón a excepción de los eritrocitos [1]. Un análisis más detallado utilizando ratones quiméricos reveló que los precursores eritroides que carecen de GATA-1 son incapaces de diferenciarse más allá del estadio de proeritroblasto [2]. Estos resultados corroboran que GATA-1 es indispensable para la diferenciación de los progenitores eritroides.

En los últimos años se ha añadido un nivel de complicación adicional condicionado por la acumulación de datos relativos a la estructura de la cromatina. Los cambios epigenéticos juegan un papel clave en el silenciamiento y la activación de genes específicos durante la diferenciación celular. Estudios recientes han puesto de manifiesto la implicación de los cambios en la metilación del DNA en el proceso de diferenciación eritropoyética [59]. La metilación del DNA de supresores tumorales es un mecanismo frecuente de represión transcripcional en procesos oncogénicos. El tratamiento con drogas antitumorales resulta, en muchos casos, en una demetilación del DNA con la consecuente reactivación de la expresión génica y la reversión del fenotipo transformado [60]. Asimismo, el uso de inhibidores de las DNA metiltransferasas y las HDACs provoca una aceleración de la reactivación del programa de diferenciación.

## ANTAGONISMO ENTRE GATA-1 Y PU.1

GATA-1 y PU.1 son factores de transcripción específicos que regulan la diferenciación hacia los linajes eritroide y mielóide, respectivamente. La diferenciación hacia un linaje u otro depende del balance entre ambas proteínas (ver esquema Figura 4). El antagonismo entre GATA-1 y PU.1 reside en la interacción física del dominio de "dedos de zinc" del extremo C-terminal

de GATA-1 y el dominio "ets" de PU.1 [4,61,62]. En el linaje mielóide, GATA-1 inhibe la función de PU.1 bloqueando la interacción con c-Jun. En el caso del linaje eritroide, se han postulado dos mecanismos que podrían ser complementarios. El grupo de Skoultschi, del Albert Einstein College of Medicine (USA), sostiene que la inhibición de GATA-1 mediada por PU.1 depende del reclutamiento de la proteína del retinoblastoma (Rb) que, junto con otras proteínas represoras como HP1 $\alpha$  y Suv39H, provoca un silenciamiento de los genes diana de GATA-1 (Figura 5) [63,64]. Como alternativa, los trabajos del grupo de Blobel, del Children's Hospital of Philadelphia (USA), señalan que PU.1 se une a GATA-1 e inhibe la acetilación, mediada por CBP (*Creb-Binding Protein*), de dos motivos ricos en lisinas altamente conservados que se localizan cerca de los dominios de dedo de zinc de los extremos N y C-terminal de la proteína (ver esquema Figura 5) [65]. Existen suficientes evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* que corroboran que la acetilación de GATA-1 incrementa la actividad transactivadora y está relacionada con su habilidad para inducir la diferenciación eritroide [66–68]. Independientemente del modelo planteado, en ambos casos se acuerda que PU.1 actúa como un inhibidor de la actividad de GATA-1 en el linaje eritroide [5,61–64].

En los últimos años, el modelo del antagonismo GATA-1-PU.1 controlando la segregación de los linajes Mk/E y GM ha quedado desplazado por uno más complejo donde PU.1 y C/EBPs antagonizan colectivamente con GATA-1/2 y FOG-1 a través de varios mecanismos independientes [69]. Un trabajo reciente del grupo de Patient, del Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital (UK), ha añadido un nuevo protagonista a la saga GATA1-PU.1, se trata del factor de transcripción Tif1gamma. En el trabajo se presenta a este factor de transcripción como un regulador de los niveles de GATA.1 y PU.1 y, por lo tanto, de la diferenciación hacia los linajes eritroide versus mielóide en células madre hematopoyéticas [70].

## ¿ES PU.1 INDISPENSABLE PARA EL BLOQUEO DE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS FRIEND?

Se ha sugerido en diversas ocasiones que la activación de PU.1, provocada por la integración del SFFV, es responsable del bloqueo de la diferenciación de las células de la eritroleucemia murina [5,61]. Esta hipótesis se ha visto reforzada al comprobar que la sobreexpresión de PU.1 induce eritroleucemia en ratones transgénicos [71]. En un estudio reciente, Papetti y colaboradores demostraron que la inhibición transitoria de la expresión de PU.1 mediante RNA interferente induce un desbloqueo parcial de la diferenciación eritroide en células MEL [72].

En un intento para identificar posibles dianas del HMBA en nuestro laboratorio se establecieron líneas celulares eritroleucémicas resistentes (MEL-R) a la acción de los agentes inductores de la diferenciación [73,74]. Estas líneas celulares son capaces de proliferar indefinidamente en presencia de HMBA sin diferenciarse en ningún momento. Inesperadamente, hemos observado que en los clones resistentes la expresión de PU.1 es nula aún cuando el SFFV está integrado en una localización similar a la que ocupa en las líneas eritroleucémicas progenitoras [77]. La ausencia de expresión de PU.1 en las líneas celulares resistentes desafía el rol oncogénico que se le atribuye a PU.1 en eritroleucemias y al mismo tiempo abre nuevos interrogantes: ¿la integración del provirus SFFV ocurre exactamente en el mismo lugar en las líneas resistentes y en las progenitoras? Si PU.1 no es indispensable para bloquear la diferenciación, ¿existe otro factor/es capaz de reemplazarlo y mantener el estado de proliferación descontrolado? ¿Es este probable factor/es capaz de antagonizar con GATA-1?

En células *knockout* para PU.1 el factor ets Fli-1 compensa la ausencia de PU.1 y ambas proteínas son capaces de ocupar con la misma eficiencia determinados elementos en cis específicos de PU.1 en células que expresan PU.1 de forma ectópica [75]. Los experimentos de coimmunoprecipitación de proteínas endógenas demostraron que Fli-1 interacciona con GATA-1 tanto en las células MEL-R como en las MEL-DS19. Fli-1, por lo tanto, es un candidato potencial para sustituir a PU.1 y bloquear la actividad de GATA-1 en las líneas resistentes. No se descarta incluso la posibilidad de que Fli-1 coopere con PU.1 para reprimir a GATA-1 en MEL-DS19. De manera consistente con esta hipótesis, Starck y colaboradores demostraron que Fli-1 es una diana transcripcional de PU.1 [76]. Los autores del trabajo sugieren que la capacidad de PU.1 para inhibir la diferenciación eritroide podría depender, al menos en parte, de la activación de Fli-1. Esta hipótesis se ve reforzada por estudios previos que demuestran que la infección sólo con el F-MuLV, el retrovirus que complementa al SFFV en el complejo Friend, también es capaz de inducir una eritroleucemia caracterizada por anemia y esplenomegalia, aunque en estos casos la infección sólo es efectiva en ratones recién nacidos (Silver y Kozak, 1986). En el 75% de los casos se produce una activación constitutiva del factor de transcripción Fli-1 (*Friend Leukemia Insertion site-1*), como consecuencia de la integración del F-MuLV en el locus del gen *fli-1* [18,77].

## LECCIONES DEL SFFV Y DEL MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS MEL

A finales de los años 80 el grupo de Harold Weintraub, del Fred Hutchinson Cancer Research Center (USA), aisló e identificó Myo-D como un gen regulador de la diferenciación del músculo esquelético. Más allá de regular la activación de genes del linaje muscular, el grupo de Weintraub demostró que Myo-D era capaz de convertir en mioblastos a células de diferentes orígenes como fibroblastos, condrocitos, neuronas y otras [78]. Esto originó la idea de la existencia de “genes maestros” de los distintos linajes celulares, capaces de orquestar el programa de diferenciación. La hipótesis de la existencia de un “gen maestro” que regula la determinación hacia un linaje específico no ha encontrado una correspondencia plena en el linaje eritroide. Uno de los factores que se asemeja a Myo-D en su modo de acción es GATA-1, capaz de activar genes marcadores de eritropoyesis y provocar la determinación hacia el linaje eritroide. Sin embargo, GATA-1 también se expresa en células pertenecientes a otros linajes, como por ejemplo en células de Sertoli, megacariocitos y eosinófilos, y juega un papel crítico en la diferenciación de los dos últimos [79–85]. Por último, su capacidad para disparar la determinación en otros sistemas es reducida [86]. Todos estos datos hacen dudar de la capacidad de GATA-1 para actuar como “gen maestro” del linaje eritroide. Los estudios realizados con células Friend han contribuido significativamente a determinar que la eritropoyesis es un proceso altamente complejo regulado más que por un único “gen maestro”, por una compleja red de factores, entre los que se encuentran factores de transcripción específicos y factores constitutivos, que funcionan en un delicado equilibrio para activar o reprimir el programa de diferenciación eritroide (Figura 6) [57,69,70]. Los estudios realizados en células Friend han contribuido significativamente en la caracterización molecular de esta complicada red de interacciones que implica la activación directa de factores específicos y la inhibición de factores característicos de programas alternativos (i.e. interacción GATA-1/PU.1, CEBP/FOG), distintas combinaciones de un número variable de factores (i.e. GATA-1/FOG, GATA-1/Gfi-1B, etc), una gran variabilidad cuantitativa de los distintos factores, etc. [87,88].

Desde que Charlotte Friend describió la inducción de eritroleucemias en ratones infectados con el complejo Friend [89], el retrovirus y la enfermedad que lleva su nombre se han convertido en una herramienta valiosa para el estudio de otros aspectos de la eritropoyesis tales como la vía de señalización de Epo, el mecanismo de desarrollo de las leucemias y la patogénesis retroviral [90]. El estudio de las células Friend ha sido útil además para identificar genes involucrados en la susceptibilidad de los ratones a la transformación

con el complejo vírico [91]. Dentro de este grupo se ha identificado el locus *Fv2* (*Friend virus susceptibility 2*) donde se encuentra el gen que codifica para una forma truncada del receptor con actividad tirosina quinasa STK (sf-STK) que carece del dominio extracelular pero conserva los dominios transmembrana y quinasa [92]. Se ha demostrado que los ratones que no expresan sf-STK son resistentes a la infección con el complejo Friend. Esta resistencia no se debe a una interferencia con la entrada del retrovirus o a alteraciones en su ciclo vital sino a la influencia de sf-STK en la determinación de la capacidad de la gp55 para inducir la proliferación de los eritroblastos infectados con el SFFV [93]. De manera consistente con estos resultados, se ha propuesto que el gen *Fv2* podría estar involucrado en la regulación del ciclo celular de las BFU-Es [94]. Debido a que las BFU-Es son las dianas principales de la infección retroviral, el efecto de *Fv2* sobre la proliferación explicaría la importancia de sf-STK para el desarrollo de la eritroleucemia mediada por el SFFV. En un modelo inicial se planteó que la gp55 mediaría una interacción funcional entre el receptor de eritropoyetina (Epo-R) y sf-STK. Sin embargo, Zhang y colaboradores demostraron que la glicoproteína gp55 del SFFV-P interacciona de forma independiente con sf-STK y el receptor de eritropoyetina (Epo-R) para inducir eritroblastosis y policitemia, respectivamente [95]. La identificación de sf-STK permite ampliar el conocimiento de los mecanismos de resistencia al cáncer en ratones y, por extrapolación, en humanos.

Por otra parte, el modelo de la eritroleucemia murina constituye un sistema ampliamente utilizado en la investigación del mecanismo de acción de los distintos agentes inductores de la diferenciación celular. Desde el hallazgo del DMSO como un agente inductor de la diferenciación de las células MEL (1971), se han desarrollado una gran variedad de compuestos químicos capaces de reactivar la diferenciación e inhibir la tumorigenicidad de células leucémicas. Entre estos compuestos se encuentra el HMBA que ha servido de punto de partida para el desarrollo de compuestos polares de segunda generación que son hasta 2000 veces más activos, entre los que destacan el EMBA (dietil-bis-[pentametileno-N,N-dimetilcarboxamida]malonato) y los ácidos hidroxámicos como el SAHA (suberoylanilida ácido hidroxámico) y el CBHA (ácido *m*-carboxinámico bis-hidroxiámina) [96]. Uno de estos compuestos, el SAHA, actúa como un inhibidor de las HDACs que activa la acetilación de histonas, factores de transcripción y proteínas involucradas en la regulación de la proliferación, la migración y la muerte celular clínicos. El SAHA ha mostrado poseer una potente actividad anticancerígena, tanto en tumores sólidos como hematológicos a dosis que son bien toleradas por los pacientes [14,96]. En conjunto, estos datos confirman la validez de las células de la eritroleucemia murina como modelo para el estudio del mecanismo de acción de los agentes antitu-

morales y el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte gracias a las ayudas del programa "CSIC para el Desarrollo" del

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el "Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica entre España e Iberoamérica" de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991;349:257-260.
2. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995;121:163-172.
3. Kastner P, Chan S. PU.1: A crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:22-27.
4. Liew CW, Rand KD, Simpson RJ, Yung WW, Mansfield RE, Crossley M et al. Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1. *J Biol Chem* 2006;281:28296-28306.
5. Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 2000;96:2641-2648.
6. Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 2010;24:1249-1257.
7. Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC et al. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* 2003;22:3813-3820.
8. Hawkins TB, Dantzer J, Peters B, Dinauer M, Mockaitis K, Mooney S et al. Identifying viral integration sites using SeqMap 2.0. *Bioinformatics* 2011;27:720-722.
9. Friend C, Patuleia MC, De Harven E. Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr* 1966;22:505-522.
10. Marks PA, Reuben R, Epner E, Breslow R, Cobb W, Bogden AE et al. Induction of murine erythroleukemia cells to differentiate: a model for the detection of new anti-tumor drugs. *Antibiot Chemother* 1978;23:33-41.
11. Singer D, Cooper M, Maniatis GM, Marks PA, Rifkind RA. Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2668-2670.
12. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:378-382.
13. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* 2001;90:105-156.
14. Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* 2007;26:1351-1356.
15. Wolff L, Ruscetti S. Malignant transformation of erythroid cells in vivo by introduction of a nonreplicating retrovirus vector. *Science* 1985;228:1549-1552.
16. Spiro C, Gliniak B, Kabat D. A tagged helper-free Friend virus causes clonal erythroblast immortality by specific proviral integration in the cellular genome. *J Virol* 1988;62:4129-4135.
17. Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A. Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* 1991;5:908-918.
18. Ben-David Y, Giddens EB, Bernstein A. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1332-1336.
19. D'Andrea AD. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* 1992;15:19-36.
20. Liao SK, Axelrad AA. Erythropoietin-independent erythroid colony formation in vitro by hemopoietic cells of mice infected with friend virus. *Int J Cancer* 1975;15:467-482.
21. Peschle C, Migliaccio G, Lettieri F, Migliaccio AR, Ceccarelli R, Barba P, et al. Kinetics of erythroid precursors in mice infected with the anemic or the polycythemic strain of Friend leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2054-2058.
22. Tambourin PE, Wendling F, Jasmin C, Smadja-Joffe F. The physiopathology of Friend leukemia. *Leuk Res* 1979;3:117-129.
23. Moreau-Gachelin F. Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:149-163.
24. Moreau-Gachelin F, Ray D, de Both NJ, van der Feltz MJ, Tambourin P, Tavitian A. Spi-1 oncogene activation in Rauscher and Friend murine virus-induced acute erythroleukemias. *Leukemia* 1990;4:20-23.
25. Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin, P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 1988;331:277-280.

26. Paul R, Schuetze S, Kozak SL, Kabat D. A common site for immortalizing proviral integrations in Friend erythroleukemia: molecular cloning and characterization. *J Virol* 1989;63:4958-4961.
27. Mowat M, Cheng A, Kimura N, Bernstein A, Benchimol S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* 1985;314:633-636.
28. Munroe DG, Peacock JW, Benchimol S. Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles. *Mol Cell Biol* 1990;10:3307-3313.
29. Rifkind RA. Acute leukemia and cell differentiation. *N Engl J Med* 1986;315:56-57.
30. Vanegas N, Garcia-Sacristan A, Lopez-Fernandez LA, Parraga M, del Mazo J, Hernandez P, et al. Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Leuk Res* 2003;27:607-615.
31. Patel VP, Lodish HF. A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukemia cells into reticulocytes. *J Cell Biol* 1987;105:3105-3118.
32. Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 2003;100:257-290.
33. Tsiftoglou AS., Pappas IS, Vizirianakis IS. The developmental program of murine erythroleukemia cells. *Oncol Res* 2003;13:339-346.
34. Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989;58:45-77.
35. Bridges K, Levenson R, Housman D, Cantley L. Calcium regulates the commitment of murine erythroleukemia cells to terminal erythroid differentiation. *J Cell Biol* 1981;90:542-544.
36. Mager D, Bernstein A. The program of Friend cell erythroid differentiation: early changes in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase function. *J Supramol Struct* 1978;8:431-438.
37. Gazitt Y, Reuben RC, Deitch AD, Marks PA, Rifkind RA. Changes in cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels during induction of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* 1978;38:3779-3783.
38. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Cell cycle regulatory proteins are targets for induced differentiation of transformed cells: Molecular and clinical studies employing hybrid polar compounds. *Int J Hematol* 1996;63:1-17.
39. Marks PA, Richon VM, Kiyokawa H, Rifkind RA. Inducing differentiation of transformed cells with hybrid polar compounds: a cell cycle-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10251-10254.
40. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 2002;21:3334-3358.
41. Yamashita T, Wakao H, Miyajima A, Asano S. Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line. *Cancer Res* 1998;58:556-561.
42. Nishigaki K, Hanson C, Ohashi T, Spadaccini A, Ruscelli S. Erythroblast transformation by the friend spleen focus-forming virus is associated with a block in erythropoietin-induced STAT1 phosphorylation and DNA binding and correlates with high expression of the hematopoietic phosphatase SHP-1. *J Virol* 2006;80:5678-5685.
43. Fibach E, Reuben RC, Rifkind RA, Marks PA. Effect of hexamethylene bisacetamide on the commitment to differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* 1977;37:440-444.
44. Friend C, Patuleia MC, De Harven E. Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr* 1966;22:505-522.
45. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:378-382.
46. Rifkind RA, Richon VM, Marks PA. Induced differentiation, the cell cycle, and the treatment of cancer. *Pharmacol Ther* 1996;69:97-102.
47. Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI. Manipulating the onset of cell cycle withdrawal in differentiated erythroid cells with cyclin-dependent kinases and inhibitors. *Blood* 2000;96:2755-2764.
48. Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene* 2003;22:4143-4149.
49. Hsieh FF, Barnett LA, Green WF, Freedman K, Matushansky I, Skoultchi AI, et al. Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood* 2000;96:2746-2754.
50. Larsson LG, Pettersson M, Oberg F, Nilsson K, Luscher B. Expression of mad, mxi1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* 1994;9:1247-1252.
51. Zhu L, Skoultchi AI. Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:91-97.

52. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5031-5042.
53. Cultraro CM, Bino T, Segal S. Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Mol Cell Biol* 1997;17:2353-2359.
54. Ohnuma S, Philpott A, Wang K, Holt CE, Harris WA. p27<sup>Xic1</sup>, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* 1999;99:499-510.
55. Choe KS, Ujhelly O, Wontakal SN, Skoultchi AI. PU.1 directly regulates *cdk6* gene expression, linking the cell proliferation and differentiation programs in erythroid cells. *J Biol Chem*. 2010;285:3044–3052.
56. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002;21:3368-3376.
57. Perry C, Soreq H. Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur J Biochem* 2002;269:3607-3618.
58. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipson S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215-1227.
59. Shearstone JR; Pop R; Bock C; Boyle P; Meissner A, Socolovsky M. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science* 2011;334:799-802.
60. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295:1079-1082.
61. Rekhman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 1999;13:1398-1411.
62. Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8705-8710.
63. Rekhman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T, Skoultchi AI. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 2003;23:7460-7474.
64. Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultchi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *Embo J* 2005;24:3712-3723.
65. Hong W, Kim AY, Ky S, Rakowski C, Seo SB, Chakravarti D, et al. Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol* 2002;22:3729-3743.
66. Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 1998;396:594-598.
67. Choi Y, Elagib KE, Delehanty LL, Goldfarb AN. Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1. *Cancer Res* 2006;66:2990-2996.
68. Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ, Blobel GA. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* 1999;19:3496-3505.
69. Mancini E; Sanjuan-Pla A, Luciani L, Moore S, Grover A, Zay A, et al. FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *Embo J* 2012;31:351–365.
70. Monteiro R, Pouget C, Patient R. The GATA1/PU.1 lineage fate paradigm varies between blood populations and is modulated by *tif1*gamma. *Embo J* 2011;30:1093–1103.
71. Barnache S, Wendling F, Lacombe C, Denis N, Titeux M, Vainchenker W, et al. Spi-1 transgenic mice develop a clonal erythroleukemia which does not depend on p53 mutation. *Oncogene* 1998;16:2989-2995.
72. Papetti M, Skoultchi AI. Reprogramming leukemia cells to terminal differentiation and growth arrest by RNA interference of PU.1. *Mol Cancer Res* 2010;5:1053-1062
73. García-Sacristán A, Fernández-Nestosa MJ, Hernández P, Schwartzman JB, Krimer DB. Protein kinase *clk*/STY is differentially regulated during erythroleukemia cell differentiation: a bias toward the skipped splice variant characterizes postcommitment stages. *Cell Research* 2005;15:495-503.
74. Fernández-Nestosa MJ, Hernández P, Schwartzman JB, Krimer DB. PU.1 is dispensable to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Leukemia Res* 2008;32:121-130.
75. Truong AHL, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000;19:6482-6489.
76. Starck J, Dubeikovski A, Sarrazin S, Gonnet C, Rao G, Skoultchi A, et al. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol* 1999;19:121-135.
77. Silver J, Kozak C. Common proviral integration region on mouse chromosome 7 in lymphomas and myelogenous leukemias induced by Friend murine leukemia virus. *J Virol* 1986;57:526-533.

78. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 1991;251:761-766.
79. Ito E, Toki T, Ishihara H, Ohtani H, Gu L, Yokoyama M, et al. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 1993;362:466-468.
80. Martin DI, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 1990;344, 444-447.
81. Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 1990;344:447-449.
82. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 1999;93:2867-2875.
83. Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD et al. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* 1994;120:1759-1766.
84. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* 2002;195:1387-1395.
85. Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, et al. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 1993;81:3234-3241.
86. Layon ME, Ackley CJ, West RJ, Lowrey CH. Expression of GATA-1 in a non-hematopoietic cell line induces beta-globin locus control region chromatin structure remodeling and an erythroid pattern of gene expression. *J Mol Biol* 2007;366:737-744.
87. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *Embo J* 2005;24:2354-2366.
88. Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 2003;23:1390-1402.
89. Friend C. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 1957;105:307-318.
90. Ney PA, D'Andrea AD. Friend erythroleukemia revisited. *Blood* 2000;96:3675-3680.
91. Axelrad A. Genetic and cellular basis of susceptibility or resistance to Friend leukemia virus infection in mice. *Proc Can Cancer Conf* 1969;8:313-343.
92. Persons DA, Paulson RF, Loyd MR, Herley MT, Bodner SM, Bernstein A, et al. Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat Genet* 1999;23:159-165.
93. Lilly F. Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:163-169.
94. Suzuki S, Axelrad AA. Fv-2 locus controls the proportion of erythropoietic progenitor cells (BFU-E) synthesizing DNA in normal mice. *Cell* 1980;19:225-236.
95. Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Schweers RL, Persons DA, et al. Role of erythropoietin receptor signaling in Friend virus-induced erythroblastosis and polycythemia. *Blood* 2006;107:73-78.
96. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 2007;25:84-90.