

Desarrollo de un modelo celular de Leucemia Mieloide Aguda mediante la tecnología CRISPR/Cas 9

Elisa González Romero¹, Antonio Rosal-Vela¹, Beatrice de Matteo¹, Mariam Ibañez^{2,3}, Alessandro Liquori^{1,3}, Alejandra SanJuan-Pla¹, Claudia Sargas¹, Mireia Boluda-Navarro¹, Marta Llop^{3,4}, Lourdes Cordón Gallego^{3,5}, Eva Barragan^{3,4}, Alexander Neef¹, Guillermo Sanz², Miguel Ángel Sanz², José María Millán^{6,7}, Rafael Vázquez-Manrique^{6,7*}, José Vicente Cervera^{*2}. (Igual contribución)

¹ Grupo de Investigación en Hematología, IIS La Fe, Valencia, ES. ²Servicio de Hematología. HUyP La Fe, Valencia. ³ CIBER de oncología (CIBERONC). ⁴Unidad de Biología Molecular, HUyP La Fe, Valencia. ⁵Lab. de Citometría de Flujo, Servicio de Hematología, IIS La Fe, Valencia. ⁶Grupo de Investigación Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, IIS La Fe, Valencia. ⁷CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid.

Introducción

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) constituye un conjunto de desórdenes neoplásicos heterogéneos producidos por el trastorno clonal de las células progenitoras hematopoyéticas de la línea mieloide. Las nuevas técnicas de secuenciación del genoma han permitido la detección de mutaciones somáticas adquiridas en un gran número de genes aumentando la complejidad biológica y clínica de la enfermedad. Para el desarrollo de terapias dirigidas es necesaria la creación de modelos de estudio que permitan caracterizar funcionalmente estas mutaciones, así como los patrones de co-ocurrencia detectados por secuenciación. Para ello hemos desarrollado un método fácil de introducción de mutaciones específicas en genes determinados en líneas celulares leucémicas humanas ayudándonos de la tecnología *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas9. Con este sistema es posible estudiar el efecto funcional de mutaciones individuales o introducirlas de forma progresiva para caracterizar la ganancia de mutaciones observada en los pacientes.

Métodos

Tradicionalmente, la introducción del gen codificante de Cas9 y las secuencias sgRNA en líneas celulares ha empleado vectores de expresión, un método tedioso que requiere previamente la clonación del guía diseñado. Para agilizar este proceso hemos establecido líneas celulares hematopoyéticas que expresan constitutivamente la nucleasa Cas9. En el caso de las secuencias guías, mediante PCRs de fusión se generaron pequeñas construcciones que expresan estas secuencias guías, y de forma opcional, el reportero GFP. Para comprobar si Cas9 es funcional en nuestras líneas celulares hemos generado estas construcciones con guías contra los genes *TP53*, *MYBL2* e *IDH2*. Las células fueron nucleofectadas con las construcciones guías y tras 48 horas se extrajo el DNA genómico. Mediante el ensayo de la Endonucleasa T7 se comprobó si se había producido corte en los genes de interés.

Resultados

Las secuencias guías contra *TP53*, *MYBL2* e *IDH2* se testaron en células HEK293, comprobando que producen corte en las zonas diana. Estos guías también produjeron corte en la línea NB4-Cas 9 con una eficiencia similar. Esto prueba que la transducción mediante lentivirus es un método eficaz para introducir secuencias de gran tamaño en las líneas celulares de LMA. El gen codificante de la Cas 9 integrado es funcional y produce cortes en las dianas de los sgRNA. Por otro lado, mediante PCR de fusión creamos sgRNAs que permiten la edición de genes de forma rápida.

Conclusiones

La tecnología CRISPR/Cas 9 representa una revolución biomédica que ya se ha empleado en múltiples campos. En concreto, este sistema puede ser empleado para elucidar el efecto

funcional y cooperante de las mutaciones detectadas en pacientes con LMA. Dado que, las líneas celulares de LMA son insensibles a los métodos clásicos de transfección hemos diseñado una estrategia eficiente y sencilla para generar o eliminar mutaciones en líneas celulares. Se han utilizado los genes *TP53*, *MYBL2* e *IDH2* como modelo. La optimización de esta técnica permitirá desarrollar modelos celulares de LMA *in vitro* y el desarrollo de nuevas terapias.

Financiación

Estudio financiado por la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RETICC) (RD12/0036/0014); CIBER de Cáncer (CIBERONC) CB16/12/00284; el Instituto de Salud Carlos III (ISC III) AC15/00068, PI12/01047, PI13/01640, PI13/02837, PI14/0164, PI16/01113, PI16/00665, PIE13/00046, PT13/0010/0026; Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport: PROMETEOII/2015/008