

# ÍNDICE

|  |              |
|--|--------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>  | <b>vii</b>   |
| <b>RESÚMENES.....</b>  | <b>xi</b>    |
| RESUMEN .....  | xi           |
| ABSTRACT .....   | xiii         |
| RESUM.....   | xv           |
| <b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>   | <b>xxi</b>   |
| <b>LISTADO DE TABLAS.....</b>  | <b>xxiii</b> |
| <b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>  | <b>xxv</b>   |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>3</b>     |
| 1. Leucemia .....  | 4            |
| 1.1. Leucemia Mieloide Aguda .....   | 5            |
| 1.2. Isocitrato deshidrogenasa 2 .....   | 8            |
| 2. Edición génica.....   | 15           |
| 2.1. Edición génica en la era pre nucleasas.....   | 15           |
| 2.2. Meganucleasas, <i>ZFN</i> y <i>TALEN</i> .....  | 16           |
| 2.3. Sistema de edición CRISPR/Cas9 .....  | 19           |
| 2.4. Otras nucleasas CRISPR .....  | 25           |
| 2.5. Edición génica en hematología .....   | 26           |
| 3. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio de cáncer.....   | 29           |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>39</b>    |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>45</b>    |
| Capítulo I. Edición de genes por CRISPR <i>in vitro</i> .....  | 45           |
| 1. Diseño de las secuencias guías de ARN .....   | 45           |
| 2. Generación de un vector CRISPR para editar el gen <i>MYBL2</i> .....  | 46           |
| 3. Generación del vector pEGR-1 .....  | 48           |
| 4. Generación de las construcciones por <i>PCR</i> que expresan las guías de ARN .....                               | 50           |
| 5. Mantenimiento y cultivos de las líneas celulares empleadas en este trabajo.....                                   | 52           |
| 6. Edición en la línea celular HEK293 .....  | 53           |
| 7. Optimización de la edición en células HEK293 .....  | 53           |
| 8. Edición del gen <i>IDH2</i> en las células HEK293 .....   | 54           |
| 9. Ensayo de eficiencia de corte mediante Endonucleasa T7 I.....   | 55           |
| 10. Ensayo de eficiencia de edición mediante <i>RFLP</i> .....   | 58           |
| 11. Edición del gen <i>IDH2</i> en líneas celulares leucémicas .....   | 58           |
| 12. Desarrollo de líneas celulares con expresión constitutiva de la nucleasa Cas9.....                               | 59           |
| 13. Eficiencia de nucleofección de las líneas leucémicas .....   | 61           |
| 14. Optimización de la edición del gen <i>IDH2</i> en células NB4-Cas9.....  | 61           |
| 15. Edición del gen <i>IDH2</i> en células NB4 .....   | 62           |
| 16. Análisis de la eficiencia de edición y los posibles efectos <i>off-targets</i> mediante secuenciación masiva. 62 |              |

|    |  |            |
|----|--|------------|
| 5. | Genotipado de gusanos por <i>PCR</i> .....   | 68         |
| 6. | Sincronización de gusanos .....  | 68         |
| 7. | Detección y cuantificación del oncometabolito 2-HG .....   | 69         |
|    | Material y Métodos comunes.....  | 70         |
|    | Secuenciación Sanger .....   | 70         |
|    | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>77</b>  |
|    | Capítulo I. Edición <i>in vitro</i> .....  | 77         |
| 1. | Desarrollo de un sistema de producción de los elementos CRISPR mediante <i>PCR</i> y optimización en células HEK293 .....  | 79         |
| 2. | El uso de dos guías aumenta la eficiencia de corte en el gen <i>IDH2</i> .....   | 82         |
| 3. | Creación de líneas celulares leucémicas con expresión constitutiva de la nucleasa Cas9 ..  | 85         |
| 4. | Alta eficiencia de transfección de las construcciones guía desarrolladas en las células NB4-Cas9 .....   | 85         |
| 5. | Las construcciones guía producen la misma eficiencia de edición que los complejos <i>RNPs</i> , pero menor porcentaje de <i>indels</i> .....                                   | 87         |
| 6. | El análisis de la edición producida con las construcciones CRISPR por secuenciación masiva muestra resultados similares de edición génica sin efectos <i>off targets</i> ..... | 90         |
|    | Capítulo II. Edición <i>in vivo</i> .....  | 96         |
| 1. | Establecimiento de posibles modelos de las mutaciones en <i>idh2</i> .....   | 96         |
| 2. | Estudio de la presencia del oncometabolito 2-HG en las cepas RMV479, RVM480 y RVM481 .....   | 99         |
|    | <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>109</b> |
|    | Las construcciones guía generadas por <i>PCR</i> son funcionales.....  | 109        |
|    | Las construcciones guía generadas por <i>PCR</i> son eficientes en la línea celular NB4-Cas9 ...   | 111        |
|    | La eficiencia de las construcciones CRISPR generadas por <i>PCR</i> es comparable a la de los complejos <i>RNPs</i> .....  | 113        |
|    | La secuenciación masiva confirma las eficiencias de corte y edición obtenidas. ....  | 115        |
|    | Mediante secuenciación masiva no se detectan cambios significativos en los <i>off targets</i> analizados.....  | 116        |
|    | Detección del oncometabolito 2-HG en los modelos desarrollados en <i>Caenorhabditis elegans</i> .....  | 118        |
|    | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>127</b> |
|    | <b>ANEXO I.....</b>  | <b>133</b> |
|    | <b>ANEXO II.....</b>   | <b>139</b> |
|    | <b>REFERENCIAS .....</b>   | <b>145</b> |