

## RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) se trata de un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos producidos por alteraciones genéticas en las células precursoras mieloides. Las mutaciones en la enzima Isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) son unas de estas alteraciones. Las mutaciones más frecuentes en esta proteína afectan a las posiciones R140 y R172, provocando una ganancia de función con la producción del oncometabolito D-2-hidroxiglutarato (2-HG). A pesar de que ambas inducen la producción de 2-HG, la mutación R172 produce mayor cantidad de oncometabolito, presenta menos concurrencias con otras alteraciones genéticas y se asocia a una peor respuesta a la quimioterapia y un mayor riesgo de recaída. Dadas sus implicaciones en el desarrollo de la enfermedad, la mutación *IDH2*<sup>R172</sup> se ha propuesto como subgrupo independiente de LMA.

Gracias a la investigación con organismos modelo ha sido posible estudiar en profundidad el papel de las mutaciones genéticas en el desarrollo de numerosas enfermedades, como en la LMA. A pesar de ello, aún quedan muchos aspectos por explicar acerca de las implicaciones de las alteraciones genéticas, como las mutaciones en *IDH2*, en el desarrollo de la enfermedad. Por todo ello, en esta Tesis se han desarrollado nuevas estrategias de edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9 con el objetivo de desarrollar nuevos modelos *in vitro* e *in vivo* de mutaciones implicadas en LMA.

En relación al desarrollo del modelo *in vitro*, debido a la baja eficiencia de transfección de los plásmidos CRISPR en las líneas celulares leucémicas, el método más empleado para introducir los elementos CRISPR han sido principalmente vectores lentivirales. Para evitar los inconvenientes de este tipo de vectores, en esta Tesis se ha desarrollado una estrategia alternativa para la introducción de la nucleasa Cas9 y los guías CRISPR. El gen codificante de la Cas9, junto a un promotor y terminador de expresión, se introdujeron en el genoma de células NB4 mediante transducción con lentivirus, generando una línea celular con expresión constitutiva de la nucleasa. Por otro lado, se desarrolló un sistema sencillo de producción de los guías CRISPR mediante *PCR* con los elementos esenciales para su expresión y la expresión del reportero *GFP* de forma opcional.

Con el objetivo de optimizar la técnica y probar su eficiencia en distintas dianas se modificaron dos genes implicados en LMA. Estos fueron el gen *IDH2*, en el cuál se buscó introducir la mutación R172, y el gen *MYBL2*, empleado con anterioridad en trabajos del grupo. Finalmente, las eficiencias de edición obtenidas se compararon con el uso de complejos de ribonucleoproteínas CRISPR, muy utilizados por su alta eficiencia. Mientras que los complejos de ribonucleoproteínas presentaron una mayor eficiencia de corte, la eficiencia de edición de la mutación R172 fue similar en ambas estrategias. Mediante secuenciación masiva se confirmó y caracterizó esta edición y se comprobó que la maquinaria de edición no había producido cortes inespecíficos en regiones similares del genoma. De esta forma, la nueva metodología desarrollada permitió editar de forma precisa líneas celulares leucémicas con eficiencias similares a otras técnicas CRISPR más extendidas y sin producir efectos inespecíficos no deseados.

Por otro lado, gracias a la gran conservación evolutiva del gen *IDH2*, los residuos R140 y R172 se encuentran conservados en la proteína *idh-2* de *Caenorhabditis elegans*. Se empleó la estrategia co-CRISPR para desarrollar y seleccionar cepas mutantes con las mutaciones ortólogas a R140 y R172, y una cepa con ambas mutaciones. A pesar de la conservación, no se observó el aumento del oncometabolito 2-HG esperado en las cepas mutantes en comparación con la cepa salvaje control N2. Esto podría deberse a la activación de vías de degradación del 2-HG. Por ello, es necesario profundizar en el estudio de las vías de degradación del 2-HG para desarrollar modelos de investigación que desarrollen las alteraciones moleculares observadas en los pacientes

Para concluir, la estrategia desarrollada de introducción de elementos CRISPR en líneas celulares, junto a los modelos producidos en *C. elegans*, permitirán en futuros estudios investigar en detalle los efectos moleculares de mutaciones detectadas en pacientes de LMA, su implicación en el desarrollo y pronóstico de la LMA y comprender su papel en la estratificación de los pacientes.