



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Elena María
Goiricelaya Seco

Tesis doctoral

Generación de una plataforma
de validación funcional y
evaluación terapéutica en
potenciales biomarcadores de
leucemia linfocítica crónica

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DE DOCTORAMIENTO

**GENERACIÓN DE UNA
PLATAFORMA DE VALIDACIÓN
FUNCIONAL Y EVALUACIÓN
TERAPÉUTICA EN POTENCIALES
BIOMARCADORES DE LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA**

Elena Goiricelaya Seco

ESCUELA DE DOCTORAMIENTO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORAMIENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

D./Dna. Elena María Goiricelaya Seco

Título da tese: “Generación de una plataforma de validación funcional y evaluación terapéutica en potenciales biomarcadores de leucemia linfocítica crónica”

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo
- 3) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, de septiembre de 2022.

Fdo. Elena María Goiricelaya Seco

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

**Generación de una plataforma de validación funcional y
evaluación terapéutica en potenciales biomarcadores de
leucemia linfocítica crónica.**

D. Ángel Carracedo Álvarez
Dña. Catarina Allegue Toscano

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña Elena María Goiricelaya Seco, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, de septiembre de 2022

Dr. Ángel Carracedo Álvarez

Dra. Catarina Allegue Toscano

DECLARACIÓN CONFLICTOS DE INTERÉS

Yo, Elena María Goiricelaya Seco, con DNI 44841611-y, declaro que la presente tesis doctoral no presenta conflicto de interés alguno.

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

Yo, Elena María Goiricelaya Seco, con DNI 44841611-Y, declaro que parte de esta tesis fue realizada al amparo del proyecto de investigación denominado 'El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente' (Exp. 01/20/LU-003), aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Santiago de Compostela (MR110250) (Anexo), de acuerdo con la normativa actual de bienestar animal y conforme a los protocolos estándar (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010-63-UE). Los procedimientos se llevaron a cabo en el animalario del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, en la Facultad de Veterinaria, Lugo (AE-LU-003), con código REGA de autorización ES270280346401, por Pablo Cabezas Sainz, personal autorizado.

AGRADECIMIENTOS

Para la elaboración de esta tesis ha sido necesario el esfuerzo, la colaboración y el apoyo de las personas que componen el Grupo de Medicina Genómica de la USC. Esta tesis no hubiera sido posible especialmente sin Catarina y Ángel, mis directores, cuyo apoyo constante ha sido fundamental para alcanzar los retos propios del trabajo.

A Catarina, por su especial apoyo en el día a día, por su ejemplo, por su tranquilidad, por su positividad ante las adversidades. Nada de esto podría haber sido posible sin ti y sin tu ilusión.

A todos y cada uno de mis compañeros. A mi querida Sara, primera compañera de laboratorio y amiga. A Alba S, gran compañera desde que llegó. A Alba P, con la que hice mi primera PCR. A Aitana, ya doctora en Canarias. A Elia, con la que aprendí cultivos. A Rocío, por su paciencia y ayuda. A Antón, amigo y compañero desde el inicio. A David, gran amigo y compañero desde la carrera. A Eduardo, fuente inagotable de conocimiento y de consejos. ¡¡A Jorge, gran incorporación y...tú serás el siguiente!! A Cristina, por saber siempre dónde hay que buscar. A Olalla y Almudena, compañeras del “labo de abajo”. A mi querida María, apoyo incondicional y salvación en esta última fase de la tesis.

A los compañeros del CIMUS, unidos todos por este GRAN edificio que juntó nuestros caminos en las *core facilities*. A todos los trabajadores del CIMUS, con especial cariño a Lucía: trabajadora sin igual, compañera de pupitre y amiga. A todos los estudiantes que pasaron por el laboratorio que, intentado enseñarles algo, me enseñaron ellos a mí.

Por último, quisiera agradecer a toda mi familia el esfuerzo y apoyo mostrado para que pudiera realizar la tesis en esta etapa de mi vida. A mi queridísimo marido Valentín, sin ti no lo hubiera empezado ni tampoco continuado y terminado. A mis hijas Carmen y Juana, que siempre ceden su tiempo “por el bien de mamá” sin siquiera comprender lo que es un *paper*. A mis padres y mi suegra, que creen en las segundas oportunidades. A mis hermanas, a Manuel, a Lola y a mis

cuñados y sobrinos, por ayudarme siempre y en especial este último verano.

ABREVIATURAS

7AAD	<i>7-Amino-Actinomycin D</i>
AAVs	Virus Adenoasociados
ACS	<i>American Cancer Society</i>
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpo
ADCP	Fagocitosis dependiente del anticuerpo
ADNc	ADN complementario
AdVs	Adenovirus
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNmi	Micro-ARN
ARSD	Arilsulfatasa D
ATP	Adenosina Trifosfato
B	Bendamustina
B2M	Beta-2-Microglobulina
BCR	Receptor de Células B
BSA	Albúmina de suero bovino
BTK	Tirosin-quinasa de Bruton
C	Ciclofosfamida
CAR	Receptor Quimérico de Antígeno
CDC	Citotoxicidad mediada por el complemento
Cebador F	Cebador <i>Forward</i>
Cebador R	Cebador <i>Reverse</i>
CiB	Clorambucilo
COO	<i>Cell Of Origin</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPRa	<i>CRISPR activation</i>

CRISPRi	<i>CRISPR interference</i>
CRS	Síndrome de liberación de citocinas
C-terminal	Carboxilo-terminal
dcADN	ADN de doble cadena
dCas9	<i>deathCas9</i>
Del	Delección
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dpf	Días después de la fecundación
dpi	Días después de la inyección
EBV	Virus de Epstein-Barr
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
F	Fludarabina
FAT	<i>Focal Adhesion Targeting</i>
FATC	<i>Focal Adhesion Targetin C-terminal</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
hpf	Horas posteriores a la fecundación
hpi	Horas después de la inyección
Ib	Ibrutinib
ICE	<i>Interference of CRISPR Edits</i>
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
ICX	Inactivación del Cromosoma X
Ide	Idelalisib
IFN- γ	Interferón gamma
IGHV	<i>Immunoglobulin Heavy Chain Variable</i>
IL	Interleucina
IMGT	<i>International immunogenetics information</i>
Kb	Kilobases

Kd	<i>Knock-down</i>
kDa	Kilodaltons
Ko	<i>Knock-out</i>
KRAB	<i>Krüppel associated box</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LBDCG	Linfoma B difuso de célula grande
LBPM	Linfoma B Primario Mediastínico de Células Grandes
LF	Linfoma Folicular
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LLC-IPI	LLC- <i>International Prognostic Index</i>
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
LVs	Lentivirus
MHC-I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad-Clase I
MILE	<i>Microarray Innovations in Leukaemia</i>
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NK	Natural Killer
N-terminal	Amino-terminal
Ob	Obinutuzumab
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI	Polieterimida
R/R	Refractario o en recaída
Rb	Rituximab

RC	Respuesta Completa
RED	<i>Repeat Expansion Detection assay</i>
RLU	<i>Relative Lights Units</i>
RNA-seq	Secuenciación de ARN mensajero
RNP	Ribonucleoproteínas
RP	Respuesta Parcial
SEER	<i>Surveillance Epidemiology End Results</i>
SEHH	Sociedad Española de Hematología y Hematoterapia
sgRNA	<i>Single-guide RNA</i>
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphims</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
SP	Supervivencia Global
SpCas9	Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
TCR	Receptor de células T
TIM-3	<i>Domain containing protein-3</i>
TNR	Mutación dinámica de repeticiones de trinucleótidos
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
UT	Unidades de transducción
UTR	<i>Unstranlated Region</i>
VIH	Virus Inmunodeficiencia Humana
Vx	Venetoclax
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Microgramo

Índice

1.	RESUMEN	29
2.	INTRODUCCIÓN.....	33
2.1.	LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC)	33
2.1.1.	Epidemiología. Componente genético-hereditario....	33
2.1.2.	Diagnóstico y biomarcadores de pronóstico.....	40
2.1.2.1.	Estadaje clínico.....	41
2.1.2.2.	Citogenética.....	42
2.1.2.2.1.	Deleción 13q.....	42
2.1.2.2.2.	Trisomía del cromosoma 12.....	43
2.1.2.2.3.	Deleción 11q.....	43
2.1.2.2.4.	Deleción 17p.....	44
2.1.2.3.	Estado mutacional <i>IGHV</i>	45
2.1.2.4.	Concentración de β 2-Microglobulina.....	46
2.1.3.	Aplicación de los biomarcadores de pronóstico en el diagnóstico clínico.....	46
2.2.	Terapia en llc y biomarcadores terapéuticos.....	47
2.2.1.	Agentes quimioterápicos.....	50
2.2.2.	Terapias dirigidas.....	50
2.2.2.1.	Anticuerpos monoclonales.....	51
2.2.2.2.	Terapias dirigidas con moléculas.....	52
2.2.2.3.	Terapia celular: CAR-T.....	55
2.3.	Búsqueda de nuevos biomarcadores.....	59
2.3.1.	<i>ARSD</i> como biomarcador candidato.....	60

2.3.2. Validación de biomarcadores en LLC.	71
2.3.2.1. Modelos celulares y edición genómica mediante CRISPR.	71
2.3.2.1.1. Descripción molecular de la línea celular de linfocitos B HG-3.	72
2.3.2.1.2. Descripción molecular de la línea celular de linfocitos T Jurkat.	74
2.3.2.1.3. Edición genómica mediante CRISPR.	74
2.3.2.2. Modelos animales de LLC.	80
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	85
3.1. Objetivo General	85
3.2. Objetivos específicos	86
4. MATERIALES Y MÉTODOS	89
4.1. LÍNEAS CELULARES. CULTIVO.	89
4.1.1. Descongelación celular.	89
4.1.2. Expansión celular.	89
4.1.3. Criogenización de las células.	90
4.2. GENERACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES. ..	90
4.2.1. Sistema de empaquetamiento lentiviral.	90
4.2.2. Preparación de los vectores de transferencia.	92
4.2.3. Titulación viral.	93
4.3. MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN.	98
4.4. HG-3: CURVAS DE MUERTE.	99
4.5. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 <i>KNOCK-OUT</i> Y <i>KNOCK-DOWN</i> PARA EL GEN <i>ARSD</i> MEDIANTE EL USO DE TECNOLOGÍA CRISPR.	101
4.5.1. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-out</i> para el gen <i>ARSD</i> (HG-3 ^{Ko-ARSD})	101

4.5.1.1. Inserción lentiviral de los componentes del sistema CRISPR: Cas9+sgRNA.	101
4.5.1.1.1. Inducción de la expresión de Cas9 con doxiciclina.	103
4.5.1.2. Análisis ICE.....	106
4.5.1.2.1. Extracción de ADN.	106
4.5.1.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	106
4.5.1.2.3. Secuenciación Sanger.	108
4.5.1.3. Crecimiento desde célula única.	110
4.5.1.4. Validación de la expresión del gen <i>ARSD</i> en clones <i>knock-out</i>	110
4.5.1.4.1. Extracción de ARN.....	111
4.5.1.4.2. Retrotranscripción (ADNc síntesis).	112
4.5.1.5. <i>PCR cuantitativa: Sondas TimePrime</i>	112
4.5.1.6. Estudio de <i>off-targets</i>	115
4.5.2. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-down</i> para el gen <i>ARSD</i> (HG-3 ^{Kd-ARSD}).	116
4.5.2.1. Inserción lentiviral de los componentes del sistema CRISPR: dCas9-KRAB+sgRNA.....	116
4.5.2.1.1. Diseño de las guías <i>knock-down</i>	117
4.5.2.1.2. Clonación de las guías en el vector de transferencia.....	117
4.5.2.2. Prueba de expresión del gen <i>ARSD</i> en el <i>bulk</i> celular.	121
4.5.2.3. Crecimiento desde célula única.	121
4.5.2.4. Validación de la expresión del gen <i>ARSD</i> en clones <i>knock-down</i>	122
4.5.2.5. Estudio de <i>off-targets</i>	122

4.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN <i>ARSD</i> EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	125
4.6.1. Estudio de proliferación celular <i>in vitro</i>	125
4.6.1.1. Estudio de la proliferación celular <i>in vitro</i> mediante conteo celular.	125
4.6.1.2. Estudio de la proliferación celular <i>in vitro</i> mediante medida de la viabilidad celular.	125
4.6.2. Estudio de proliferación celular <i>in vivo</i> : <i>xenograft</i> en pez cebra.	126
4.6.2.1. Mantenimiento del pez cebra.	127
4.6.2.2. Ensayo xenoinjerto (<i>xenograft</i>) y análisis de imágenes.....	127
4.7. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA <i>IN VITRO</i>	128
4.7.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib.	128
4.7.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con células CAR-T.	129
4.7.2.1. Comprobación de la positividad y negatividad para CD19 de las líneas celulares HG-3 ^{Ko-<i>ARSD</i>} , HG-3 ^{Kd-<i>ARSD</i>} y HEK.	129
4.7.2.2. Inserción del CAR anti CD19 en la línea celular Jurkat.	130
4.7.2.3. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.	130
4.7.2.4. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con células CAR-T. .	131
5. RESULTADOS.....	135
5.1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 <i>KNOCK-OUT</i> Y <i>KNOCK-DOWN</i> PARA EL GEN <i>ARSD</i> MEDIANTE EL USO DE TECNOLOGÍA CRISPR.	135

5.1.1. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-out</i> para el gen <i>ARSD</i> mediante CRISPR.	135
5.1.1.1. Inserción genética de los componentes del sistema CRISPR con vectores lentivirales.....	135
5.1.1.2. Análisis <i>Interference of CRISPR Edits</i> (ICE)...	139
5.1.1.3. Validación de clones <i>knock out</i> en los que la expresión del gen <i>ARSD</i> ha sido eliminada.	143
5.1.1.4. Estudio de <i>off-targets</i>	145
5.1.2. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-down</i> para el gen <i>ARSD</i> mediante CRISPR.	149
5.1.2.1. Inserción genética de los componentes del sistema CRISPR con vectores lentivirales.....	149
5.1.2.2. Prueba de expresión del gen <i>ARSD</i> en el <i>bulk</i> celular	150
5.1.2.3. Validación de la expresión del gen <i>ARSD</i> en clones <i>knock-down</i>	151
5.1.2.4. Estudio de <i>off-targets</i>	152
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN <i>ARSD</i> EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	155
5.2.1. Estudio de proliferación celular <i>in vitro</i>	155
5.2.1.1. Estudio de la proliferación celular <i>in vitro</i> mediante conteo celular.....	155
5.2.1.2. Estudio de la proliferación celular <i>in vitro</i> mediante ensayos de viabilidad celular.....	157
5.2.2. Estudio de proliferación celular <i>in vivo</i>	159
5.3. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA <i>IN VITRO</i>	162
5.3.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en la viabilidad celular en respuesta al ibrutinib e idelalisib.	162

5.3.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con células CAR-T.	164
5.3.2.1. Generación de la línea celular CAR-T.	164
5.3.2.1.1. Inserción del CAR anti CD19 en la línea celular Jurkat.	164
5.3.2.1.2. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.	165
5.3.2.2. Cocultivo ratio 1:1.	167
5.3.2.3. Cocultivo ratio 1:5.	169
6. DISCUSIÓN	173
6.1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 <i>KNOCK-OUT</i> Y <i>KNOCK-DOWN</i> PARA EL GEN <i>ARSD</i>	175
6.1.1. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-out</i> para el gen <i>ARSD</i>	176
6.1.2. Generación de los modelos celulares HG-3 <i>knock-down</i> para el gen <i>ARSD</i> mediante CRISPR.	179
6.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN <i>ARSD</i> EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	181
6.3. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA <i>IN VITRO</i>	184
6.3.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib <i>in vitro</i>	184
6.3.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con células CAR-T.	186
6.3.2.1. Generación de la línea celular CAR-T.	186
6.3.2.2. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.	188
6.3.2.3. Cocultivo con células diana HG-3 ^{Kd-ARSD} y HG-3 ^{Ko-ARSD}	189

7.	CONCLUSIONES.....	195
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	199
9.	ANEXOS.....	227
9.1.	ESQUEMA PLÁSMIDOS EMPLEADOS.....	227
9.1.1.	Sistema de empaquetamiento viral.....	227
9.1.2.	Plásmidos de transferencia.....	229
9.2.	AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO 2020-2025.....	234
9.3.	INFORME COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEAA).....	236
9.4.	Índice de tablas.....	237
9.5.	Índice de figuras.....	238

RESUMEN

1. RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B caracterizada por el crecimiento clonal y acumulación no controlados de células B típicamente CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺ y CD23⁺ en la médula ósea, la sangre y órganos linfoides. La *World Health Organization* estimó en el año 2020 para la LLC una incidencia de 5.8 por cada 100.000 habitantes que alcanza el 14.8 si consideramos únicamente a la población mayor de 50 años. La distinta incidencia entre grupos poblacionales según su ascendencia y entre sexos (mayor para hombres) indica la posible existencia de un componente genético en el desarrollo de la enfermedad.

El objetivo general de esta tesis es sentar las bases para la generación de una plataforma que permita afrontar los retos que supone la interpretación biomédica de los datos que se generan tras tecnologías-ÓMICAS. Pese a los avances en las herramientas de análisis bioinformáticos para el tratamiento masivo de datos y de los predictores de patogenicidad *in silico*, su interpretación en entorno clínico supone un reto. El significado biológico de un elevado número de variantes es incierto. En esta dirección, en la presente tesis se lleva a cabo la generación de un modelo celular *in vitro* para una validación de variaciones genómicas en el contexto de la CLL. Dicho modelo es en sí mismo una plataforma de abordaje de genómica funcional y validación terapéutica que ha sido puesta a punto como prueba de concepto sobre un potencial biomarcador detectado tras análisis completo de exomas de pacientes con LLC: el gen *ARSD*. Específicamente se lleva a cabo la generación de modelos celulares *knock-down* y *knock-out* para el gen *ARSD* a partir de células B inmortalizadas derivadas de un paciente con LLC mediante tecnología CRISPR. Se desarrollan estudios comparativos de proliferación *in vitro* e *in vivo*, así como de respuesta a terapia celular dirigida con ibrutinib e idelalisib y a terapia celular CAR-T. De esta forma se intentará discernir la posible implicación del gen *ARSD* en la LLC.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC)

2.1.1. Epidemiología. Componente genético-hereditario

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B caracterizada por el crecimiento clonal y acumulación no controlados de células B típicamente CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺ y CD23⁺ en la médula ósea, la sangre y órganos linfoides ¹. La *American Cancer Society* (ACS), clasifica las leucemias según el linaje celular afectado (mieloide o linfocítico) y según la tasa de crecimiento de las células afectadas (aguda o crónica). Así, podemos distinguir 4 tipos fundamentales de leucemia: leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia mieloide aguda (LMA).

La nomenclatura “leucemia linfocítica” y “linfomas”, ambas enfermedades neoplasias linfoides, ha sido históricamente confusa. Ambas enfermedades son distinguidas por el órgano primario afectado, siendo para la leucemia la médula ósea y para los linfomas los órganos linfoides. En la Tabla 1 se presenta la clasificación propuesta por la ACS:

Tabla 1: Clasificación de leucemias y linfomas. Fuente: ACS.

Clasificación Leucemia
Leucemia mieloide aguda (LMA)
Leucemia mieloide crónica (LMC)
Leucemia linfocítica aguda (LLA)
Leucemia linfocítica crónica (LLC)
Clasificación Linfomas
Linfomas de células B
Linfoma difuso de células B grandes (incluido el linfoma primario de células B del mediastino)
Linfoma folicular
Linfoma de linfocitos pequeños

Linfoma de células del manto
Linfoma de la zona marginal (incluido el linfoma de células B de la zona marginal extraganglionar, el linfoma de células B de la zona marginal ganglionar y el linfoma de células B de la zona marginal esplénica)
Linfoma de Burkitt
Linfoma linfoplasmacítico (macroglobulemia de Waldenstrom)
Linfomas de células T
Linfoma/leucemia linfoblástico T
Linfomas periféricos de células T (incluidos los linfomas cutáneos de células T, el linfoma de células T en adultos, el linfoma de células T angioinmunoblástico, el linfoma de células T extraganglionar natural asesino/tipo nasal, el linfoma de células T intestinal asociado a enteropatía, el linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células T periféricas ni especificado de otra manera)
Clasificación Linfomas
Hodgkin
Non-Hodgkin

La Tabla 1 muestra una doble clasificación para los linfomas, una atendiendo al linfocito afectado (B o T) y otra atendiendo a la presencia o no de células de Reed-Sternberg (presentes en linfoma Hodgkin).

La *World Health Organization* (WHO) estima 30.2 millones casos nuevos de cáncer en la población mundial en el año 2040, de los cuales 692.000 serán diagnosticados en España siendo 7.830 de leucemia. El cáncer será la causa de muerte de 6.222.069 personas en todo el mundo (83.100 muertes serán de leucemia).

En el año 2020, último año de actualización de la WHO, los datos revelan para la leucemia una incidencia estandarizada de 5.8 por cada 100.000 habitantes (ambos sexos, todos los rangos de edad), siendo mayor si se considera la población de más de 50 años (14.8). El desglose de los datos por sexos muestra una incidencia de 6.3 para hombres mayores de 50 años y de 4.5 para mujeres de más de 50 años. La mortalidad calculada para el 2020 fue de 10.4 (ambos sexos, mayores de 50 años), siendo para hombres de 13.2 y para mujeres de 8.2. En España, en el año 2020, hubo 5.935 casos de leucemia (todas las edades, ambos sexos), suponiendo una incidencia de 6.8 por cada 100.000 habitantes.

Para encontrar datos desglosados por el tipo de leucemia, debemos atender a los datos recabados y presentados por la ACS para la población estadounidense:

Tabla 2: Estimación nuevos casos y muertes de todos los cánceres y leucemia para el año 2022. Fuente: ACS.

Estimación nuevos casos 2022				Estimación muertes 2022		
Tipo cáncer	MUJERES	HOMBRES	AMBOS	MUJERES	HOMBRES	AMBOS
Leucemia	24.840	35.810	60.650	9.980	14.020	24.000
LLC	7.530	12.630	20.160	1.680	2.730	4.410
LMA	9.010	11.040	20.050	4.810	6.730	11.540
LMC	3.740	5.120	8.860	550	670	1.220
LLA	2.920	3.740	6.660	680	880	1.560
Otras leucemias	1.740	3.180	4.920	2.260	3.010	5.270
Todos los cánceres	1.918.030			609.360		

Se observa en la Tabla 2, que la LLC es la leucemia más común (27.05%) seguida de cerca por la LMA. Atendiendo al número de casos según sexo, se observa también un mayor número de casos en hombres que en mujeres.

Además, la ACS también cuenta con datos de distintos años que permiten hacer comparativas y retrospectivas analizando los datos según sexo (hombre/mujer) y según ascendencia (europea/afroamericana) en porcentaje (datos tomados de población estadounidense). Como se detalla en la Figura 1 A-B, el grupo poblacional Hombre-Europeo es el que presenta una mayor incidencia según el año de diagnóstico y también según la edad en el momento del diagnóstico. En la Figura 1-B se observa el punto de inflexión en el que la incidencia comienza a subir conforme aumenta la edad en el momento del diagnóstico, en todos los casos, siendo este punto cercano a los 50 años.

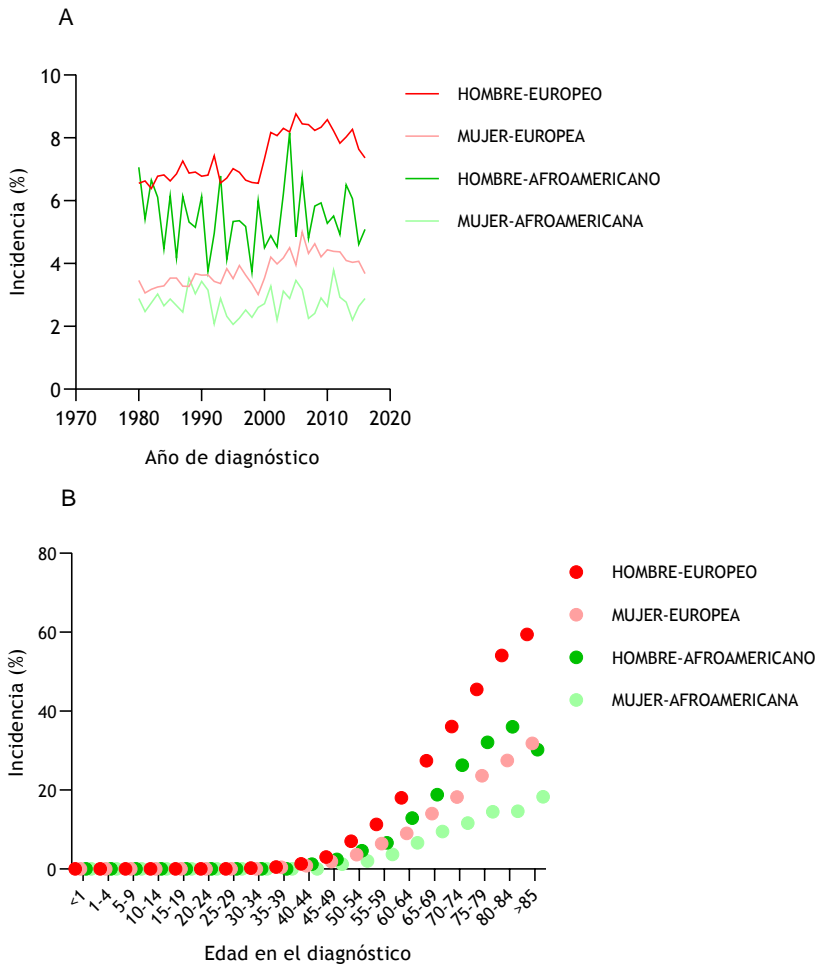


Figura 1: Incidencia en porcentaje de la LLC. A) Incidencia según el año de diagnóstico (1980-2016). B) Incidencia según la edad de diagnóstico (2012-2016). Fuente: ACS

En cuanto a la supervivencia (Figura 2 A-B), se observa una mayor supervivencia relativa a 5 años según el año de diagnóstico en el grupo Mujer-Europea, aunque seguida muy de cerca por el grupo Hombre-Europeo. En todos los grupos, la supervivencia relativa a 5 años según la edad de diagnóstico decrece a partir de los 54 años, siendo el grupo

que presenta menor supervivencia el de Mujer-Afroamericana mayor de 75 años.

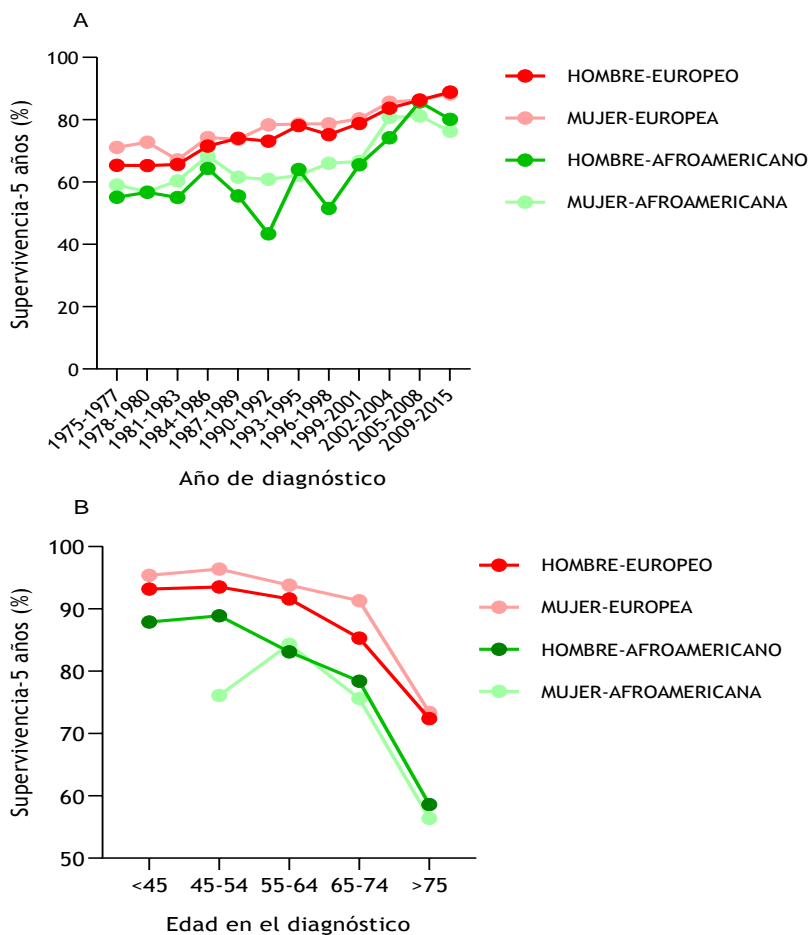


Figura 2: Supervivencia en porcentaje de la LLC. A) Supervivencia según el año de diagnóstico (1975-2015). B) Supervivencia según la edad en el momento del diagnóstico. Fuente: ACS.

Otro dato epidemiológico que aporta la ACS es la incidencia de la LLC según la ascendencia (en porcentaje). En la Figura 3, el grupo de ascendencia europea es el que presenta mayor incidencia. En

contraposición observamos los datos para el grupo ascendencia Isleña Asiática del Pacífico, que presenta la incidencia más baja (menor al 10%) de todos los grupos.

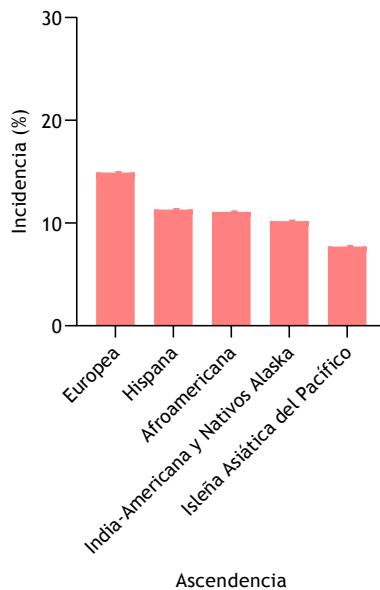


Figura 3: Incidencia en porcentaje de la LLC según la ascendencia. Fuente: ACS

Los datos epidemiológicos indican una mayor incidencia de la LLC en el grupo de ascendencia europea, siendo destacable la baja incidencia en el grupo Isleño Asiático. Además, dentro del grupo Europeo, el subgrupo Hombre-Europeo presenta las mayores incidencias atendiendo tanto al año como a la edad de diagnóstico. Estos datos nos indican la posible existencia de un componente genético en el desarrollo de la enfermedad.

Desde principios del siglo XX, en el contexto clínico, comenzó la sospecha de la existencia de cierto componente genético de carácter hereditario en el desarrollo de la LLC. Las sospechas comenzaron con la identificación de pacientes con LLC de edad menor a la edad media de diagnóstico (fenómeno hoy conocido como anticipación). Otra

característica de estos pacientes era la existencia de familiares que también sufrían LLC, otras neoplasias de células B u otros desórdenes linfoproliferativos. Desde entonces muchos investigadores han tratado de localizar, sin éxito, los *loci* involucrados en el supuesto componente hereditario de la LLC, así como los *loci* responsables del fenómeno de anticipación.

En el año 2000 Yuille *et al*² publicaron una revisión exhaustiva de los estudios previos de LLC en familias, ampliando la cohorte con encuestas a 268 familias nuevas. En sus estudios, revisaron familiares de primer y segundo grado de pacientes con LLC concluyendo que un 13% de los pacientes tenían familiares con desórdenes linfoproliferativos, de los cuales un 6% había sufrido LLC.

En el año 2005 Jonsson *et al*³ emplearon los *Royal Danish Archives, The Provincial Archives of Sealand, The Civil Registration System of Denmark y The National Collection of Midwife-Books* para continuar con el estudio de LLC familiar comenzado por Videbaek en 1947⁴, ampliando el estudio hasta la generación 14. En el estudio compararon la incidencia de desórdenes linfoproliferativos en estas familias con la incidencia esperada según *The Danish Cancer Registry* (1943-2002), donde se observa una incidencia 8 veces superior a la esperada para la LLC.

En 2010 Goldin *et al*⁵ llevaron a cabo uno de los estudios estadísticos más exhaustivos en LLC empleando el registro de población de Suecia (1958-2004). Este registro incluye 9.712 pacientes con LLC y sus familiares de primer grado (26.947). Completaron el estudio añadiendo 38.159 controles y sus familiares de primer grado (107.223). Aplicando un modelo de supervivencia, concluyen que los familiares de primer grado de enfermos de LLC presentaban 8.5 veces más riesgo relativo de desarrollar la enfermedad que los familiares de los controles. Sin embargo, el riesgo absoluto de dichos familiares seguía siendo bajo.

El fenómeno de anticipación de una enfermedad hereditaria conlleva la aparición cada vez más temprana de la enfermedad según avanzan las generaciones, además de suponer un incremento en su severidad y en el número de familiares afectados. En 2002 Wiernik *et al*⁶ realizaron un estudio en el que incluyeron a 60 pares de progenitor/a-

hijo/a pertenecientes a 46 familias de LLC. La edad de diagnóstico de estas parejas fue comparada con *The Surveillance Epidemiology End Results (SEER) Program of the U.S. National Center Institute*. La media de edad en el momento del diagnóstico para el grupo de hijos/as incluidos en el estudio fue de 51 años, mientras que para el grupo progenitores/as fue de 72. Cuando compararon este resultado con la base de datos SEER, observaron diferencias significativas entre la edad de diagnóstico del grupo hijos/as y la población SEER, pero no entre el grupo progenitores/as y la población SEER.

Hasta la fecha, la mutación dinámica de repeticiones de trinucleótidos (su acrónimo en inglés, TNR) es el único mecanismo reconocido como generador del fenómeno de anticipación. Con el objetivo de definir este mecanismo en la LLC, Benzow *et al*⁷ estudiaron la expansión CAG/CTG empleando la técnica *Repeat Expansion Detection assay (RED)*. Para el ensayo contaron con 13 familias LLC, con 17 miembros afectados, y 32 pacientes con diagnóstico de LLC a edad temprana (46 años de media) del *Royal Marsden Hospital Trust*. No encontraron evidencia de la presencia de expansiones CAG noveles para esta enfermedad.

2.1.2. Diagnóstico y biomarcadores de pronóstico.

Atendiendo a la última Guía Nacional para el Diagnóstico de Leucemia Linfática Crónica (2020) publicada por la Sociedad Española de Hematología y Hematoterapia (SEHH)⁸ es necesario:

- Un recuento de células B superior a 5×10^9 células por litro de sangre periférica (linfocitosis) mantenida durante al menos 3 meses en ausencia de infección.

- La confirmación por citometría de flujo de la clonalidad de las células B. El inmunofenotipado de las células B asociado a CLL es de positividad para CD19, co-expresión aberrante de CD5/CD23 y expresión débil de inmunoglobulinas de superficie CD20 y CD79b2. En casos confusos, CD43, CD81, CD200, CD10 o ROR1 puede ayudar a confirmar el diagnóstico.

- Presencia de una citopenia causada por un infiltrado típico en médula ósea, sin necesidad de linfocitosis o de afectación gangliolar.

La gran heterogeneidad en la progresión clínica presente en los pacientes que sufren esta enfermedad ha promovido, en las últimas décadas, la búsqueda de biomarcadores predictivos de la evolución clínica de los pacientes, así como de la respuesta a los distintos tratamientos.

2.1.2.1. Estadaje clínico.

El estadaje clínico de la LLC viene definido tradicionalmente por los sistemas Rai⁹ y Binet¹⁰. El sistema Rai (Tabla 3) inicialmente definió 5 estadios que posteriormente fueron reducidos a 3 grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto). El sistema Binet (Tabla 4) se basa principalmente en el número de grupos de tejido linfóide afectados (ganglios linfáticos del cuello, de la ingle, de la axila, del bazo e hígado)

Tabla 3: Estadios clínicos de la LLC según el Sistema Rai. Fuente: ACS

Estadaje	Linfocitosis	Gánglios linfáticos agrandados	Hígado o bazo agrandados	Anemia	Nivel plaquetario bajo	Riesgo
0	SI	NO	NO	NO	NO	Bajo
I	SI	SI	NO	NO	NO	Medio
II	SI	SI/NO	SI	NO	NO	
III	SI	SI/NO	SI/NO	NO	NO	Alto
IV	SI	SI/NO	SI/NO	SI/NO	SI	

Tabla 4: Estadiajes clínicos de la LLC según el Sistema Binet. Fuente: ACS.

Estadiaje	Número de áreas de ganglios linfáticos agrandados	Anemia	Nivel plaquetario bajo
A	Menos de 3	No	No
B	Al menos 3	No	No
C	Cualquier número	Si o bajo nivel plaquetario	Si o anemia

2.1.2.2. Citogenética.

Las aberraciones cromosómicas están presentes en un 80% de los pacientes con LLC¹¹, considerándose buenas predictoras de la progresión de la enfermedad, así como de la respuesta a los distintos tratamientos. El desarrollo de la Hibridación Fluorescente *in situ* (su acrónimo en inglés, FISH), ha permitido caracterizar de manera sistemática las aberraciones cromosómicas presentes en los pacientes de LLC a partir de muestras de sangre periférica. Las principales son:

2.1.2.2.1. Deleción 13q.

Esta deleción se encuentra en más de la mitad de los pacientes diagnosticados con LLC¹¹. La deleción más común incluye el brazo largo del cromosoma 13. La deleción 13q como única aberración cromosómica presente en el paciente es predictora de buena prognosis¹². El tamaño de la deleción, aunque muy variable, permite definir dos subgrupos de pacientes con distinta progresión clínica. La deleción mínima (Tipo 1) afecta al *loci* miR15a/miR16/DLEU2 y la deleción más grande (Tipo 2) afecta al gen *RBI*¹³.

Los micro-ARNs (miARN) son ARNs pequeños no codificantes que se unen por complementariedad a regiones 3'UTR de otros ARNm reduciendo su estabilidad e impidiendo su traducción¹⁴. Los miARNs miR15a/miR16 delecionados (ubicados en la región intrónica del gen

DLEU2) tienen como diana el ARNm del gen *TP53*, su delección supone un incremento de los niveles de ARNm del gen *TP53*, pero no un aumento en la expresión de la proteína TP53¹⁵. Los altos niveles de ARNm TP53 están asociados con la sobreexpresión del conocido oncogén *BCL2*¹⁶.

La proteína RB presenta una importante función en la correcta progresión del ciclo celular y manteniendo la estabilidad genómica, su inactivación supone la acumulación de cortes de la doble cadena de ADN (su acrónimo anglosajón, DSBs) en las células mediante la desregulación de los factores de transcripción de la familia E2F. La delección Tipo 2, que incluye la delección de *RBI*, está relacionada con una menor supervivencia global (SP), una menor supervivencia libre de progresión (SLP) pero no con un menor tiempo hasta el primer tratamiento desde el diagnóstico¹⁷.

2.1.2.2.2. Trisomía del cromosoma 12.

Identificada en un 15% de los pacientes diagnosticados, en la mayoría de los casos (70%) se encuentra como única aberración¹¹. Pese a lo común de su presencia, poco se sabe de las implicaciones de esta aberración en el contexto de la LLC. Las células B que portan la trisomía 12 presentan a menudo variaciones morfológicas e inmunofenotípicas¹⁸. En un 40% de los pacientes que presentan trisomía 12 se observan mutaciones en el gen *NOTCH*¹⁸.

2.1.2.2.3. Delección 11q.

Presente en hasta un 20% de los pacientes con LLC en el momento del diagnóstico, se asocia a mala prognosis¹⁹. Comprende un grupo heterogéneo de pacientes definido principalmente por la delección monoalélica del gen *ATM* y cuya prognosis empeorará dependiendo del estado mutacional del alelo alternativo, que aumentará en número de mutaciones conforme progresa la enfermedad²⁰. En la mayoría de los pacientes, la delección 11q comprende más de 20 megabases mientras que la región mínima delecionada no suele ser inferior a 2-3 megabases²¹. El tamaño de la delección es también importante y es menor el tiempo hasta el primer tratamiento para delecciones grandes²². Los posibles genes implicados, según el tamaño de la delección, son:

*ATM, RDX, FRDX1, RAB39, CUL5, ACAT1, NPAT, KDEL2, EXPH5, MRE11, H2AX y BIRC3*²³. Aunque la implicación exacta de los genes mencionados en el contexto de la delección no ha sido claramente definida, parece que el gen *ATM* es el responsable de las características moleculares de este biomarcador. El gen *ATM* codifica para la proteína seronina/treonina quinasa ATM que tiene una función principal en la ruta de respuesta a DSBs, sincronizando la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis^{24,25}. La proteína ATM presenta un dominio catalítico de fosfoinositol-3-quinasa (su acrónimo en inglés, PI3K) que incluye un lugar de unión al ATP y un lugar catalítico, un dominio *focal adhesión targetin* (FAT) con un lugar de autofosforilación, y otro dominio *focal adhesión targeting C-terminal* (ATC) que contiene un lugar de acetilación^{26 27}. La correcta disposición estructural de la proteína facilita la interacción con TP53, BRCA1, LKB1 y NBS1, además de ser necesaria para la localización nuclear de la proteína ATM y su asociación con la cromatina^{27,28,29}. La proteína ATM también presenta varias repeticiones HEAT (de su acrónimo en inglés, *Huntington, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1*) que permiten el correcto plegamiento superhelicoidal de la proteína, creando dos estructuras que facilitan su asociación con el ADN de doble cadena o con otras proteínas³⁰. Estudios *in vitro* con células de pacientes con LLC expuestas a los agentes citotóxicos fludarabina, clorambucil y ciclofosfamida, han determinado defectos en la activación de la proteína TP53 y apoptosis con pérdida bialélica del gen *ATM*, defectos no observados cuando la pérdida era monoalélica³¹.

2.1.2.2.4. Delección 17p.

Presente en el 5-8% de los pacientes que aún no han recibido tratamiento y hasta en un 37% en pacientes que ya han recibido alguna línea de tratamiento³². Esta delección siempre incluye la banda 17p13, donde se localiza el gen *TP53*. El 80% de los pacientes que presentan esta delección monoalélica, presentan también mutaciones en el alelo alternativo³³. El gen *TP53* codifica para una proteína de 393 aminoácidos que presenta 3 dominios funcionales diferenciados: un dominio amino-terminal (N-terminal) implicado en la activación

transcripcional, un dominio central que contiene la zona específica de unión al ADN (región más conservada de la proteína) y un dominio carboxilo-terminal (C-terminal) donde hay una región flexible^{34,35}. En condiciones normales, la proteína TP53 inactiva se encuentra en el citoplasma a baja concentración. Para pasar a su estado funcionalmente activo debe recibir señales o sufrir modificaciones relacionadas con daño en el ADN, inhibición de rutas de síntesis, hipoxia, altos índices mitóticos, etc^{36,37}. Bajo condiciones de daño o estrés celular la proteína TP53 sufre un proceso de activación post-traduccional de modo que sus residuos son modificados por fosforilación, acetilación o sumolización³⁸. Estas modificaciones permiten a la proteína TP53 actuar como un factor de transcripción, unirse a regiones de ADN específicas y regular la transcripción de determinados genes relacionados con la detención del ciclo celular, así como de rutas de reparación de daño celular.

2.1.2.3. Estado mutacional *IGHV*.

Otro biomarcador de gran importancia son los genes *IGHV* (de su acrónimo en inglés, *Immunoglobulin Heavy Chain Variable*). La presencia de mutaciones en estos genes divide a los pacientes de LLC en dos subgrupos bien caracterizados: M-*IGHV* (para los pacientes que presentan este *loci* mutado) y NM-*IGHV* (para los pacientes que presentan este *loci* no mutado)^{11,39}. El estado mutacional del *loci*, que es ampliamente conservado a lo largo de la enfermedad, está altamente relacionado con la SLP y la SG, siendo el pronóstico más favorable para los pacientes que presentan M-*IGHV*^{40,41}. Este biomarcador ha sido ampliamente debatido debido a sus implicaciones en el establecimiento de la célula de origen (su acrónimo en inglés, COO) en el contexto de la enfermedad. Aunque la teoría predominante postula que en los pacientes que presentan M-*IGHV* su COO es una célula B madura post germinales y los que presentan UM-*IGHV* su COO es una célula B *naive* pre-germinal⁴², existen otras teorías que apuntan a una única COO que derivaría de células B de memoria^{43,44} o a que las células que presentan M-*IGHV* derivan de células B CD5+ post-germinales y las que presentan NM-*IGHV* derivan de células B CD5+ pre-germinales⁴⁵.

En un contexto clínico, para determinar el estado mutacional del locus *IGHV* se puede partir tanto de muestras de sangre periférica como de médula ósea. Mediante secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas de los pacientes con los genes de la línea germinal en bases de datos⁴⁶ (como por ejemplo: *International immunogenetics information* (IMGT), V-Base o GenBank) se puede calcular el porcentaje de identidad entre ambas secuencias (ratio del número de mutaciones en la región IGH y la longitud en nucleótidos de la línea germinal IGH más homóloga a disposición). Por consenso, una tasa de mutación superior o igual al 2% es considerado mutado. Este punto de corte en el 98% de homología fue elegido para eliminar posibles secuencias variantes polimórficas. Debido a la dificultad y coste de la prueba, se han propuesto varios marcadores sustitutos del estado mutacional *IGHV* como es el caso de ZAP-70^{47,48}, molécula señalizadora perteneciente a la familia de kinasas Syk-ZAP-70, o del antígeno de superficie CD38⁴⁹, medibles ambos mediante citometría de flujo.

2.1.2.4. Concentración de β 2-Microglobulina.

Otro biomarcador pronóstico importante en la LLC es la concentración de β 2-microglobulina (B2M) en suero. La B2M es un componente del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (su acrónimo en inglés, MHC-I) presente en todas las células nucleadas excepto en eritrocitos⁵⁰. Las células LLC liberan de manera continuada B2M y su concentración en suero se correlaciona con la masa tumoral⁵¹. Así, una concentración en suero superior a 3.5 μ g/mL supone un tiempo hasta el primer tratamiento corto, indicativo de rápida progresión de la enfermedad⁵².

2.1.3. Aplicación de los biomarcadores de pronóstico en el diagnóstico clínico.

En la actualidad el índice más empleado es el denominado *CLL International Prognostic Index* (LLC-IPI)⁵³, este sistema está basado en información no redundante de naturaleza clínica, biológica y genética. Los cinco biomarcadores de pronóstico independientes seleccionados por el LLC-IPI son: edad (>65 años, 1 punto), estadiaje clínico (>0, 1

punto), estado mutacional del locus *IGHV* (NM-*IGHV*, 2 puntos), delección 17p y/o mutación en TP53 (presencia, 4 puntos) y concentración de β 2-microglobulina en suero (> 3.5 mg/dl, 2 puntos). Como vemos en la Tabla 5, la suma de los puntos alcanzada define el grupo de riesgo al que pertenece el paciente.

Tabla 5: Grupos de riesgo en LLC-IPI.

GRUPO DE RIESGO	FACTORES DE RIESGO	SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS
Bajo	0-1	93 %
Intermedio	2-3	79 %
Alto	4-6	64 %
Muy alto	7-10	23 %

2.2. TERAPIA EN LLC Y BIOMARCADORES TERAPÉUTICOS.

En la actualidad, la LLC es considerada una enfermedad incurable, con la excepción de los pacientes que pueden ser sometidos a trasplante alogénico de células madre⁵⁴. Sin embargo, los tratamientos actuales basados en la quimioterapia y la terapia dirigida son capaces de controlar la enfermedad y aumentar la supervivencia global en una parte de los pacientes.

Existe un elevado número de guías clínicas con propuestas de tratamiento para los pacientes de LLC, tanto en la primera línea de tratamiento como en las posteriores. Sin embargo, todas tienen en común el uso de los mismos biomarcadores para definir el tipo de tratamiento que recibirán los pacientes con enfermedad activa de manera individual. Los biomarcadores empleados en la actualidad son: presencia de la del (17p), presencia de mutaciones en *TP53*, presencia de del (11q) y estado mutacional *IGHV*. También es necesario saber la edad del paciente, definir su estado general de salud, determinar la presencia de comorbilidades y conocer si está recibiendo otros tratamientos. Todos ellos son factores que definirán al paciente como apto o no apto para los tratamientos y ayudarán a la priorización y a la elección de la terapia.

Como muestra la Figura 4, el estudio de genes y rutas alteradas en LLC, la búsqueda de biomarcadores, el desarrollo de agentes quimioterápicos, anticuerpos monoclonales y otras terapias dirigidas en monoterapia y/o terapia combinada, ha supuesto en su conjunto un incremento moderado en la supervivencia de los pacientes con LLC.

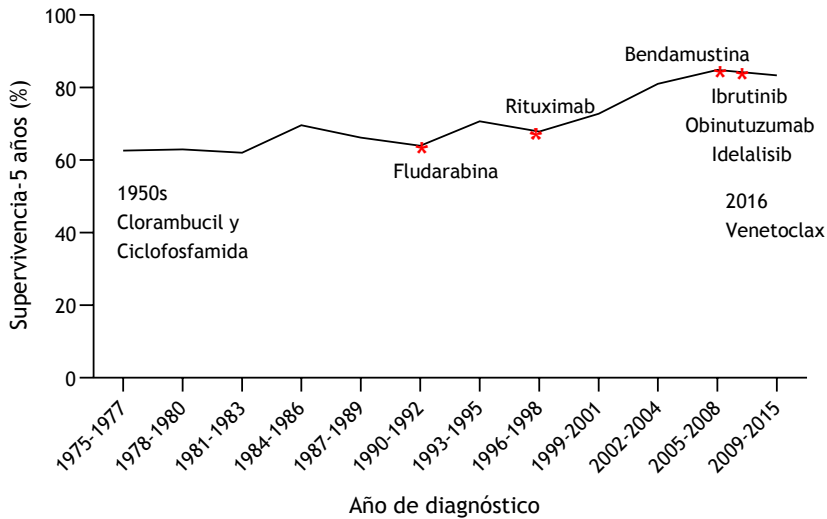


Figura 4: Supervivencia a 5 años para pacientes con LLC según el año de diagnóstico (Datos: ACS). También vemos indicado con asteriscos rojos el año en el que la FDA aprobó el uso de algunos de los distintos fármacos empleados en LLC.

En la Tabla 6 se muestra el esquema de los tratamientos propuestos en la Guía Nacional de LLC del Grupo Español de LLC publicada por la SEHH⁸. Cabe destacar que para los pacientes que presentan la del(17p) y/o mutaciones en TP53 no se recomienda la aplicación de tratamiento con quimioinmunoterapia.

Tabla 6: Primera línea de tratamiento de LLC. (Guía nacional de LLC).
(Abreviaturas: Ib: ibrutinib, Rb:rituximab, Ide:idelalisib, FCR: fludarabina-
ciclofosfamida-rituximab, Ob: obinutuzumab, Cib: clorambucilo).

PRIMERA LÍNEA DE TRATAMIENTO LLC (Por orden de preferencia)				
Del (17p) y/o TP53 mutado	Apto	Ib		
	No Apto	Rb-Ide		
No Del (17p) y/o TP53 mutado	M-IGHV/No Del (11q)	Apto	<65 años	FCR/Ib
			≥65 años	Rb-Ib
	No Apto	Ib/Ob-Cib		
		NM-IGHV/Del (11q)	Apto	Ib
	No Apto	Ib/Ob-Cib		

Según la especificidad en su mecanismo de acción, los fármacos empleados pueden clasificarse en dos grandes grupos: agentes quimioterápicos y terapias dirigidas. Los agentes quimioterápicos presentan como mecanismo de acción general la alteración en la división celular, en la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas. Su principal característica es su baja especificidad y que puede afectar a células sanas principalmente si se encuentran en división activa. Sin embargo, en las terapias dirigidas se busca aumentar la ventana terapéutica (rango de concentración plasmática en la que se puede utilizar un fármaco sin provocar efectos tóxicos) actuando de forma selectiva en una diana, de modo que el fármaco sólo ejerza su función en las células afectadas.

2.2.1. Agentes quimioterápicos.

Como agentes quimioterápicos la guía propone: Clorambucilo (Cib), ciclofosfamida (C), fludarabina (F) y bendamustina (B).

La fludarabina, antimetabolito análogo de la purina adenosina⁵⁵, en contacto con las fosfatasa del suero es desfosforilada principalmente en F-ara-A que es capaz de entrar en las células donde es fosforilada a F-ara_ATP. El principal mecanismo de F-ara-ATP es la inhibición de la síntesis de ADN (aunque también afecta a la síntesis de ARN) que tiene como resultado final la apoptosis celular⁵⁶.

La ciclofosfamida y el clorambucilo, son agentes alquilantes del tipo mostaza nitrogenada⁵⁷, ejercen su acción sustituyendo los grupos alquilo por átomos de hidrógeno en el ADN. Este cambio supone la formación de enlaces cruzados entre las hebras de ADN, alterándose la pauta normal de lectura, así como inhibiéndose la síntesis de ADN/ARN/proteínas⁵⁸.

La bendamustina es un agente quimioterápico derivado de la mecloretamina que presenta similitudes tanto con los agentes alquilantes como con los análogos de purinas⁵⁹.

2.2.2. Terapias dirigidas.

El avance en el conocimiento de los cambios en el ADN y las proteínas que provocan cáncer ha servido para diseñar tratamientos dirigidos. El primer fármaco dirigido para cáncer fue el tamoxifeno, un agonista de receptores de estrógeno que se aprobó en los años 70 para el cáncer de mama. El hallazgo de variantes genéticas en determinados genes como receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y/o el inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) en ciertos tipos de cáncer, facilitó el desarrollo de las terapias dirigidas. Durante la década de 2000 se desarrollaron las terapias dirigidas como el trastuzumab (*Herceptin*) y el imatinib (*Gleevec*), medicamentos que encuentran y eliminan las células cancerosas con mutaciones en HER2 y TKI, respectivamente. Se inició por tanto el desarrollo de las terapias dirigidas, que aportan la ventaja de ser más eficaces en aquellos pacientes con variantes genéticas concretas en sus células tumorales que alteran como crecen, se dividen y se propagan. Se trata de la base de la medicina de precisión.

2.2.2.1. Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales son proteínas sintéticas que ejercen su función del mismo modo que lo hacen los anticuerpos en el sistema inmunitario. Son diseñados para que reconozcan como antígenos moléculas presentes en las células sobre las que van a actuar. Pueden ser de origen murino (de ratón, nomenclatura con sufijo -omab), quiméricos (humano-ratón, nomenclatura con sufijo -ximab), humanizados (con pequeñas partes de ratón, nomenclatura con sufijo -zumab) y humanos (nomenclatura con sufijo -umab). Como anticuerpos monoclonales la guía propone rituximab y obinutuzumab.

El rituximab (Rb) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20. El antígeno CD20 se encuentra en todos los linajes de células B (aunque no en células madre, células plasmáticas o en tejidos no linfoides)⁶⁰. Aunque con distinta intensidad, es expresado por el 95% de células B neoplásicas⁶¹, siendo en las células de LLC en las que se encuentra menor intensidad de expresión⁶². Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales, se han definido distintos mecanismos de actuación del Rb: aumento del flujo de calcio, translocación de fosfolípidos de la superficie celular, activación de las caspasas, inhibición de la síntesis de ADN, arresto del ciclo celular, citotoxicidad mediada por el complemento (su acrónimo en inglés, CDC), citotoxicidad dependiente de anticuerpo (su acrónimo en inglés, ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpo (su acrónimo del inglés, ADCP) y apoptosis^{63,64,65,66}. Sin embargo, los mecanismos específicos de acción en estudios con humanos siguen siendo motivo de debate.

En las células B, el antígeno CD20 se colocaliza en las mismas balsas de esfingolípidos y colesterol que el receptor de células B (su acrónimo del inglés, BCR)⁶⁷, existiendo correlación entre los niveles de expresión en la superficie celular de CD20 y de BCR para las células de LLC. El silenciamiento de CD20 en células B neoplásicas, supone la afectación en la fosforilación de las quinasas LYN, SYK, GAB1 y ERK asociadas con la señalización dependiente del BCR⁶⁸, lo cual sugiere que existe una relación importante del dímero CD20-BCR en el mantenimiento de la señal basal del BCR⁶⁹.

El obinutuzumab (Ob) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 derivado de un anticuerpo de tipo II, diferenciándose del Rb por ser

derivado de un anticuerpo de tipo I^{70,71}. Así el Rb, mediante su unión efectiva no homotípica al antígeno CD20, aún en condiciones de saturación^{72,73}, supone la localización del CD20 en las balsas lipídicas⁷⁴, una CDC mínima y respuestas ADCC y ADP⁷⁵. El Ob presenta una unión homotípica al antígeno CD20 que desciende en condiciones de saturación^{72,73}, no produce la localización de CD20 en las balsas lipídicas⁷⁴, presenta una DCD potente e independiente de caspasas, una mínima CDC y unas ADCC y ADP más potentes que el Rb⁷³.

2.2.2.2. Terapias dirigidas con moléculas.

La guía propone para esta categoría el uso de ibrutinib (Ib), idelalisib (Ide) y venetoclax (Vx).

El ibrutinib es un inhibidor de la tirosin-quinasa de Bruton (su acrónimo del inglés, BTK). La proteína BTK desempeña una función bien definida en la ruta de señalización del BCR, ruta fundamental en el desarrollo y mantenimiento de las células B. En respuesta a señalización mediada por el BCR, las quinasas de la familia Src activan la proteína BTK, activando ésta a su vez a la fosfolipasa-C γ que produce la movilización de calcio y la activación de las rutas de señalización de las quinasas MAP y de NF- κ B⁷⁶. La proteína BTK está sobreexpresada en los pacientes con LLC, de modo que inhibiendo su activación con el Ib se consigue citotoxicidad directa, inhibición de la proliferación, disrupción de la ruta de señalización mediada por citoquinas y quimiocinas e inhibición de la migración celular^{77,78,79}.

El idelalisib es un inhibidor específico de fosfatidilinositol 3-quinasa isoforma delta (su acrónimo del inglés, PI3K- δ), isoforma de PI3K expresada en el linaje hematopoyético y esencial para la proliferación, activación y supervivencia de los linfocitos B⁸⁰. Aunque la PI3K- δ está sobreexpresada en un 5.5% de los pacientes con LLC⁸¹, su activación continuada suele deberse a la actividad constante del BCR en la enfermedad, además de otros receptores como el CD40⁸². La actividad citotóxica del Ide es principalmente caspasa dependiente y, aunque no produce la apoptosis de otras células del sistema inmune como las células T o las *Natural Killer* (NK), sí produce una alteración en la producción de citoquinas como la IL-6, IL-10, TNF- α o el ligando

CD40⁸³, que promueven la proliferación o mejoran la supervivencia de las células de LLC^{84,85,86}.

El venetoclax es un mimético de BH3 que regula a la proteína anti-apoptótica BCL2⁸⁷, sobreexpresada en pacientes con LLC⁸⁸. La familia de proteínas BCL2 está compuesta por, al menos, 25 miembros⁸⁹. La mayor parte de estos miembros son conocidos como proteínas BH3 cuya función es la de modular la acción de los otros miembros de la familia BCL2 como son las proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bak) y las anti-apoptóticas BCL-2 y BCL-XL. El Vx neutraliza selectivamente a la proteína BCL-2 frente a BCL-XL, suponiendo una ventaja sobre otros miméticos de BH3, como el Navitoclax, que suponían la muerte apoptótica de las plaquetas.

El uso de terapias combinadas, así como la preferencia del orden de uso de un fármaco viene establecido principalmente por los resultados de los ensayos clínicos en los que fueron probadas las distintas combinaciones de fármacos.

La primera línea de tratamiento para pacientes que no presentan del(17p), del(11q), menores de 65 años y con M-IGHV viene definida por el ensayo clínico CLL8 (NCT00281918) iniciado en el año 2003^{90,91}. En este ensayo, en el que participaron 817 pacientes de LLC no tratados previamente, se comparó el tratamiento base del momento compuesto por fludarabina y ciclofosfamida (FC) con el mismo tratamiento complementado con rituximab (FCR). Con un seguimiento medio de 5,9 años, el nuevo tratamiento consiguió una SLP de 56.8 meses (32.9 meses para FC) y una presencia de neoplasias malignas secundarias del 13.1 % (17.4 % en FC).

Para la misma citogenética, pero cambiando la edad del paciente (≥ 65 años), la quimioinmunoterapia es sustituida por Ib-Rb. Shanafelt *et al* llevaron a cabo el ensayo clínico (NCT02048813) en el que se compararon ambos tratamientos en 529 pacientes de LLC ≥ 70 años y no tratados previamente⁹². Compararon la SLP de ambos grupos y observaron una mejor respuesta para el grupo tratado con Ib-Rb que con FCR (89.4% vs. 72.9% a 3 años) y una mejor SG (98.8% vs. 91.5% a 3 años).

Para pacientes > 65 años el tratamiento será B-Rb en base al ensayo clínico CLL10 (NCT2000769522)⁹³ en el que se observaron menos efectos tóxicos para este grupo de pacientes.

Cuando el paciente presenta mal estado general o existen comorbilidades, se recomienda el uso de Ib o de la combinación Ob-Cib. El uso de esta combinación mostró, en el ensayo clínico CLL11 para pacientes con una puntuación de la escala de valoración acumulativa de enfermedades (su acrónimo del inglés, CIRS) de 8, (NCT01010061) una mejor respuesta tanto a nivel de la SLP como del cálculo de la SG⁹⁴.

La recaída en LLC es definida como la evidencia de progresión de la enfermedad en un paciente que previamente había conseguido respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP) durante 6 meses. Es decir, el paciente debe tener de nuevo enfermedad activa.

Para la elección del nuevo tratamiento en el paciente r/r (refractario/recaída), además de tener en cuenta los factores anteriores (edad, comorbilidades, estado de salud general, etc.) se tendrá en cuenta el tratamiento recibido en primera línea, así como descartar la posibilidad de transformación a un linfoma de alto grado (Síndrome de Richter).

Como se muestra en la Tabla 7, la guía propone la inclusión del paciente en un ensayo clínico siempre que sea posible y reduce los posibles tratamientos a terapia dirigida. También se observa la posibilidad de recibir un trasplante alogénico o participar en ensayo clínico con terapia celular CAR-T en pacientes jóvenes de alto riesgo cuya enfermedad progrese después de haber recibido Ib y Vx.

Tabla 7: Tratamientos propuestos para pacientes con LLC R/R. (Guía nacional de LLC) (Abreviaturas: IQT: inmunquimioterapia, R: rituximab, Vx: venetoclax, Ide: idelalisib, Ib: ibrutinib)

TRATAMIENTO PACIENTES R/R DE LLC (Por orden de preferencia)	
R/R IQT	Ensayo clínico/R-Vx/R-Ide
Intolerante a Ib	Ensayo clínico/R-Vx/R-Ide
R/R Ib	Ensayo clínico/R-Vx/R-Ide. Valorar Alo-TMO
R/R Vx	Ensayo clínico/ Ib/ R-Ide. Valorar Alo-TMO

2.2.2.3. Terapia celular: CAR-T.

La respuesta inmune de los linfocitos T se basa en el reconocimiento antigénico por medio de su receptor de membrana (su acrónimo del inglés, TCR). El TCR posee tres regiones diferenciadas: un dominio extracelular a través del cual reconoce como ligandos pequeños péptidos que deben estar asociados a células presentadoras de antígenos, un dominio transmembrana y un dominio intracelular a través del cual se desencadenan las rutas de señalización.

Los receptores de antígeno quiméricos (su acrónimo en inglés, CARs) son receptores transmembrana sintéticos, que, al igual que el TCR, constan de tres regiones fundamentales (Figura 5). Una primera porción extracelular, análoga a la región variable de los anticuerpos, con capacidad de reconocimiento antigénico, en los CARs aprobados comercialmente para neoplasias de células B es la región ScFv correspondiente al anticuerpo monoclonal FMC63. Una segunda porción, región bisagra y transmembrana, que cumple funciones estructurales, ya que la distancia a la que se produce la interacción entre las células y la transmisión de las señales resultan clave en la acción citotóxica del linfocito. La tercera región, intracelular, encargada de transducir señales de activación, está formada por la porción intracelular de señalización del TCR CD3- ζ y el dominio coestimulador (CD28 o 4-1BB para los CARs aprobados comercialmente). La integración y expresión del CAR-CD19 en las células T, les permite el reconocimiento autónomo del antígeno CD19, pudiendo llevar a cabo su actividad efectora sobre las células CD19⁺.

Kymriah (tisagenlecleucel, *Novartis Pharmaceuticals Corporation*) fue el primer fármaco con autorización comercial empleando esta tecnología tanto por la *Food and Drug Administration* (FDA) (2017) como por la *European Medicines Agency* (EMA) (2018). Seguido de cerca por *Yescarta* (axicabtagene ciloleucel, *Kite Pharma Inc.*), autorizado por ambos organismos en 2018. *Kymriah* está indicado para pacientes con r/r LLA y edad ≤ 25 años, así como en pacientes adultos con r/r Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) y r/r linfoma folicular (LF). Por su parte, *Yescarta* está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con r/r LBDCG y r/r linfoma B primario mediastínico de células grandes (LBPM). Como se muestra en Figura

5, la estructura del CAR es muy similar en ambos medicamentos y presentan su diferencia fundamental en el dominio coestimulador de CD3- ζ (intracelular del CAR.)

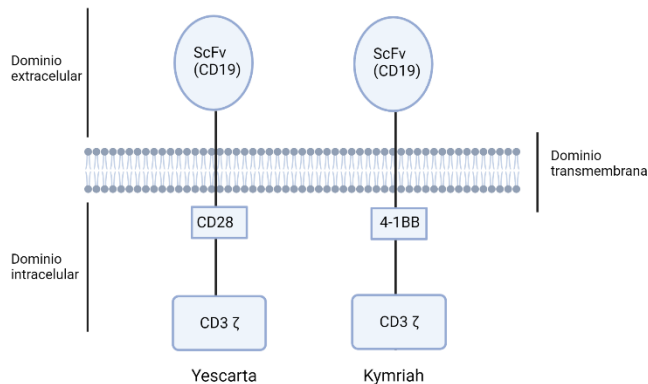


Figura 5: Estructura CAR en *Yescarta* (Kite Pharma) y *Kymriah* (Novartis). Realizada en Biorender.com.

El proceso de producción de células CAR-T (Figura 6) comienza con la extracción de células mononucleares de sangre periférica (su acrónimo del inglés, PBMCs) del paciente y posterior selección o lavado de linfocitos T. La activación de los linfocitos T es necesaria tanto para su expansión *ex vivo* como para la transducción del ADNc del CAR mediante retrovirus⁹⁵. En los CARs autorizados comercialmente, los sistemas de transducción retrovirales empleados son γ -retrovirus en *Yescarta* y lentivirus en *Kymriah*, ambos sistemas han demostrado altas eficiencias de transducción e integración así como seguridad en su uso en el contexto de terapia celular^{96,97}. El último paso en la producción consiste en la expansión controlada de las células CAR-T. A lo largo del proceso de producción de las células CAR-T, que para los sistemas comerciales son llevados a cabo en salas blancas en sistemas total o parcialmente automatizados, existen múltiples puntos de control de calidad⁹⁸. De acuerdo con la producción en condiciones *Good Manufacturing Practices* (GMP) además del control de ambiente en el que se producen las CAR-T y los equipos, medios y reactivos, se deben realizar controles *in-process*, es decir, a lo largo del proceso de

producción⁹⁹. Podemos agrupar los controles en cuatro grupos: de seguridad, de pureza, de identidad y de potencia. Los controles de seguridad incluyen pruebas de tinción Gram, micoplasma, nivel de endotoxinas, número de copias del transgén y comprobación de la replicación incompetente del retrovirus. La pureza y la identidad es medida en ambos CARs como % células T CD3⁺ y % células CAR-T (para Yescarta y Kymriah). Por último, la potencia es medida *in vitro* mediante la cuantificación de la secreción de IFN- γ ¹⁰⁰.

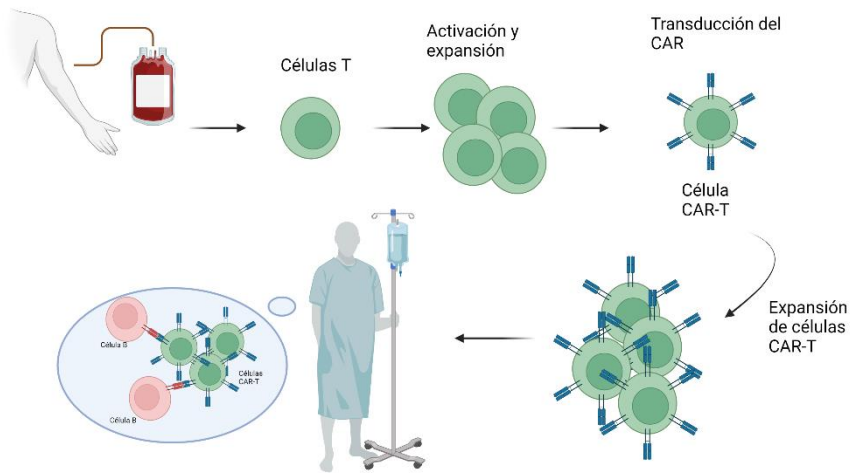


Figura 6: Proceso general de la terapia CAR-T. Realizada en: Biorender.com

Los buenos resultados obtenidos con estas dos terapias vienen recogidos en el seguimiento a 5 años de los ensayos clínicos en los que fueron probados. Para *Kymriah*, el ensayo clínico se denominó *Eliana global* (NCT02435849), los resultados con un seguimiento a 5 años, publicados recientemente en su web¹⁰¹ muestran una SG del 55% para los 79 pacientes con r/r LLA. En el caso de *Yescarta*, en el que se trataron a 101 pacientes con r/r LBDCG, los resultados son recogidos en el seguimiento a 4 años del ensayo clínico *Zuma-1* (NCT02348216) siendo la SG del 44%¹⁰².

Otras terapias con células CAR-T han sido aprobadas por la EMA recientemente como son *Tecartus* para el linfoma de células del manto, *Breyanzi* para para DLBCL, PMBCL y linfoma folicular de grado 3,

MB-CART2019.1 para el DLBCL y *CARVYKTI* y *Abecma* para el mieloma múltiple.

Sin embargo, la terapia CAR-T no está exenta de efectos adversos. Uno de los grandes efectos adversos de la terapia CAR-T es la enfermedad de injerto contra el huésped¹⁰³, pero no es el único. Las CAR anti-CD19 causan una importante depleción linfoide B¹⁰⁴, ya que actúan sobre todas las células B CD19⁺. La terapia CAR-T también puede ocasionar el síndrome de liberación de citoquinas¹⁰⁵ (su acrónimo en inglés, CRS), que supone la activación aguda del sistema inmune en el que se produce la liberación masiva de IFN- γ , TNF- α , IL-10 y especialmente la IL-6, que pone en riesgo la vida del paciente^{106,107}. Otro de los efectos adversos observados tras el tratamiento con CAR-T es la neurotoxicidad con alteración a nivel de conciencia, alucinaciones, *delirium*, afasia y mioclonías¹⁰⁸.

Desde el año 2011, en el que por primera vez se enroló a un paciente con LLC en un ensayo clínico con CAR-T, unos 100 pacientes más han recibido esta terapia. Aunque en alguno de los pacientes se observaron remisiones duraderas¹⁰⁹, los resultados de la terapia para la LLC distan mucho de los obtenidos en otras neoplasias de células B para los que fue autorizada. Así, en los distintos ensayos clínicos, vemos que los pacientes de LLC obtuvieron una tasa de respuesta general del 0 al 60%, siendo del 68 a 93% para pacientes con LLA y del 64 a 86% en linfomas de células B¹¹⁰.

Los factores determinantes en la respuesta a la terapia CAR-T son: el estado funcional de los linfocitos T extraídos del paciente, el microambiente tumoral inhibitorio de la actividad de los linfocitos T generado por las células cancerosas y las interacciones antígeno-CAR entre las células CAR-T y las células B neoplásicas.

La correcta función de los linfocitos T desempeña un papel fundamental en la producción de las células CAR-T plenamente activas, pues son su “materia prima” durante el proceso de producción de las mismas. Sin embargo, en la mayoría de los ensayos clínicos vemos incluidos pacientes de LLC que han recibido hasta 5 tratamientos previos¹¹¹. La persistente exposición de los linfocitos T a los antígenos tumorales, así como a los tratamientos, hacen que los linfocitos T se encuentren exhaustos, perdiendo robustez en sus funciones efectoras y

expresando gran cantidad de receptores de factores de inhibición como PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 que conllevan, en último término, a una falta de activación de las células CAR-T y de la producción de citoquinas potenciados por la alta sensibilidad de estas células hacia el microambiente tumoral¹¹². De este modo la respuesta inmune es insuficiente o inexistente.

La comparación de las células CAR-T de los pacientes con LLC respondedores a la terapia *versus* los no respondedores, determinaron que las CAR-T de respondedores presentaban un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con la memoria, mientras que los linfocitos T de no respondedores presentaban un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con la diferenciación efectora, glicolisis, agotamiento y apoptosis. Además, la comparativa de los linfocitos T antes de la producción de las células CAR-T, determinó que la presencia en los mismos de una mayor frecuencia de la subpoblación de linfocitos T CD27⁺ CD45 RO⁻ CD8⁺ está relacionada con una remisión completa de la enfermedad después del tratamiento. Esta subpoblación presenta características de células de memoria¹¹³.

2.3. BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES.

La identificación de marcadores genéticos que expliquen el origen de la enfermedad, así como su distinta incidencia entre sexos y ascendencia, además de la búsqueda de marcadores de pronóstico y de respuesta a tratamiento, es de vital importancia para mejorar la atención clínica de los pacientes.

En esta dirección, el *International Cancer Genome Consortium* (ICGC) intenta aunar esfuerzos para avanzar en la correcta descripción genómica, transcriptómica y epigenética de más de 50 tipos de cánceres a lo largo del mundo. El grupo español del consorcio es el encargado de abordar el estudio sistemático de la LLC. Para conseguir este objetivo, han creado una base de datos formada, hasta ahora, por 551 pacientes de LLC.

En el estudio sistemático de exomas que incluye 439 pacientes de la cohorte de LLC del consorcio internacional¹¹⁴ (49 con linfocitosis monoclonal de células B y 390 pacientes de LLC sin tratar), estudio complementario al llevado a cabo por el consorcio¹¹⁵, se han

identificado 12.057 mutaciones en regiones que codifican proteínas (8.965 mutaciones identificadas como *Single Nucleotide Variations* (SNVs), y 1.888 mutaciones que afectan a más de un nucleótido). Las mutaciones se detectaron mediante dos métodos diferentes: *VarsCan*¹¹⁶ y *Platypus*¹¹⁷. Las posibles mutaciones *drivers* en LLC se definieron integrando los datos obtenidos con las herramientas *MusiC2*¹¹⁸, *OncodriveFM*¹¹⁹, *OncodriveClust*¹²⁰ y *Mutation3D*¹²¹. Como resultado del estudio se detectaron 66 posibles genes *drivers* de la LLC, de los cuáles 32 habían sido previamente descritos por Puente *et al*¹²².

2.3.1. ARSD como biomarcador candidato.

ARSD (Ariilsulfatasa D), gen ubicado en la región Xp22.3, se encuentra mutado en 11 pacientes pertenecientes al estudio de exomas completo de LLC¹¹⁴ (Tabla 8). Los 11 pacientes presentan 12 mutaciones distintas que suponen un cambio nucleotídico en la secuencia del gen (3 de éstas, silenciosas). De las 4 variaciones restantes, 3 suponen un cambio aminoacídico y 1 supone la generación de un codón de terminación (determinando el final de la síntesis de la proteína anticipadamente y, presumiblemente, determinando disfunción proteica).

Tabla 8: Descripción de los SNVs en *ARSD*¹²³.

SNVs					
Posición (GRCh38)	Nº Pacientes	SNV	Consecuencia	dbSNP	Transcript_ID
X:2915564	5	C>T	<i>Stop Gained</i>	rs111939179	ENST00000381154
X:2915597	2	C>T	<i>Missense</i>	rs370769167	ENST00000381154
X:2915602	1	C>A	<i>Missense</i>	rs115332247	ENST00000381154
X:2918000	1	A>T	<i>Missense</i>	rs67272620	ENST00000381154

Atendiendo a la base de datos ALFA¹²⁴, las frecuencias alélicas de las variantes descritas presentan gran variabilidad entre poblaciones (Tabla

9), resultan llamativas las diferencias de las frecuencias alélicas del alelo alternativo entre las poblaciones europea y asiática del este.

Tabla 9: Frecuencias alélicas SNVs ARSD. Fuente: ALFA.

Código dbSNP	Población	Tamaño de muestra	Alelo Referencia	Alelo Alternativo
rs111939179	Total	13530	C=0.78884	T=0.21116
	Europea	10572	C=0.78282	T=0.21718
	Africana	608	C=0.783	T=0.217
	<i>Africana (otros)</i>	8	C=0.9	T=0.1
	<i>Afroamericana</i>	600	C=0.782	T=0.218
	Asiática	56	C=0.89	T=0.11
	<i>Asia (del este)</i>	26	C=0.92	T=0.08
	<i>Asia (otros)</i>	30	C=0.87	T=0.13
rs370769167	Otros	2294	C=0.8156	T=0.1844
	Total	13530	C=0.78758	T=0.21242
	Europea	10574	C=0.78173	T=0.21827
	Africana	608	C=0.781	T=0.219
	<i>Africana (otros)</i>	8	C=0.9	T=0.1
	<i>Afroamericana</i>	600	C=0.780	T=0.220
	Asiática	56	C=0.89	T=0.11
	<i>Asia (del este)</i>	26	C=0.92	T=0.08
rs115332247	<i>Asia (otros)</i>	30	C=0.87	T=0.13
	Otros	2292	C=0.8137	T=0.1863
	Total	13528	C=0.79295	A=0.20705
	Europea	10574	C=0.78702	A=0.21298
	Africana	606	C=0.785	A=0.215
	<i>Africana (otros)</i>	8	C=0.9	A=0.1
<i>Afroamericana</i>	598	C=0.784	A=0.216	
Asiática	56	C=0.91	A=0.09	

	<i>Asia (del este)</i>	26	C=0.92	A=0.08
	<i>Asia (otros)</i>	30	C=0.90	A=0.10
	Otros	2292	C=0.8194	A=0.1806
rs67272620	Total	27570	A=0.88546	T=0.11309
	Europea	20252	A=0.87572	T=0.12295
	Africana	3506	A=0.9615	T=0.0376
	<i>Africana (otros)</i>	122	A=0.992	T=0.008
	<i>Afroamericana</i>	3384	A=0.9604	T=0.0387
	Asiática	168	A=0.940	T=0.060
	<i>Asia (del este)</i>	112	A=0.964	T=0.036
	<i>Asia (otros)</i>	56	A=0.89	T=0.11
	Otros	2790	A=0.8222	T=0.1742

El gen *ARSD* (Ensemble¹²⁵ ENSG00000006756.16) se encuentra en el cromosoma X (región Xp22.3), y presenta un pseudogén en la región pseudoautosómica del cromosoma Y. En los humanos, como mamíferos, la compensación de la dosis de cromosomas sexuales en mujeres se logra silenciando uno de los dos cromosomas X, proceso conocido como Inactivación del Cromosoma X (ICX). Durante la ICX, uno de los cromosomas X es inactivado y compactado formando una estructura denominada cuerpo de Barr. En el proceso interactúan transcritos no codificantes, modificadores de la cromatina y factores de organización nuclear¹²⁶.

Aunque la mayoría de los genes del cromosoma X compactado son silenciados, existen genes que escapan a la inactivación, suponiendo un desbalance de la expresión de estos genes entre sexos^{127,128,129}. La expresión bialélica de los genes que escapan a la inactivación cromosómica, explican una parte de la diferente incidencia entre hombres y mujeres en algunos cánceres como el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, el carcinoma renal de células claras renales o el glioma de bajo grado¹³⁰. En otros casos, como en del factor GRPR, la dosis extra en mujeres, puede suponer un incremento en la susceptibilidad a sufrir cáncer de pulmón entre mujeres fumadoras.¹³¹

El gen *ARSD*, localizado en el cromosoma X (región Xp22.3), es un reconocido gen que escapa a la inactivación cromosómica^{127,129,132,133,134}, manteniéndose la inactivación, además, a lo largo de numerosos tejidos aunque con distinta intensidad¹²⁹.

ARSD codifica para 2 transcritos distintos (ENST00000381154.6 y ENST00000458014.1) que dan lugar a proteínas de distinta longitud (593 y 159 aminoácidos respectivamente). Ambas proteínas presentan distinto nivel de soporte de transcripción (su acrónimo en inglés, TSL) GENCODE¹³⁵. El nivel de soporte para el primer transcrito es TSL 1 (evidenciado por el alineamiento de varios ARNm) y para el segundo 3 (evidenciado por el alineamiento de único *expressed sequence tag* (EST)). También se observan 4 transcritos procesados, de los cuáles sólo uno presenta TSL 1 (ENST00000217890.10). Además, también presenta un ARN largo no codificante (su acrónimo del inglés, lncRNA), denominado *ARSD-AS1* ubicado en la región no traducida 3' (3'UTR).

El transcrito ENSG0000006756.16 es el identificado con la *reference sequence* NM_001669.4 de acuerdo con el proyecto MANE¹³⁶. El transcrito corresponde con la proteína P51689 (593 aminoácidos) isoforma 1 en Uniprot¹³⁷, identificándose 2 isoformas más generadas mediante *splicing* alternativo. Este transcrito también es el que presenta el CCDS35196.

El transcrito ENST00000458014.1 presenta también una correspondencia en Uniprot (H7C327, proteína de 159 aminoácidos) aunque su evidencia tiene una puntuación de 1/5 y no presentan información acerca de su estructura.

El gen *ARSD* presenta genes ortólogos en distintos animales placentarios como son la *Marmota flaviventris*, *Canis lupus familiaris* o *Macaca mulatta*,

ARSD codifica para la proteína ARSD (Arilsulfatasa D). Las arilsulfatasas son proteínas que pertenecen a la familia de las sulfatasas (enzimas estererasas, catalizadoras de la hidrólisis de ésteres de sulfato).¹³⁸ Hasta la fecha, se han descrito 13 genes que codifican para distintas sulfatasas, siendo de la subfamilia de las arilsulfatasas los genes que codifican para las proteínas ARSA, ARSB, ARSC, ARSD, ARSE y ARSF¹³⁹. Cuatro de estos genes (*ARSC*, *ARSD*, *ARSE* y *ARSF*), están

localizados en la misma región cromosómica (Xp22.3), y presentan una estructura genética altamente conservada¹³⁹. La proteína codificada por estos 4 genes es post-transcripcionalmente glicosilada y puede ser localizada en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y lisosomas¹³⁸. Aunque la proteína ARSD no tiene sustrato biológico conocido, se han descrito sustratos biológicos para las enzimas ARSA, ARSB y ARSC y se ha documentado, además, la actividad para las proteínas ARSE y ARSF¹³⁶.

Según muestra la base de datos de *The Human Protein Atlas*¹⁴⁰, el gen *ARSD* es expresado en todos los órganos con evidencia a nivel ARN y proteína (Figura 7). Aunque con baja especificidad de tejido, los niveles de expresión de ARN más elevados corresponden con el hígado y la vesícula biliar, seguidos del riñón y vejiga urinaria. La médula ósea y el tejido linfoide presentan también expresión positiva del gen. Seleccionando la expresión del gen en los distintos tipos celulares del sistema inmune, se puede comprobar la expresión de *ARSD* en los linfocitos B (Figura 8), destacando los monocitos como la línea celular del sistema inmune que muestra mayor expresión.

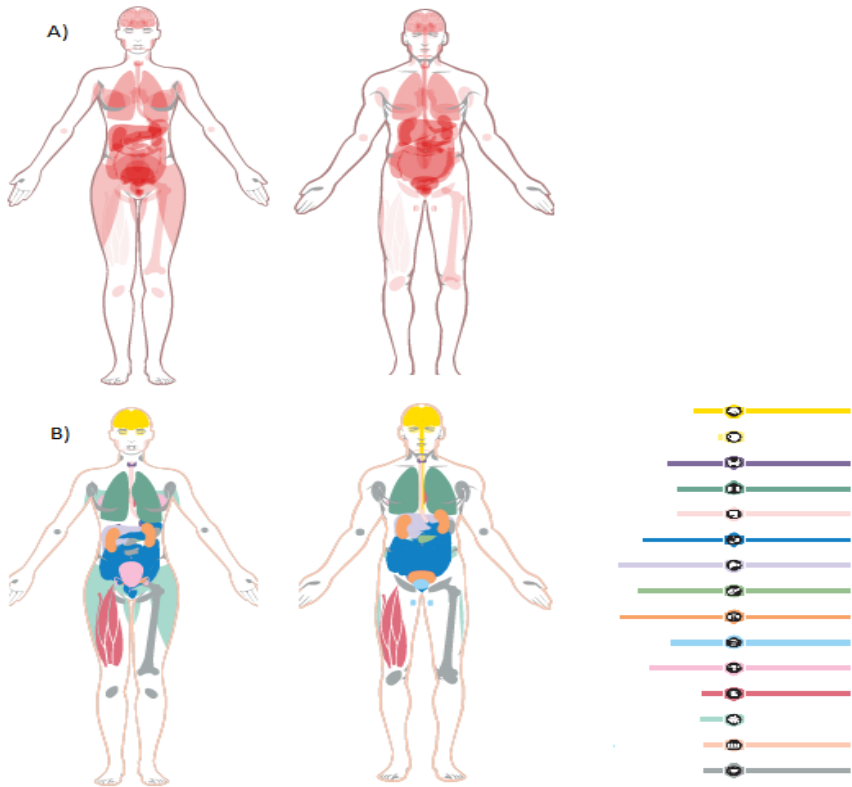


Figura 7: Expresión del gen *ARSD* en distintos órganos humanos. A) Esquema de la expresión de ARN del gen *ARSD* en los distintos órganos. B) Esquema de la detección de la proteína *ARSD* en los distintos órganos. Fuente: The Human Atlas Protein

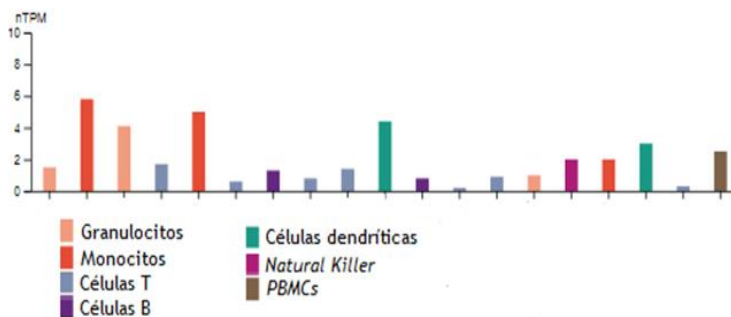


Figura 8: Expresión del gen *ARSD* en células del sistema inmune. Fuente: The Human Atlas Protein

Para obtener una visión general de las rutas atribuidas a la proteína ARSD, empleamos la herramienta REACTOME¹⁴¹ (Figura 9). La proteína ARSD es incluida en la ruta “Activación de las arilsulfatasas”, y se detalla como SUMF1 y SUMF2 llevan a cabo la activación de la proteína en el retículo endoplasmático mediante la oxidación de un residuo de cisteína. ARSD también es incluida en las siguientes rutas “Metabolismo de glucoesfingolípidos”, “Metabolismo de esfingolípidos”, “Metabolismo de lípidos” y “Metabolismo de proteínas”.

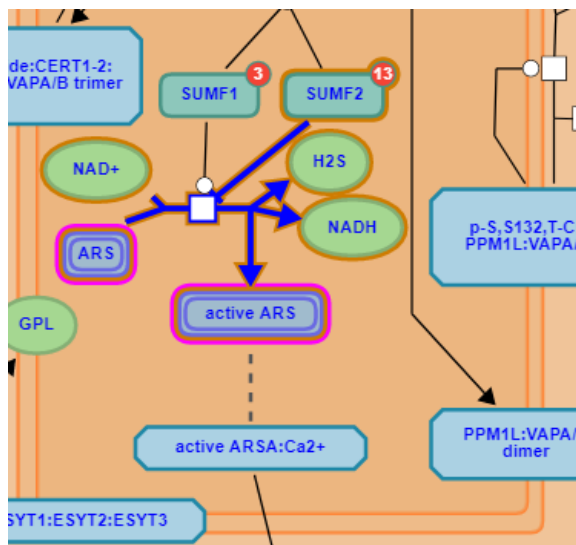


Figura 9: Activación de la proteína ARSD en el retículo endoplasmático. Fuente: REACTOME

La herramienta Genemania¹⁴², que integra información procedente de las bases de datos GEO, BioGRID, EMBL-EBI, Pfam, Ensemble, NCBI, MGI, I2D, InParanoid y Pathway Commons, propone como elementos de interacción físicos SUMF1 y SUMF2, al igual que REACTOME, y aumenta el número de elementos de interacción identificados con otras sulfatasas y arilsulfatasas además de una

fosfolipasa (PNPLA4) y un factor de iniciación de la traducción (EIF1AX) (Figura 10)

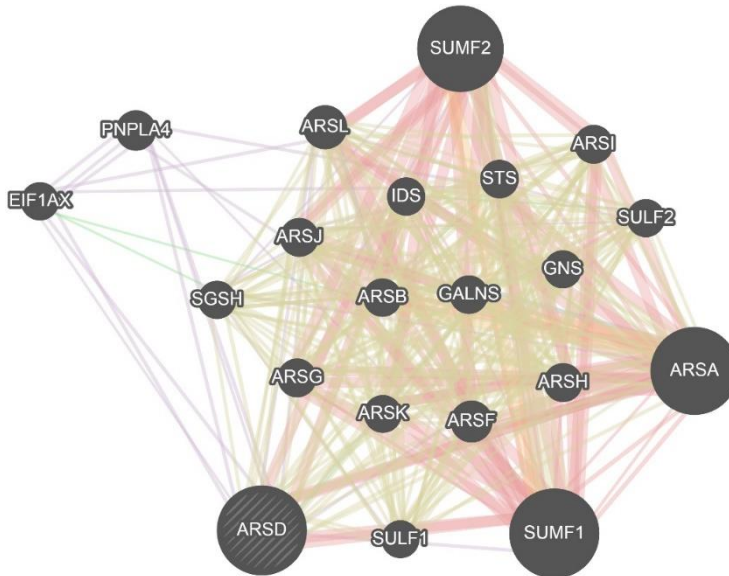


Figura 10: Interacciones propuestas para la proteína ARSD. Fuente: Genemania.

Se han descrito distintas enfermedades relacionadas con deficiencias en las enzimas arilsulfatasas y su implicación en las esfingolipidosis como son la leucodistrofia metacromática (asociada a una mutación en *ARSA*)¹⁴³, el síndrome de Maroteaux-Lamy (asociada a una deficiencia en *ARSB*)¹⁴⁴ o un tipo de *condrodysplasia punctata* (asociada a una mutación en el gen *ARSE*)¹⁴⁵. Las esfingolipidosis son un conjunto de enfermedades genéticas hereditarias caracterizadas por la no metabolización y acumulación de distintos esfingolípidos, y la consecuente reducción de la reserva de ceramida en los lisosomas.

La producción *de novo* de ceramida es llevada a cabo en el retículo endoplasmático. Posteriormente es transportada al aparato de Golgi donde es empleada para producir esfingolípidos (como la esfingomielina y los glucoesfingolípidos)¹⁴⁶. La ceramida, la esfingosina y los glucoesfingolípidos, se encuentran en numerosos compartimentos celulares. En la membrana plasmática se encuentran tanto de forma independiente como agregada, formando las balsas lipídicas que albergan receptores y moléculas reguladoras,

interviniendo, como plataforma, en la transducción de señales. En un proceso de renovación continuo, la esfingomielina y los glucoesfingolípidos son transportados a los lisosomas donde son empleados en producir ceramida que será reutilizada/reciclada de nuevo¹⁴⁷.

Los galactosilcerebrósidos sulfátidos (ceramida unida a una galactosa esterificada con un sulfato en su carbono 3) son una de las cuatro vías de producción de ceramida en los lisosomas (junto con la glucosilceramida, lactosilceramida y esfingomielina)¹⁴⁸. En la ruta de producción de ceramida en los lisosomas, las arilsulfatasas hidrolizan el grupo sulfato de los galactosilcerebrósidos sulfátidos para dar lugar a galactosilceramida que, a su vez, mediante la acción de la galactosilceramidasa C (GALC) da lugar a ceramida y galactosa.¹⁴⁸ (Figura 11).

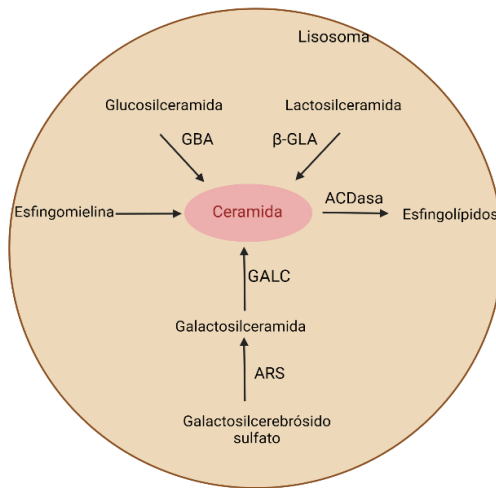


Figura 11: Vías de producción de ceramida en los lisosomas. GBA: glucocerebrosidasa. β-GLA: β-galactosidasa. GALC: galactocerebrosidasa. ARS: arilsulfatasa. Realizada en BioRender.com.

El balance en las reservas de ceramida y de glucosilceramida desempeñan un papel conocido en los procesos cancerosos, la glucosilceramida es producida *de novo* a partir de ceramida mediante la acción de la enzima UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa (su acrónimo del inglés UGCG). Mientras que elevados niveles de

ceramida contribuyen a la apoptosis e inhibición del crecimiento celular, la glucosilceramida acciona mecanismos proliferativos, de transformación maligna y antiapoptóticos^{149,150}.

La acción de ARSA y ARSB ha sido descrita en distintas neoplasias. De este modo, silenciamiento de *ARSB* en líneas celulares de melanoma ha sido relacionado con una mayor capacidad de invasión promoviendo la sobreexpresión de *CSPG4* y *MMP2*¹⁵¹. ARSA y ARSB presentan una mayor actividad en neoplasias de pulmón mientras que en cáncer de mama presentan menor actividad¹⁵². En cáncer de mama también ha sido identificada una reducción en la expresión de *ARSD* y una mayor reducción del *long non coding RNA* ARSD-AS1. Estudios *in silico* de ARSD-AS1 identifican como posibles *targets* de este ARN los genes *EZH2* y *HDAC1*, así como también identifican a TP53, TEAD4, KDM5B y TP63 como posibles factores de transcripción del mismo¹⁵³.

Recientemente se han publicados dos estudios que relacionan específicamente la expresión de *ARSD* con el cáncer de mama. En el primer estudio¹⁵⁴ comparan la expresión del gen en dos tipos distintos de cáncer de mama, el subtipo luminal y el triple negativo, encontrando mayor expresión del gen *ARSD* en el subtipo luminal. Además, relacionan la sobreexpresión de *ARSD* en el subtipo luminal con la expresión de los factores de transcripción luminales FOXA1, GATA3 y ER α . Empleando un modelo celular de cáncer de mama triple negativo, demostraron que la sobreexpresión de *ARSD* suponía una inhibición de la proliferación, así como una reducción de las capacidades de migración y formación de colonias de las células, presumiblemente, mediante la activación de la ruta Hippo/YAP. Otorgándole a la sobreexpresión de *ARSD*, en definitiva, una actividad tumor supresora. Los mismos investigadores, en un segundo estudio¹⁵⁵, proponen que la disminución de la capacidad proliferativa y formadora de colonias vista en el cáncer de mama luminal con respecto al triple negativo, es debida a la amiloidosis generada por la mayor expresión de *ARSD* en el cáncer luminal.

Aunque la LLC no es considerada una neoplasia en la que las hormonas tengan un papel fundamental, la distinta incidencia, pronosis y respuesta a tratamientos entre sexos, hacen especular acerca

de un posible papel protector de las hormonas, en concreto del estrógeno, en las mujeres ante esta enfermedad. Allaint *et al*¹⁵⁶ llevaron a cabo un estudio de hormonas esteroideas circulantes e hipofisiarias en 156 pacientes de LLC *versus* controles. En su estudio encontraron diferencias entre las hormonas circulantes entre pacientes y controles sanos, así como una relación entre los elevados niveles de la hormona luteinizante (LH) encontrada en hombres con LLC y un menor tiempo hasta el primer tratamiento y una relación entre los altos niveles de testosterona, dihidrotestosterona y metoestrógenos en mujeres con LLC y un mayor tiempo hasta el primer tratamiento.

En la base de datos central de expresión de células hematopoyéticas *Bloodspot*¹⁵⁷ se puede realizar una comparativa de la expresión del gen *ARSD* de los 448 pacientes con LLC del estudio MILE (por su acrónimo del inglés, *Microarray Innovations in Leukaemia*) a los que se les tomaron muestras de médula ósea y compararla con células de médula ósea de pacientes control sanos. La *web* interactiva, permite, además, aplicar t de Student a las poblaciones seleccionadas. Como se muestra la Figura 12, ambas poblaciones presentan una diferencia significativa para la expresión del gen *ARSD*, se observa el gen de media infraexpresado en la población de pacientes con LLC analizada.

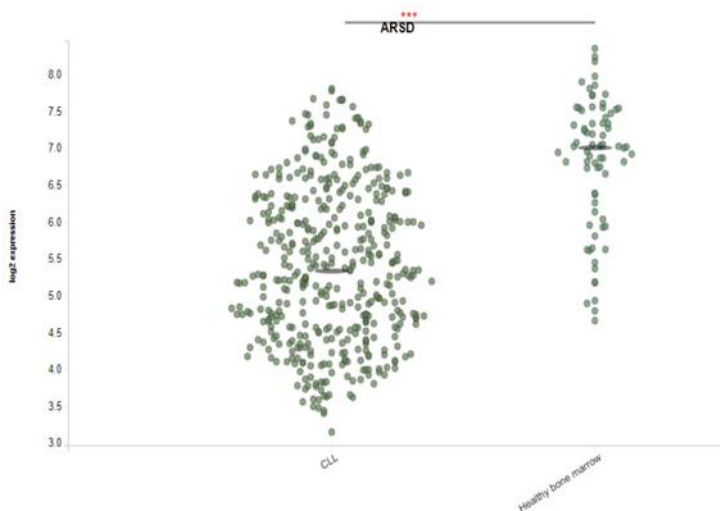


Figura 12: Expresión del gen *ARSD* en pacientes del estudio MILE. Fuente: Bloodspot. Significación estadística: *** $p < 0.001$

Contrariamente a los resultados obtenidos en *Bloodspot*, el estudio llevado a cabo por A. Trojani *et al*¹⁵⁸ identifica al gen *ARSD* como sobreexpresado en pacientes con LLC. Clasificando los pacientes según el estado mutacional IGHV y el marcador ZAP70, identificaron 68 genes, entre ellos *ARSD*, que se expresaban diferencialmente en ambos grupos. El grupo caracterizado como NM-IGHV+ZAP70⁺ presentaba mayor expresión de la proteína *ARSD* que el caracterizado como M-IGHV+ZAP⁻, así como los controles sanos.

La necesidad de estudiar la implicación del gen en el contexto de la LLC se pone de manifiesto teniendo en cuenta los siguientes aspectos: La diferente incidencia entre sexos en la LLC (teniendo en cuenta que el gen *ARSD* pertenece al grupo de genes que escapan a la ICX); la presencia de pacientes con SNVs en el gen *ARSD* en el estudio WES del consorcio internacional; la infraexpresión media del gen en la base de datos de expresión de los pacientes del estudio MILE; su posible funcionalidad en el metabolismo de esfingolípidos y de glucoesfingolípidos y; por último, los resultados de las recientes investigaciones que sitúan a *ARSD* como biomarcador en cáncer de mama e identifican su participación en el metabolismo de estrógeno.

2.3.2. Validación de biomarcadores en LLC.

Las líneas celulares y el modelo animal empleados en la presente tesis, para la generación de una plataforma de validación funcional y evaluación terapéutica en potenciales biomarcadores de leucemia linfocítica crónica, son detallados a continuación:

2.3.2.1. Modelos celulares y edición genómica mediante CRISPR.

Las líneas celulares inmortalizadas humanas han sido empleadas sistemáticamente como modelos de enfermedades en investigación biomédica, incluyendo el cáncer. Algunas ventajas importantes incluyen su alta accesibilidad y bajo coste de cultivo, posicionando a las líneas celulares inmortalizadas humanas como eje central de la investigación básica tanto en el estudio de mecanismos moleculares presentes en las neoplasias como en la respuesta a fármacos¹⁵⁹. Desde hace décadas, se han establecido paneles de líneas

celulares validadas con el objetivo de facilitar y estandarizar la actividad investigadora así como reducir el número de animales empleados en experimentación^{160,161}. En el año 2019 el Instituto Leibniz publicó un panel con 100 líneas celulares de utilidad en la investigación para la leucemia y linfoma¹⁶² que están disponibles públicamente en el banco celular DSMZ. Aplicando las técnicas de *Whole Exome Sequencing* (WES) y *mRNA sequencing* (RNA-seq) se analizaron y validaron 100 líneas celulares correspondientes a 22 subtipos de leucemia y linfoma, entre las que encontramos las líneas celulares de LLC HG-3^{163,164} y MEC-1¹⁶⁵. Ambas líneas celulares fueron extraídas de pacientes varones afectados con LLC e inmortalizadas mediante la infección del virus de Epstein-Barr (de su acrónimo en inglés, EBV). La línea celular MEC-1 presenta como alteraciones citogenéticas principales la delección en el brazo corto del cromosoma 17 y anormalidad en el cromosoma 12, el estado mutacional de los genes *IGHV* es clasificado como mutado (94.8% de homología con respecto a la secuencia de referencia que emplearon). La línea celular HG-3 presenta como alteración citogenética la delección 13q, y su estado mutacional *IGHV* es no mutado (NM-*IGHV*).

2.3.2.1.1. Descripción molecular de la línea celular de linfocitos B HG-3.

La línea celular HG-3¹⁶³ fue establecida en 1998 a partir de células B de paciente humano caucásico, de 70 años de edad, diagnosticado con LLC en estadiaje Rai II. Las células B del paciente fueron inmortalizadas empleando el EBV, específicamente la cepa B95-8-EBV. Aunque el EBV no está relacionado con la etiología de la enfermedad, en algunos estudios realizados hasta un 54% de los pacientes con LLC son positivos para EBV¹⁶⁶. La infección por EBV *in vitro* de los linfocitos B derivados de paciente con LLC es posible gracias a que éstos expresan el receptor viral CD21 en su superficie, la infección *in vitro* de las células B resulta en una infección latente que conlleva además la inmortalización de las células B de LLC.

La morfología de las HG3¹⁶⁴ es redondeada, formando parcialmente agregados celulares de distinta densidad (Figura 13). Su modo de crecimiento es en suspensión, aunque pueden observarse células ligeramente adherentes. Su inmunofenotipo es: CD3⁻, CD4⁻, CD5⁺, CD10⁻, CD13⁻, CD15⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD34⁻, CD37⁺, CD80⁺, HLA-DR⁺, cyIgG⁻, cyIgM⁺, cykappa⁻, cylambda⁺. Pudiéndose perder la positividad de CD5 tras meses de cultivo.

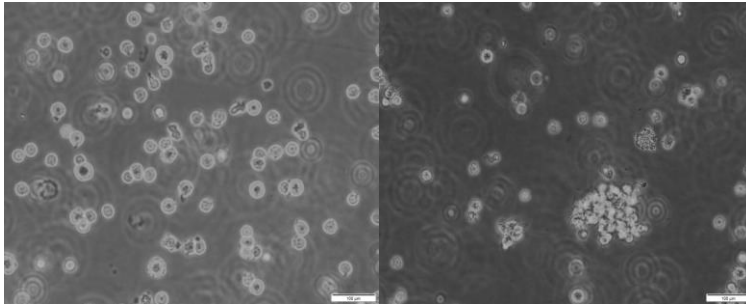


Figura 13: Línea celular HG-3 en cultivo.

La línea inmortalizada HG-3¹⁶⁴, como las células del propio paciente, presentan el mismo cariotipo, con presencia en ambas de la deleción 13q14 (deleción bialélica). Esta deleción produce pérdida genómica de DLEU7 (miR15A con PCR cuantitativa negativa y miR16-1 con PCR cuantitativa positiva). Además, en HG-3 se detectaron inserciones, no presentes en las células del paciente, en los cromosomas 11 y 14.

Se comparó la expresión de 21.632 genes en la línea celular HG-3¹⁶⁴ y dos líneas celulares derivadas de linfocitos B sanos (IARC-171 y LCL-3M), encontrándose en HG-3 32 genes sobreexpresados y 24 genes infraexpresados. Los genes con más sobreexpresión fueron LHX y LILRA4 y los genes más infraexpresados fueron PARD3, FCRLA y TCL1¹⁶⁴.

La presencia de la deleción 13q, la ausencia de mutaciones en el gen TP53 (al igual que en la mayoría de pacientes con LLC¹²) así como la existencia de una comparativa en la expresión de más de 20.000 genes entre la línea celular inmortalizada y líneas celulares B sanas, permitiendo corroborar la expresión no alterada del gen diana ARSD, nos han llevado a elegir la línea celular HG-3 como modelo celular empleado en la presente tesis.

2.3.2.1.2. Descripción molecular de la línea celular de linfocitos T Jurkat.

La línea celular Jurkat fue generada en 1977 a partir de células de un varón de 14 años con ALL, antes de su primera recaída¹⁶⁷. Ha sido ampliamente utilizada para definir los mecanismos de activación de los linfocitos T mediante el TCR o mediante mecanismos independientes de TCR¹⁶⁸. Actualmente, son además empleadas como un modelo celular de gran utilidad en el contexto de la terapia CAR, ampliamente utilizado para el cribado de *single chain antibodies*¹⁶⁹ (su acrónimo en inglés, scFv), diseño de conectores y bisagras¹⁶⁹, así como en la elección de dominios coestimuladores¹⁷⁰, debido a su fácil cultivo *in vitro* y homogeneidad en su respuesta. Las células Jurkat han demostrado ser un buen modelo de la terapia celular CAR-T. Las células Jurkat, modificadas para que expresen un determinado CAR, la correcta interacción receptor-antígeno produce la activación inequívoca de las células Jurkat que, al igual que en los linfocitos T primarios, puede ser medida mediante un aumento de la expresión del marcador temprano de activación CD69¹⁷¹ y mediante la secreción de IL-2 así como de INF- γ ^{172,173,174,175}.

2.3.2.1.3. Edición genómica mediante CRISPR.

Pese a la disponibilidad de dos líneas celulares inmortalizadas y validadas de LLC, se puede afirmar que la amplia variabilidad genética presente en los pacientes de LLC dificulta la generación de modelos de enfermedad.

Una manera de solventar esta limitación es la aplicación de la técnica de edición genómica CRISPR¹⁷⁶ (por su acrónimo en inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que, a día de hoy, nos permite tanto incluir como eliminar o sustituir de manera dirigida mutaciones, deleciones e inserciones así como modular la expresión de genes específicos en modelos celulares existentes, manteniendo el trasfondo genético.

El sistema CRISPR, basado en el sistema inmune adaptativo presente en bacterias y archaeas, está compuesto originalmente por la proteína SpCas9 (procedente de *Streptococcus pyogenes*) cuya actividad endonucleasa es guiada por una secuencia de ARN corto de

cadena sencilla denominada sgRNA (por su acrónimo en inglés, single-guide RNA). La sgRNA presenta dos regiones bien diferenciadas, el crRNA (de unos 21 nucleótidos de longitud y complementaria a la secuencia diana elegida) y el tracrRNA, región constante del sgRNA que cumple funciones estructurales y de unión a la Cas9 (Figura 14). El complejo SpCas9-sgRNA, una vez en el núcleo celular, es capaz de reconocer la región diana del ADN seleccionada mediante la complementariedad de bases del crRNA y mediante el reconocimiento de la secuencia PAM (por su acrónimo en inglés, *Protospacer Adjacent Motif*) por parte de la proteína SpCas9 (NGG). Una vez reconocidas ambas secuencias, la SpCas9 puede ejercer su actividad endonucleasa sobre la doble hélice de ADN, produciendo cortes en ambas hebras a 3 nucleótidos aguas arriba de la secuencia PAM.

En este punto, los mecanismos de reparación celular intentarán corregir los cortes producidos en el ADN. El resultado de la reparación variará en función del mecanismo empleado.

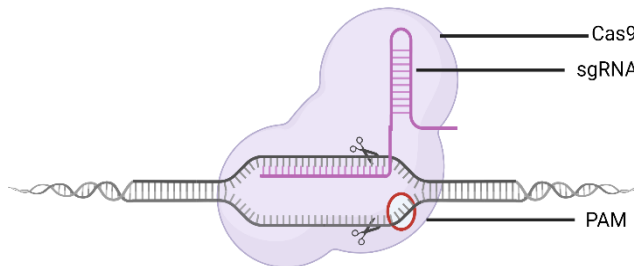


Figura 14: Componentes del sistema CRISPR. Realizada en Biorender.com

Las células presentan dos mecanismos para la reparación de los DSBs (Figura 15): el sistema de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por su acrónimo en inglés, *non-homologous end joining*) y el sistema de reparación por homología directa (HDR, del inglés, *homology directed repair*). El sistema NHEJ es una vía rápida y predominante en las células en respuesta a DSBs, sin embargo, es poco exacta y propensa al error, teniendo como resultado la generación de pequeñas inserciones y deleciones (indels) en la región de corte. Las indels generadas pueden producir cambios en el marco de lectura, pudiendo llegar a suponer la disrupción del gen (*knock-out*). El sistema HDR es una vía de reparación menos activa en las células, pero precisa. La vía HDR tiene

como requisito la presencia de un molde de ADN que, por recombinación homóloga, se incorporará al genoma. A fin de generar líneas con variantes genómicas concretas, en el molde de ADN se incorporan las variantes de interés en la secuencia, como por ejemplo una sustitución de uno o más nucleótidos (*knock-in*).

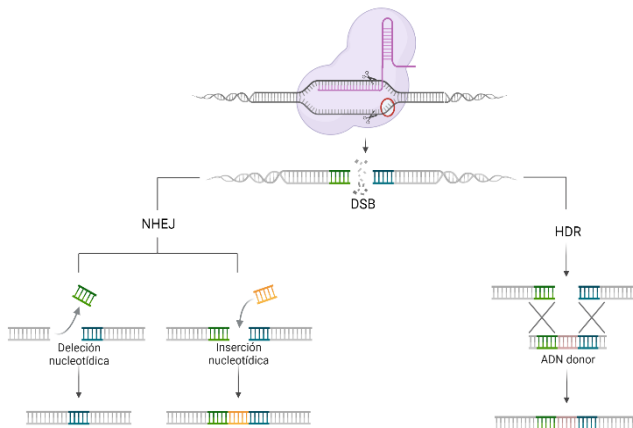


Figura 15: Mecanismos de reparación celular frente a DSBs. Realizada en Biorender.com

El efecto no deseado de la edición genómica mediante CRISPR, es la posible presencia de edición genómica “fuera de diana” (*off-target*), es decir, que la sgRNA se una de manera no precisa a otras regiones del ADN produciéndose en estas regiones alternativas la edición del ADN. Existen distintas estrategias para mejorar la eficiencia de edición genómica “en la diana” y minimizar los efectos “fuera de diana”, como son el diseño óptimo de la sgRNA con herramientas bioinformáticas, la selección racional de la nucleasa nucleasa y el método de introducción de los componentes CRISPR en el interior celular.

El diseño de la sgRNA es un punto crítico en el sistema CRISPR puesto que la especificidad de la secuencia de la sgRNA es un factor determinante en la eficiencia del proceso¹⁷⁷. Existen numerosas herramientas web que permiten valorar la especificidad de la sgRNA y la existencia de otras regiones del ADN que compartan similitud con la

región diana elegida, como son CRISPR-ERA¹⁷⁸, CHOP-CHOP¹⁷⁹, CRISPOR¹⁸⁰, Breaking-Cas¹⁸¹, etc. La longitud de la sgRNA ajustándola a 18-20 nucleótidos y el contenido en GC de entre el 40 y 60% de la guía¹⁸², son factores que ayudan a disminuir el posible efecto *off-target*.

La SpCas9 fue la primera endonucleasa disponible para llevar a cabo la edición genómica mediante CRISPR, caracterizada por reconocer la secuencia nucleotídica -NGG. Se han desarrollado distintas variantes de Cas9 para intentar minimizar los efectos *off-target* propios de la enzima.

Un ejemplo es la SpCas9-nickasa que se diferencia de la SpCas9 por presentar una mutación puntual que anula uno de sus dos dominios endonucleasa, de esta forma son necesarias dos guías para conseguir el DSB del ADN¹⁸³. Si el dominio anulado es el dominio endonucleasa RuvC, la cadena de ADN diana será la cortada y si el dominio endonucleasa anulado es el HNH, la cadena no diana será la cortada¹⁸⁴ (Figura 16).

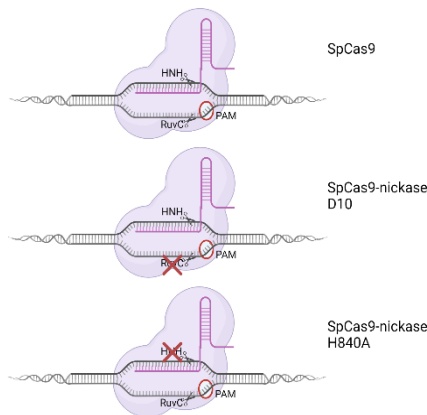


Figura 16: Acción de la enzima SpCas9 versus SpCas9-nickasa (D10 y H840A).
Realizada en BioRender.com.

Otra manera de disminuir los posibles efectos *off-target* es controlar la cantidad de componentes CRISPR que se van a introducir en la célula, puesto que una gran cantidad de los componentes o una expresión

duradera en el tiempo de los mismos supone un incremento de los eventos *off-target*¹⁸⁵. Cuando la línea celular se puede transfectar eficientemente (ya sea mediante transfección química o física), la metodología que aporta mayor precisión es en la transfectamos los componentes CRISPR en forma de ribonucleoproteínas (RNPs), que permite controlar la cantidad de elementos que transfectamos¹⁸⁶. En líneas celulares difíciles de transfectar, como en el caso de los linfocitos, a menudo se emplea la transfección viral (denominada transducción) para introducir los componentes CRISPR. Los vectores virales más empleados son adenovirus (su acrónimo del inglés, AdVs), virus adenoasociados (su acrónimo del inglés, AAVs) y lentivirus (LVs). Los AdVs, son virus capaces de infectar tanto a células en división como en no división, siendo su infección no integrativa. Actualmente su capacidad de empaquetamiento es de hasta 35 kb, permitiendo el empaquetamiento de todos los componentes CRISPR en un único vector¹⁸⁷. Sin embargo, la infección por AdVs puede originar respuestas de estrés en la línea celular, cambios metabólicos y respuesta inmune¹⁸⁸. Los vectores AAVs, son también virus no integrativos capaces de infectar tanto a células en división como no. Presentan una capacidad de empaquetamiento limitada, 4.5 kb, siendo necesario el uso de dos vectores para empaquetar los componentes CRISPR (la SpCas9 ya supone el uso de 4.2 kb). Otra característica importante es el elevado tropismo hacia tejidos concretos que presentan los distintos serotipos de AAVs¹⁸⁹. Los LVs, al igual que los AdVs y AAVs, son también capaces de infectar tanto a células en división como no, siendo su capacidad de empaquetamiento de 8kb. Como en el vector lentiviral se han eliminado todos los genes virales, no activan ninguna respuesta inmune en las células hospedadoras¹⁹⁰. Otra característica del uso de LVs es que se integran en el ADN genómico de la célula, siendo una ventaja si queremos mantener la expresión del transgén en células que se están dividiendo activamente pero también es una desventaja, pues la integración aleatoria puede ocasionar mutagénesis¹⁹⁰.

La tecnología CRISPR también ha evolucionado hacia sistemas que no suponen la edición del ADN, sino que suponen la modulación de la expresión génica. Así, vemos el sistema CRISPR-dCas9¹⁹¹, en el que la nucleasa empleada es la dCas9 (por su acrónimo en inglés, *death Cas9*), caracterizada por presentar ambos dominios endonucleasa inactivados mediante mutaciones puntuales. Fusionando la proteína dCas9 con represores o activadores y dirigiendo el complejo mediante la sgRNA hacia la región de inicio de la transcripción del gen diana, podemos modular la expresión génica (Figura 17). El sistema de represión, comúnmente denominado CRISPRi¹⁹², presenta fusionado a la proteína dCas9 el dominio KRAB (del inglés, Krüppel associated box). Ambos componentes, junto con la sgRNA dirigida a la región aguas abajo del TSS (por su acrónimo en inglés, *Transcription Start Site*) del gen diana, son capaces de inhibir la transcripción del gen de manera eficiente. Del mismo modo, el sistema de activación, comúnmente denominado CRISPRa¹⁹³, presenta fusionados los activadores de la transcripción VP64 y P65¹⁹⁴. Los tres componentes, junto con la sgRNA dirigida a la región aguas arriba del TSS del gen diana, son capaces de aumentar la transcripción del gen.

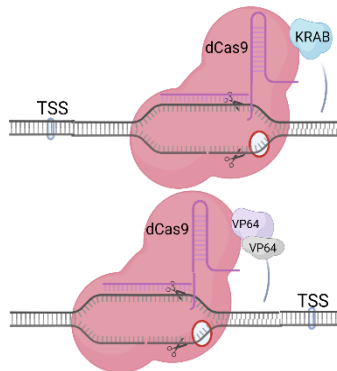


Figura 17: Componentes de los sistemas CRISPRi y CRISPRa. Realizada en BioRender.com.

2.3.2.2. Modelos animales de LLC.

Se encuentran disponibles varios modelos animales de ratón para el estudio de la LLC. Unos modelos recapitulan mutaciones presentes en los pacientes con LLC, como es el caso de la línea de ratón mir-15a/16-1^{-/-} o de la línea de ratón MDR^{-/-}¹⁹⁵, que recapitulan la delección 13q14 presente en la mayoría de pacientes con LLC en distintos tamaños¹¹. Otros modelos recapitulan la desregulación de genes sobreexpresados en la LLC y desarrollan la enfermedad de manera similar (*LLC-like*) con distinta penetrancia¹⁹⁶, así la línea de ratón TLC1 (sobreexpresa el gen TLC1)¹⁹⁷, la línea de ratón APRIL (que sobreexpresa a este miembro de los TNFs)¹⁹⁸ o la línea de ratón que presenta una sobreexpresión del gen *BCL2*¹⁹⁹.

Para los xenoinjertos o *xenografts*, proceso de implantación de células de una especie en otra, en ratón, y más específicamente, en el contexto de terapia celular con CAR-T, un modelo ampliamente usado es el ratón NGS (del inglés, *NOD Scid Gamma Mouse*), siendo los empleados en los ensayos preclínicos que condujeron a la aprobación de la terapia CAR-T en humanos en el año 2017²⁰⁰. Los ratones NGS se caracterizan por ser la línea de ratón que presenta mayor grado de inmunodeficiencia²⁰¹ al carecer de células maduras T, B y *natural killer*²⁰². Esta característica los hace unos modelos excelentes para el *xenograft* de estas líneas celulares humanas.

El pez cebra (*Danio rerio*), escogido como modelo animal para llevar a cabo los ensayos *in vivo* en la presente tesis, ha ido ganando representación como modelo de distintas enfermedades desde 1983, año en que George Streisinger publicó el primer ensayo empleándolo como modelo animal²⁰³. Las ventajas principales del pez cebra como modelo de experimentación animal son: fecundación y desarrollo externos (los embriones son ópticamente visibles y manipulables), rápido desarrollo en comparación con los mamíferos (sus órganos principales están formados entre 2 y 3 días después de la fertilización), presentan dimorfismo sexual y sexualidad madura a los 2-3 meses de vida, fecundidad elevada (una pareja puede llegar a producir cientos de embriones a la semana), elevada homología genética con humanos (el 70% de sus genes son compartidos, subiendo este porcentaje al 84% si

tenemos sólo cuenta a los genes ligados a alguna enfermedad) y huevos y larvas transparentes^{204,205}.

El pez cebra pertenece a la familia de los ciprínidos, su hábitat natural son los lagos, ríos y lagunas del sudeste asiático (con temperaturas que oscilan entre 16.5 a 33 °C). Son peces que viven en grupo (cardúmenes), alargados, con una única aleta dorsal, los ejemplares adultos miden entre 3 y 4 cm, aunque pueden llegar hasta los 6 cm de longitud.²⁰⁶

El primer *xenograft* de células tumorales humanas en pez cebra fue llevado a cabo en el año 2005 con células de melanoma. La habilidad de supervivencia, de circulación y de migración de las células en los embriones de pez cebra fue similar a la presentada en la piel humana²⁰⁷. Los siguientes ensayos en los que se empleó este modelo animal se centraron en optimizar las condiciones en las que realizar los ensayos *xenograft*, que hoy podemos denominar condiciones estándar. Estas condiciones definen el lugar donde realizar la microinyección de las células, momento idóneo para su microinyección y temperatura y duración a la que se llevará a cabo el ensayo.

Existen distintos puntos en los que se puede llevar a cabo la microinyección de las células tumorales en el pez cebra para determinar la supervivencia celular, la capacidad de división y migración así como la capacidad de extravasar cerca del tejido hematopoyético caudal y formar tumores^{208,209,210}. Estos puntos son: el saco vitelino²¹¹, compartimento con elevado componente lipídico del cual se alimenta el animal hasta que es capaz de alimentarse por sí mismo, unos 5 días después de la fecundación (su acrónimo del inglés, dpf). La vena cardinal²⁰⁹, que permite incluir las células microinyectadas directamente en el sistema circulatorio. El espacio perivitelino²¹², que permite identificar inequívocamente nuevos vasos formados y, por último, la cavidad intraperitoneal²¹³, empleada fundamentalmente en peces cebra adultos inmunocomprometidos (como por ejemplo la línea mutante *rag2* que presenta una alta limitación en el número de linfocitos B y T).

El momento óptimo para la microinyección de las células tumorales se ha establecido en 2 dpf debido a que su sistema inmune adaptativo no se comienza a desarrollar hasta el día 14 dpf. Al

microinyectar a 2 dpf no es necesaria la inducción de la inmunosupresión del pez cebra para que las células puedan sobrevivir, proliferar y metastatizar²¹⁴. La transparencia de los embriones y las larvas hace posible que mediante fluorescencia o mediante tinción lipofílica, el movimiento de las células puede ser directamente monitorizado²¹⁵.

El inconveniente principal de este modelo animal es la temperatura óptima de cría del pez cebra (16.5-33 °C) *versus* la temperatura óptima de crecimiento de las células humanas (37°C). A este respecto existe la aceptación de una temperatura intermedia entre ambas de 34°C, a expensas de reducir la duración del ensayo a 6 días después de la inyección²¹⁶.

Actualmente también se están realizando ensayos en el contexto de la terapia celular CAR-T en embriones de pez cebra, a 24 horas, en los que se ha observado actividad citotóxica del CAR anti-CD19 sobre la línea celular Nalm6²¹⁷ o sobre la línea celular Raji²¹⁸

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La gran heterogeneidad clínica que presentan los pacientes con LLC, así como la elevada incidencia de la enfermedad, justifican la necesidad de identificar nuevos biomarcadores de pronóstico y de respuesta a los distintos tratamientos. Aunque en los últimos años la supervivencia relativa a 5 años ha alcanzado valores cercanos al 85% para pacientes con LLC, la supervivencia relativa a 10 años baja notablemente hasta el 59.5%²¹⁹.

Gracias a la introducción de las técnicas de secuenciación masiva, así como de análisis transcriptómico en las metodologías de diagnóstico clínico, cada vez están disponibles más datos que provienen del análisis bioinformático en patología humana. Dichos estudios describen variantes genómicas cuya implicación debe ser evaluada en un gran número de casos para establecer asociaciones con la enfermedad. Entre estas variaciones genómicas se describen nuevos potenciales biomarcadores de pronóstico, así como de respuesta a terapia. Resulta por tanto fundamental validar funcionalmente los potenciales biomarcadores y definir su implicación en el contexto de la enfermedad, para así evitar información que puede no tener interés real en el desarrollo o pronóstico de la patología, resultar redundante o sesgada.

La elevada cantidad de nuevos tratamientos dirigidos disponibles, así como la distinta respuesta que presentan los pacientes a los mismos, hace necesaria la búsqueda de biomarcadores de respuesta a tratamiento que ayuden a garantizar la idoneidad del tratamiento prescrito a los pacientes antes de ser recibido.

En vista de lo descrito anteriormente se plantean los siguientes objetivos en la presente tesis:

3.1. OBJETIVO GENERAL

Se propone la generación de una plataforma de validación funcional de potenciales biomarcadores identificados tras análisis de datos de pacientes con LLC. La plataforma se desarrolla mediante la

generación de modelos celulares empleando la tecnología CRISPR, el análisis de la capacidad proliferativa *in vitro* e *in vivo*, así como el estudio de la respuesta a terapias dirigidas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar nuevos modelos de LLC a partir de células B inmortalizadas de pacientes (HG-3).
 - 1.1. Generación de modelos celulares *knock-out* para el gen *ARSD* empleando la tecnología de edición genómica CRISPR en la línea celular HG-3.
 - 1.2. Generación de modelos celulares *knock-down* para el gen *ARSD* empleando la tecnología CRISPR en la línea celular HG-3
2. Se llevará a cabo la valoración funcional de los modelos generados analizando el efecto de la expresión diferencial del gen candidato *ARSD* en la proliferación celular.
 - 2.1. Efecto de la expresión diferencial en la proliferación celular *in vitro* (líneas celulares isogénicas HG-3)
 - 2.2. Efecto de la expresión diferencial en la proliferación celular *in vivo* (*xenograft* de líneas celulares isogénicas en pez cebra (*Danio rerio*))
3. Se realizará la evaluación terapéutica *in vitro* mediante:
 - 3.1. El estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib.
 - 3.2. El estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con células CAR-T generadas (anti CD19).

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LÍNEAS CELULARES. CULTIVO.

En la presente tesis se emplearon las líneas celulares comerciales HG-3 (*DSMZ*), HEK293 (*ATCC*) y Jurkat (*ThermoFisher Scientific*). Todas las líneas celulares fueron cultivadas empleando Medio RPMI 1640 Glutamax (*Gibco*) suplementado con el 10% de suero bovino fetal inactivado (iFBS) (*Gibco*) y 1% de antibiótico-antimicótico (*Gibco*). Este medio será denominado medio completo. Las líneas celulares fueron cultivadas en incubadores celulares que mantienen de manera continuada las condiciones de 37°C, 5% CO₂ y a saturación de humedad.

4.1.1. Descongelación celular.

Los viales celulares criogenizados recibidos contenían una suspensión de 1×10^6 células en FBS complementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Hasta su descongelación, los viales celulares fueron conservados en nitrógeno líquido. Para la descongelación celular, los viales fueron introducidos en un baño de agua caliente a 37°C y a continuación diluidas en 10 mL de medio completo. Las células se centrifugaron a 300 xg durante 5 minutos, se aspiró el medio y el sedimento celular se resuspendió en medio completo a la densidad estándar de 400.000 células/mL para las células en suspensión (HG-3 y Jurkat, en formato Flask T25 (*Corning*)) y en 10 mL de medio completo para las células HEK293, en formato placa de 10 cm (*Corning*).

4.1.2. Expansión celular.

Para la expansión del cultivo de células HEK293, se esperó a que llegasen al 70% de confluencia. Las células adheridas al recipiente de cultivo fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (su acrónimo del inglés, PBS) y se añadieron 5mL de solución tripsina-EDTA (*Gibco*) que provoca la lisis proteica de las uniones membrana

celular-superficie de cultivo. Las células se mantuvieron en la solución tripsina-EDTA durante 5 minutos en el incubador celular. Pasado el tiempo se neutralizó la digestión enzimática añadiendo medio de cultivo completo. Las células fueron resembradas y el proceso fue repetido tantas veces como fueron necesarias para obtener la cantidad de células para cada uno de los ensayos.

Para la expansión de las células en suspensión HG-3 y Jurkat, se esperó a que alcanzasen la densidad celular de 1×10^6 células/mL y fueron diluidas añadiendo más medio completo hasta volver a la concentración inicial de 400.000 células/mL. Cada aproximadamente dos diluciones, las células fueron centrifugadas a $300 \times g$ durante 5 minutos, el medio fue retirado y el sedimento celular fue nuevamente sembrado a 400.000 células/mL.

4.1.3. Criogenización de las células.

Para criogenizar las células, los sedimentos celulares de aproximadamente 1×10^6 células fueron resuspendidos en 1 mL de medio de congelación. Para las líneas celulares HEK y Jurkat se empleó como medio de congelación el compuesto por un 90% de iFBS y 10% de DMSO. Para la línea celular HG-3 se empleó como medio de congelación el compuesto por 80% medio completo, 10% de iFBS y 10% de DMSO. El medio de congelación con las células resuspendidas se incluyó en crioviales que fueron depositados en contenedores *Mr. Frosty (Nalgene)* y almacenados durante 24-48 horas en congeladores de -80°C . Los crioviales fueron depositados finalmente en nitrógeno líquido.

4.2. GENERACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES.

4.2.1. Sistema de empaquetamiento lentiviral.

El sistema de generación de partículas lentivirales o unidades de transducción (UT) no auto replicantes empleado en la presente tesis está compuesto por tres plásmidos: pMDG2.D, psPAX2 (ambos obsequios de Didier Trono (*Addgene*)) y el vector de transferencia correspondiente. La Figura 18 muestra como el genoma lentiviral (basado en el virus VIH-1) ha sido condensado para crear el sistema de empaquetamiento de segunda generación. En este sistema únicamente

permanecen presentes los genes imprescindibles para la producción viral: Gag (proteína estructural), Pol (polimerasa), Tat (transactivador viral para la activación transcripcional desde el 5' LTR (del inglés, largas repeticiones terminales)) y Rev (facilita la exportación nuclear de los transcritos). La proteína de la envoltura viral presente en el sistema es la VSV-G, definiendo un tropismo amplio para las partículas virales generadas.

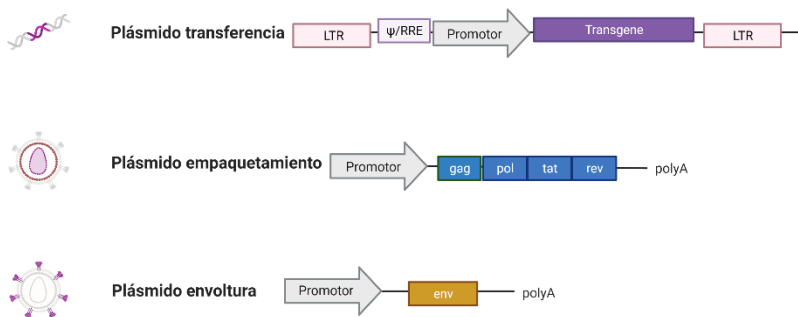


Figura 18: Sistema de empaquetamiento viral de segunda generación. Realizada en Biorender.com

El plásmido de transferencia es el que porta el transgén que deseamos integrar en el genoma celular. Los plásmidos de transferencia de segunda generación presentan el gen de interés y su promotor flanqueados por las regiones LTR, la transactivación dependiente del elemento Tat es necesaria para su transcripción. Los plásmidos de transferencia de tercera generación presentan un 5' LTR quimérico que elimina la necesidad del elemento Tat. Por este motivo el sistema de empaquetamiento de segunda generación puede ser empleado tanto con vectores de transferencia de segunda como de tercera generación. Los plásmidos empleados son detallados en la Tabla 10 (todos pertenecen al repositorio *Addgene* excepto el plásmido LV04 (*Sigma*)). El esquema de todos los plásmidos empleados está incluido en la sección ANEXOS.

Tabla 10: Plásmidos empleados. Esquema detallado incluido en ANEXOS.

Plásmido	Transgén principal	Gen resistencia a antibiótico	Referencia
pLenti_CMV_GFP Neo	GFP	Neomicina(G418)	17447
pLX_311-KRAB-dCas9	dCas9-KRAB	Blasticidina	96918
Lenti-iCas9-neo	iCas9	Neomicina (G418)	85400
Lenti-sgRNA neo	sgRNA	Neomicina (G418)	104992
LV04	sgRNA	Puromicina	Sigma(<i>Custom</i>)
pSLCAR-CD19-BBz	CD19-BBz	Sin resistencia	135992
pMD2.G	Sistema de empaquetamiento viral/envuelta		12259
psPAX2			12260

4.2.2. Preparación de los vectores de transferencia.

Los plásmidos solicitados a *Addgene.org* fueron recibidos en formato *stab agar*. La preparación de todos los plásmidos se llevó a cabo mediante la misma metodología. Fueron tomados 2 μL del *stab agar*, que contiene la bacteria transformada con el plásmido de interés, y diluidos en 500 μL de medio Luria-Bertani (medio LB) suplementados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico ampicilina (antibiótico de selección en bacterias presente en todos los plásmidos empleados). 5 μL de la dilución fueron sembrados en formato placas de LB con agar (6 g/L) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina. La placa fue depositada en el incubador de bacterias a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se confirmó visualmente el crecimiento de colonias y se seleccionó una colonia aislada. La colonia fue tomada y depositada para crecer en 5 mL de medio LB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina durante 8 horas (minicultivo). Pasado el tiempo el minicultivo bacteriano fue expandido a 250 mL y dejado en crecimiento durante toda la noche a 37°C y agitación.

Al día siguiente las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación (5000 xg durante 10 minutos a 4°C) y se procedió a la purificación del plásmido mediante el uso del kit *NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sedimento bacteriano fue resuspendido en el buffer RES-EF y las bacterias fueron lisadas empleando el búfer LYS-EF precalentado a 37°C (coloración azul). A continuación, se procedió a la neutralización añadiendo el búfer NEU-EF, mezclando abundantemente durante 5 minutos en hielo (pérdida de coloración azul). Además de la lisis, este proceso supone la precipitación de proteínas, del ADN cromosómico, así como de los demás constituyentes bacterianos a excepción del ADN plasmídico que permanece en disolución. Continuó el proceso con la reconstitución de la columna de purificación a la que acoplamos el filtro sobre el que añadimos los lisados bacterianos con los precipitados y el ADN plasmídico en disolución. Una vez filtrado, se añadieron 5ml de búfer FIL-EF y se descartó el filtro. A continuación, se añadieron 35 mL de búfer ENDO-EF y 15 mL de búfer WASH-EF sobre la columna para alcanzar la eliminación total de endotoxinas que pudieran quedar retenidas en la misma.

Para la elución del ADN plasmídico retenido en la columna, se añadieron 5mL del búfer ELU-EF precalentado a 50°C. Con la acción de este búfer, las cargas positivas de la resina de intercambio aniónico de la columna que mantienen retenido el ADN mediante sus grupos fosfato, se neutralizaron y el plásmido puede liberarse. Para conseguir la precipitación del ADN plasmídico, se añadieron 3,5 mL de isopropanol y se centrifugó durante 1 hora a 5525 x g a 4°C. El precipitado se lavó con 2mL de etanol al 70% continuando con una segunda centrifugación de 5 minutos a 5525g y temperatura ambiente. Una vez decantado el sobrenadante, se dejó secar el precipitado a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se procedió a la reconstitución del ADN plasmídico añadiendo 250 µL de agua libre de endotoxinas. La concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido se realizó empleando el espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop 2000. El ADN plasmídico purificado fue conservado a -20 °C.

4.2.3. Titulación viral.

Para cuantificar la cantidad de unidades de transducción (UT) generadas mediante el sistema de empaquetamiento viral conformado por los plásmidos pMDG2.D y psPAX2, se empleó el plásmido de transferencia pLenti_CMV_GFP Neo (obsequio de Eric Campeau and

Paul Kaufman, *Addgene*) que presenta como transgén el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (su acrónimo del inglés, GFP). Este plásmido de transferencia permitió la cuantificación de las UT mediante citometría de flujo, pudiendo ser empleado como producción de referencia para la estimación de la UT generadas con vectores de transferencia con o sin gen reportero por el método *Lenti-X GoStix Plus* (*Takara*).

La línea celular empleada para producir las UT fue la línea celular HEK293. Para determinar la concentración de ADN total que supone mayor eficiencia de transfección (es decir, mayor número de células GFP positivas), se sembraron 3.8×10^6 células HEK293 por placa en placas de 10cm con 10mL de medio completo. Las células fueron mantenidas en el incubador celular. Al día siguiente (confluencia del 70%) las células fueron transfectadas con los tres plásmidos que componen el sistema de producción viral en cantidades crecientes de ADN total (10-20-40 μg) diluidos en 100 μL de medio OptiMEM (*Gibco*). Como agente químico transfectante se empleó la polietirimida (PEI, *Sigma*) en proporción 1:3 (1 μg ADN: 1 μL PEI (1mg/mL) diluida en medio OptiMEM. 48 horas después de la transfección, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de células GFP positivas en cada una de las condiciones testadas. Como vemos en la Figura 19-A, la condición correspondiente a 10 μg de ADN total es la que presentó mayor porcentaje de células GFP positivas (92%).

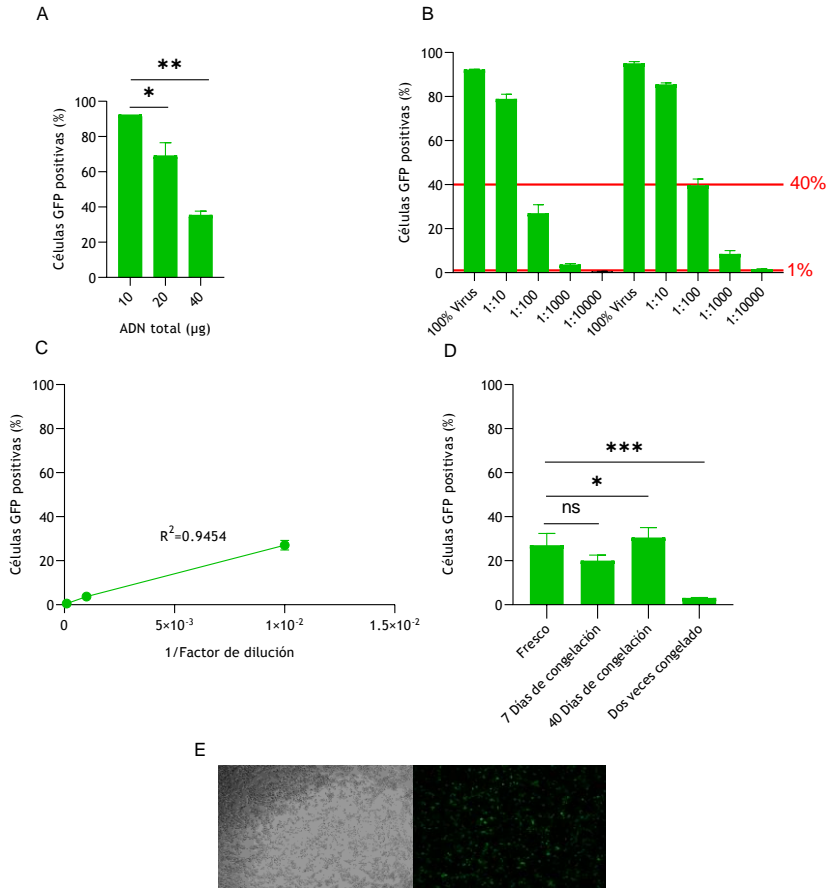


Figura 19: Determinación de la titulación viral mediante citometría. A) Cuantificación de las células HEK 293 GFP positivas (%) en relación con la cantidad de ADN total añadida en cada transfección. B) Cuantificación de células HEK293 GFP positivas (%) en función de la dilución seriada viral empleada. C) Relación lineal entre el % de células HEK293 GFP positivas y 1/factor de dilución para las condiciones que presentaron entre el 40 y el 1% de células HEK293 GFP positivas en la gráfica anterior. D) Comparativa de la estimación de las UT en las condiciones probadas. E) Imagen de las células HEK transfectadas con 10µg de ADN total para los 3 plásmidos que conforman el sistema de empaquetamiento lentiviral en la producción de partículas lentivirales GFP. Resultados expresados como Media ± DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

Para la cuantificación de las UT se sembraron 3.8×10^6 células HEK293 en placas de 10cm con 10mL de medio completo. Las células fueron

mantenidas en el incubador celular. Al día siguiente (confluencia del 70%) las células fueron transfectadas con los tres plásmidos que componen el sistema de producción viral (10 μ g ADN total) diluidos en 100 μ L de medio OptiMEM. Como agente químico transfectante se empleó PEI en proporción 1:3 (1 μ g ADN: 3 μ L PEI (1mg/mL) diluida en 100 μ L de medio OptiMEM. 18 horas después de la transfección se cambió el medio por 5mL de medio completo. 48 y 72 horas después de la transfección se procedió a recoger los sobrenadantes (primera y segunda recogida de virus). Los sobrenadantes fueron purificados mediante centrifugación (300x g, 10 minutos) y mediante filtrado (filtro poro 0.45 μ m). Parte de los sobrenadantes fue empleada directamente para la cuantificación directa de las UT en fresco mientras que el resto se congeló a -80°C y fue descongelada para la estimación de las UT a los 7 y 40 días. Los sobrenadantes descongelados a los 7 días fueron nuevamente congelados, descongelados y estimados.

Para la estimación de las UT, en todas las condiciones, se sembraron 20.000 células HEK293 por pocillo en 200 μ L de medio en formato placa de 96 pocillos. Las células fueron mantenidas en el incubador celular. Al día siguiente se les cambió el medio completo por medio que contenía diluciones seriadas de los sobrenadantes virales (desde 1-0 a 1-10.000). Transcurridas 48 horas, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en el citómetro *BD Accuri RUO with C Sampler* (BD Biosciences) y se determinó la cantidad (%) de células GFP positivas en cada condición.

Como se observa en la Figura 19-B, el número de células HEK293 GFP positivas disminuye a medida que se aumenta la dilución de los sobrenadantes virales empleados. Para la estimación de las UT generadas se descartaron las condiciones que suponían una presencia de células HEK293 GFP positivas superior al 40% (de este modo se puede suponer que una célula HEK293 positiva ha sido infectada por una única UT). También se descartaron las condiciones que supongan una presencia inferior al 1% de células HEK293 GFP positivas. En la Figura 19-C se observa la relación lineal entre el número de células HEK293 GFP positivas y 1/ Factor dilución empleado ($R^2= 0.9454$) para las condiciones que presentan entre el 40 y 1% de células HEK293 GFP positivas. Aplicando la fórmula $TU/ml = (\text{células sembradas}) \times$

[MOI / (ml de sobrenadantes virales empleados)] se calculó la producción de UT en 5.41×10^6 UT/mL para la primera recogida de virus (48 horas) y de 7.95×10^6 UT/mL para la segunda recogida de virus (72 horas).

Para validar la metodología de conservación de las partículas lentivirales producidas mediante el sistema empleado, los sobrenadantes lentivirales fueron congelados a -80°C y descongelados para su cuantificación a distintos tiempos (7 y 40 días). Del mismo modo también fueron descongelados- congelados- descongelados y cuantificados. Como se detalla en la Figura 19-D, la congelación directa de los sobrenadantes a -80°C durante 7 y 40 días no supone una pérdida de la viabilidad significativa, sin embargo, una nueva ronda de congelación-descongelación supone una reducción de su viabilidad en un 88%.

Para determinar la cantidad de UT producidas por el sistema de empaquetamiento compuesto por los plásmidos pMDG2.D y psPAX2 y los vectores de transferencia necesarios para generar las distintas líneas celulares, se empleó, además, el kit de cuantificación *Lenti-X GoStix Plus (Takara)* en las condiciones propuestas por el fabricante. Añadimos 20 μL de los sobrenadantes virales en la celdilla S del *cassette GoStix*, una vez pasados 10 minutos de espera la banda aparecida (banda T) presenta una intensidad proporcional a la cantidad de UT presentes en los sobrenadantes añadidos. El *cassette GoStix* fue entonces fotografiado y analizada la imagen mediante la aplicación *GoStix Plus app*. Con esta aplicación, se calculó la titulación viral mediante el Valor GoStix (VG) que es equivalente a los ng/mL de la proteína p24 viral. El kit incluye un control de la proteína p24 (banda C). Una vez obtenido el valor VG se puede calcular el valor Unidades de infección/mL tomando como referencia la medida de la producción viral previamente titulada (la referencia viral titulada empleada es la producida por el sistema de empaquetamiento pMDG2.D y psPAX2 y el vector de transferencia pLenti CMV GFP Neo que se cuantificó por citometría de flujo debido a la presencia del gen reportero GFP). La fórmula aplicada para calcular la titulación fue: GV (titulación desconocida) x (Unidades de infección/mL de referencia) / GV

(titulación de referencia) = Unidades de infección/mL (titulación desconocida). (Tabla 11)

Tabla 11: Estimación UT producidas mediante el sistema GoStix.

Plásmido Transferencia	GV (ng/mL)	(TU/mL) /GV Plásmido Referencia	TU/mL Calculada
Lenti-dCas9-KRAB-blast	695	8.302,4	5.770.168,00
Lenti-iCas9-neo	613		5.089.371,20
Lenti-sgRNA ₁	714		5.927.913,60
Lenti-sgRNA ₂	650		5.396.560,00
LV04-21855	725		6.019.240,00
LV04-21856	709		5.886.401,60
pSLCAR-CD19-BBz	800		6.641.920,00

4.3. MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN.

Para establecer la multiplicidad de infección (su acrónimo del inglés, MOI) de la línea celular HG-3 se emplearon nuevamente las partículas lentivirales generadas mediante el sistema de empaquetamiento compuesto por pMDG2.D, psPAX2 y el plásmido pLenti_CMV_GFP Neo, que fueron cuantificadas en el apartado anterior. Se procedió a sembrar 40.000 células HG-3 por pocillo, en el formato placa de 96 pocillos que fueron infectadas con distintas concentraciones virales hasta alcanzar las siguientes ratios: número de células HG-3: número UT (1:0; 1:1; 1:3; 1:5, 1:10 y 1:20). Las células fueron mantenidas en el incubador celular durante 48 horas. Seguidamente las células se analizaron mediante citometría de flujo con el citómetro *BD Accuri RUO with C Sampler* (BD Biosciences). Como vemos en la Figura 20, a medida que aumenta el número de UT por célula, aumenta el número de células HG-3 GFP positivas hasta llegar a la ratio 1:20 en la que no se alcanza en ninguno de los replicados el número de eventos necesarios definido para el ensayo (10.000 eventos), debido a la alta mortalidad. La condición que presenta mayor número de células HG-3 positivas es la que corresponde con la ratio 1:10 (67.99%), sin embargo, en la presente tesis se empleó en todos los casos la ratio 1:3 (39,55% de

células GFP positivas) con el objetivo de minimizar el riesgo de infección múltiple (es decir, de integración múltiple de los genes de transferencia).

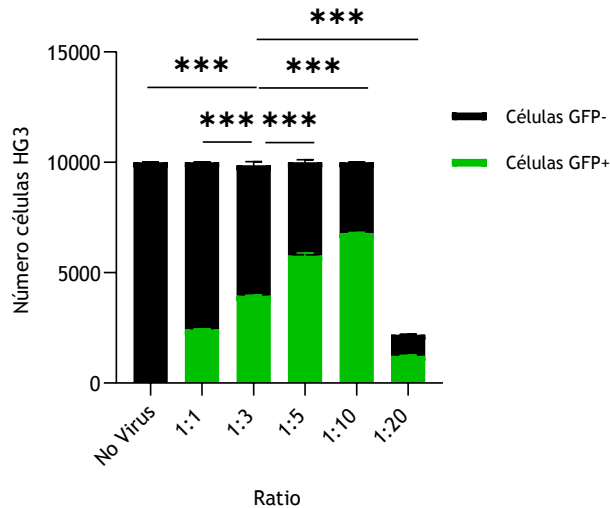


Figura 20: MOI de la línea celular HG-3. Relación entre el número de células HG-3 GFP positivas y la ratio número células HG3: número de UT virales. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

Para la línea celular Jurkat, la MOI empleada fue 1:10 según fuentes bibliográficas^{175,220,221,222,223}.

4.4. HG-3: CURVAS DE MUERTE.

Para seleccionar las células infectadas por los lentivirus generados, los plásmidos de transferencia presentan comúnmente un transgén de selección que consiste en un gen de resistencia a un antibiótico determinado. De esta manera, sabiendo que las células infectadas son resistentes al antibiótico referido, pueden ser positivamente seleccionadas. Para alcanzar la selección positiva primero se determinó la cantidad de antibiótico que se debe añadir al cultivo durante 7 días para eliminar las células no infectadas (curva de muerte).

Se determinaron las curvas de muerte de la línea celular HG-3 para los antibióticos Geneticina G418 (*Life Technologies*), Blastidina (*Life Technologies*) y Puomicina (*Life Technologies*). Para el antibiótico geneticina, se empleó el rango 0 $\mu\text{g/mL}$ - 800 $\mu\text{g/mL}$, para el antibiótico puomicina se empleó el rango 0 $\mu\text{g/mL}$ - 7 $\mu\text{g/mL}$ y para el antibiótico blastidina se empleó el rango 0 $\mu\text{g/mL}$ - 12 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada uno de los antibióticos, se sembraron células HG-3 en formato placa de 384 pocillos a la densidad de 10.000 células por pocillo, empleando medio completo (pero sin antibiótico/antimicótico) al que le fueron añadidas las distintas concentraciones crecientes de antibiótico mencionadas. Las células fueron mantenidas en el incubador durante 7 días y el medio con el antibiótico específico fue refrescado cada 2 días. La presencia de células viables después de 7 días de cultivo fue determinada empleando el Kit *ATPLite Luminiscence assay* (*PerkinElmer*), siguiendo el protocolo del fabricante para el formato placa de 384 pocillos. El kit se basa en el empleo de la cantidad de ATP presente en el interior celular (indicador inequívoco de la presencia de células vivas metabólicamente activas) como cofactor de la enzima luciferasa. La luciferasa, teniendo el ATP como cofactor, es responsable de la oxidación de la luciferina en una reacción en la que se desprende energía en forma de luz (proporcional a la cantidad de ATP). La luminiscencia generada se cuantificó mediante el lector *ULTRA Evolution* (*Tecan*).

Las dosis para las curvas de muerte a 7 días resultantes fueron: 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el antibiótico geneticina (Figura 21-A), 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el antibiótico puromicina (Figura 21-B) y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el antibiótico blastidina (Figura 21-C).

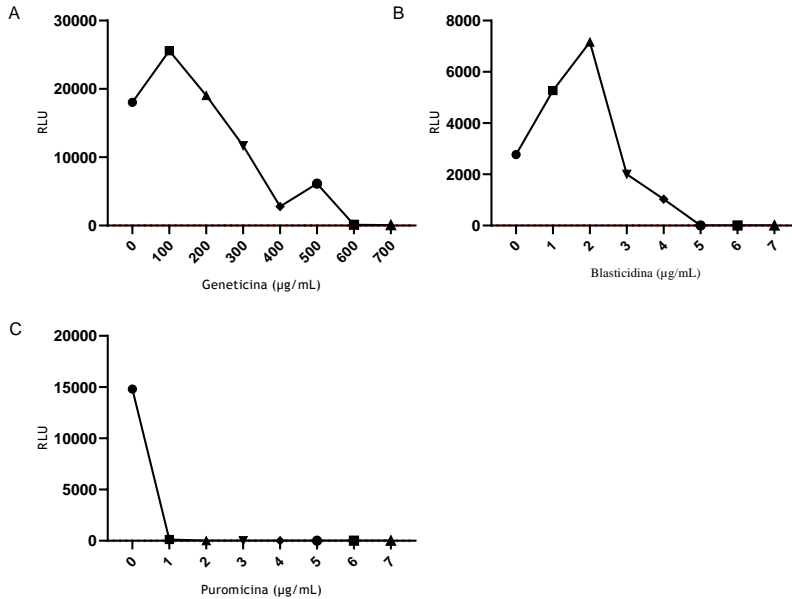


Figura 21: Curvas de muerte obtenidas por exposición de antibióticos de selección de la línea celular HG-3 a 7 días. A) Curva de muerte de la línea celular HG-3 al antibiótico geneticina. B) Curva de muerte de la línea celular HG-3 al antibiótico blastidina. C) Curva de muerte de la línea celular HG-3 al antibiótico puromicina. (RLU= Luminiscencia relativa a unidades)

4.5. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 *KNOCK-OUT* Y *KNOCK-DOWN* PARA EL GEN *ARSD* MEDIANTE EL USO DE TECNOLOGÍA CRISPR.

4.5.1. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD* (HG-3^{Ko-ARSD})

4.5.1.1. Inserción lentiviral de los componentes del sistema CRISPR: Cas9+sgRNA.

Para la generación de la línea celular HG-3-iCas9 se empleó el sistema lentiviral compuesto por los plásmidos pMD2.G y psPAX2 y el

vector de transferencia Lenti-iCas9-neo (obsequio de Qin Yan (Addgene)) que supone la integración de la proteína Cas9 bajo un promotor inducible con doxiciclina. Además, también supone la integración del gen reportero GFP, así como el gen de resistencia a antibiótico neomicina (G418). Los plásmidos fueron preparados y las partículas virales fueron producidas y cuantificadas según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Las partículas virales fueron empleadas para infectar las células HG-3 con una MOI=3.

Las células se dejaron en contacto con las partículas virales durante 48 horas en el incubador celular. A continuación, se les cambió el medio completo por medio con geneticina para seleccionar positivamente las células infectadas (600µg/mL de geneticina durante 7 días, según datos de la curva de muerte).

Para generar las líneas celulares HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD* se emplearon las guías comerciales prediseñadas propuestas por la casa comercial *Sigma*, una guía fue dirigida al exón 3 y la otra al exón 5 del gen. Para los diseños se tuvieron en cuenta los genomas de referencia GRCh38 (hg38) y GRCh37 (hg19). Los *off-targets* de los sgRNAs fueron definidos mediante el uso de la herramienta web *CRISPR design tools-off-target search* (*Sigma*), encontrándose como posibles *off-targets* para la guía dirigida al exón 3 del gen *ARSD*: el exón 4 del gen *ARSE*, la región intrónica 10-11 del gen *FAM172A*, el exón 10 del gen *ENPP2* y el intrón 0-1 del gen *MRLPL11*. Para la guía dirigida al exón 5 del gen *ARSD* los *off-targets* encontrados fueron: exón 14 del gen *ZNF236*, intrón 1-2 del gen *MRPL27* y el intrón 2-3 del gen *IRAK2*. Todos los *off-targets* suponen la sustitución de al menos 2 nucleótidos con respecto de la región diana del gen *ARSD*.

Las guías fueron incluidas también comercialmente en los vectores de transferencia LV04 (*Sigma*), que presentan como antibiótico de selección la puromicina. Para introducir cada sgRNA se empleó el sistema lentiviral compuesto por los plásmidos pMD2.G y psPAX2 y como vector de transferencia el LV04 con cada una de las guías. Los plásmidos fueron preparados y las partículas virales fueron producidas y cuantificadas según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Las partículas virales fueron empleadas para infectar la línea celular HG-3-iCas9 con MOI=3.

Las células se dejaron en contacto con las partículas virales durante 48 horas en el incubador celular. A continuación, se les cambió el medio completo por medio con antibiótico de selección (3 µg/mL de puomicina durante 7 días, según datos de la curva de muerte). Seguidamente, se procedió a la inducción con doxiciclina durante 24 horas y se dejó expandir el cultivo durante 3 semanas en medio completo.

4.5.1.1.1. Inducción de la expresión de Cas9 con doxiciclina.

Para conocer la cantidad de doxiciclina que se debe añadir al medio de cultivo e inducir la expresión de la proteína Cas9, las células HG-3-iCas9 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a densidad celular de 400.000 células/mL y se añadió doxiciclina en cantidades crecientes (0-1-2-4-8-16-32-64-128 µg/mL) durante 24 horas. A continuación, las células fueron analizadas en el citómetro *BD Accuri RUO with C Sampler (BD Biosciences)* y fue cuantificada la cantidad de células GFP positivas (%), analizando 10.000 eventos en todas las condiciones. Como control negativo se tomó la condición 0 µg/mL, verificándose los datos con la línea celular HG-3.

Para estudiar la desinducción del promotor una vez inducido, las células HG-3-iCas9 fueron sembradas nuevamente en placas de 96 pocillos a densidad celular de 400.000 células/mL y se añadió doxiciclina a concentración final de 32 µg/mL durante 24 horas. Cada día de lectura (0-24-48-72-96-120-168-240-264 horas), las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en el citómetro *BD Accuri RUO with C Sampler (BD Biosciences)* y fue cuantificada la cantidad de células GFP positivas (%), analizando 10.000 eventos en todas las condiciones. Como control negativo se empleó la línea celular HG-3-iCas9 sin inducir.

Para la inducción de la línea celular en el ensayo CRISPR, se empleó la condición 4 µg/mL de doxiciclina con el objetivo de evitar las concentraciones que indujeron muerte en el cultivo celular. Esta condición supuso la presencia de un 78% de células GFP positivas. Esta condición no presenta diferencias significativas en % de células GFP con las condiciones 8 y 16 µg/mL.

Además de mediante la expresión de su gen reportero, la expresión de la proteína Cas9 se corroboró mediante inmunodetección por *western blot*. Para la detección de la proteína Cas9 en la línea celular HG3-iCas9, partimos de las células en cultivo crecidas en placas de 6 pocillos en medio completo y con una densidad celular de 400.000 células/mL. Después de 24 horas de inducción con doxiciclina (32 µg/mL) (control negativo y 3 replicados con doxiciclina) se procedió a retirar el medio de cultivo mediante centrifugación y se lavaron las células con PBS que fue retirado también mediante centrifugación.

La extracción proteica se llevó a cabo mediante el kit *RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz)* según las condiciones del fabricante. Para la radioinmunoprecipitación el preparado para 1mL consta de: fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) al 1%, solución con inhibidores de proteasa al 1%, ortovanadato de sodio al 1% y buffer de lisis hasta completar 1 mL. Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en el preparado de RIPA (50 µL del preparado por cada 10⁶ células) e incubados en hielo durante 1 hora. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron recuperados y conservados en -80°C hasta su uso.

La cuantificación proteica se basó en el método colorimétrico Lowry modificado mediante el uso del kit *DC Protein Assay (BioRad)* siguiendo las condiciones del fabricante y una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (su acrónimo del inglés, BSA) (*Sigma-Aldrich*). Las absorbancias se midieron a 750 nm en el lector de placas *Enspire (PerkinElmer)*.

A continuación, se tomaron 15 µg de proteína total de cada condición por triplicado y el volumen entre las muestras se igualó con agua miliQ. Las proteínas fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C en tampón de carga *Bolt LDS (4x) (Novex)*. Para llevar a cabo la separación de las proteínas mediante electroforesis en tampón *Bolt MES SDS (Invitrogen)*, las muestras fueron cargadas en los geles comerciales *Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen)*. El estándar proteico empleado fue *Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad)*. La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 150V.

La membrana *Immun-Blot® PVDF Membrane (BioRad)* se activó en metanol (*ChemLab*) durante un minuto. Tanto el gel de proteínas

como la membrana se sumergieron en tampón de transferencia Towbin modificado (metanol al 20%, Tris 20 mM (*Sigma*) y glicina 150 mM (*ThermoScientific*), pH=8). La transferencia semi-seca de las proteínas del gel a la membrana de transferencia se produjo a 15 V constantes durante 90 minutos. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado TBS-T (suero tamponado con Tris complementado con Tween 20 (*Sigma*) al 0.1%) y se bloqueó con BSA al 5 % en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La membrana se volvió a lavar con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario *anti-Cas9 clone 7A9* de ratón (*Sigma*) a 4 °C durante toda la noche a una dilución 1:4000. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana se volvió a lavar con TBS-T (3 lavados de 10 minutos cada uno) y se incubó con el anticuerpo secundario *Goat anti-mouse IgG (HPR)* (*Abcam*) durante una hora a temperatura ambiente a una concentración de 1:15.000. A continuación, la membrana se lavó con TBS-T (3 lavados de 10 minutos cada uno). Como control de carga se empleó la proteína β -ACT mediante el uso del anticuerpo β -*Actin-HPR* (*Cell Signal*) que fue incubado a dilución 1:15000 durante 1 hora. A continuación, se procedió a repetir el lavado con TBS-T (3 lavados de 10 minutos) (Tabla 12).

Para la detección de las proteínas por quimioluminiscencia se empleó el reactivo *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) que se añadió sobre la membrana, dejándose incubar durante un minuto. Para su revelado se emplearon las películas fotográficas de *Amersham Hyperfilm ECL (VWR)* y el procesador *FPM-100A (FujiFilm)*.

Tabla 12: Anticuerpos en la inmunodetección por *western blot*.

Proteína	kDa	Referencia	Dilución
Cas9/dCas9	160 kDa	MAC133 (<i>Sigma</i>)	1:4000
β -Actin HPR	45 KDa	8H10D10 (<i>CellSignal</i>)	1:15000
Goat anti-mouse IgG		ab-205719 (<i>Abcam</i>)	1:15000

4.5.1.2. Análisis ICE.

Para llevar a cabo el análisis ICE (del inglés, *Interference of CRISPR Edits*) y determinar la eficiencia de edición de las guías, se extrajo ADN de cada una de las dos líneas celulares generadas (*bulks* celulares): HG-3-iCas9-sgRNA_{E3} y HG-3-iCas9-sgRNA_{E5}, así como de la línea celular HG-3 y HG-3-iCas9, se amplificaron mediante PCR las regiones susceptibles de edición genómica y se secuenciaron mediante Sanger. Los archivos ab1 generados se analizaron mediante la herramienta web *ICE CRISPR Analysis Tool* (*Synthego*).

4.5.1.2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico celular se llevó a cabo mediante el uso del kit *ALLPREP DNA/RNA/miRNA Universal Kit* (*Quiagen*), a partir de, al menos, 250.000 células. Las células fueron centrifugadas (300 xg, 5 minutos) y los sobrenadantes fueron aspirados. El pellet fue resuspendido en 350 µL del búfer de lisis RLT plus suplementado con β-Mercaptoetanol (10 µL/mL Bufer empleado), además el búfer provoca la inactivación de ADNasas y ARNasas manteniendo intactos ambos ácidos nucleicos. Para homogenizar, el lisado fue mezclado con vórtex durante 2 minutos. A continuación, el lisado homogenizado fue incluido en la minicolumna de ADN y centrifugado durante 30 segundos a 20.000 xg, quedando el ADN genómico unido selectivamente a la columna. Mediante digestión con el búfer de Proteinasa K y posteriores lavados con etanol, se consiguió aumentar la pureza de la muestra que fue finalmente eluida mediante la adición de 100 µL de búfer EB y centrifugación durante 1 minuto a 10.000 xg.

La concentración y pureza del ADN genómico obtenido se realizó empleando el espectrofotómetro de microvolúmenes *NanoDrop 2000*. El ADN genómico purificado fue conservado a -20 °C.

4.5.1.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de moléculas de ADN es un paso fundamental para la aplicación de distintas técnicas de biología molecular que requieren, para ser efectivas, una gran cantidad de copias de regiones específicas de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (su acrónimo del inglés, PCR) es una reacción *in vitro*

Materiales y métodos

Llevada a cabo por la enzima ADN polimerasa en la que la región diana es copiada fielmente durante varios ciclos. Para llevar a cabo la reacción, se necesitan el ADN molde (portador de la región que se quiere amplificar), desoxirribonucleótidos trifosfatados (su acrónimo del inglés, dNTPs), ión magnesio (cofactor de la polimerasa), solución amortiguadora o búfer, agua y cebadores (forward (F) y reverse (R)) específicos para la región que se quiere amplificar.

Para llevar a cabo las PCR se empleó el kit *Amplitaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)* con el esquema de reacción detallado en la Tabla 13.

Tabla 13: Reacción PCR.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final (25 μ L)
Búfer	10x	1X
dNTPS	10mM	200uM
Cl2Mg	25mM	1,5mM
Cebador F/R	5uM	0,3uM
AmpliAq Gold	5U/ul	1U
ADN	75 ng	3 ng/ μ L
Agua	-	-

La secuencia de los cebadores empleados es detallada en la Tabla 14.

Tabla 14: Cebadores empleados en PCR y secuenciación.

Gen	Cebador	
ARSD-E3	F	ACTGTCTCCTTTGGTGCTGA
	R	GGAAGACGATGAATTGCAGGTGA
ARSD-E5	F	CCCGCCACCTGTATTGTATT
	R	AGGAGGAGTACCAAGAGATGAA

Las PCRs fueron llevadas a cabo en el termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*) con el esquema de temperaturas y tiempos indicado en la Figura 22. La temperatura de hibridación (su acrónimo del inglés, T_m) fue escogida en función de cada pareja de cebadores y el tiempo de extensión fue modificado en función del tamaño de la región amplificada por cada pareja de cebadores (siguiendo las especificaciones de 1 minuto por cada kb). Los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

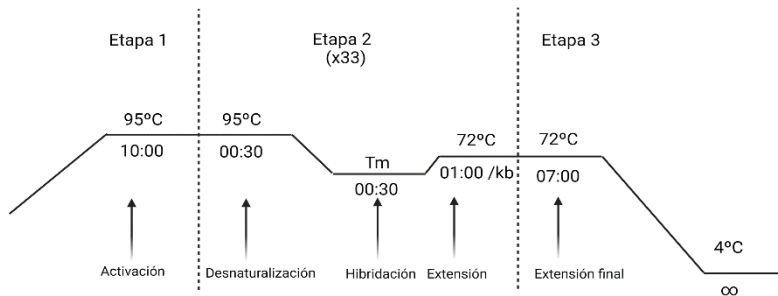


Figura 22: Temperaturas y tiempos empleados en PCR. Realizada en BioRender.com.

Para confirmar la amplificación positiva de las regiones de ADN seleccionadas, así como su tamaño esperado, $10\ \mu\text{L}$ del producto de PCR de cada muestra fue cargado en un gel de agarosa al 1% suplementado con *RedSafe Nucleic Acid Stainig Solution* (Intron Biotechnology). Como búfer de carga fue empleado $1\ \mu\text{L}$ por muestra de *5x Green GoTaq* (Promega). Como estándar de ADN se utilizó *1kb Plus Ladder DNA* (ThermoScientific).

Cargadas las muestras en los pocillos del gel, se dejó correr el gel durante 30 minutos a $90\ \text{V}$ para separar los fragmentos según su tamaño. Una vez separados los fragmentos, fueron visualizados mediante el uso del transiluminador *Gel Doc XR+* (*BioRad*). El analizador de imágenes empleado fue *ImageLab* (*BioRAD*).

4.5.1.2.3. Secuenciación Sanger.

Previa a la secuenciación Sanger, los productos de PCR fueron purificados de los cebadores y dNTPs excedentes mediante el sistema comercial *ExoSAP-IT* (*Applied Biosystems*). El método de

purificación está basado en la acción hidrolítica de las enzimas exonucleasa I (degrada los residuos monocatenarios de los cebadores) y la fosfatasa alcalina de camarón (hidroliza los dNTPs). Para cada muestra que se secuenció, se tomaron 2.15 μL de su producto de PCR y se le añadieron 0.85 μL del producto comercial (por duplicado, para *forward* y *reverse*). A continuación, la mezcla se incubó en el termociclador: 15 minutos a 37°C seguidos de 15 minutos a 80°C.

La secuenciación Sanger o secuenciación por terminación es una técnica que nos permite conocer la secuencia de bases de un fragmento de ADN (típicamente de hasta 900 pb). Al igual que en la PCR, la metodología consiste en copiar múltiples veces la región que deseamos secuenciar, empleando la enzima polimerasa, el cebador (F y R), los dNTPs y el molde de ADN (producto de PCR purificado); sin embargo, a diferencia de la PCR, también se añaden versiones didesoxi de los 4 nucleótidos (ddNTPs) marcados diferencialmente, también denominados terminadores de cadena (no tienen grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar), aunque en menor cantidad que los dNTPs. De esta manera, al igual que en la PCR, la polimerasa, una vez unido el cebador, va añadiendo nucleótidos hasta que aleatoriamente añade un ddNTP, no pudiéndose añadir más nucleótidos. Al finalizar los ciclos se puede asegurar que se ha incorporado un nucleótido didesoxi en cada una de las posiciones del fragmento de ADN del que queremos saber su secuencia en, al menos, una reacción (Figura 24). De esta forma se obtienen fragmentos de distinta longitud cuyo último nucleótido será un ddNTP. Para la amplificación con marcaje se empleó el preparado *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems), tomando 8 μL para cada una de las muestras, también se añadió 1 μL de cebador (*forward/reverse*, según pocillo). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *Veriti* (Applied Biosystems).

A continuación, las muestras fueron nuevamente purificadas mediante el uso de las placas *Optima DTR* (EdgeBio) con las que, a través de una centrifugación, las muestras pasan a través de un filtro de resina, que supone la eliminación de *BigDye* excendente, así como de dNTPs, ddNTPs, cebadores y fragmentos de ADN cortos (de hasta 20 pb). Las muestras fueron secuenciadas mediante el uso del Analizador de ADN 3730 XL de 96 capilares (*Applied Biosystems*).

4.5.1.3. Crecimiento desde célula única.

Para obtener una población celular homogénea en la que todas las células presenten la misma edición genómica resuelta de la misma manera por los mecanismos de reparación celular, se procedió al crecimiento celular desde célula única. A partir de los *bulks* celulares, se realizó una dilución limitante a concentración 1célula/1000 μ L, sembrándose 50 μ L de la dilución en cada uno de los pocillos de placas de 384 pocillos para cada guía. El medio empleado para la dilución limitante fue medio completo suplementado con un 20% de iFBS y combinado con un 20% de medio celular condicionado (medio empleado previamente para el cultivo celular y filtrado con filtro de poro de 0.45 μ m), hasta el formato placa de 96 pocillos, momento a partir del cual se empleó el medio de crecimiento completo estándar. Los pocillos fueron verificados empleando el microscopio (*IX70, Olympus*), las células fueron mantenidas en el incubador celular durante toda la expansión.

4.5.1.4. Validación de la expresión del gen *ARSD* en clones *knock-out*.

La validación de las líneas celulares *knock-out* se realizó a partir de los 54 clones obtenidos desde célula única mediante secuenciación Sanger (la extracción de ADN, la amplificación y la secuenciación se realizó conforme a la metodología detallada en el apartado anterior, los cebadores empleados son los detallados en la Tabla 13). Para analizar las secuencias se empleó el programa *CodonCode Aligner*. Se seleccionaron los clones que presentaban indicio de edición genómica en la región del exón 3 o del exón 5, según corresponda, tomando como referencia la secuencia de la línea celular HG-3 (y HG-3-iCas9, ambas iguales).

La ausencia de expresión del gen *ARSD* en los clones se verificó mediante PCR cuantitativa con la metodología *PrimeTime Probe*, empleando como línea control la HG-3 y como gen de expresión constitutiva la β -*ACT*, según se detalla a continuación.

4.5.1.4.1. Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN de células en cultivo se empleó el reactivo *TRIzol* (*Invitrogen*) según las especificaciones del fabricante. El *TRIzol* es una solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina que permite, tras la adición de cloroformo y centrifugación, la separación de los componentes celulares en tres fases diferenciadas.

Para la extracción de ARN se tomaron 2×10^6 células de cada condición por triplicado y fueron lavadas con PBS para evitar interferencias del medio celular con el reactivo *TRIzol*. A continuación, se añadieron 750 μL de *TRIzol*, se pipeteó para homogenizar y se dejó incubar 5 minutos a RT para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Después de la incubación se añadieron 150 μL de cloroformo, se mezclaron con vórtex las muestras durante 40 segundos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para conseguir la separación de los componentes celulares en distintas fases, se procedió a centrifugar las muestras durante 15 minutos a 12.000 xg. De este proceso obtuvimos una fase inferior roja con fenol-cloroformo, una interfase blanquecina (donde se encuentra el ADN) y una fase superior acuosa, donde se encuentra el ARN. Mediante la extracción de la parte superior acuosa a un nuevo tubo y la adición de 375 μL de isopropanol, se consiguió la precipitación del ARN. A continuación, se homogenizó por inversión, se incubó durante 10 minutos a RT, se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 xg y se eliminó el sobrenadante en todas las muestras. Seguidamente, procedimos a lavar el ARN precipitado con 750 μL de etanol al 75%, se mezcló con vortex y se centrifugó durante 5 minutos a 7.500 xg y 4°C. Los sobrenadantes fueron descartados. Los precipitados se dejaron secar al aire durante 10 minutos. Pasado este tiempo, los pellets fueron solubilizados con 20 μL de agua libre de ARNasas e incubados en el termobloque durante 10 minutos a 55°C (para facilitar la solubilización). A continuación, las muestras fueron valoradas en el *NanoDrop*. Las muestras de ARN fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

4.5.1.4.2. Retrotranscripción (ADNc síntesis).

La síntesis de ADNc a partir de ARN se llevó a cabo mediante el kit *iScript cDNA synthesis (BioRad)*, según las condiciones del fabricante. Los componentes de la reacción son detallados en la Tabla 15.

Tabla 15: Reacción de retrotranscripción.

Reactivo	Volumen /reacción
ARN	1 μ L
Máster Mix	4 μ L
Reverso transcriptasa	1 μ L
Agua	14 μ L
Volumen final	20 μ L

La reacción se llevó a cabo en el termociclador *Veriti (Applied Biosystems)* mediante el programa: Activación: 5 minutos a 25°C, retrotranscripción: 20 minutos a 46°C e inactivación: 1 minuto a 95°C. El ADNc obtenido fue valorado en el *Nanodrop* y reservado a -20°C hasta su uso.

4.5.1.5. PCR cuantitativa: Sondas *TimePrime*.

La PCR cuantitativa, a partir de ADNc, se llevó a cabo mediante la tecnología *PrimeTime qPCR Probe Assay (IDT)*, tecnología equivalente a la *Taqman (ThermoFisher)*. Esta técnica permite la cuantificación en tiempo real de la expresión génica. Los ensayos incluyen un oligonucleótido marcado con fluorescencia (sonda o *probe*), además de los cebadores. La combinación de la sonda y los cebadores incrementa la especificidad de la reacción de amplificación puesto que los tres deben estar unidos a la diana para que la señal fluorescente sea generada. Las sondas *PrimeTime qPCR* presentan un fluoróforo en 5' (*FAM*) y un apagador o *quencher* en 3' (*Iowa Black FQ*). Mientras que el fluoróforo y el *quencher* estén próximos, no se emite fluorescencia. Durante la fase de hibridación de la PCR los cebadores y la sonda se unen a sus regiones complementarias en la región diana. Durante la extensión, la Taq ADN polimerasa usa su

actividad exonucleasa para hidrolizar la sonda, de manera que el fluoróforo en 5' es liberado de su *quencher* y la fluorescencia puede ser detectada por el instrumento. La cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR que se está sintetizando. El tiempo transcurrido hasta que esta señal fluorescente supera el valor umbral es inversamente proporcional a la cantidad de producto generado en la PCR. (Figura 23)

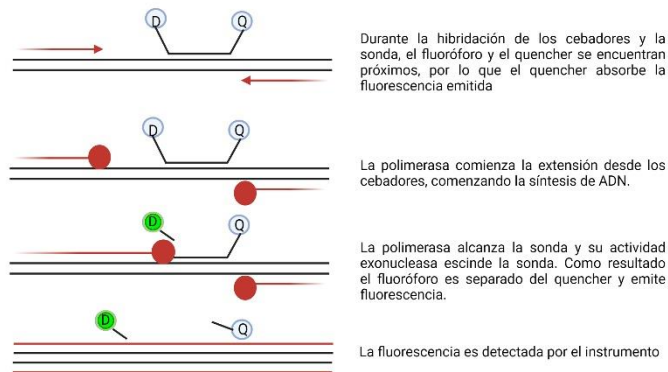


Figura 23: Esquema de la metodología de qPCR PrimeTime. Realizada en: Biorender.com

Para llevar a cabo las reacciones se empleó el kit *PrimeTime gene expression Master Mix (IDT)* que consta de una ADN polimerasa (provista también en estado inactivo), dNTPs, cloruro de magnesio, potenciadores, estabilizadores y la referencia pasiva. Los reactivos empleados se ajustaron a la modalidad del kit 10 μL de volumen final (componentes de la reacción detallados en la Tabla 16).

Tabla 16: Reacción *PrimeTime Probe*.

Reactivo	Volumen /reacción
Máster Mix	5 μL
Cebadores- <i>Probe</i>	0,5 μL
ADNc	1 μL
Agua	3,5
Volumen final	10 μL

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *QuantStudio 5* (*Applied Biosystems*) mediante el programa: Activación: 3 minutos a 95°C, Amplificación con desnaturalización: 15 minutos a 95°C y anillado/extensión-lectura de placa: 1 minuto a 60°C durante 45 ciclos.

Para la cuantificación de la expresión génica se emplearon las *PrimeTime qPCR Probe Assays* (IDT) prediseñadas que detectan la expresión de todas las posibles variantes de empalme generadas (detalladas en la Tabla 17).

Para cada *Prime Time qPCR Probe Assay* empleada la eficiencia fue calculada mediante el método de diluciones seriadas 1:10 a partir de ADNc (1000-500-50-5 ng de ADNc) de la línea celular HG-3. Todas presentaron una eficiencia entre el 90 y 100% en el rango ensayado. Como gen de expresión constitutiva se eligió β -*ACT*.

Tabla 17: *TimePrime Probes* empleadas en qPCR.

Referencia (IDT)		Secuencia	Eficiencia (%)
<i>Hs.PT.56a.1191910</i> <i>ARSD</i>	F	CAAAGTGGTTTCGTTCTCAGG	95,21
	Probe	TTCCTTCAGATCAGGCATGGACG	
	R	CGAGCTGCATTCTCACA	
<i>Hs.PT.56a.4128129</i> <i>ARSD</i>	Cebador 1	CGCTGGAAGTGTATCCTGATG	93,48
	Cebador 2	CAGCAAAGAAAGGAAGAGGAGA	
	Probe	AACGTCACGGAGCAACCCATGG	
<i>Hs.PT.39a.2221487</i> <i>ACTB</i>	Cebador 1	ACAGAGCCTCGCCTTTG	93,47
	Cebador 2	CCTTGACATGCCGGAG	
	Probe	TCATCCATGGTGAGCTGGCGG	

La ausencia en los niveles de expresión se determinó mediante el parámetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$, empleando como control endógeno (o *housekeeping*) la β -*ACT*. Para la comparativa entre los datos de expresión se utilizó un sistema de análisis de varianzas (ANOVA). La significación estadística se fijó en $\alpha = 0.05$.

4.5.1.6. Estudio de *off-targets*.

El estudio de posibles *off-targets* fue llevado a cabo en los clones que no presentaron expresión del gen *ARSD*. La extracción de ADN, la amplificación y secuenciación Sanger fue llevada a cabo como se detalló anteriormente. Los cebadores empleados, detallados en la Tabla 18, fueron dirigidos a los posibles *off-targets* definidos. Las secuencias fueron analizadas empleando el programa *CodonCode Aligner*.

Tabla 18: Cebadores empleados en la secuenciación de los posibles *off-targets*.

Gen/ Plásmido		Cebador
ARSE	F	GATGACCAGCAGACCTTCTATG
	R	CACCCTAGTGCAGTTGTAAGA
FAM172A	F	AGTGAACAGTCTAGCTGTGATAAG
	R	GTGTCCATTTCTACTTGGAGGT
ENPP2	F	ATAGAGAGCATTGGCCTGGG
	R	TCCCTTCGGCTCTGCTGTAG
MRPL11	F	TGATGGCCTCTCTGTCTCCAT
	R	GGAACAGCAGAGGTACAGGAT
ZNF236	F	AGGCAAGTAACCTTTGACAGCA
	R	TGGGAAAGGCTGCAAACTC
MRPL27	F	GACCGGAAGTGAGTGATCGAA
	R	TGCTCTTCAAACGCCCTCAC
IRAK2	F	AGGACGAAGCCACTCATCAC
	R	CCCTGGGACCTCACTTTTCAA

4.5.2. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-down* para el gen *ARSD* (HG-3^{Kd-ARSD}).

4.5.2.1. Inserción lentiviral de los componentes del sistema CRISPR: dCas9-KRAB+sgRNA.

Para la generación de la línea celular HG-3-dCas9-KRAB se empleó el sistema lentiviral compuesto por los plásmidos pMD2.G y psPAX2 y el vector de transferencia pLX_311-KRAB-dCas9 (obsequio de John Doench, William Hahn y David Root (Addgene)), que supone la integración de la proteína dCas9 y el dominio represor KRAB bajo un promotor de expresión constitutiva. Además, también supone la integración del gen de resistencia al antibiótico blasticidina. Los plásmidos fueron preparados y las partículas virales fueron producidas y cuantificadas según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y métodos. Las partículas virales fueron empleadas para infectar la línea celular HG-3 con una MOI=3.

Las células se dejaron en contacto con las partículas virales durante 48 horas en el incubador celular. A continuación, se les cambió el medio completo por medio con antibiótico para seleccionar positivamente las células infectadas (5 µg/mL de blasticidina durante 7 días, según datos de la curva de muerte).

La validación de la expresión de la proteína dCas9 en la línea celular HG-3-dCas9-KRAB seleccionada se realizó también mediante inmunodetección. La metodología empleada para la extracción y cuantificación proteica, así como los anticuerpos empleados para el *western blot*, fueron los mismos que los utilizados para la línea celular HG-3-iCas9.

Para introducir cada sgRNA se empleó el sistema lentiviral compuesto por los plásmidos pMD2.G y psPAX2 y como vector de transferencia el plásmido Lenti sgRNA Neo (obsequio de Brett Stringer (Addgene)) clonado con cada una de las guías. Los plásmidos fueron preparados y las partículas virales fueron producidas y cuantificadas según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y métodos. Además, se generaron partículas virales con el vector de transferencia vacío. Las partículas virales fueron empleadas para infectar la línea celular HG-3-dCas9 con MOI=3. Las células se dejaron en contacto con las partículas virales durante 48 horas en el incubador celular. A continuación, se les

cambio el medio completo por medio con antibiótico de selección (600µg/mL de geneticina durante 7 días, según datos de la curva de muerte).

4.5.2.1.1. Diseño de las guías knock-down.

Para el diseño de las guías utilizadas para generar los modelos celulares *knock-down* se utilizó la herramienta CRISPR ERA²²⁴ en donde seleccionamos como método de edición *gene repression*, como organismo de referencia *Human* (GRCh37/hg19) y como gen *ARSD*. Las guías fueron elegidas teniendo en cuenta como región diana del gen *ARSD* los primeros 500 nucleótidos aguas abajo desde el TSS. Además, las guías fueron seleccionadas atendiendo a la no concordancia con otras regiones genómicas teniendo en cuenta la variación de 0, 1, 2 y 3 nucleótidos. De este modo los *off-targets* seleccionados para las guías *knock-down* fueron encontrados mediante el uso de la herramienta web *CRISPR-Cas9 guide RNA design checker (IDT)* seleccionando 4 variaciones nucleótídicas de discordancia. Para la guía situada 41 nucleótidos desde el TSS fueron seleccionados: el exón 2 del gen *TTC24* y el exón 6 del gen *GOLGA3*. Para la guía situada 182 nucleótidos desde el TSS fueron seleccionados: el exón 7 del gen *AUH* y el exón 1 del gen *RIOK1*.

4.5.2.1.2. Clonación de las guías en el vector de transferencia.

Para los modelos *knock-down*, se eligió como vector de transferencia el plásmido Lenti sgRNA que presenta el componente tracrRNA de la sgRNA junto a una secuencia flanqueada por dos puntos de corte de la enzima de restricción BsmBI (Esp3I) que nos permite integrar en posición correcta el crARN de la sgRNA (Figura 24).

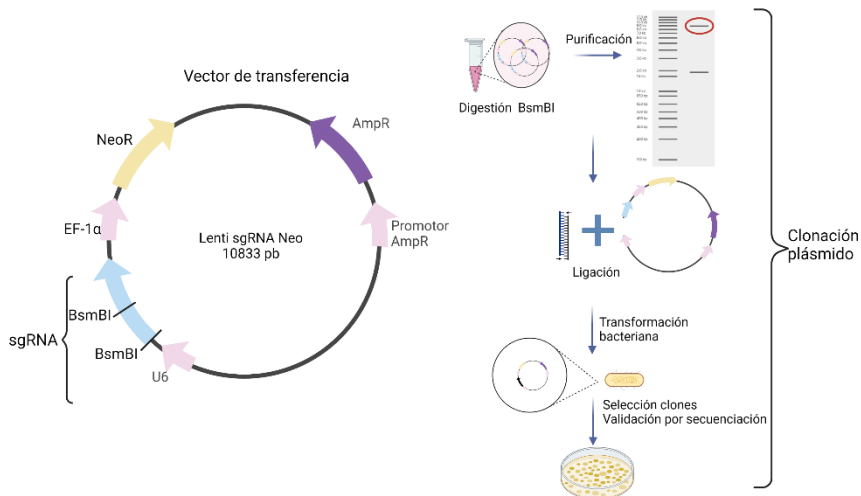


Figura 24: Esquema del proceso de clonación de las sgRNAs en el vector de transferencia lentiviral. Realizada en BioRender.com.

La digestión del plásmido Lenti sgRNA Neo se llevó a cabo empleando la enzima *BsmBI Fast Digest* (ThermoScientific) durante 3 horas a 37°C (composición de la reacción detallada en la Tabla 19), al terminar la digestión la enzima fue inactivada mediante incubación a 65°C durante 10 minutos.

Tabla 19: Componentes de la reacción de digestión enzimática (BsmBI).

Reactivo	Volumen /reacción
Plásmido	1 µL
Búfer	2 µL
DTT (20mM)	1 µL
Agua	15,5 µL
BsmBI	0,5 µL
Volumen final	20 µL

Para separar los dos fragmentos generados después de la digestión (un fragmento de 8948 pb y otro de 1885 pb) los productos de la digestión fueron cargados en un gel de agarosa al 0.5% que se dejó correr durante

30 minutos a 90 V para separar los dos fragmentos según su tamaño. Como indicador de peso molecular empleamos *1Kb Plus DNA Ladder* (*ThermoScientific*). Una vez separados los fragmentos empleamos el transiluminador *Gel Doc XR+* (*BioRad*) y analizador de imágenes *ImageLab* (*BioRAD*) para visualizar la banda deseada (banda de 8948 pb) y extraerla. La purificación del fragmento del plásmido Lenti sgRNA deseado fue llevada a cabo mediante el uso del kit *GenElute Gel Extraction* (*Sigma*). Para la purificación, cada extracto del gel de agarosa fue diluido en la solución *Gel Solubilization* (5 minutos a 60°C). Los extractos diluidos se añadieron a las columnas y mediante centrifugación (1 minuto a 12.000 xg) se favoreció su paso a través de la columna, permitiendo que los fragmentos de ADN solubilizados se uniesen a la membrana de sílice de la columna. Tras dos lavados con la solución *WASH*, el ADN fue separado de la membrana mediante el uso de la solución de elución del kit precalentada a 65°C. El ADN obtenido fue cuantificado usando el *NanoDrop* y reservado a -20°C hasta su uso.

Los crRNA de las guías y sus secuencias complementarias fueron encargados como oligonucleótidos a *IDT*. Para el diseño de los crRNAs se incluyeron los nucleótidos compatibles necesarios para su correcta inserción en el vector de transferencia digerido con la enzima de restricción (Figura 25).

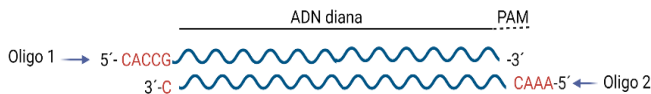


Figura 25: Oligonucleótidos para la ligación con el vector de transferencia.
Realizada en: Biorender.com

Recibidos los oligonucleótidos liofilizados, fueron resuspendidos a concentración 100 μ M. Para la formación de los oligodúplex se llevó a cabo la reacción compuesta por los elementos detallados en la Tabla 20 empleando el termociclador siguiendo el programa 5 minutos a 95 °C, seguidos de una bajada de temperatura hasta 25°C (bajando 5°C cada minuto). Los oligodúplex fueron diluidos (1:200) y conservados a -20°C hasta su uso.

Tabla 20: Reacción formación oligodúplex

Reactivo	Volumen /reacción
Oligo 1	2 μ L
Oligo 2	2 μ L
Búfer ligación	2 μ L
Agua	14 μ L
Volumen final	20 μ L

Para la reacción de ligación del plásmido digerido y purificado con cada oligodúplex diluido se empleó la enzima *T4 DNA ligase* (NEB), siguiendo el esquema detallado en la Tabla 21. La reacción fue llevada a cabo en el termociclador a 16°C durante toda la noche.

Tabla 21: Reacción ligación.

Reactivo	Volumen /reacción
Plásmido digerido	1 μ L
Oligodúplex	1 μ L
Búfer T4	1,2 μ L
T4 DNA Ligase	0,8 μ L
Agua	8 μ L
Volumen final	12 μ L

Al día siguiente se procedió a la transformación de las bacterias *High Efficiency E. coli 5-alpha competent* (NEB) con el producto de ligación mediante choque térmico. Para conseguirlo, se tomaron 25 μ L de las bacterias a las que se les añadieron 2 μ L del producto de ligación. La mezcla fue incubada :30 minutos en hielo, 30 segundos a 42°C y 5 minutos nuevamente en hielo. A continuación, se añadieron 250 μ L del medio SOC (NEB) y se incubó la mezcla durante 1,5 horas a 37°C en agitación. El medio SOC es un medio isotónico que favorece la supervivencia de las bacterias después de su transformación por choque térmico. Terminada la incubación, las bacterias transformadas fueron sedimentadas mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 3 minutos y

resuspendidas en 75 μL del medio SOC usado. La siembra de las bacterias en placas de medio LB con agarosa (6 g/L) y ampicilina (100 mg/mL) fue realizada tomando 5 μL de las bacterias transformadas concentradas. Las placas sembradas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Al día siguiente las colonias crecidas aisladas (5 en cada placa) fueron tomadas y crecidas en minicultivos durante 8 horas. Pasado este tiempo, se tomaron 2 μL de cada minicultivo y se emplearon para llevar a cabo la amplificación mediante PCR de la región receptora del crRNA en el plásmido. Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1% para verificar el tamaño de los amplicones generados. Las muestras que presentaron un patrón de bandas en gel de agarosa correcto fueron secuenciadas mediante Sanger. Como vectores de transferencia para el *knock-down*, fueron elegidos los plásmidos que presentaban las guías insertadas correctamente verificados mediante secuenciación Sanger (metodología anteriormente detallada). Los cebadores empleados son detallados en la Tabla 22.

Tabla 22: Cebadores empleados en la verificación del clonaje.

Plásmido	Cebador	
<i>Lenti-sgRNA neo</i>	F	GACTATCATATGCTTACCGT
	R	GCCCAGTCATAGCCGAATAG

4.5.2.2. Prueba de expresión del gen *ARSD* en el *bulk* celular.

A continuación, se procedió al estudio de la expresión del gen *ARSD* en los *bulks* celulares mediante PCR cuantitativa (*PrimeTime Probe*, metodología anteriormente detallada). Se emplearon como líneas control HG-3 y HG-3-dCas9-sgRNA (línea que presenta insertado el vector de transferencia vacío). Como gen de expresión constitutiva se utilizó β -*ACT*.

4.5.2.3. Crecimiento desde célula única.

Para obtener una población celular homogénea, con el mismo nivel de expresión del gen *ARSD*, se procedió al crecimiento celular desde célula única. Partiendo de los *bulks* celulares, se realizó una dilución limitante a concentración 1célula/1000 μL , sembrándose 50

μL de la dilución en cada uno de los pocillos de placas de 384 pocillos para cada guía. El medio empleado para la dilución limitante fue medio completo suplementado con un 20% de iFBS y combinado con un 20% de medio celular condicionado (medio empleado previamente para el cultivo celular y filtrado con filtro de poro de $0.45\ \mu\text{m}$), hasta el formato placa de 96 pocillos, momento a partir del cual se empleó el medio de crecimiento estándar. Los pocillos fueron verificados empleando el microscopio (*IX70, Olympus*), las células fueron mantenidas en el incubador celular durante toda la expansión.

4.5.2.4. Validación de la expresión del gen *ARSD* en clones *knock-down*.

La validación de las líneas celulares *knock-down* se realizó a partir de 6 de los clones obtenidos desde célula única mediante PCR cuantitativa (*PrimeTime Probe*, metodología anteriormente detallada). Se emplearon como líneas control HG-3 y HG-3-dCas9-sgRNA (línea que presenta insertado el vector de transferencia vacío). Como gen de expresión constitutiva la $\beta\text{-ACT}$.

4.5.2.5. Estudio de *off-targets*.

El estudio de los posibles *off-targets* se llevó a cabo analizando la expresión de los posibles genes diana anteriormente citados mediante PCR cuantitativa en los 6 clones validados.

La extracción proteica y la síntesis de ADNc se llevó a cabo siguiendo la metodología anteriormente citada. Para la PCR cuantitativa se empleó la tecnología colorante indicador (*SYBR Green*), que se une al ADN de doble cadena (ADNdc) generado por la ADN polimerasa en cada ciclo de amplificación, produciendo una señal fluorescente. (Figura 26). El tiempo transcurrido hasta que esta señal fluorescente supera el valor umbral es inversamente proporcional a la cantidad de producto generado en la PCR.

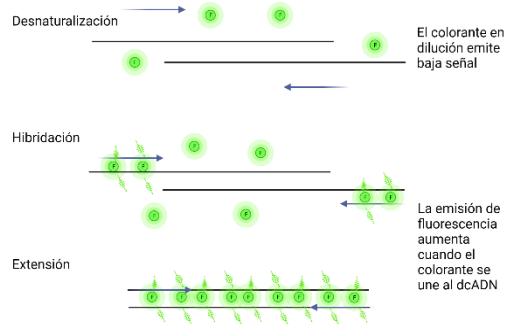


Figura 26: Esquema de la metodología de qPCR SYBR Green. Realizada en: Biorender.com

Para llevar a cabo la reacción se empleó el kit *iTaq universal SYBR Green supermix (BioRad)* según las condiciones del fabricante. La supermix está compuesta por una mezcla de dTTP/dUTP, la enzima *DNA Taq Gol DNA polimerase Ultra Pure* (provista en estado inactivo permitiendo la mezcla de los reactivos a RT), el colorante *SYBR Green* y la referencia pasiva ROX (normalizador de las fluctuaciones no relacionadas con la PCR en la señal de fluorescencia). Los reactivos empleados se ajustaron a la modalidad del kit 10 μL de volumen final (componentes de la reacción detallados en la Tabla 23).

Tabla 23: Reacción qPCR *SYBR Green*.

Reactivo	Volumen/reacción
SYBR Green ROX	5 μL
Cebador F	0,8 μL
Cebador R	0,8 μL
ADNc	1 μL
Agua	2,4
Volumen final	10 μL

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador mediante el programa: Activación de la polimerasa y desnaturalización del ADNc: 5 minutos a 95°C, amplificación con desnaturalización: 15 segundos a 95°C, e hibridación/extensión- lectura de placa a 60°C durante 60 segundos durante 40 ciclos.

Para cada una de las parejas de cebadores empleadas la eficiencia fue calculada mediante el método de diluciones seriadas 1:10 a partir de ADNc (1000-100-10-1-0.1 ng de ADNc) de la línea celular HG-3. Como gen de expresión constitutiva se eligió β -ACT.

Los cebadores específicos para la detección de los genes de interés, así como su eficiencia, se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Cebadores empleados en la qPCR SYBR Green

Gen	Cebador		Eficiencia (%)
TTC24	F	TTCCATTTGTAGGTCCAGGC	94,81
	R	CAGATGCCCGACTCCATG	
GOLGA3	F	GATCTCGTCCCTGCAGAGTG	96,9
	R	GGGTCATCTGTCCAACCTGG	
AUH	F	GGGATGGAGGTCGATTTAGTAAC	93,89
	R	CTGTTCCTTTTATTCTCCTTTATAGCG	
RIOK1	F	AGTTATCAGAATCCAAGGCTCG	93,65
	R	AATGATATACACGCCTCCACC	
ACTB	F	AACCATGGATGATGATATCGC	93,08
	R	TCATTGTAGAAGGTGTGGTG	

Los niveles de expresión se determinaron mediante el parámetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$, empleando como control endógeno (o *housekeeping*) la β -ACT. Para la comparativa entre los datos de expresión se utilizó un sistema de análisis de varianzas (ANOVA). La significación estadística se fijó en $\alpha=0.05$

4.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *ARSD* EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

4.6.1. Estudio de proliferación celular *in vitro*.

4.6.1.1. Estudio de la proliferación celular *in vitro* mediante conteo celular.

Para llevar a cabo el estudio comparativo de la proliferación celular entre las líneas celulares HG-3 y HG-3 *knock-out* (*clones 11 y 10*) /*down* (*clones 1 y 3*) para el gen *ARSD*, se realizó el conteo celular tras 0-3-6 días de cultivo, mediante el uso del contador automático Luna II. Para cada ensayo, se sembraron en placas de 6 pocillos células a la densidad celular de 400.000 células/mL por pocillo, empleando 3 replicados por línea celular. A los 3 y 6 días, fue añadido medio de cultivo para ajustar la densidad celular a 400.000 células/mL. Para excluir las células muertas se empleó en todas las medidas *Trypan Blue Solution 0.4%* (*Sigma*). Como controles se emplearon también las líneas celulares HG-3-iCas9 y HG-3-dCas9-KRAB-sgRNA (vector de transferencias sin guía).

Para comparar los datos de conteo celular se empleó un sistema de análisis de varianzas (ANOVA). La significación estadística se fijó en $\alpha = 0.05$.

4.6.1.2. Estudio de la proliferación celular *in vitro* mediante medida de la viabilidad celular.

Para llevar a cabo el estudio comparativo de la proliferación celular *in vitro* de las líneas HG-3 y HG-3 *knock-out* /*down* para el gen *ARSD* se utilizó el reactivo, sal de monotetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (*Invitrogen*), conocido como MTT. La reducción del MTT tiene como resultado la rotura de su anillo central, formándose una molécula insoluble en agua de color azul/violeta llamada formazán. Debido a su estructura, el MTT es capaz de atravesar tanto la membrana citoplasmática como la mitocondrial, de modo que las células metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT (con la consecuente producción de formazán).

La producción de formazán intracelular puede ser monitorizada y empleada para determinar la actividad celular y permite inferir parámetros como citotoxicidad/viabilidad celular o proliferación celular.

Las lecturas de densidad óptica en placa se realizaron a 0-72-144 horas. Para cada ensayo, 10.000 células por línea celular fueron sembradas en 100 μ L de medio completo en formato placa de 96 pocillos. Se sembraron en cada ensayo 10 replicados de cada línea celular. Para ensayar la línea celular HG-3^{Ko-ARSD} se tomaron los clones 11 y 10 y para la línea celular HG-3^{Kd-ARSD} los clones 1 y 3. Se tomaron, además, como controles las líneas celulares HG-3-iCas9 y HG-3-dCas9-KRAB-sgRNA.

Para el ensayo el reactivo MTT fue disuelto en PBS a concentración 5mg/mL y fue añadido en proporción final 1:10 en cada pocillo (concentración final: 0.5 mg/mL), las células fueron mantenidas en el incubador celular durante 4 horas. A continuación, se añadió el solubilizador de formazán en proporción 1:2 y se mantuvieron las placas en agitación durante 30 minutos en oscuridad para favorecer la correcta solubilización del formazán. Seguidamente, las placas fueron leídas a 595 nm en el lector de placas *Mithras LB940 Microplate Multimode Reader (Interchim)*.

Para comparar los datos de densidad óptica se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de la razón entre las medias (*fold change*) y se tomó como valor 1 el *fold change* de la línea celular HG-3. La significación estadística se fijó en $\alpha=0.05$.

4.6.2. Estudio de proliferación celular *in vivo*: xenograft en pez cebra.

El estudio de proliferación celular *in vivo* se llevó a cabo mediante colaboración con los doctores Laura Sánchez Piñón y Pablo Cabezas Sáinz del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria (USC), y se llevó a cabo conforme a la autorización adjuntada (ANEXOS).

El estudio de proliferación celular *in vivo* se realizó empleando como modelo de experimentación animal el pez cebra (*Danio rerio*,

wild type), microinyectando las células de las líneas celulares HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} (clones 1 y 3).

4.6.2.1. Mantenimiento del pez cebra.

Se cruzaron adultos de pez cebra (*Danio rerio*, *wild-type*) por la mañana para obtener los embriones. Los adultos se mantuvieron en acuarios con una relación de 1 pez por litro de agua, ciclo día/noche de 14:10h, respectivamente; y la temperatura del agua se mantuvo a 28'5°C, según los procedimientos publicados²²⁵. Los procedimientos utilizados en los experimentos, el cuidado y tratamiento de los peces se realizaron de acuerdo con el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Santiago de Compostela y los protocolos estándar de España (Directiva 2012-63-DaUE). Al final de los experimentos, los embriones utilizados fueron sacrificados por sobredosis de triclaína.

4.6.2.2. Ensayo xenoinjerto (*xenograft*) y análisis de imágenes.

Los embriones de pez cebra se obtuvieron apareándose adultos y se recolectaron a las 0 hpf (horas posteriores a la fecundación) y se colocaron en la incubadora a 28'5 °C en placas de petri hasta las 48 hpf. Las líneas celulares fueron mantenidas en el incubador celular en medio completo hasta su uso.

Para realizar los ensayos de *xenograft*, las células se concentraron en un tubo *ependorf* a razón de 1 millón de células/condición y se resuspendieron en 10 µL de PBS con 2% de PVP40 (polivinilpirrolidona) (*Sigma*) para evitar la agregación celular. A continuación, las células fueron teñidas con el colorante lipofílico Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (*Invitrogen*)). Posteriormente, se anestesiaron embriones de pez cebra de 48 hpf con 0,003 % de triclaína (*Sigma*) y se les inyectaron las diferentes condiciones HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} (clon 1 y clon3). Para cada de los 3 ensayos se inyectaron 20 embriones de pez cebra por línea celular. La inyección de células se realizó utilizando agujas de borosilicato (1 mm D.E. x 0,75 mm D.I.; *World Precision Instruments*). Se inyectaron entre 100 y 200 células en la circulación de cada pez (conducto de Cuvier) utilizando un microinyector (Microinyector

eléctrico IM-31, *Narishige*) con una presión de salida de 15kPA y 20ms de tiempo de inyección por inyección. Después de la inyección, los embriones se mantuvieron a 34°C hasta 6 días post inyección (dpi) en placas petri de 30mL con SDTW (Salt Declorinate Tap Water).

Las imágenes de los embriones inyectados se realizaron utilizando el estereomicroscopio de fluorescencia *AZ-100 (Nikon)* a 1, 4 y 6 dpi para medir la proliferación de las células inyectadas en el tejido hematopoyético caudal (CHT) de los embriones de pez cebra en cada una de las condiciones ensayadas. Para realizar el análisis de las imágenes tomadas en los diferentes puntos de tiempo de los embriones se utilizó el *software Quantifish*. Este *software* procesador de imágenes realiza la medida de la intensidad de fluorescencia y el área de píxeles positivos, correspondientes a las células inyectadas, por encima de un umbral previamente definido. Teniendo en cuenta estos parámetros se obtiene la densidad integrada (producto de los píxeles positivos por la intensidad media de esos píxeles) que permite comparar diferentes tiempos entre imágenes y obtener un índice de proliferación de las células en la región del tejido hematopoyético caudal (CHT) de los embriones, donde las células normalmente metastatizan.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el *software* Graphpad (*GraphPad Prism*). Para comparar los datos se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de la razón entre las medias (*fold change*) y se tomó como valor 1 el *fold change* de la línea celular HG-3. La significancia estadística se fijó en $\alpha = 0.05$.

4.7. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA *IN VITRO*.

4.7.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib.

La viabilidad celular de las distintas líneas celulares en respuesta a los fármacos idelalisib (CAL-101, *Selleckchem*) e ibrutinib (PCI-32765, *Selleckchem*) se analizó mediante ensayo MTT a las 0-72 horas. Las concentraciones probadas para el ibrutinib fueron 0-0.5-1-2-4-8 μM . Las concentraciones probadas para el idelalisib fueron 0-0.1-0.5-1-2-4 μM . Para cada ensayo, 10.000 células por línea celular fueron sembradas en 100 μL de medio completo con el fármaco a la

concentración correspondiente, en formato placa de 96 pocillos. Se sembraron en cada ensayo 3 replicados de cada línea celular. Para ensayar la línea celular HG-3^{Ko-ARSD} se tomó el clon 11 (guía dirigida al exón 3) y para la línea celular HG-3^{Kd-ARSD} el clon 3 (guía dirigida a 181 NT del TSS). Se tomaron, además, como controles las líneas celulares HG-3-iCas9 y HG-3-dCas9-KRAB-sgRNA.

Como los fármacos se encontraban disueltos en DMSO, se incluyeron también controles con DMSO en la misma proporción para realizar las correcciones en las medidas de citotoxicidad.

Para comparar los datos de viabilidad obtenidos se empleó un análisis de varianzas (ANOVA) y se fijó la significancia estadística en $\alpha=0.05$.

4.7.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con células CAR-T.

4.7.2.1. Comprobación de la positividad y negatividad para CD19 de las líneas celulares HG-3^{Ko-ARSD}, HG-3^{Kd-ARSD} y HEK.

Previo al cocultivo con las células CAR-T (anti CD19), se comprobó la positividad de todas las líneas celulares para CD19 mediante tinción diferencial en citometría de flujo. Los anticuerpos empleados fueron *PE Mouse Anti-Human CD19 (BD Pharmingen)* y como control de isotipo *PE Mouse IgG1, κ Isotype Control (BD, Pharmingen)*. Del mismo modo, también se comprobó la negatividad en CD19 de la línea celular HEK293. El citómetro empleado fue *FACSCalibur (Becton Dickinson)* y el tratamiento de datos se realizó con el programa *FlowJo* (Figura 27).

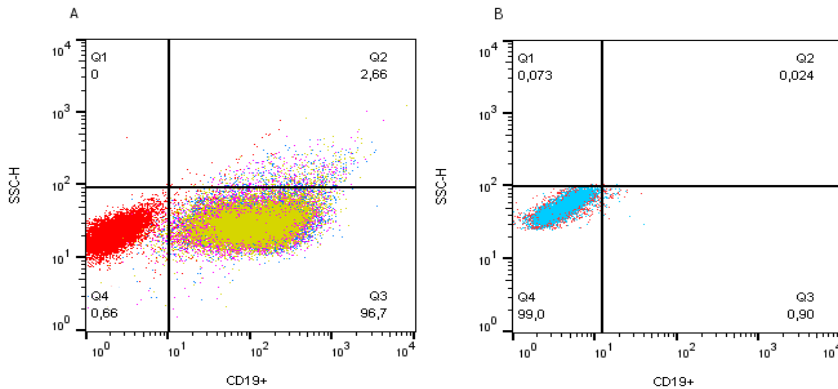


Figura 27: Positividad/negatividad en CD19 (PE) mediante citometría. A) Expresión de CD19 en las líneas HG-3 (azul), HG-3Kd-ARSDclon 3 (rosa) y HG-3Ko-ARSD clon 11 (amarillo), en rojo vemos la línea HG-3 sin tinción. B) Expresión de CD19 en la línea celular HEK293 (azul) frente a su control sin teñir (rojo).

4.7.2.2. Inserción del CAR anti CD19 en la línea celular Jurkat.

Para introducir el CAR anti CD19 (FMC63-41BB-3z) en la línea celular Jurkat se empleó el sistema lentiviral compuesto por los plásmidos pMD2.G y psPAX2 y como vector de transferencia el plásmido pSLCAR-CD19-BBz (obsequio de Scott McComb (Addgene)). Los plásmidos fueron preparados y las partículas virales fueron producidas y cuantificadas según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Las partículas virales fueron empleadas para infectar la línea celular Jurkat con MOI=10. Las células se dejaron en contacto con las partículas virales durante 48 horas en el incubador celular. La eficiencia de la infección fue determinada mediante la cuantificación de la expresión del gen reportero *GFP* (en %) empleando citometría de flujo después de 7 días de expansión celular con medio competo. El citómetro empleado fue *FACSCalibur* (Becton Dickinson) y el tratamiento de datos se realizó con el programa *FlowJo*.

4.7.2.3. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.

La activación específica de la línea celular generada CAR-T fue determinada cocultivando las células CAR-T (anti CD19) y Jurkat

(sin CAR) con las células HG-3 (CD19⁺) y células HEK (CD19⁻) a distinta ratio (célula efectora: célula diana).

La activación específica de las células CAR-T anti CD19 contra su diana fue definida mediante el cocultivo de las distintas células efectoras y diana (CAR-T- HG-3, CAR-T- HEK293, Jurkat- HG-3) a distintos ratios (1:0, 1:1, 1:10, 1:100) durante 24 horas en formato placa de 96 pocillos, para cada uno de los ensayos. Como indicador de la activación se eligió el marcador CD69. La expresión del marcador CD69 fue monitorizada mediante citometría de flujo, empleando el anticuerpo marcado con tinción *APC Mouse Anti-Human CD69 (BD Pharmingen)*. Como control negativo se utilizaron las células en monocultivo teñidas, sin teñir, así como teñidas con el control de isotipo *APC Mouse IgG1, κ Isotype Control (BD, Pharmingen)*. El citómetro empleado fue *FACSCalibur (Becton Dickinson)* y el tratamiento de datos se realizó con el programa *FlowJo*. El número de eventos por pocillo fue de al menos 10.000 eventos.

Para comparar la activación de las células CAR-T en el cocultivo CAR-T-HG-3 a distintos ratios se empleó el sistema de análisis de varianzas (ANOVA). Del mismo modo, fueron comparados los niveles de activación por ratio en los 3 cocultivos realizados (CAR-T- HG-3, CAR-T- HEK293, Jurkat- HG-3). En ambas comparativas, la significación estadística se fijó en $\alpha=0.05$.

4.7.2.4. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con células CAR-T.

La citotoxicidad de las células CAR-T anti CD19 generadas contra la línea celular HG-3 y las líneas HG-3^{Ko-ARSD} clon 11 (guía dirigida al exón 3) y HG-3^{Kd-ARSD} clon 3 (guía dirigida a 181NT del TSS) se determinó mediante el cocultivo de las mismas durante 72 horas en formato placa de 96 pocillos en 200 μ L de medio completo, para cada uno de los ensayos. Para el cocultivo en ratio 1:1 se tomaron 50.000 células CAR-T y 50.000 células diana de cada línea por pocillo. Para el cocultivo 5:1 se tomaron 100.000 células CAR-T y 20.000 células diana de cada línea por pocillo. Como controles se emplearon pocillos en cocultivo en las mismas condiciones pero sustituyendo las

células CAR-T por células Jurkat, de este modo, el número de células CD19⁺ viables recolectadas en estas condiciones control fueron establecidas como 100% de viabilidad.

La citotoxicidad se calculó a las 24-48-72 horas en el cocultivo a ratio 1:1 y a las 24-72 horas en el cocultivo a ratio 5:1.

Los anticuerpos marcados empleados fueron *PE Mouse Anti-Human CD19 (BD Pharmingen)* y *APC Mouse Anti-Human CD69 (BD Pharmingen)*. Como controles de isotipo se emplearon *PE Mouse IgG1, κ Isotype Control (BD, Pharmingen)*, *APC Mouse IgG1 y κ Isotype Control (BD, Pharmingen)*. Para la exclusión de células no viables se empleó el marcador *7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen)* El citómetro empleado fue *FACSCalibur (Becton Dickinson)*. El tratamiento de datos se realizó con el programa *FlowJo*. El número de eventos por pocillo fue de 10.000 eventos en el cocultivo a ratio 1:1 y de 50.000 eventos para el cocultivo a ratio 5:1. La estrategia de *gating* empleada es especificada en la Figura 28.

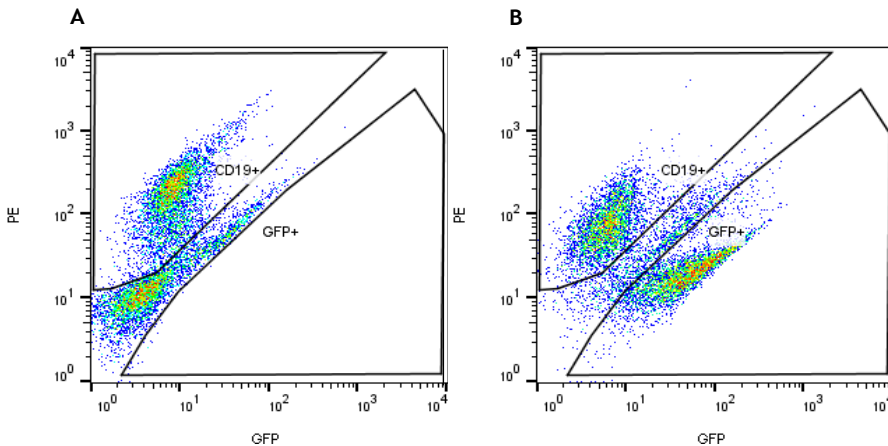


Figura 28: Estrategia de *gating* empleada en citometría de flujo para el análisis de las poblaciones celulares presentes en el cocultivo mediante tinción diferencial con anticuerpos. A) Estrategia de *gating* para los cocultivos en los que se emplearon la línea celular Jurkat y las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{Ko-ARSD}. B) Estrategia de *gating* para los cocultivos en los que se emplearon la línea celular CAR-T anti CD19 y las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{Ko-ARSD}.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 *KNOCK-OUT* Y *KNOCK-DOWN* PARA EL GEN *ARSD* MEDIANTE EL USO DE TECNOLOGÍA CRISPR.

5.1.1. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD* mediante CRISPR.

5.1.1.1. Inserción genética de los componentes del sistema CRISPR con vectores lentivirales.

Para generar la línea celular HG-3 que exprese de manera controlada la proteína Cas9 fue elegido el vector de transferencia lentiviral Lenti-iCas9-neo²²⁶. Este plásmido presenta como transgenes el gen de la proteína Cas9 (de *Streptococcus pyogenes*) y de la proteína reportera GFP, ambos bajo un promotor inducible con doxiciclina (además del gen de resistencia al antibiótico neomicina). Una vez infectadas las células HG-3 con las partículas lentivirales generadas en células HEK293 tal y como se detalla en Materiales y métodos, procedimos a seleccionarlas positivamente con geneticina.

Con el objetivo de conocer cuándo comienza el posible evento de edición genómica y cuándo se puede dar por finalizado, se procedió al estudio del promotor inducible por doxiciclina bajo el que se expresan la proteína Cas9 y su proteína reportera GFP. Para conseguirlo, las células generadas HG-3-iCas9 fueron expuestas a concentraciones crecientes de doxiciclina durante 24 horas y se cuantificó el número de células GFP positivas (%) presente en cada una de las condiciones mediante citometría de flujo. Como se detalla en la Figura 29-A, todas las condiciones en las que se añadió doxiciclina presentaron células GFP positivas tras 24 horas de inducción, también se observa cómo aumenta el número de células HG-3-iCas9 GFP positivas a medida que aumenta la concentración de doxiciclina en el medio de cultivo (y, por consiguiente, mayor es el número de células que expresan la proteína Cas9) hasta un máximo de 32 µg/mL. A partir de esta concentración, y debido a la alta mortalidad, no se alcanza el número de eventos

necesarios definido para el ensayo en ninguno de los replicados (10.000 eventos).

Seguidamente, se procedió al estudio de la cronología del promotor inducible, empleando la concentración de doxiciclina que supuso una mayor presencia de células HG-3-iCas9 GFP positivas y haciendo un seguimiento temporal del transgén. Según se muestra en la Figura 29-B, el número máximo de células HG-3-iCas9 GFP positivas es alcanzado 48 horas después del inicio de la inducción, momento a partir del cual la señal de la proteína reportera comienza a disminuir, siendo inexistente a las 264 horas (11 días). De este modo, el posible evento de edición genómica, dependiente de la presencia de la proteína Cas9, se delimitó en un tiempo mínimo de 264 horas después de la inducción con doxiciclina.

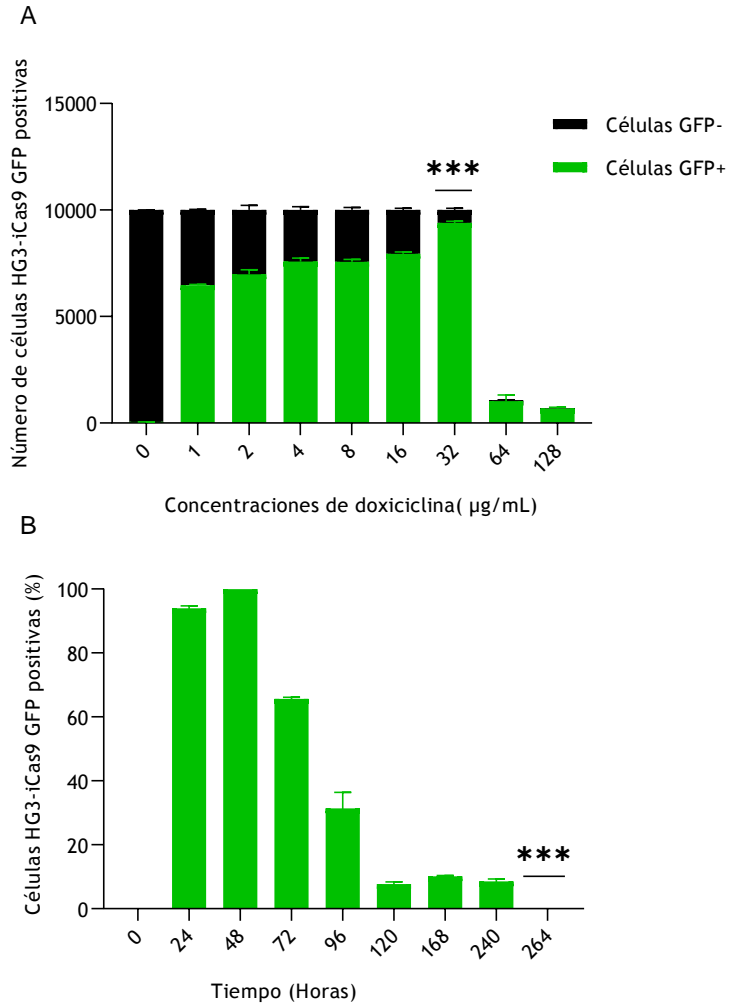


Figura 29: Estudio de la inducción del promotor de Cas9. A) Número de células HG-3-iCas9 GFP positivas en función de la concentración de doxiciclina. B) Células HG-3-iCas9 GFP positivas en función del tiempo tras la inducción (%). Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

La inserción del transgén con la proteína Cas9 en la línea celular a los tiempos y concentraciones submáximas (48h, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue también confirmada mediante *western blot* (Figura 30)

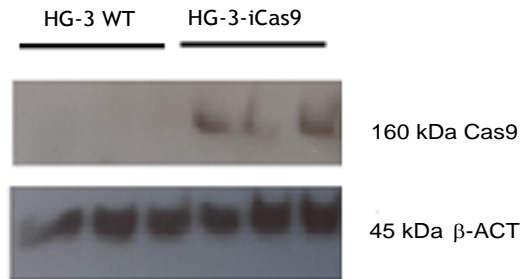


Figura 30: *Western blot* de la proteína Cas9 en la línea celular HG-3-iCas9 (inducida).

Para la generación de la línea celular HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD*, se eligieron dos guías (una dirigida al exón 3 y la otra al exón 5 del gen) (Figura 31) que se insertaron en el vector lentiviral LV04 que presenta, además, el gen de resistencia al antibiótico puromicina. Las células HG-3-iCas9 fueron infectadas con las partículas virales generadas con los vectores de transferencia portadores de las guías. A continuación, se procedió a la selección con el antibiótico puromicina.

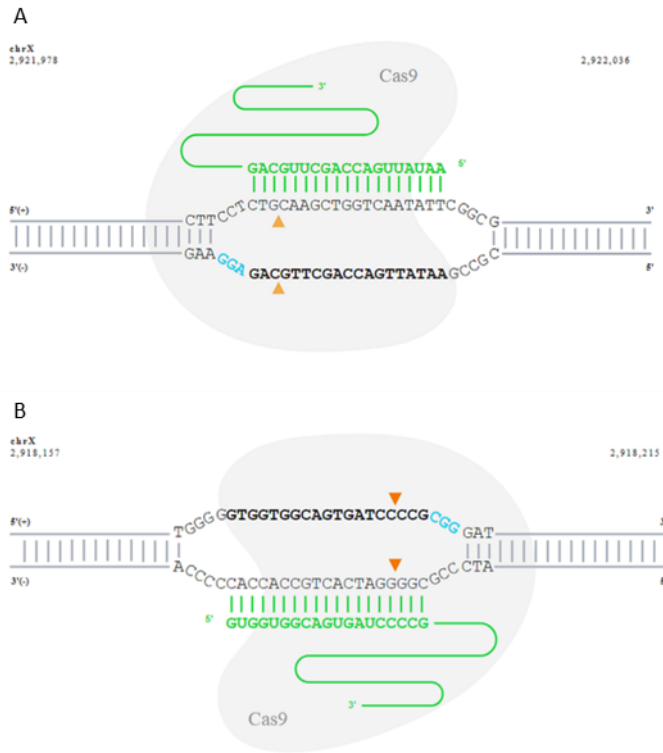


Figura 31: Guías para el *knock-out* del gen *ARSD*. A) Guía diseñada para el exón 3 del gen *ARSD*. B) Guía diseñada para el exón 5 del gen *ARSD*.

Finalizada la selección con antibiótico, procedimos a la inducción de la nucleasa Cas9 con doxiciclina y se expandió el cultivo durante 3 semanas para dar por concluidos los posibles eventos de edición genómica. Por tanto, esta manipulación genética para eliminar el gen *ARSD* en linfocitos B ha resultado en un conjunto de células editadas en los exones 3 o 5 con tecnología CRISPR. La secuenciación de ADN de dichos linfocitos B permitirá analizar la eficiencia de esta edición.

5.1.1.2. Análisis *Interference of CRISPR Edits* (ICE).

A continuación, se procedió a realizar el análisis ICE a partir de los datos de secuenciación de los *bulks* celulares presentes. El análisis de la línea celular HG-3 editada con la sgRNA para el exón 3

muestra las secuencias inferidas presentes en la población editada y sus proporciones relativas (Figura 32). Se observa que el porcentaje de indel es de un 60% y el *knock-out score* es de 58 (proporción de indels que indican un cambio de marco o tienen una longitud superior a 21 pares de bases). Para la línea celular editada con la sgRNA para el exón 5 el porcentaje de indel es del 38% y el *knock-out score* es de 38 (Figura 33).

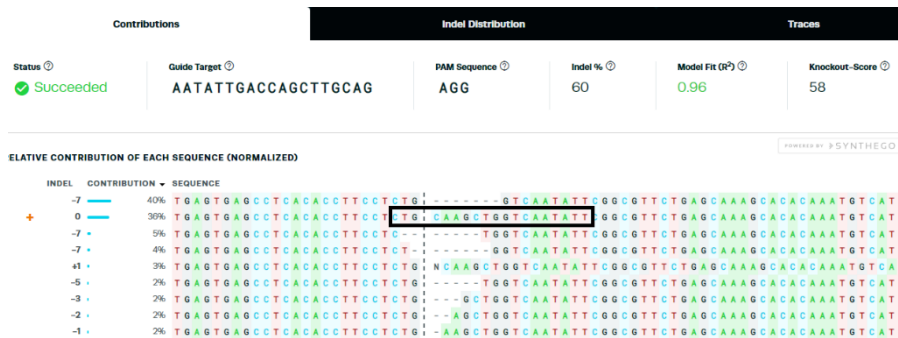


Figura 32: Análisis de contribuciones-sgRNA Exón 3 (ICE Analysis) proporcionado por la *webtool* Synthego para el *bulk* de la línea celular HG-3 editada.



Figura 33: Análisis de contribuciones -sgRNA Exón 5 (ICE Analysis) proporcionado por la *webtool* Synthego para el *bulk* de la línea celular HG-3 editada.

El diagrama de Indel muestra la distribución inferida de indels en toda la población editada. Para el exón 3 (Figura 34), se observa resaltada la indel que supone una eliminación de 7 nucleótidos y que está presente en un 50% de los genomas. Para el exón 5 (Figura 35), se observa

resaltada la indel que supone una eliminación de 1 nucleótido y que está presente en un 21% de los genomas.

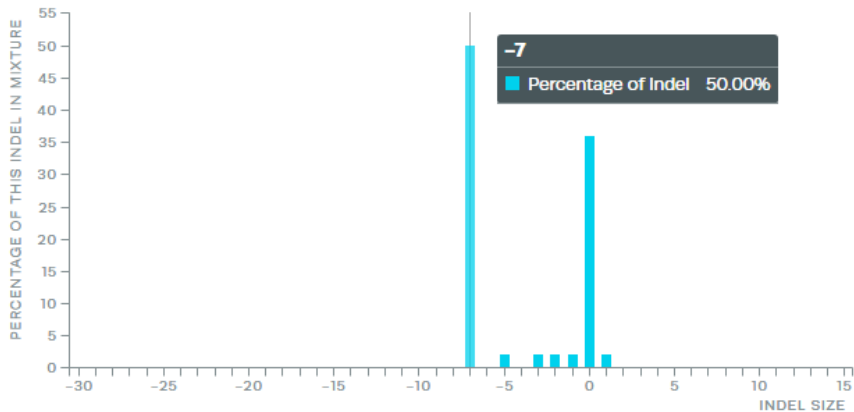


Figura 34: Distribución de indels en función de su tamaño-sgRNA Exón 3 (ICE Analysis) proporcionado por la webtool Synthego para el bulk de la línea celular HG-3 editada.

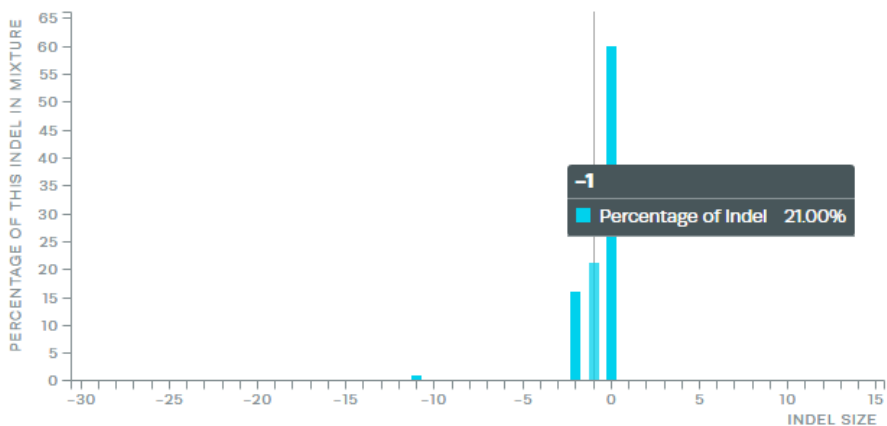


Figura 35: Distribución de indels en función de su tamaño-sgRNA Exón 5 (ICE Analysis) proporcionado por la webtool Synthego para el bulk de la línea celular HG-3 editada.

En el gráfico de discordancia (Figura 36 y 37) se detalla el nivel de alineación por base entre el tipo salvaje (control *wild type*) y la muestra editada en la ventana de inferencia (la región alrededor del sitio de corte). Es decir, muestra la cantidad promedio de señal que no está de

acuerdo con la secuencia de referencia derivada del archivo *control trace*. En ambos casos, tanto para el exón 3 como para el exón 5, la línea verde y la línea naranja del gráfico están próximas antes del sitio de corte (suponiendo una baja discordancia entre la secuencia control y la editada) pero están separadas después del sitio de corte (suponiendo una alta discordancia entre la secuencia control y la editada).

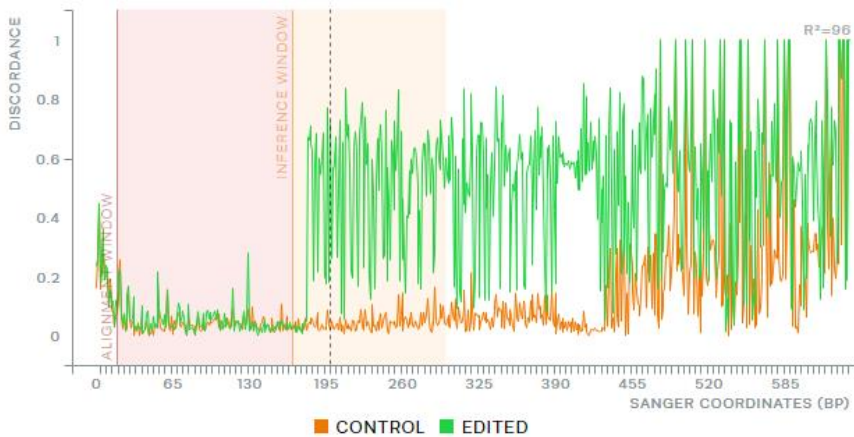


Figura 36: Gráfico de discordancia-sgRNA Exón 3 (ICE Analysis) proporcionado por la *webtool* Synthego para el *bulk* de la línea celular HG-3 editada.



Figura 37: Gráfico de discordancia-sgRNA Exón 5 (ICE Analysis) proporcionado por la *webtool* Synthego para el *bulk* de la línea celular HG-3 editada.

Estos datos indican que hay una elevada probabilidad de encontrar en los *bulks* celulares clones editados con éxito.

5.1.1.3. Validación de clones *knock out* en los que la expresión del gen *ARSD* ha sido eliminada.

A partir de los *bulks* celulares se procedió al crecimiento de clones desde célula única. Una vez crecidos los clones, la región diana en cada línea celular fue secuenciada y comparada. Se seleccionaron los clones que presentaron indels en la región diana.

Para los clones crecidos a partir del *bulk* celular editado con la guía dirigida al exón 3, se seleccionaron los clones 11 y 12. Como se detalla en la Figura 38 (superior), ambos clones presentaron una delección de 7 nucleótidos en la región diana. Para los clones crecidos a partir del *bulk* celular editado con la guía dirigida al exón 5, se seleccionaron los clones 2,7,8 y 10. Los clones presentaron indels o falta de coincidencia en la región diana (Figura 38- inferior).

La validación de los clones candidatos para el *knock out* del gen *ARSD* se realizó mediante PCR cuantitativa. En la Figura 39 se observa la expresión relativa del gen *ARSD* para los clones 11 y 12 (región diana en el exón 3 del gen *ARSD*), no detectándose expresión en ninguno de los dos clones seleccionados. Para los clones editados con la sgRNA dirigida al exón 5 (clones 10, 8, 7, y 2) no se detectó expresión del gen *ARSD* en los clones 10 y 2. Para los clones 7 y 8 se detecta expresión, aunque resulta en una reducción de expresión significativa (95% y 99% respectivamente).

Contig1

HG31-ARS1-ARS2-ESF_A01	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
HG31-ARS9-ARS10-ESF_B01	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
ARS1-CL0M11-ESF_D03	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
ARS1-CL0M12-ESF_E03	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
<< HG3-WT-ARS1-ARS2-ESF_A02	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
<< HG31-ARS9-ARS10-ESF_B02	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
<< ARS1-CL0M11-ESF_D04	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC
<< ARS1-CL0M12-ESF_E04	ATGCAATTTGTTGTTTGTCTCAGAAACGCGGAAATTTGACAGGTTGACAGGAAAGGTTGAGGCTCACTCAGCACTTGGGGC

Contig1

<< HG3-WT-ARS1-ARS2-ESF_F07	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
<< HG3-1-ARS9-ARS10-ESF_C07	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
<< ARS1-CL0M2-ESF_G07	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
<< ARS1-CL0M7-ESF_H09	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
<< ARS1-CL0M9-ESF_I09	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
<< ARS1-CL0M10-ESF_D09	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
HG3-WT-ARS1-ARS2-ESF_F08	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
HG3-1-ARS9-ARS10-ESF_C08	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
ARS1-CL0M2-ESF_G08	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
ARS1-CL0M7-ESF_H10	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
ARS1-CL0M9-ESF_I10	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT
ARS1-CL0M10-ESF_D10	CCCTAGAAATGTCAAATCCCTGTTTACGGGGTGGTGGCAGTGCATCCCCCGGGGATGCAATTCACACCTTGGTCCCATT

Figura 38: Selección de clones mediante secuenciación Sanger. Superior: alineamiento de la línea celular HG-3, Clon 11 y Clon 12 para el exón 3 del gen *ARSD*. Inferior: Alineamiento de las líneas celulares HG-3, Clon 2, Clon 7, Clon 8 y Clon 10 para el exón 5 del gen *ARSD*.

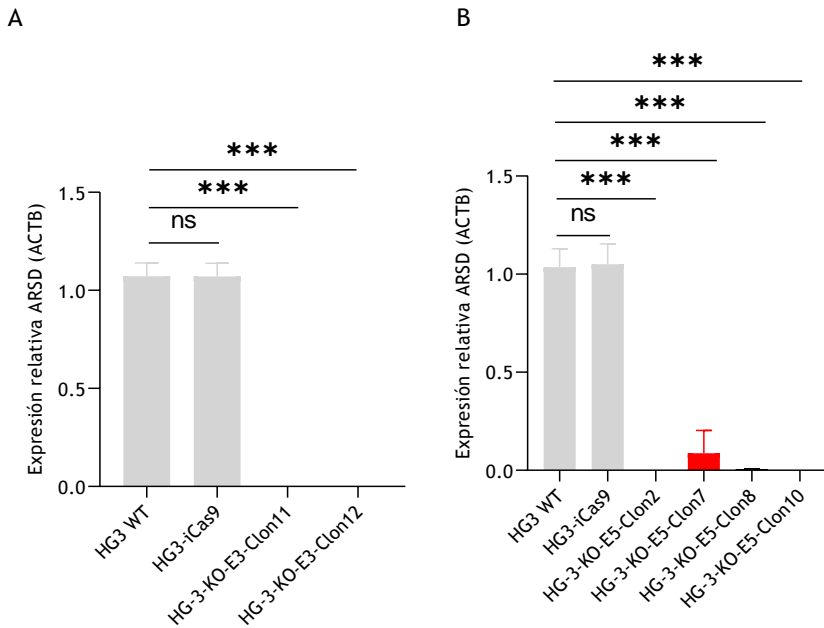


Figura 39: Expresión de ARSD en clones knock-out. A) Expresión relativa del gen ARSD en los clones 11 y 12 editados con la guía dirigida al exón 3. B) Expresión relativa del gen ARSD en los clones 10, 8, 7, y 2 editados con la guía dirigida al exón 5. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.1.1.4. Estudio de *off-targets*.

Para el estudio de los posibles *off-targets* se buscaron las regiones genómicas que pudieran ser diana de las guías diseñadas asumiendo la variación de 0, 1, 2 y 3 nucleótidos con respecto a la región diana. En la Tabla 25 se detalla el listado de los posibles *off-targets* para las guías empleadas. Las regiones de los genes seleccionados se secuenciaron y se alinearon con la línea celular sin editar, seleccionándose los clones que no presentaron ningún tipo de modificación en las regiones estudiadas. El clon 2 (guía exón 5) fue

descartado por presentar cambios en la secuencia para el gen *MRPL27*. (Figura 40 y 41).

Tabla 25: sgRNAs diseñadas para el *knock-out* del gen *ARSD* y posibles *off-targets*.

Guía	Región diana gen <i>ARSD</i>	<i>Off-target</i>	Gen
sgRNAE3	AATATTGACCAGCTTGACG	AATATTGACC GC CTTGACG	<i>ARSE</i>
		AATATTGAT CAGCTT CAT	<i>FAM172A</i>
		AATATT A CCAT A TTGCAG	<i>ENPP2</i>
		AAT G T A GACTAGCTTGACG	<i>MRPL11</i>
sgRNAE5	GTGGTGGCAGTGATCCCCG	GTGGT C GCAG C GA A CCCCG	<i>ZNF236</i>
		G AGGT A CA C TGATCCCCG	<i>MRPL27</i>
		GGTGGTGGCAGTGAT GG CAG	<i>IRAK2</i>

Figura 40: Secuencias Sanger de posibles *off-targets*-sgRNA Exón 3. Líneas celulares HG-3 y clones 11 y 12.

Figura 41: Secuencias Sanger de posibles *off-targets*-sgRNA Exón 5. Líneas celulares HG-3 y clones 2 y 10.

5.1.2. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-down* para el gen *ARSD* mediante CRISPR.

5.1.2.1. Inserción genética de los componentes del sistema CRISPR con vectores lentivirales.

Para generar la línea celular HG-3 que exprese de manera constitutiva la proteína dCas9 fue elegido el vector de transferencia lentiviral pLX_311-KRAB-dCas9²²⁷. Este plásmido presenta como transgenes el gen de la proteína dCas9 (de *Streptococcus pyogenes*) fusionada al represor transcripcional KRAB, ambos bajo el mismo promotor (además del gen de resistencia al antibiótico blasticidina). Una vez infectadas las células HG-3 con las partículas lentivirales generadas en células HEK293 tal y como se detalla en Materiales y métodos, procedimos a seleccionarlas positivamente según los datos de la curva de muerte para el antibiótico blasticidina.

La correcta inserción y expresión del transgén se confirmó mediante *western blot* (Figura 42)

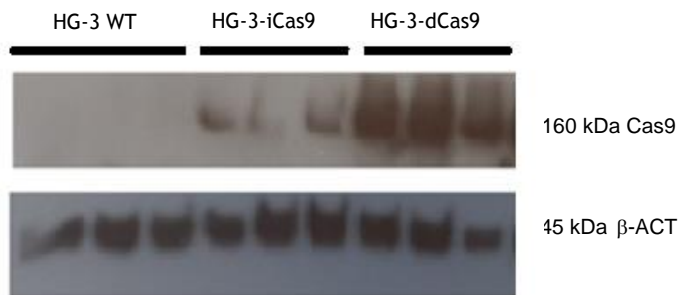


Figura 42: *Western blot* de la proteína dCas9 en la línea celular HG-3-dCas9.

Para la generación de la línea celular HG3-dCas9 *knock-down* para el gen *ARSD* (línea celular HG3-dCas9^{Kd-ARSD}) se eligieron dos guías. Una fue dirigida al punto 41 nucleótidos del extremo 3' del TSS calculado y la otra fue dirigida 182 nucleótidos del extremo 3' del mismo TSS (Figura 43). Las guías fueron clonadas en el vector de transferencia Lenti-sgRNA-Neo²²⁸. Este plásmido clonado presenta como transgenes cada una de las sgRNA seleccionadas (además del gen de resistencia al antibiótico geneticina). Una vez infectadas las células HG3-dCas9-

KRAB con las partículas lentivirales generadas, procedimos a seleccionarlas positivamente según los datos de la curva de muerte para el antibiótico geneticina.

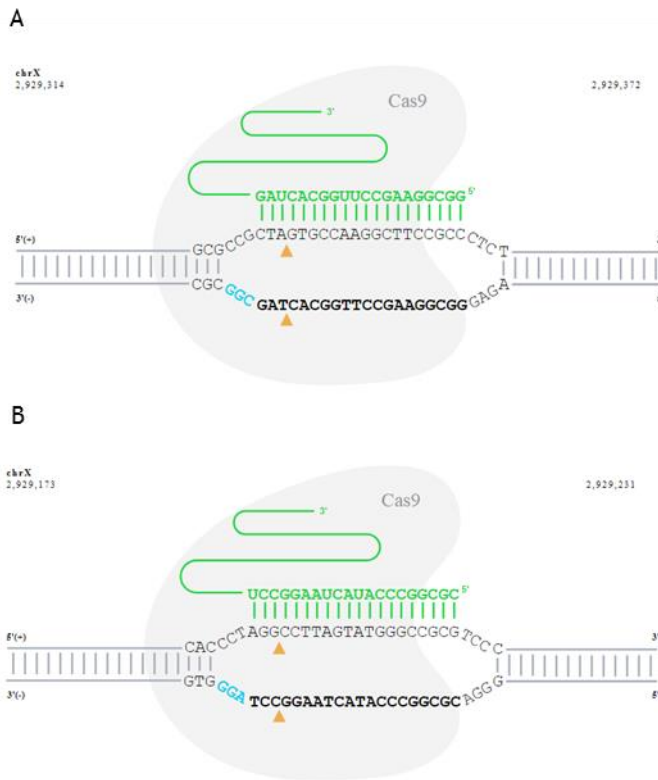


Figura 43: Guías para el *knock-down* del gen *ARSD*. A) Guía diseñada a 41 nucleótidos del TSS del gen *ARSD*. B) Guía diseñada a 182 nucleótidos del TSS del gen *ARSD*.

5.1.2.2. Prueba de expresión del gen *ARSD* en el *bulk* celular

Finalizada la selección con antibiótico, procedimos a realizar el análisis de expresión del gen *ARSD* en el *bulk* celular presente mediante PCR cuantitativa. Como se detalla en la Figura 44, se alcanzó, con ambas guías una reducción de la expresión del $72 \pm 15\%$ de media.

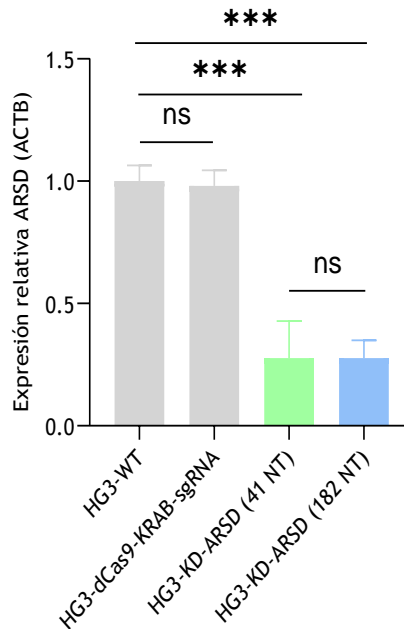


Figura 44: Expresión del gen *ARSD* en bulks celulares *knock-down*. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3): * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.1.2.3. Validación de la expresión del gen *ARSD* en clones *knock-down*.

A partir del *bulk* celular se procedió al crecimiento de clones desde célula única. Una vez crecidos los clones, se procedió a validarlos empleando de nuevo la PCR cuantitativa. Los 6 clones analizados presentaron una reducción significativa en la expresión del gen *ARSD*. Los clones modificados con la guía dirigida a 41NT del TSS presentaron una reducción para los clones 1, 2 y 3 del 74%, 61% y 65% respectivamente. Los clones 1, 2 y 3 modificados con la guía dirigida a 182NT presentaron una reducción del 82%, 79% y 74% respectivamente. (Figura 45).

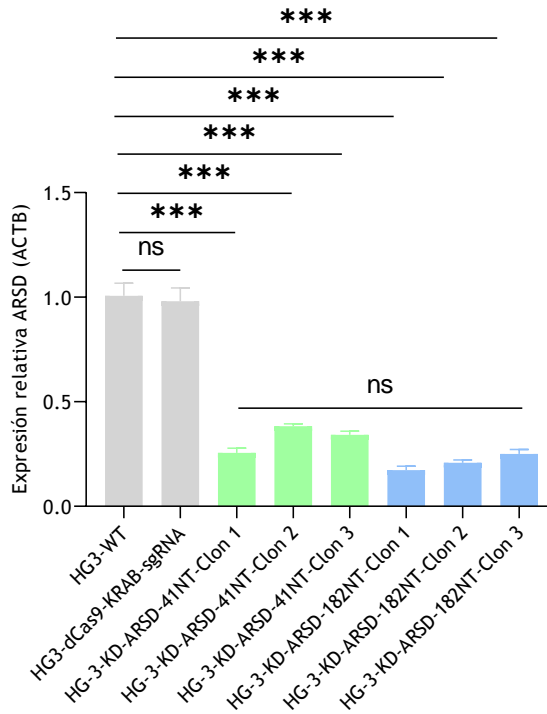


Figura 45: Expresión del gen *ARSD* en clones *knock-down*. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.1.2.4. Estudio de *off-targets*.

Para el estudio de los *off-targets* se buscaron las regiones genómicas que pudieran ser diana de las guías diseñadas permitiendo una discordancia con respecto de la región diana en 4 nucleótidos. En la Tabla 26 se detalla un listado de los posibles *off-targets* para las guías empleadas.

Tabla 26: sgRNAs diseñadas para el *knock-down* del gen *ARSD* y posibles *off-targets*.

Guía	Región diana gen <i>ARSD</i>	<i>Off-target</i>	Gen
sgRNA 41 NT-TSS	GGCGGAAGCCTTGGCACTAG	GGCCGCAGCCCTGGCACTGG	TTC24
		GCTGGAAGCCTTGTCACTGG	GOLGA3
sgRNA 182 NT-TSS	CGCGGCCATACTAAGGCCT	CGCGGCCTACAGGAAGGCCT	AUH
		CACGGCCGATCCAAGGCCT	RIOK1

La posible modificación en la expresión de los genes se estudió mediante PCR cuantitativa, no encontrándose en ninguno de los clones modificación de la expresión significativa (Figura 46).

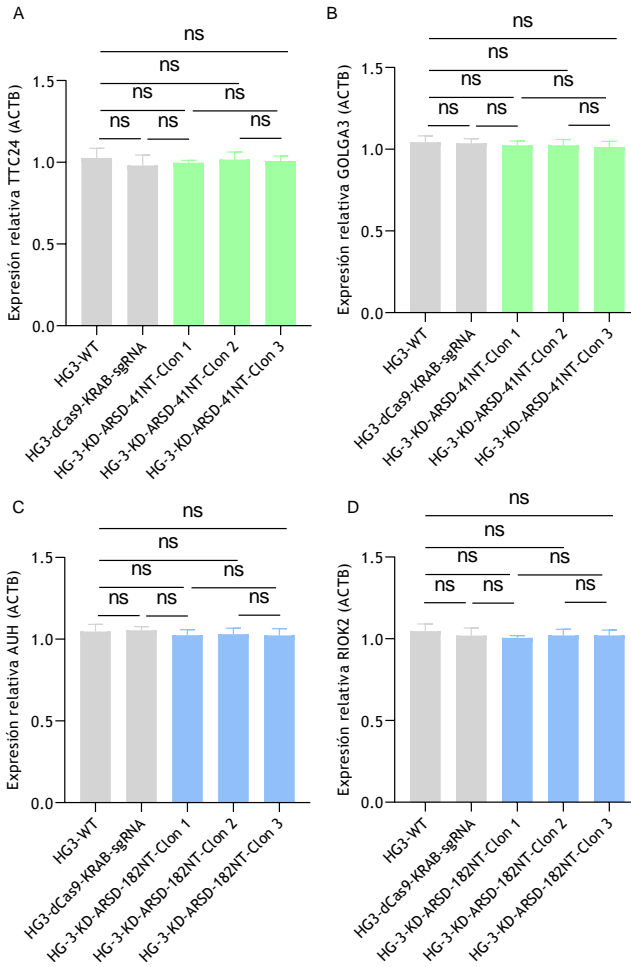


Figura 46: Expresión de los genes posibles *off-targets* de las guías *knock-down* diseñadas en los clones *knock-down*. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, **, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *ARSD* EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

5.2.1. Estudio de proliferación celular *in vitro*.

5.2.1.1. Estudio de la proliferación celular *in vitro* mediante conteo celular.

El estudio de la proliferación celular fue llevado a cabo mediante conteo celular a lo largo de 6 días, empleando el contador automático LunaII. Como se detalla en la Figura 47-A, las líneas celulares *knock-out* clones 10 y 11 no presentaron diferencias significativas en el conteo celular tras 6 días de cultivo respecto a la línea celular HG-3. Como se observa en la Figura 47-B, las líneas celulares *knock-down* clones 1 (guía 41NT) y 3 (guía 182NT) no presentaron diferencias significativas en el conteo celular tras 3 días de cultivo, en cambio presentaron diferencias significativas tras 6 días de cultivo.

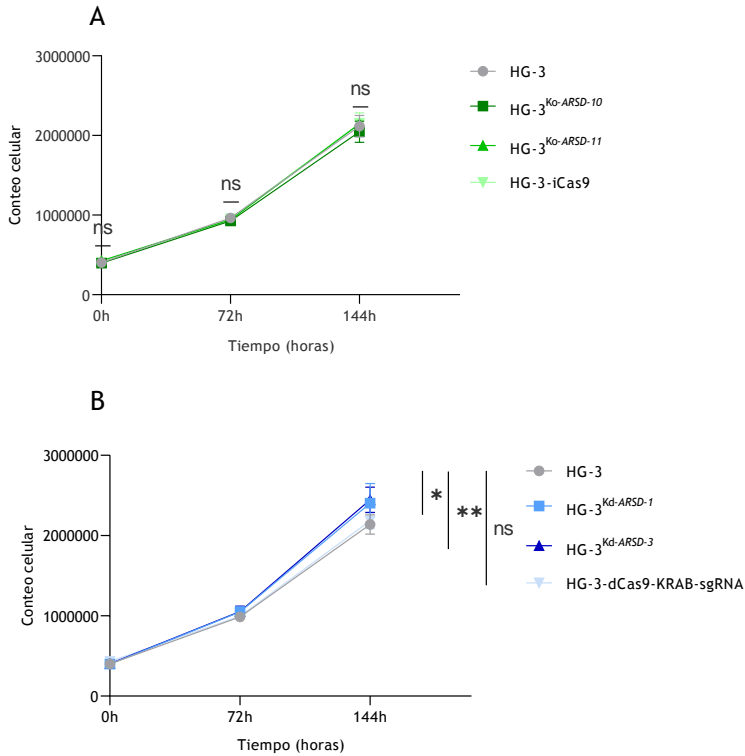


Figura 47: Efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en la proliferación celular mediante conteo celular. A) Conteo celular de las líneas celulares HG-3 y HG-3^{Ko-ARSD} clones 10 y 11 a 0-72-144 horas. B) Conteo celular de las líneas celulares HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} clones 1 (41NT) y 3 (182NT) a 0-72-144 horas. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** , ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.2.1.2. Estudio de la proliferación celular *in vitro* mediante ensayos de viabilidad celular.

La variación en la proliferación celular entre las distintas líneas celulares fue también medida mediante el cálculo del *fold change* de la viabilidad celular a lo largo de 3 y 6 días de cultivo respecto de la línea HG-3 (medidas a 0-72-144 horas), a través de medición indirecta de la viabilidad celular mediante ensayo con MTT.

Como se detalla en la Figura 48-A, las líneas celulares *knock-out* no presentaron diferencias significativas en el *fold change* de 0-72 horas ni en el de 0-144 horas. Como se observa en la Figura 48-B, las líneas celulares *knock-down* sí presentaron diferencias significativas en el *fold change* tanto de 0-72 horas como de 0-144 horas. Estas diferencias supusieron un incremento en el *fold change* de 0-72 horas del 3% para los clones clones 1 y 3; y de un *fold change* del 8% para el clon 1 y del 13% para el clon 3 de 0-144 horas.

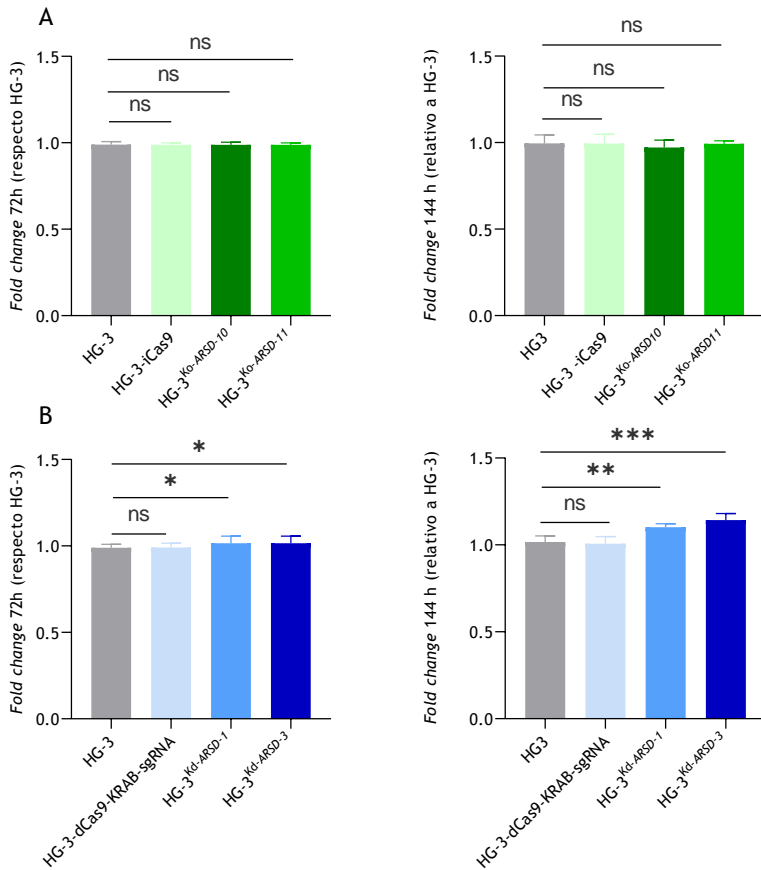


Figura 48: Efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en la proliferación celular mediante ensayo MTT. A) *Fold change* de las líneas celulares HG-3^{Ko-ARSD} clones 10 y 11 de 0-72 y 0-144 horas, respecto de HG-3. B) *Fold change* de las líneas celulares HG-3^{Ko-ARSD} clones 1(41NT) y 3 (182NT) de 0-72 y 0-144 horas, respecto de HG-3. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, **, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.2.2. Estudio de proliferación celular *in vivo*.

El estudio de la proliferación celular *in vivo* fue realizado mediante *xenograft* de las distintas líneas celulares en el modelo de experimentación animal pez cebra (*Danio rerio*). Este ensayo se llevó a cabo mediante colaboración con los doctores Laura Sánchez Picón y Pablo Cabezas Sáinz.

Los ensayos realizados fueron llevados a cabo conforme las condiciones de la autorización recibida (Anexo). Las líneas celulares seleccionadas para llevar a cabo el ensayo fueron HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} (clones 1 (guía 41NT) y 3 (guía 182NT)) En el día 0, los embriones de pez cebra de 48 hpf (horas después de la fecundación) fueron microinyectados con las líneas celulares HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} (clones 1 y 3) (teñidas con fluorescencia) en el Conducto de Cuvier. En los 1-4-6 dpi (días después de la inyección), se tomaron imágenes del tejido hematopoyético caudal con un estereomicroscopio de fluorescencia (Figura 49 y 50). Las imágenes realizadas, fueron analizadas con el *software* procesador de imágenes *Quantifish*. Este *software* realiza la integración de la medida de intensidad de fluorescencia y el área de píxeles positivos, correspondientes a las células inyectadas.

Los resultados obtenidos de la integración de los datos de las imágenes fueron tratados para calcular el *fold change* proliferativo de 0 a 4 y de 0 a 6 dpi relativos a la línea HG-3. Como se detalla en la Figura 51 los resultados obtenidos indican que la línea celular HG-3^{Kd-ARSD} clon 3 presenta un aumento significativo en el *fold change* de 0 a 4dpi con respecto a la línea HG-3, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el *fold change* de 0 a 6dpi entre las líneas celulares. Para el clon 1, no se encuentran diferencias significativas en el *fold change* ni a 4 ni a 6 dpi con respecto a HG-3.

4 dpi

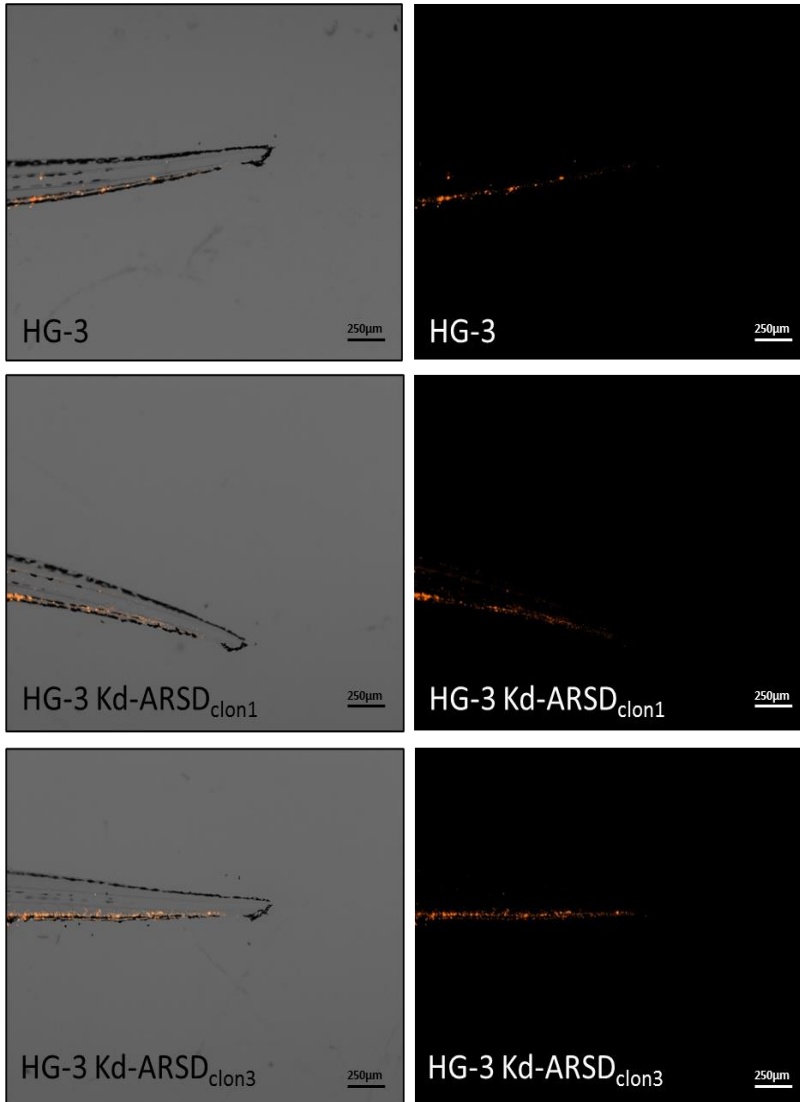


Figura 49: Embriones de pez cebra xenoinjertados con las células HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} clones 1 y 3 a 4 dpi. Las imágenes se muestran en escala de grises combinadas con imágenes fluorescentes de las células injertadas. El canal de fluorescencia sólo se agrega a cada imagen para una mejor visualización de las celdas y la distribución. (Barra de escala = 250µm).

6 dpi

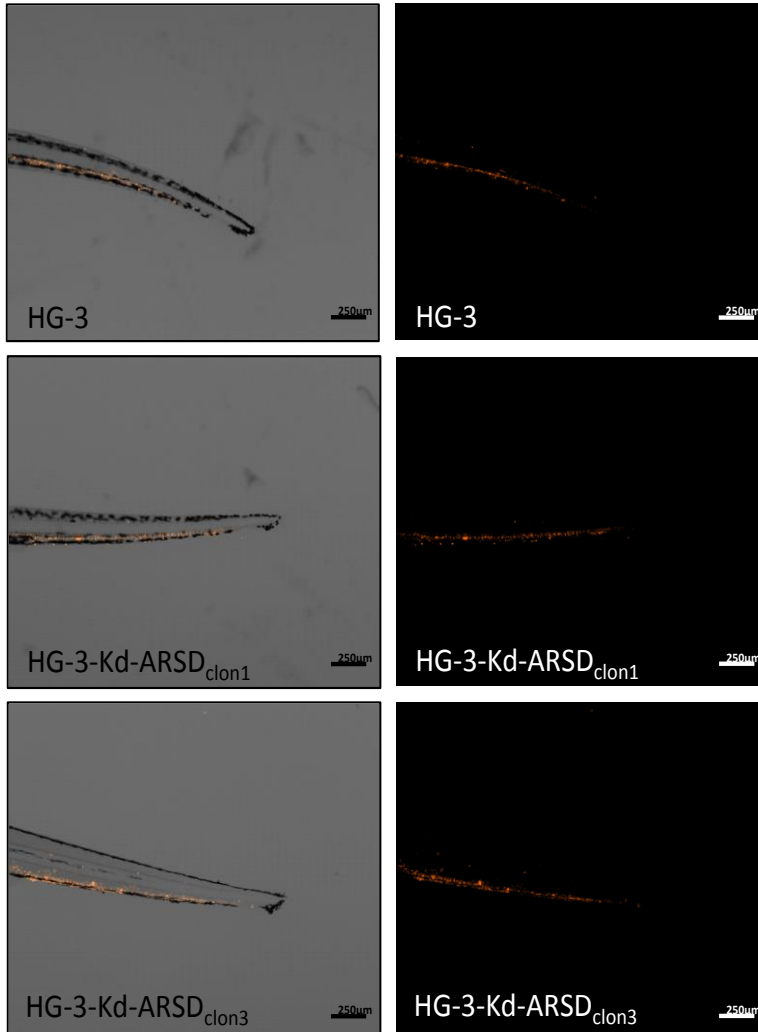


Figura 50: Embriones de pez cebra xenoinjertados con las células HG-3 y HG-3^{Kd-ARSD} clones 1 y 3 a 6 dpi. Las imágenes se muestran en escala de grises combinadas con imágenes fluorescentes de las células injectadas. El canal de fluorescencia sólo se agrega a cada imagen para una mejor visualización de las celdas y la distribución. (Barra de escala = 250µm).

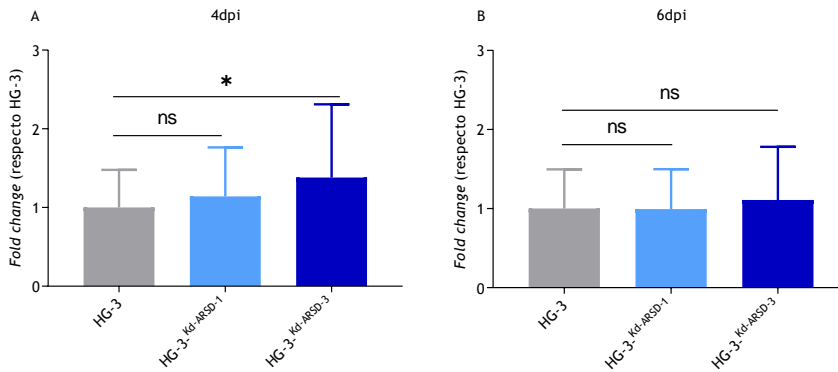


Figura 51: Efecto de la infraexpresión del gen ARSD en el *fold change* proliferativo mediante ensayo *xenograft* en pez cebra. A) *Fold change* proliferativo de los clones *knock-down* de 0-4 dpi, respecto de HG-3. B) *Fold change* de 0-6 dpi, respecto de HG-3. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.3. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA *IN VITRO*.

5.3.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen ARSD en la viabilidad celular en respuesta al ibrutinib e idelalisib.

Para determinar el posible efecto de la expresión diferencial del gen ARSD en la respuesta al ibrutinib e idelalisib, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con MTT tras el tratamiento de las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} (clon3) y HG-3^{Ko-ARSD} (clon 11) durante 72 horas con los fármacos a distintas concentraciones.

Para el ibrutinib se emplearon las concentraciones 0-0.5-1-2-4-8 μ M. Como se detalla en la Figura 52-A, tras 72 horas de tratamiento, todas las líneas celulares vieron disminuida su viabilidad celular para todas las concentraciones probadas de ibrutinib. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre ninguna de las líneas celulares, para ninguna de las concentraciones de ibrutinib probadas tras 72 horas de tratamiento.

Para el idelalisib se emplearon las concentraciones 0-0.1-0.5-1-2-4 μ M. Como se observa en la Figura 52-B, todas las líneas celulares

vieron disminuida su viabilidad celular en todas las concentraciones probadas de idelalisib tras 72 horas de tratamiento. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre ninguna de las líneas celulares empleadas, para ninguna de las concentraciones de idelalisib tras 72 horas de tratamiento.

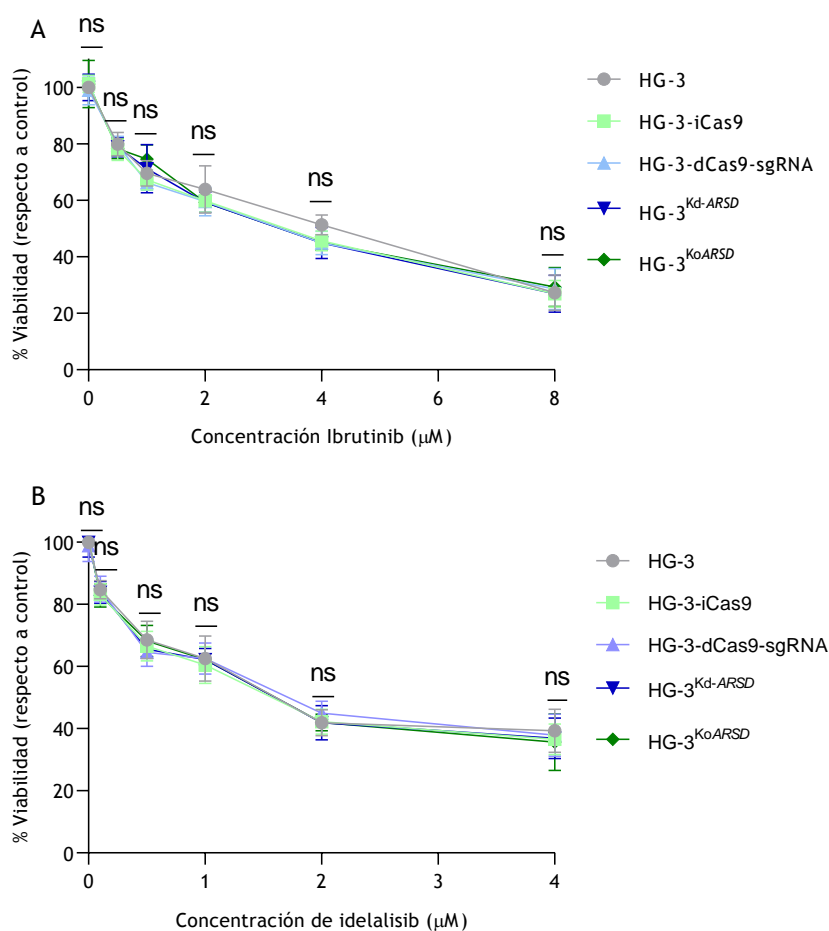


Figura 52: Efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib. Viabilidad celular de las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{Ko-ARSD} (además de los controles HG-3-dCas9-sgRNA y Hg-3-iCas9) tras 72 horas de tratamiento con ibrutinib (A) o con idelalisib (B) a distintas concentraciones. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos

independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

5.3.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con células CAR-T.

Para conseguir este objetivo, se generó la línea celular CAR anti CD19, a partir de la línea celular Jurkat, y se realizaron cocultivos a distinta ratio en los que se calculó la citotoxicidad ejercida por las células CAR sobre las distintas líneas celulares.

5.3.2.1. Generación de la línea celular CAR-T.

5.3.2.1.1. Inserción del CAR anti CD19 en la línea celular Jurkat.

La línea celular CAR anti CD19 fue generada a partir de células Jurkat a las que se les incluyó el CAR anti CD19 (*FMC63-41BB-3z*) empleando el vector de transferencia lentiviral pSLCAR-CD19-BBz¹⁷⁵. El gen reportero *GFP* permitió calcular el tanto por ciento de células CAR-T presente en las células Jurkat infectadas (de media 81%) (Figura 53 y 54).

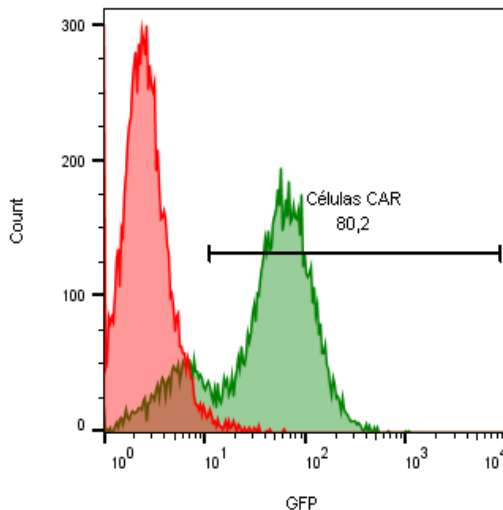


Figura 53: Expresión de GFP de la línea celular Jurkat con el CAR anti CD19-GFP.

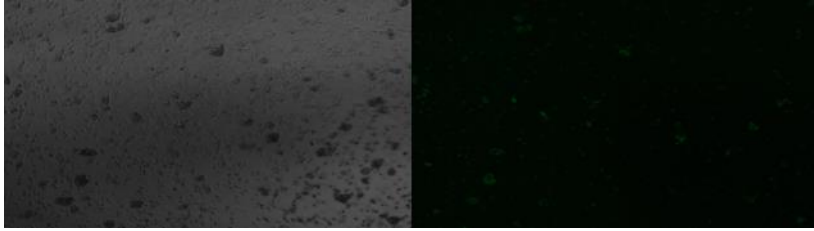


Figura 54: Imagen de la expresión de GFP de la línea celular CAR anti CD19-GFP.

5.3.2.1.2. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.

La activación específica de las células CAR-T anti CD19 generadas frente a su antígeno CD19, así como la ratio célula efectora-célula diana que supone mayor activación, se determinó realizando ensayos en los que las líneas celulares CAR-T y Jurkat fueron cocultivadas a distintas ratios con células CD19⁺ y CD19⁻, empleando como marcador de la activación CD69. Como célula diana CD19⁺ se empleó la línea celular HG-3 y como célula CD19⁻ se empleó la línea celular HEK293. Como se detalla en la Figura 55-A, las células Jurkat (color verde) presentaron positividad basal en la expresión de CD69, no aumentando la intensidad de expresión del marcador de activación en ninguno de los cocultivos con células HG-3. Sin embargo, las células con el CAR inserto (color naranja), si muestran un incremento en la activación de CD69 conforme vamos aumentando el número de células HG-3 en el cocultivo, hasta llegar a la ratio 1:1, en donde se observa una elevada activación en un 84% de media para las células CAR. En la Figura 55-B, la activación específica de las células CAR es comparada mediante el cocultivo con células HG-3 (naranja) y células HEK293 (azul), no se observan incrementos en la activación de las células CAR anti CD19 en ninguno de los cocultivos con células HEK293.

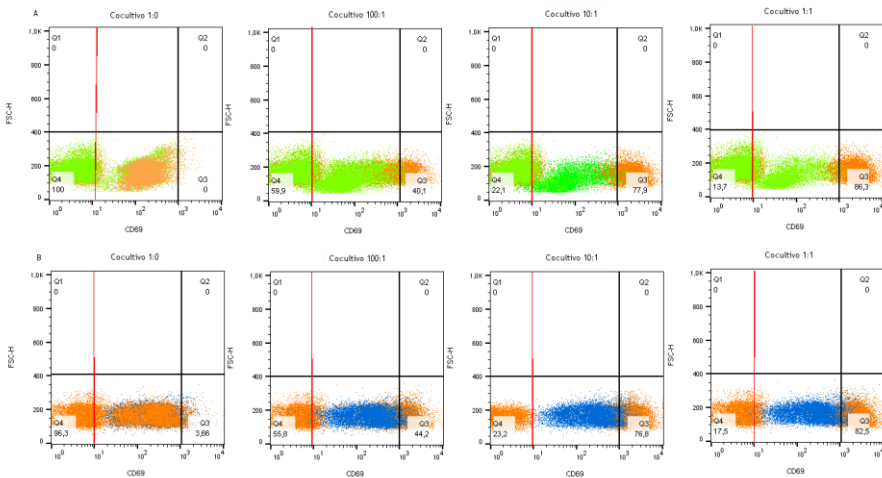


Figura 55: Activación específica de las células CAR anti CD19. A) Activación de las células CAR (naranja) y Jurkat (verde) en cocultivo con células HG-3 a distintas ratios, mediante el uso del marcador CD69. B) Activación de las células CAR en cocultivo con células HG-3 (naranja) y HEK293 (azul) a distintas ratios, mediante el uso del marcador CD69

Como se muestra en la Figura 56, la activación de las células CAR-T, medida como la media en la intensidad de expresión del marcador de activación CD69, aumenta de manera significativa conforme igualamos la cantidad de células CAR a las CD19⁺, alcanzando su valor máximo en la ratio 1:1. Sin embargo, la expresión de CD69 se mantiene en niveles de activación basales constantes cuando el cocultivo es llevado a cabo entre las células Jurkat-HG-3 y CAR-T-HEK.

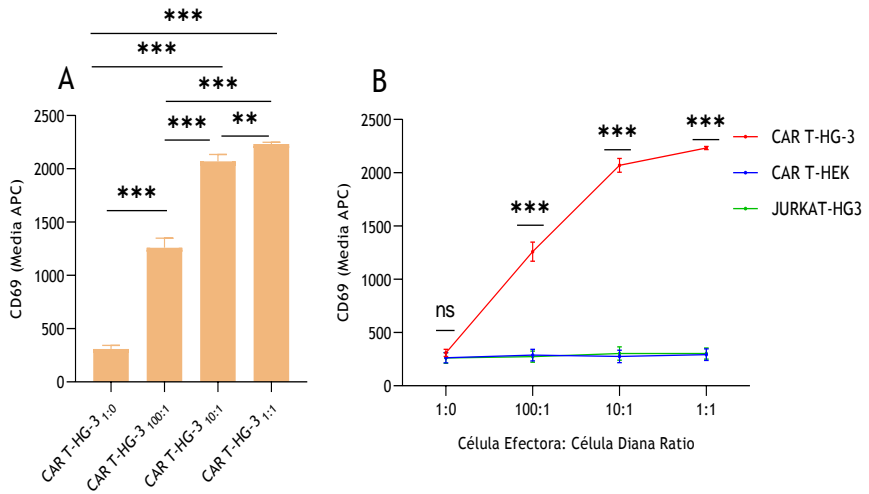


Figura 56: Medidas de intensidad de expresión en CD69 de las células CAR-T. A) Medidas de la intensidad de expresión de CD69 en el cocultivo CAR-T-HG-3 a distintas ratios. B) Medidas de la intensidad de expresión de CD69 en los 3 cocultivos a las ratios probadas. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: \times significancia < 0.05, $\times\times$ significancia < 0.01, $\times\times\times$ significancia < 0.001.

5.3.2.2. Cocultivo ratio 1:1.

En el primer cocultivo ensayado se empleó la ratio 1:1 (célula efectora: célula diana). La citotoxicidad de las células CAR-T sobre las líneas celulares diana (HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} (clon 3) y HG-3^{Ko-ARSD} (clon 11)) fue calculada tras 24, 48 y 72 horas de cocultivo, con respecto de su control.

Como se detalla en la Figura 57, la citotoxicidad de las células CAR-T sobre las distintas líneas celulares diana disminuye a medida que aumentamos el tiempo de cocultivo, alcanzando valores próximos a cero o negativos tras 72 horas de cocultivo. La citotoxicidad máxima se alcanzó a las 24 horas, en donde la citotoxicidad media fue del 30%. No se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad de las células CAR-T sobre las distintas líneas celulares diana a las 24, 48 y 72 horas de cocultivo.

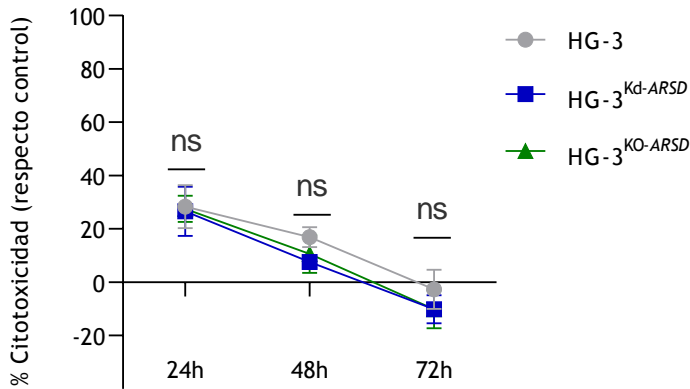


Figura 57: Citotoxicidad de las células CAR-T en ratio 1:1. Citotoxicidad de las células CAR anti CD19 (en %) sobre las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{KO-ARSD} tras 24-48-72 horas de cocultivo, respecto a los controles. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001

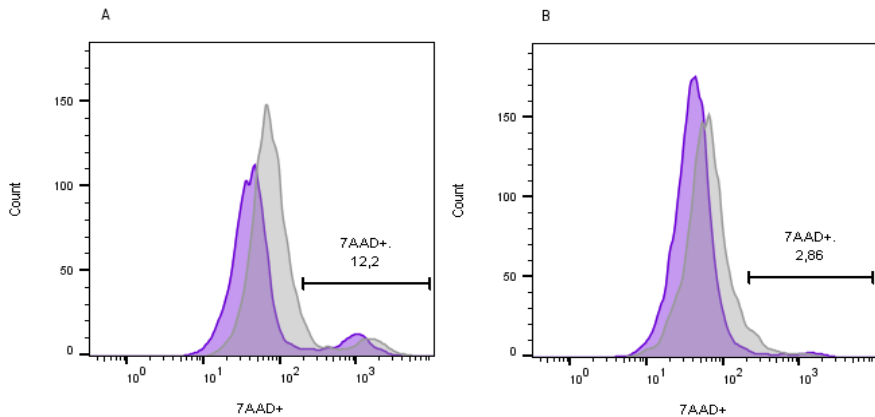


Figura 58: Viabilidad de células CD19⁺ ratio 1:1. A) Viabilidad de las células CD19⁺ tras 24 horas de cocultivo. B) Viabilidad de las células CD19⁺ tras 72 horas de cocultivo. Cococultivos con células Jurkat (gris) y con células portadoras del CAR anti CD19 (violeta).

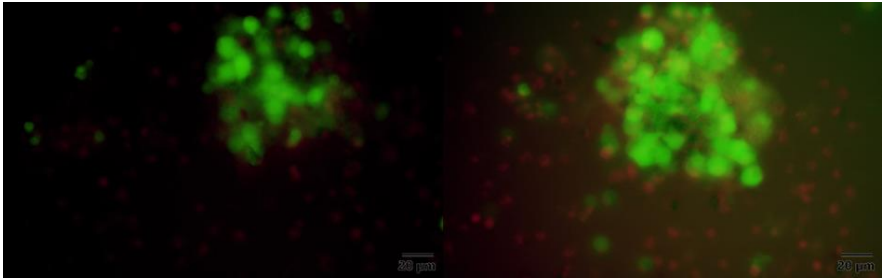


Figura 59: Imágenes del cocultivo de células CAR-T (GFP+) con células HG-3 (rojas, teñidas con DRAQ5) a la ratio 1:1.

5.3.2.3. Cocultivo ratio 1:5.

El cocultivo fue repetido, variando la ratio a 5:1 (célula efectora: célula diana). La citotoxicidad de las células CAR-T sobre las líneas celulares diana fue calculada a las 24 y 72 horas de cocultivo. Como se observa en la Figura 60, la citotoxicidad calculada no presentó diferencias significativas entre las líneas celulares en ninguna de las dos medidas realizadas. La citotoxicidad media tras 24 horas de cocultivo fue 76% y tras 72 horas de cocultivo fue de 83%.

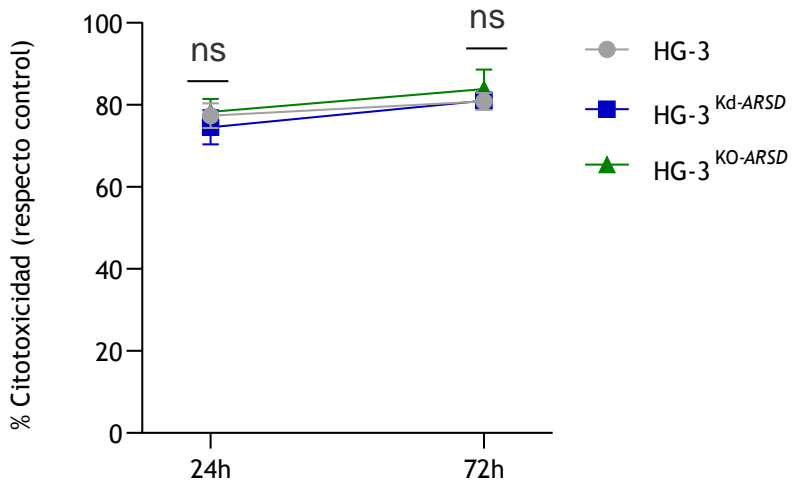


Figura 60: Citotoxicidad de las células CAR-T en ratio 5:1. Citotoxicidad de las células CAR anti CD19 (en %) sobre las líneas celulares HG-3 , HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{KO-ARSD} tras 24-72 horas de cocultivo, respecto a los controles. Resultados expresados como Media \pm DS de tres ensayos independientes (N=3). Significancias estadísticas de la prueba ANOVA: * significancia < 0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia < 0.001.

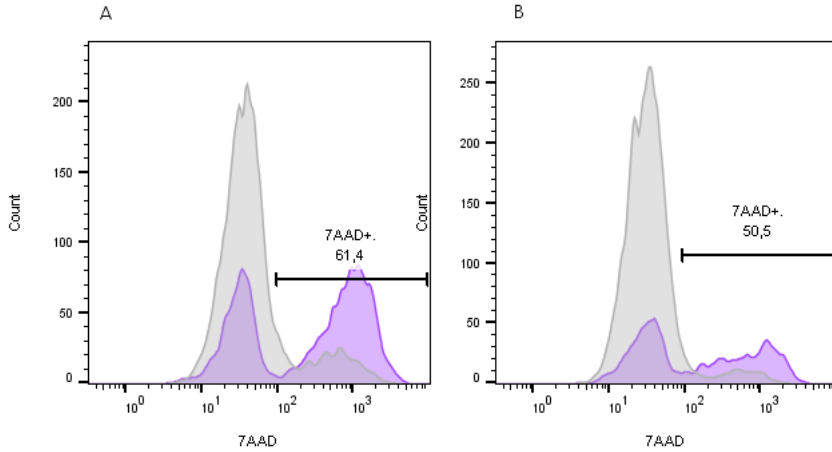


Figura 61: Viabilidad de células CD19⁺ ratio 5:1. A) Viabilidad de las células CD19⁺ tras 24 horas de cocultivo. B) Viabilidad de las células CD19⁺ tras 72 horas de cocultivo. Cocultivos con células Jurkat (gris) y con células portadoras del CAR anti CD19 (violeta).

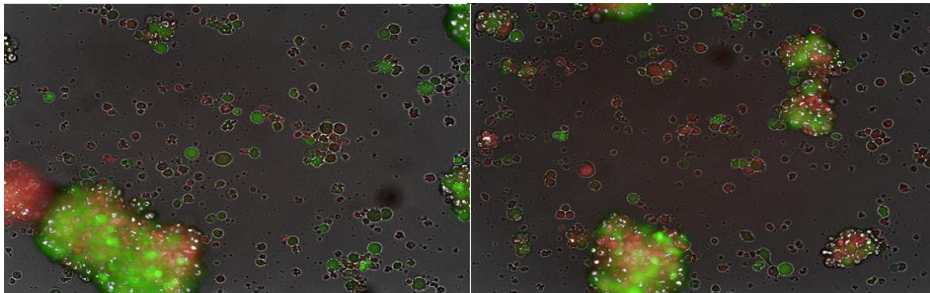


Figura 62: Imágenes del cocultivo de células CAR-T (GFP+) con células HG-3 (rojas, teñidas con DRAQ5) a la ratio 1:5.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El objetivo general de esta tesis es sentar las bases para la implementación de una plataforma que permita de manera efectiva afrontar los retos que supone la interpretación biomédica de los datos generados con tecnologías-ÓMICAS. Dicha plataforma sería de utilidad en el entorno clínico y podría mejorar las tecnologías de diagnóstico y terapéutica. Concretamente, la presente tesis desarrolla modelos *in vitro* para la valoración funcional de la variación genómica y potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas en LLC (Figura 63).

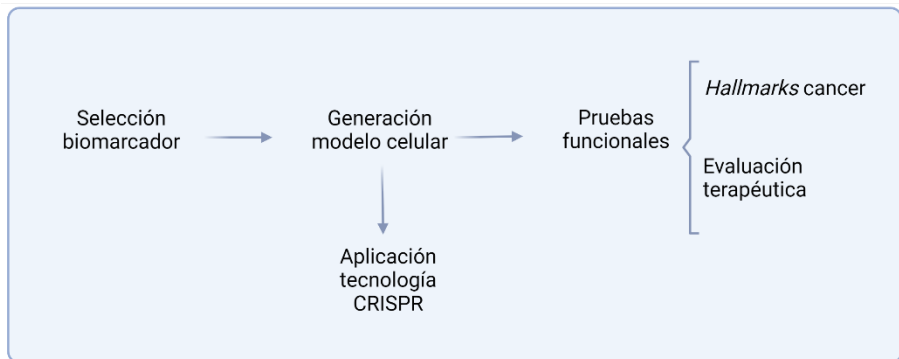


Figura 63: Flujo de trabajo propuesto en la plataforma.

La generación de modelos de enfermedad resulta fundamental en la medicina del siglo XXI. La medicina ha sido y es testigo de un cambio de paradigma desde la inclusión de las pruebas genéticas en el diagnóstico, pronóstico y orientación terapéutica de las enfermedades humanas. Dicho cambio se debe en gran parte al desarrollo tecnológico que se ha dado desde principios del nuevo milenio en el ámbito de la secuenciación del genoma. Hoy podríamos acceder a los datos de genomas completos de pacientes en un margen incluso inferior a 24 horas²²⁹ y a un coste asumible por los sistemas de salud. Este desarrollo ha resultado fundamental a la hora de diagnosticar pacientes y fomenta la interacción entre el médico clínico y el científico-investigador. El análisis de exomas completos, de genomas, así como el estudio

conjunto de datos de expresión génica como RNASeq o de marcas epigenéticas, han logrado desentrañar en muchas ocasiones la causa de una patología (muy especialmente en patologías raras de baja incidencia y patologías sin diagnóstico) e incluso han logrado poner nombre a las mismas. La capacidad diagnóstica se ve beneficiada de estos avances que desembocan en una mejora en el manejo de los pacientes y sus familiares. Dichos pacientes ven además un beneficio en la reducción de la incertidumbre asociada a la falta de diagnóstico, muchas veces tras múltiples pruebas clínicas. Somos por tanto testigos y parte del desarrollo de un nuevo paradigma en la medicina. Se trata de una nueva medicina de precisión y personalizada en la que cada paciente es tratado y orientado clínicamente en función de la variación genómica que le es propia. Sin embargo, pese a los avances en las herramientas de análisis bioinformáticos para el tratamiento de la cantidad de datos y de los predictores de patogenicidad *in silico* su interpretación en entorno clínico supone un reto. El significado biológico de un elevado número de variantes es incierto en un elevado número de casos, siendo por tanto consideradas irrelevantes para su aplicación directa en el informe clínico-genético. Este desafío debe ser abordado desde un punto de vista multidisciplinar y en entorno clínico-científico dentro de los sistemas de salud, en plataformas traslacionales en que se aúnen los esfuerzos de los servicios asistenciales y del abordaje científico de la genómica funcional.

En esta dirección, en la presente tesis se lleva a cabo la generación de un modelo *in vitro* para una validación de variaciones genómicas en el contexto de la LLC. Dicho modelo es en sí mismo una plataforma de abordaje de genómica funcional y validación terapéutica que ha sido puesta a punto como prueba de concepto sobre un potencial biomarcador detectado tras análisis completo de exomas de pacientes con LLC: el gen *ARSD*. Previamente han sido generados modelos celulares en los que incluyen mutaciones de gran impacto como la TP53 o ATM²³⁰. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento ningún modelo de validación funcional que permita obtener información sobre genes que presentan variaciones genómicas concretas en entorno de la LLC. Tal y como se explicó en Búsqueda de biomarcadores de la presente tesis, se han descrito variantes genómicas con potencial papel

en la prognosis de la LLC¹²³. Pese a que los modelos de predicción *in silico* son cada vez más desarrollados, es necesaria la generación de modelos que confirmen o desmientan estas predicciones en sistemas biológicos.

6.1. GENERACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES HG-3 *KNOCK-OUT* Y *KNOCK-DOWN* PARA EL GEN *ARSD*.

Históricamente las líneas celulares inmortalizadas han sido de gran ayuda en el contexto de la investigación básica. Su mayor limitación es que, en ocasiones, las líneas celulares disponibles no abarcan la totalidad de la diversidad genética presente en el contexto de numerosas enfermedades, como en la LLC. En este sentido, la edición genómica mediante CRISPR ha permitido agilizar la generación de nuevas líneas celulares que recapitulan las variaciones genéticas presentes en una determinada enfermedad.

El bloqueo de la expresión de los genes (*knock-out*), su represión (*knock-down*) y su sobreexpresión (*knock up*), son herramientas fundamentales para el conocimiento de la funcionalidad de los genes. Siendo los modelos *knock-out* y *knock-down* complementarios, puesto que el bloqueo total de la expresión de determinados genes esenciales es letal, además de sólo proporcionar información acerca de su función parcial en un contexto dado.

El abordaje experimental de la generación de los modelos celulares *knock-out* y *knock-down* empleando la tecnología CRISPR en la línea celular de linfocitos B HG-3, con el objetivo de bloquear y reprimir la expresión del gen *ARSD*, fue definido principalmente por la baja capacidad de transfección que presenta la línea celular. Por este motivo, el método elegido para introducir las proteínas Cas9 y dCas9, así como las sgRNAs específicas para el gen *ARSD*, fue el sistema lentiviral. Los sistemas de transferencia genética basados en vectores virales son la tecnología de elección para muchas terapias génicas y celulares. Como principal ventaja de dicha tecnología, destaca su eficiencia para integrarse en el genoma de forma estable. Por otro lado, la principal desventaja de este modelo es que la transferencia de genes empleando lentivirus supone su integración aleatoria en el genoma huésped, pudiendo causar genotoxicidad y mutagénesis causada por la inserción

de los transgenes aleatoria en los cromosomas²³¹. Para evitar la integración de múltiples copias de los transgenes, las partículas virales fueron cuantificadas, previamente a su utilización en los experimentos de inserción genética para manipular el gen *ARSD* en linfocitos B, además de ser establecida la multiplicidad de infección de la línea celular HG-3 empleando el vector de transferencia pLenti-CMV-GFP.

6.1.1. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD*.

En el sistema de edición genómica *knock-out* mediante CRISPR, el control de la cantidad de los componentes CRISPR introducidos, es decir, la cantidad de Cas9 y de sgRNA introducidos en la célula, es un punto clave a la hora de evitar los posibles eventos de edición fuera de diana (*off-targets*)¹⁸⁵. Para minimizar este riesgo, empleando como metodología de introducción de los componentes CRISPR los lentivirus, se eligió como vector de transferencia el plásmido Lenti-iCas9-Neo. Este plásmido presenta como característica fundamental la presencia de un promotor de expresión del transgén dependiente de inducción por doxiciclina. El promotor inducible, ya de por sí de baja expresión, permite además limitar en el tiempo la cantidad de proteína Cas9 expresada, en comparación con la expresión constitutiva de los transgenes presentada por la mayoría de los vectores de transferencia lentivirales. Las sgRNAs específicas para bloquear la expresión del gen *ARSD*, fueron insertadas en el vector lentiviral LV04 que presenta un promotor de expresión constitutiva del transgén. De este modo, limitando uno de los dos componentes CRISPR necesarios para el *knock-out*, minimizamos las probabilidades de producir edición genómica fuera de diana. El estudio de la inducción y evolución de la expresión del promotor una vez inducido, nos permitió, además, definir temporalmente el fin del posible evento de edición genómica, y así caracterizar con mayor precisión el *bulk* celular presente, una vez que ya no se van a producir más eventos de edición.

La nucleofección, tecnología que mediante el uso de pulsos eléctricos permite la transferencia directa de moléculas al núcleo celular, está siendo empleada en la actualidad como una alternativa al uso de lentivirus en células con baja capacidad de transfección. La

nucleofección para introducir la sgRNA combinada con la introducción lentiviral de la proteína Cas9, ha sido exitosamente empleada en la generación de la línea celular HG-3 del(11q) ATM^{KO230}.

La metodología empleada para estimar la eficiencia de edición genómica de los *bulks* celulares *knock-out* y poder valorar la continuidad del proceso hacia crecimiento desde célula única, fue la combinación de secuenciación Sanger y el análisis ICE (*Synthego*). La secuenciación Sanger, con menor capacidad para detectar variantes de baja frecuencia presentes en una muestra que la tecnología NGS²³², nos permitió obtener unos resultados ICE de eficiencia de edición del 58% y 38% para las guías seleccionadas (Figuras 32 y 33). Si bien estos resultados pueden ser considerados como una infraestima, debido a las limitaciones de la técnica Sanger, fue valorada como una eficiencia suficiente para continuar el experimento.

El crecimiento desde célula única en las condiciones descritas resultó en la obtención de 24 clones para la guía dirigida al exón 3 del gen *ARSD* y de 21 clones para la guía dirigida al exón 5. Todos los clones fueron secuenciados mediante Sanger. El análisis de las secuencias (Figura 38) sólo mostró discordancia con la secuencia *wild type* en 2 clones para la guía dirigida al exón 3 y en 4 clones para la dirigida al exón 5, suponiendo unas eficiencias de edición reales del 8 y 24% respectivamente. La disparidad entre el dato de eficiencia de edición estimada por la herramienta ICE (58 y 38% respectivamente) y la eficiencia real obtenida (8 y 24% respectivamente) puede ser debida al bajo número de clones analizados.

La validación del *knock-out* necesaria para seleccionar los clones que no expresan el gen *ARSD*, fue llevada a cabo mediante PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa es una técnica ampliamente utilizada para validar la ausencia de expresión génica producida por edición mediante CRISPR^{233,234,235,236}. Mediante esta técnica conseguimos validar positivamente los 2 clones seleccionados en Sanger para la guía dirigida al exón 3 y 2 de los 4 clones seleccionados mediante Sanger para la guía dirigida al exón 5 (Figura 39). Los clones descartados, clones 8 y 7, presentaron positividad en la expresión del gen *ARSD* en ciclos finales de la PCR, suponiendo que la edición genómica

ocasionada no supuso el bloqueo de la expresión del gen, aunque sí supuso una reducción en la expresión del mismo.

Existen dos metodologías para llevar a cabo el estudio de posibles *off-targets* de las guías seleccionadas en los clones validados, definidas como métodos sesgados o no sesgados. La metodología no sesgada incluye la detección de edición genómica teniendo en cuenta todo el genoma celular, empleando técnicas como secuenciación de genoma completo o GUIDE-seq^{237,238}. En el presente trabajo, realizado en un contexto de investigación básica con una visión aplicada, hemos elegido como metodología de estudio de posibles *off-targets*, la metodología sesgada. Dicha metodología sesgada incluye el uso de herramientas bioinformáticas que, mediante la integración de algoritmos, son capaces de detectar regiones similares a la región diana elegida con respecto a un genoma de referencia. De este modo, introduciendo la secuencia de la región diana seleccionada, la herramienta busca en el genoma de referencia regiones similares a la diana permitiendo falta de coincidencia para 1-2-3 o más nucleótidos dentro de la región. El estudio de *off-targets* de las guías seleccionadas para editar el gen *ARSD*, ofreció como resultado la selección de 5 regiones en el genoma que podrían ser susceptibles de edición genómica indeseada. Las 5 regiones fueron analizadas mediante secuenciación Sanger, teniendo como resultado el descarte del clon 2 por presentar falta de coincidencia con respecto a la secuencia *wild type* para el gen *MRPL27* (Figura 41).

De este modo fueron aceptados como modelos de *knock-out* para el gen *ARSD* los clones 11 y 12 editados con la guía dirigida al exón 3 y el clon 10 editado con la guía dirigida al exón 5. La eficiencia de edición *knock-out* sin *off-targets* mediante CRISPR obtenida finalmente fue del 8% para la guía dirigida al exón 3 y de 5% para la guía dirigida al exón 5 del gen *ARSD* (teniendo en cuenta el análisis de 24 y 21 clones totales respectivamente). Una mayor eficiencia de la edición genómica podría haber sido alcanzada mediante el uso de una línea celular clonal HG-3-iCas9 en la que todas las células fueran positivamente inducidas con bajas concentraciones de doxiciclina para la expresión del transgén, o mediante el uso de vectores de

transferencias portadores de más de una guía dirigidas a distintos puntos del gen diana.

De este modo, fue alcanzado el objetivo de conseguir un modelo celular validado en el que fue bloqueada la expresión del gen *ARSD* mediante el uso de dos guías distintas empleando la tecnología CRISPR-Cas9, sin evidencia de *off-targets*.

6.1.2. Generación de los modelos celulares HG-3 *knock-down* para el gen *ARSD* mediante CRISPR.

La evolución del sistema de edición genómica CRISPR hacia un sistema de modulación de la expresión génica (tanto de inhibición (CRISPRi) como de activación (CRISPRa)), fue iniciado mediante el uso del sistema *detah*Cas9-sgRNA como sistema de represión, de modo que la dCas9 dirigida a la región de ADN diana gracias a la acción de la sgRNA, bloquea físicamente a la ARN polimerasa, no pudiendo llevarse a cabo la transcripción¹⁹¹. Posteriormente, el sistema fue mejorado mediante la fusión de un dominio de represión de la transcripción a la proteína dCas9, para finalmente evolucionar también hacia un sistema válido de activación de la expresión génica mediante la fusión de dominios de activación²³⁹.

A diferencia del modelo celular *knock-out*, el modelo celular *knock-down* requiere la presencia continuada de los componentes del sistema CRISPR para llevarse a cabo, puesto que no tiene como resultado la modificación del genoma celular sino la modulación de la expresión del gen diana. Dicha modulación, sólo estará presente mientras estén activos los componentes del sistema de represión. Por este motivo, para el abordaje experimental de este modelo celular, fueron elegidos vectores de transferencia lentivirales que expresan de manera continuada tanto la proteína dCas9 (fusionada al represor KRAB) como la sgRNA.

El diseño de las dos guías seleccionadas fue llevado a cabo teniendo en cuenta la posición del TSS calculado, puesto que, a tenor de los *screenings* y ensayos realizados en este sentido, la eficiencia del *knock-down* aumenta significativamente cuando las sgRNAs son diseñadas entre -50 y +300 nucleótidos del TSS del gen diana^{239,240}.

Para el diseño de las guías también se tuvo en cuenta la expresión constitutiva de los componentes CRISPR, seleccionando sólo aquellas guías que no presentaban regiones concordantes para 1-2-3 nucleótidos con respecto de la región diana. De este modo, se intentó evitar que la expresión continuada de la dCas9 y de las sgRNAs derivase en la presencia de *off-targets*. Actualmente, existen también modelos lentivirales de expresión inducible para la dCas9, que permiten que el proceso de represión de la expresión sea reversible o controlado en el tiempo²⁴¹.

Al igual que para el *knock-out*, la validación del *knock-down* también fue llevada a cabo mediante PCR cuantitativa, como citábamos antes, técnica ampliamente utilizada para comparar la expresión diferencial de genes. Cabe destacar en este sentido, la gran concordancia en los niveles de represión del gen *ARSD* en los *bulks* celulares ($72\pm 15\%$) y los clones crecidos desde célula única. Concluyéndose de este dato la existencia de una amplia represión homogénea a lo largo de todo el *bulk* celular.

Al igual que para la generación de las líneas celulares *knock-out*, la metodología empleada para el análisis de *off-targets* fue la sesgada. El estudio de *off-targets* para las dos guías seleccionadas (con 4 nucleótidos de discordancia con respecto a la diana) tuvo como resultado la selección de 4 genes susceptibles de ver su expresión alterada por la acción del sistema CRISPR. La expresión de los genes fue analizada, no encontrándose diferencias en la expresión en ninguno de ellos con respecto a la línea celular HG-3 *wild type* (Figura 46).

Hoy en día, hay dos tecnologías fundamentales que permiten modular la expresión genómica: la tecnología CRISPR y la tecnología ARNi (ARN de interferencia). Ambas metodologías se diferencian en que ejercen su acción represora a dos niveles distintos: uno a nivel ADN y el otro a nivel ARNm.

El ARNi o silenciamiento génico post transcripcional, basado en mecanismos celulares naturales de interferencia en la expresión como son los ARNmi, consiste en la introducción de ARN de doble cadena en el interior celular (como un pre-miRNA) en donde será dividido en fragmentos más pequeños mediante la acción de la nucleasa Dicer. Estos ARN de menor tamaño, se asociarán con el complejo de

silenciamiento inducido por ARN (RISC), de modo que la cadena antisentido se separa de la cadena sentido. Una vez separados pueden asociarse con su ARNm complementario. Una vez llevada a cabo la asociación, una proteína de la familia Argonauta escinde el ARNm e inhibe la expresión de la proteína que es codificada por ese ARNm²⁴².

Ambas metodologías de represión de la expresión génica, que presentan elevadas eficiencias en su acción, presentan también como desventaja principal la generación de posibles *off-targets* en el genoma. Sin embargo, los últimos desarrollos en las herramientas bioinformáticas disponibles para el diseño de sgRNAs para la metodología CRISPR, han supuesto una mejora sustancial en la reducción de *off-targets* para esta técnica²⁴³.

Así, también fue alcanzado el objetivo de conseguir un modelo celular validado en el que fue reprimida la expresión del gen *ARSD* mediante el uso de dos guías distintas empleando la tecnología CRISPR-Cas9, sin evidencia de *off-targets*.

6.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN ARSD EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Desde su publicación en los años 2000, los *Hallmarks of cancer*²⁴⁴ son una guía fundamental para la comprensión de los cambios celulares necesarios que suponen la transformación de una célula sana en una neoplásica. En su primera versión, la guía engloba los procesos transformantes en 6 habilidades necesarias adquiridas por las células neoplásicas, como son: la evasión de la apoptosis, autosuficiencia en la señalización de crecimiento celular, insensibilidad ante la señalización antiapoptótica, pérdida del límite replicativo, invasión de tejidos y angiogénesis. Aunque no todos los *Hallmarks* son igualmente modelables, la comparación de la proliferación diferencial entre líneas celulares puede ser evaluada *in vitro* e *in vivo*.

La aproximación experimental para determinar la influencia de la expresión diferencial del gen *ARSD* en la proliferación celular *in vitro* fue llevada a cabo mediante dos ensayos: el conteo directo de las líneas

celulares a distintos tiempos y el cálculo de la viabilidad celular indirecto medido a través de ensayo MTT.

En el estudio de la proliferación celular *in vitro* llevado a cabo mediante conteo celular automatizado, no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular entre las líneas HG-3 y HG-3 *knock-out* para el gen *ARSD*. Sin embargo, los conteos celulares de las líneas celulares *knock-down* si mostraron diferencias significativas en el conteo tras 6 días de cocultivo (si bien, los conteos inferiores a 3 días sólo pueden ser considerados como tendencia). El estudio de proliferación mediante medición indirecta corroboró los resultados obtenidos para las líneas *knock-out*. El estudio de las líneas *knock-down* confirmó las diferencias significativas encontradas a 6 días mediante conteo celular, y aumentó a significativo el *fold change* de 0 a 3 días. El incremento en la proliferación obtenido en las líneas celulares *knock-down*, aunque significativo, parece poco relevante, pero puede ser entendido como un indicio de la modesta contribución que puede aportar un sólo gen a la variabilidad presente en la enfermedad, dentro de la heterogeneidad presente en los grandes grupos en los que se clasifican los pacientes con LLC. Las mutaciones definitorias presentes en la línea celular HG-3: el estado mutacional NM-IGHV y la delección bialélica 13q (con pérdida de *DLEU7* y el ARNmi 15a) presentan grandes implicaciones en la capacidad replicativa de la línea celular y en su resistencia a la apoptosis. Por un lado, el ARNmi15a tiene acción supresora de tumores al inhibir postranscripcionalmente *BCL2*¹⁹⁵ y, por el otro, el estado mutacional IGHV no mutado ha sido propuesto como una consecuencia del mayor índice de reparación homóloga directa presente en las células con una elevada tasa de proliferación²⁴⁵. Estudios de proliferación comparativos entre líneas celulares de LLC con o sin la mutación TP53 o ATM, mostraron incrementos en el *fold change* de hasta el 40% en tres días. Estos incrementos en la proliferación debido a las mutaciones en TP53 y ATM, también fueron confirmados y con un valor significativo superior en ensayos *in vivo*, empleando como modelo animal el ratón NGS²⁴⁶.

Para llevar a cabo el ensayo de proliferación celular *in vivo*, se escogió la metodología *xenograft* de las líneas celulares *knock-down* (clones 1 y 3) y HG-3 en el modelo de experimentación animal pez cebra. El modelo en pez cebra ha sido utilizado con éxito como alternativa a los modelos en mamífero, en el contexto de la experimentación animal, teniendo una gran acogida a tenor de los numerosos datos disponibles. Para la leucemia, han sido empleados en el *screening* de fármacos mediante *xenograft* de las líneas celulares K562, Jurkat y NB4²⁴⁷ y también han sido empleados en *xenograft* para estudiar la respuesta a fármacos en líneas celulares leucémicas con mutaciones en NOTCH y PTEN como son Jurkat, Karpas45 y TALL1²⁴⁸. Al igual que el ensayo realizado para la presente tesis, también emplearon embriones de pez cebra de 48 hdf para la microinyección, eligen 34°C como temperatura de compromiso para los embriones microinyectados y las líneas celulares y limitan la duración del ensayo a 6 dpi. Los ensayos llevados a cabo, en los que se microinyectaron un total de 60 embriones de pez cebra por línea celular, mostraron un *fold change* significativamente superior para el clon 3 a 4 dpi, de un modo similar a los efectos proliferativos observados *in vitro*. Sin embargo, en las mediciones realizadas a 6 dpi no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las líneas.

De los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* concluimos que tanto el bloqueo como la infraexpresión del gen *ARSD* no influyen de manera relevante en la proliferación celular y que, aunque podemos considerar los resultados *in vitro* como parcialmente positivos para las líneas *knock-down*, las diferencias encontradas no son suficientes para demostrar un efecto sustancial de *ARSD* en la proliferación de linfocitos B.

6.3. EVALUACIÓN TERAPÉUTICA *IN VITRO*.

6.3.1. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib *in vitro*.

Desde los años 90, numerosas terapias dirigidas se han ido aprobando para el tratamiento de los pacientes con LLC, incrementando de manera sensible su esperanza de vida. Debido a su gran importancia funcional, parte de estas terapias dirigidas están focalizadas en la inhibición de la ruta de señalización del BCR, como es el caso del idelalisib y del ibrutinib.

Cuando el BCR se une a su antígeno específico, son activadas kinasas de señalización como BTK y BLN que ejercen su acción mediante la fosfolipasa C- γ 2, PI3K y BTK. Su acción conjunta termina por inducir la movilización de calcio y la activación de las rutas de señalización de las kinasas MAP y de NF- κ B, claves para el desarrollo maduración y funcionalidad de los linfocitos B⁷⁷.

Nos propusimos realizar ensayos de viabilidad celular en respuesta a los fármacos ibrutinib e idelalisib, en los que incluimos la línea celular HG-3 y las nuevas líneas celulares en las que hemos modificado la expresión del gen *ARSD*, manteniendo el fondo genético. El interés de este experimento consiste en evaluar si la variación genética de *ARSD* presente en un grupo de pacientes podría ser un factor de respuesta a la terapia. Sin embargo, los datos no mostraron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas en ambos fármacos en cuanto a la eficacia de los fármacos para disminuir parcialmente la proliferación de linfocitos B.

Desde su aprobación, el fármaco *first-in-class* ibrutinib ha revolucionado el esquema de tratamiento de la LLC. Actualmente es recomendado en monoterapia o en terapia combinada como una de las primeras líneas de tratamiento en la mayoría de las guías de tratamientos para la LLC en todo el mundo. Su eficacia y alta tolerabilidad ha sido ampliamente demostrada en los ensayos clínicos en los que se probó el fármaco. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Advani *et al* en los que los resultados en primera fase mostraron una tasa de respuesta general del 60% y una remisión completa del 16% en pacientes r/r²⁴⁹. Estudios posteriores demostraron la mejora clínica

en todas las subclases de pacientes de LLC, incluyendo a los pacientes que presentaban la delección 17p²⁵⁰.

Aunque el tratamiento con ibrutinib en monoterapia produce mejoría clínica durable en el tiempo para la mayoría de los pacientes con LLC, un 15.5% de los pacientes no tratados previamente²⁵¹ y hasta casi un 30% de los pacientes r/r sufren progresión de la enfermedad²⁵². El ibrutinib, además de inhibir la acción de la proteína BTK, es también capaz de inhibir la acción de otras kinasas como la EGFR, TEC, IL-2 e ITK²⁵³. La inactivación de estas kinasas genera respuestas de toxicidad al tratamiento y suponen la discontinuidad del tratamiento o una reducción en su dosis en los pacientes que las sufren²⁵¹.

El idelalisib es un inhibidor específico de la kinasa PI3K δ , isoforma mayormente expresada en linfocitos²⁵⁴. Es efectivo promoviendo la apoptosis de las células de LLC tanto en pacientes con M-IGHV como NM-IGHV y su citotoxicidad es caspasa dependiente²⁵⁵. El ensayo clínico con idelalisib llevado a cabo por Brown *et al* en fase uno llevado a cabo con pacientes r/r mostró una tasa de respuesta general del 72% y una progresión libre de enfermedad media de 15.8 meses²⁵⁶.

Diferencias significativas que suponen una disminución en la sensibilidad al ibrutinib y al idelalisib han sido previamente descritas para línea celular HG-3 en la que se introdujo la delección 11q y se mutó el gen supresor de tumores TP53²⁴⁶. Por otro lado, la progresión de la enfermedad durante el tratamiento con ibrutinib está relacionada con la presencia de mutaciones en el punto de unión del ibrutinib con la proteína BTK o con la presencia de mutaciones en la fosfolipasa C- γ 2 (proteína sobre la que actúa BTK en la ruta de señalización mediada por el BCR)²⁵⁷. Ambas mutaciones están presentes en mayor proporción cuanto más progresa la enfermedad²⁵⁸. Al estar la resistencia al tratamiento con ibrutinib relacionada con mala prognosis, es de vital importancia revisar la presencia de mutaciones antes de comenzar el tratamiento. Los mecanismos de resistencia al idelalisib son actualmente desconocidos, aunque en los últimos meses se ha publicado un estudio en el que relacionan la resistencia al tratamiento con mutaciones en los genes MAP2K1, BRAF, y KRAS²⁵⁹.

6.3.2. Estudio del efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en respuesta al tratamiento con células CAR-T.

El primer estudio publicado empleando como terapia las células CAR-T fue llevado a cabo por Porter *et al* en el año 2011²⁶⁰ en un paciente con LLC.r/r. En un artículo publicado en la revista *Nature* a principios de este año, nos recordaban que las dos primeras personas con LLC en recibir esta terapia seguían aún hoy en remisión, y que ambos presentaban aún células CAR-T detectables en su cuerpo²⁶¹.

Las células CAR-T son generadas mediante la transducción de células T con los receptores quiméricos de antígeno (CAR). Los CARs están compuestos por un fragmento variable monocatenario de reconocimiento de antígenos (ScFv), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, como CD3 ζ . Para conferir a las células T mayor capacidad de expansión, de actividad y de persistencia, se han añadido dominios coestimuladores como CD28 o 4-1BB (CD137) para generar los CARs de segunda generación. Conforme aumentan las generaciones de CARs, mayor es el número de complementos añadidos a la estructura original. Así, los CARs de tercera generación están caracterizados por el uso de dos dominios coestimuladores. Los de cuarta generación incluyen, además, sistemas de inducción de liberación de citoquinas²⁶² y, los de quinta generación, están caracterizados por el uso de sistemas de edición genómica, como CRISPR, para, por ejemplo, generar modelos celulares en los que el TCR endógeno es bloqueado para no interferir con el CAR²⁶³ o es bloqueado el receptor PD-1 de los linfocitos T (punto de control del sistema inmunitario) para impedir que reciban señales que suponen su agotamiento²⁶⁴.

6.3.2.1. Generación de la línea celular CAR-T.

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* de terapia CAR-T hemos elegido el CAR anti CD19 asociado a CD3 ζ con el dominio coestimulador 4-1BB (CD137). Este CAR, de segunda generación, es en estructura similar al ofrecido por *Kymriah* (Novartis). Aunque no hay gran disponibilidad de datos que comparen en paralelo los CARs que presentan el dominio coestimulador 4-1BB frente a CD28, si se han realizado asociaciones con distintas características entre ambos CARs.

Por un lado, se ha asociado el uso del dominio coestimulador CD28 con la generación de células CAR-T que presentan una gran respuesta proliferativa y producción de células T de memoria. Mientras que, por el otro, el uso del coestimulador 4-1BB ha sido asociado con una respuesta progresiva, otorgando mayor persistencia a su función²⁶⁵.

Al igual que en el proceso clínico, hemos introducido el CAR en la línea celular T mediante el empleo de un vector de transferencia lentiviral. La transducción viral del CAR empleando gamma retrovirus y lentivirus es la más común dentro de las terapias CAR-T aprobadas debido a las altas eficiencias conseguidas mediante esta técnica (tanto integrativos como no integrativos²⁶⁶). Sin embargo, y como citábamos antes, su uso implica la existencia de posibles efectos genotóxicos y de mutagénesis por inserción²³¹. La falta de capacidad de carga de los sistemas lentivirales a la hora de integrar más de un gen a la vez, así como los potenciales riesgos en su uso, han promovido el uso y el desarrollo de tecnologías alternativas para esta aplicación. La electroporación y la nucleofección, tecnologías que mediante pulsos eléctricos inducen la formación de poros temporales en la membrana citoplasmática, permitiendo la introducción eficiente de material genético, presentan como ventaja principal un aumento en la capacidad de carga en el proceso de *delivery*²⁶⁷. Sin embargo, cuando estas técnicas son empleadas en procesos *ex vivo*, es importante el elevado efecto citotóxico sobre las células electroporadas/nucleofectadas, así como la pérdida de material citoplasmático²⁶⁸. El uso de nanopartículas, aún poco empleado en el contexto de terapia celular CAR-T, supone un gran avance con respecto al uso de retrovirus debido a que presentan alta capacidad de carga, baja citotoxicidad y son altamente adaptables²⁶⁹. Las nanopartículas permiten el *delivery* dirigido por tipo celular e incluso mediante el uso de marcadores de superficie dentro de un mismo tipo celular, convirtiéndolas en una promesa de futuro tanto para aplicaciones *in vivo* como *ex vivo*²⁷⁰. Empleando la tecnología *Sleeping Beauty* combinada con un sistema de *delivery* basado en vectores minicírculo, el proyecto CARAMBA ha conseguido la autorización para realizar un ensayo clínico en terapia celular CAR-T contra el mieloma múltiple (diana SLAMF7) libre de virus²⁷¹. Los vectores minicírculo son *cassettes* de expresión derivados de vectores

plasmídicos a los que se les han eliminado todos los componentes bacterianos de la estructura. Debido a su pequeño tamaño, presentan eficiencias de transfección más elevadas que los vectores plasmídicos²⁷². En nuestros experimentos, conseguimos con éxito producir células CAR-T Jurkat anti CD19 y el reportero GFP, y por lo tanto decidimos continuar con los estudios funcionales y de eficacia en modelos de LLC.

6.3.2.2. Activación específica de las células CAR-T. Ratio.

El primer ensayo realizado con las células CAR-T en la presente tesis, fue el ensayo en el que se validó la activación específica del CAR-T generado frente a las células que presentan su antígeno diana. Los resultados obtenidos, muestran la activación inequívoca de las células CAR generadas en respuesta al cocultivo con las células HG-3. La activación específica fue medida mediante el uso del biomarcador de activación de células T CD69, como se detalló en las Figuras 55 y 56. Se observan diferencias significativas en los niveles de intensidad expresión de CD69 en todos los cocultivos de las células CAR-T generadas con su diana. Por otro lado, el cocultivo de las células Jurkat (sin CAR) con las células HG-3, así como el cocultivo de las células CAR-T con células CD19, no supuso un aumento en la intensidad de expresión de CD69 ni en la condición de cocultivo 1:1.

Con el objetivo de generar una plataforma de validación sistemática y dinámica de nuevos biomarcadores en terapia CAR-T, incluyendo la posibilidad futura de la validación del diseño de nuevas dianas terapéuticas, el uso de la línea celular Jurkat es una herramienta de mucha utilidad a la hora de dinamizar los procesos iniciales y realizar pruebas de concepto. Como se ha propuesto en numerosos ensayos, las células Jurkat son un modelo fiable en cuanto a su activación específica, su acción citotóxica y su respuesta homogénea^{172, 173, 174}.

A la vista de los datos de eficiencia de infección, así como de activación específica frente a su antígeno diana, hemos empleado la línea CAR-T generada a partir de células Jurkat para medir la citotoxicidad ejercida en la línea celular HG-3 y las líneas modificadas mediante tecnología CRISPR.

6.3.2.1. Cocultivo con células diana HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{Ko-ARSD}

Con el objetivo de alcanzar el mayor grado de activación de las células CAR, y de emplear una dosis *in vitro* estándar, el primer cocultivo se realizó a la ratio 1:1. Como vemos en la Figura 57, tras 24 horas de cocultivo entre las células CAR-T y las líneas celulares HG-3, HG-3^{Kd-ARSD} y HG-3^{Ko-ARSD} la citotoxicidad ejercida por las células se cuantificó en valores de media del 30%. A medida que se incrementó el tiempo de cocultivo la citotoxicidad calculada comenzó a disminuir, hasta las 72 horas de cocultivo, momento en que la citotoxicidad calculada fue próxima a cero o negativa tanto para la línea celular HG-3 como para las líneas celulares modificadas mediante CRISPR.

Al comparar los datos de citotoxicidad obtenidos tras 24 horas en nuestro cocultivo, con los datos de otros ensayos *in vitro* para la misma ratio, como el llevado a cabo con la línea celular NALM6, se valoró la terapia como no efectiva. En el ensayo citado, tras menos de 24 horas de cocultivo de las células NALM6 (de ALL) con las células CAR-T anti CD19, se consiguieron valores de citotoxicidad cercanos al 100%²⁷³.

Debido a la baja citotoxicidad observada en el primer cocultivo, se repitió el ensayo de cocultivo aumentando por cinco la ratio célula efectora: célula diana (5:1). Como se detalló en la Figura 60, la terapia comenzó a tener valores de citotoxicidad más elevados desde la primera medida. Tras 24 horas de cocultivo la citotoxicidad media alcanzó un 76%, alcanzándose de media el 83% tras 72 horas de cocultivo. En ambas medidas, no se encontraron diferencias significativas entre la línea celular HG-3 y las líneas celulares modificadas genéticamente mediante tecnología CRISPR.

Los datos de citotoxicidad obtenidos en este cocultivo, están en línea con el estudio realizado para la misma línea celular y en las mismas condiciones (ratio 5:1) pero empleando linfocitos T primarios, en el que, tras 96 horas de cocultivo, se alcanzaron porcentajes de citotoxicidad del 100% en la línea celular HG-3 y HG-3 con mutaciones en TP53²⁷⁴. Sin embargo, las citotoxicidades observadas en ensayos realizados *in vivo* son inferiores posiblemente debido a que el estado

funcional de los linfocitos T y el microambiente tumoral son determinantes en la respuesta a esta terapia¹¹².

La titulación de la dosis en el tratamiento CAR-T para la LLC, es una estrategia empleada en varios ensayos clínicos, donde podemos observar dosis bajas del orden de 3.1×10^6 células/Kg hasta dosis altas de 5×10^8 células/Kg¹¹⁰. El aumento en la dosis en la terapia CAR-T está íntimamente relacionado con la aparición de toxicidad en los pacientes, como es el síndrome de liberación de citoquinas²⁷⁵. Sin embargo, en el seguimiento a largo plazo del ensayo clínico realizado en 2016 (NCT02640209) y publicado en 2020, obtienen mejores resultados empleando dosis altas en el tratamiento con CAR-T para pacientes con LLC avanzada y los efectos citotóxicos logran ser paliados²⁷⁶.

En el contexto clínico, además de un aumento en la dosis de células CAR-T para pacientes con LLC avanzada, también se están consiguiendo mejorar las eficiencias del tratamiento mediante la combinación de la terapia celular con otras terapias dirigidas. Aunque algunos de los tratamientos empleados en la LLC, presentan efectos adversos en la funcionalidad de las células T, lo que supone un claro inconveniente en esta terapia celular en la que la materia prima son los linfocitos del propio paciente, estos efectos no se han identificado cuando la terapia CAR-T se combina con terapias dirigidas con ibrutinib o venetoclax.

En el año 2016 se publicaron los resultados de tres ensayos clínicos con pacientes de LLC (NCT01747486, NCT01105247 y NCT01217749) en los que se estudió el efecto del ibrutinib sobre la expansión y funcionalidad de las células CAR-T. Los resultados mostraron una mejor expansión de las células CAR-T en los pacientes tratados con ibrutinib (durante un tiempo igual o superior a un año antes de la terapia). Además, determinaron que el ibrutinib no afecta a la funcionalidad de las células CAR-T *in vitro*, y que además mejora el injerto, la expansión y la supervivencia en ensayos *xenografts*²⁷⁷. También hay resultados positivos de cotratamiento entre ibrutinib y terapia CAR-T, en los que se encontraron buena tolerabilidad al tratamiento, además de un menor síndrome de liberación de citoquinas en los pacientes tratados²⁷⁸. Este año también han sido publicados los

datos del ensayo en fase I TRANSCEND CLL 004 (NCT03331198.) en el que emplean el fármaco liso-cel en monoterapia, previo tratamiento con ibrutinib o ibrutinib y venetoclax, en pacientes r/r de LLC y SLL. Para los 22 pacientes de los 25 incluidos en el ensayo, obtienen en fase I unos resultados del 82% de respuesta, siendo la respuesta completa del 45% con un seguimiento medio de 24 meses²⁷⁹.

Para aumentar la eficiencia de la terapia CAR-T en el contexto de la LLC, también se están buscando nuevas dianas sustitutas o complementarias al antígeno CD19. El antígeno CD20 es ampliamente expresado por las células de LLC, y es una diana terapéutica conocida en el tratamiento de la LLC con anticuerpos monoclonales como el rituximab²⁸⁰. El CAR biespecífico CD19-CD20 ha sido ensayado en ratones NGS, presentando elevada eficiencia de citotoxicidad y evitando el *antigen escape* en CD19 que presentan las células neoplásicas B de LLC²⁸¹. Una diana distinta de CD19, la CD30, también se está probando en LH (Linfoma de Hodgkin), cuyas células expresan este marcador diferencialmente²⁸².

Una estrategia emergente en terapia celular es la sustitución de las células T por células *Natural Killer* (NK), como células portadoras del CAR²⁸³. Las células NK, al igual que las células T, muestran actividad citotóxica dirigida cuando el CAR es insertado y, a diferencia de las células T, no presentan necesidad de compatibilidad HLA, pudiendo ser transferidas de un donante sano²⁸⁴. Sin embargo, presentan como inconveniente su baja persistencia en ausencia de soporte mediado por citoquinas. Los resultados presentados del ensayo clínico en fase I y II llevado a cabo por Liu *et al*, empleando células NK de cordón umbilical anti CD19 en 11 pacientes con LLC o NHL avanzada, muestran unos datos prometedores con un seguimiento de 13.8 meses. La infusión de las células NK no conllevó la aparición del síndrome de liberación de citoquinas, neurotoxicidad o rechazo por injerto. De los 8 pacientes tratados, 8 mostraron respuesta, siendo la respuesta completa en 7 de ellos²⁸⁵.

La presente tesis ha sentado las bases y optimizado los protocolos para una validación funcional en el contexto de los hallazgos detectados a nivel genómico en LLC de manera rápida y coste-efectiva. La profundización en el estudio de las causalidades biológicas

determinantes de la iniciación y evolución de la LLC, así como de respuesta a los distintos tratamientos, es un factor clave para la correcta atención de los pacientes que la sufren, así como para alcanzar una mayor eficiencia en el uso de los recursos disponibles. La gran cantidad de datos genómicos generados en los últimos años hace necesaria una plataforma de validación sistemática de los hallazgos encontrados. De este modo, podremos discernir entre los hallazgos genómicos no concluyentes, tales como las variantes de significado incierto (su acrónimo del inglés, VUS) o los hallazgos concluyentes, que podrían permitir explicar las diferencias en la prognosis y en la respuesta a terapias presente en los pacientes con LLC clasificados actualmente en base a biomarcadores fundamentales. Se hace necesaria la ampliación de otros potenciales biomarcadores para proponer una guía que proporcione un *score* del valor pronóstico que sirva de aplicación directa en la práctica clínica. Finalmente, creemos que una plataforma transversal basada en edición genómica mediante sistemas CRISPR permite abordar algunos de los retos de la medicina personalizada de modo escalable de cara a la validación de biomarcadores y variaciones identificadas con análisis genómicos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Se ha conseguido generar una plataforma de validación funcional y evaluación terapéutica de potenciales biomarcadores en LLC, identificados en estudios de variantes genómicas detectadas en pacientes. Se trata de una plataforma transversal basada en edición genómica mediante sistemas CRISPR. Es escalable de cara a la validación de biomarcadores y variaciones detectadas tras análisis –OMICOS en el ámbito de la medicina personalizada. Como resultado de la implementación de esta plataforma hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.-La generación de las líneas celulares HG-iCas9 y HG-3-dCas9-KRAB a partir de lentivirus generados *ad-hoc* han demostrado ser efectivas y sientan las bases para abordar el estudio de nuevos genes y variantes candidatas en LLC.
- 2.-Los sistemas CRISPR empleados mediante transducción lentiviral han demostrado eficacia a la hora de generar los modelos isogénicos a partir de la línea celular HG-3 para el bloqueo (*knock-out*) e infraexpresión (*knock-down*) de potenciales biomarcadores, como el gen *ARSD*.
- 3.-Se ha generado una metodología de estudio de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* que permitió discernir el efecto de la expresión diferencial del gen *ARSD* en la proliferación celular.
- 4.- Tras los ensayos de proliferación realizados *in vitro*, se concluye que tanto el bloqueo como la infraexpresión del gen *ARSD* no afectan de manera relevante a la proliferación celular.
- 5.- Tras el ensayo de proliferación mediante *xenograft* en pez cebra (*Danio rerio*), se concluye que la infraexpresión del gen *ARSD* no afecta de manera significativa a la proliferación celular.
- 6.-Los resultados obtenidos tras el estudio de la respuesta de los modelos generados al tratamiento dirigido con ibrutinib (inhibidor de BTK, en la ruta de señalización mediada a través del BCR), confirman

que tanto el bloqueo como la infraexpresión del gen *ARSD* no son relevantes para su eficacia.

7.- Los resultados obtenidos tras el estudio de la respuesta de los modelos generados al tratamiento dirigido con idelalisib (inhibidor de PI3K δ , en la ruta de señalización mediada a través del BCR), confirman que tanto el bloqueo como la infraexpresión del gen *ARSD* no son relevantes para su eficacia.

8.- Se ha optimizado un protocolo de determinación de la activación específica de la línea celular Jurkat portadora del CAR anti CD19 frente a su antígeno mediante el empleo de un vector de transferencia que permite el abordaje de futuros ensayos para la validación de otros antígenos diana en el contexto de las neoplasias, mediante protocolos simples de digestión enzimática del vector de transferencia.

9.- Los resultados obtenidos tras el estudio de la respuesta de los modelos generados a tratamiento con la aproximación de terapia celular CAR anti CD19 en células Jurkat, muestran que tanto el bloqueo como la infraexpresión del gen *ARSD* no tienen influencia en la respuesta a esta terapia.

10.- Los modelos isogénicos generados en la línea celular HG-3 pueden ser empleados en un futuro para estudiar en profundidad los mecanismos de acción específicos de la proteína *ARSD* en el contexto celular.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hallek, M. *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 131, 2745–2760 (2018).
2. Yuille, M. R. *et al.* Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br. J. Haematol.* 109, 794–799 (2000).
3. Jønsson, V. *et al.* CLL family ‘Pedigree 14’ revisited: 1947–2004. *Leukemia* 19, 1025–1028 (2005).
4. Videbaek, A. Heredity in human leukemia and its relation to cancer : a genetic and clinical study of 209 probands. *Wellcome Collection Wellcome Collection.Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)*.
5. Goldin, L. R., Slager, S. L. & Caporaso, N. E. Familial Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 350–355 (2010).
6. Wiernik, P. H., Ashwin, M., Hu, X.-P., Paietta, E. & Brown, K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 113, 407–414 (2001).
7. Benzow, K. A. *et al.* Instability of CAG-trinucleotide repeats in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 43, 1987–1990 (2002).
8. www.sehh.es. Guía nacional de LLC y LL. (2020).
9. Rai, K. R. *et al.* Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 46, 219–234 (1975).
10. Binet, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198–206 (1981).
11. Döhner, H. *et al.* Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343, 1910–1916 (2000).
12. Yi, S. *et al.* The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative

- disorders: a retrospective study. *Int. J. Hematol.* 106, 418–425 (2017).
13. Ouillette, P. *et al.* Integrated Genomic Profiling of Chronic Lymphocytic Leukemia Identifies Subtypes of Deletion 13q14. *Cancer Res.* 68, 1012–1021 (2008).
 14. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355 (2004).
 15. Lin, K. *et al.* Loss of *MIR15A* and *MIR16-1* at 13q14 is associated with increased *TP53* mRNA, de-repression of *BCL2* and adverse outcome in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 167, 346–355 (2014).
 16. Pekarsky, Y. & Croce, C. M. Noncoding RNA genes in cancer pathogenesis. *Adv. Biol. Regul.* 71, 219–223 (2019).
 17. Nava-Rodríguez, M. P. *et al.* Genomic instability in a chronic lymphocytic leukemia patient with mono-allelic deletion of the *DLEU* and *RB1* genes. *Mol. Cytogenet.* 12, 2 (2019).
 18. Que, T. *et al.* Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 82, 571–575 (1993).
 19. Döhner, H. *et al.* 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis. *Blood* 89, 2516–2522 (1997).
 20. Bullrich, F. *et al.* ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 59, 24–27 (1999).
 21. Stilgenbauer, S. *et al.* Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 5 (1996).
 22. Marasca, R. *et al.* Clinical heterogeneity of *de novo* 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone: Prognostic relevance of 11q deleted nuclei load in CLL. *Hematol. Oncol.* 31, 88–95 (2013).
 23. Stankovic, T. & Skowronska, A. The role of *ATM* mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 55, 1227–1239 (2014).

24. Lavin, M. F. *et al.* Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair* 3, 1197–1205 (2004).
25. Clouaire, T., Marnef, A. & Legube, G. Taming Tricky DSBs: ATM on duty. *DNA Repair* 56, 84–91 (2017).
26. Bosotti, Roberta, Isacchi, Antonella, & Sonnhammer, Erik. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci* 25, 225–227 (2000).
27. Falck, J., Coates, J. & Jackson, S. P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611 (2005).
28. Fernandes, N. *et al.* DNA Damage-induced Association of ATM with Its Target Proteins Requires a Protein Interaction Domain in the N Terminus of ATM. *J. Biol. Chem.* 280, 15158–15164 (2005).
29. Young, D. B. *et al.* Identification of Domains of Ataxia-telangiectasia Mutated Required for Nuclear Localization and Chromatin Association. *J. Biol. Chem.* 280, 27587–27594 (2005).
30. Llorca, O., Rivera-Calzada, A., Grantham, J. & Willison, K. R. Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA. *Oncogene* 22, 3867–3874 (2003).
31. Austen, B. *et al.* Mutation Status of the Residual ATM Allele Is an Important Determinant of the Cellular Response to Chemotherapy and Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Containing an 11q Deletion. *J. Clin. Oncol.* 25, 5448–5457 (2007).
32. Zenz, T. *et al.* Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 112, 3322–3329 (2008).
33. Seiffert, M. *et al.* Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 53, 1023–1031 (2012).
34. Soussi, T., Dehouche, K. & Bérout, C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between

- epidemiology and carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 15, 105–113 (2000).
35. Ahn, J. & Prives, C. The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat. Struct. Biol.* 8, 730–732 (2001).
 36. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331 (1997).
 37. Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 10, 2438–2451 (1996).
 38. Bates, S. & Vousden, K. H. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 28–37 (1999).
 39. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848–1854 (1999).
 40. Gladstone, D. E. *et al.* Importance of immunoglobulin heavy chain variable region mutational status in del(13q) chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52, 1873–1881 (2011).
 41. Gladstone, D. E. *et al.* The importance of IGHV mutational status in del(11q) and del(17p) chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 12, 132–137 (2012).
 42. Forconi, F. *et al.* The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood* 115, 71–77 (2010).
 43. Klein, U. *et al.* Gene Expression Profiling of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals a Homogeneous Phenotype Related to Memory B Cells. *J. Exp. Med.* 194, 1625–1638 (2001).
 44. Rosenwald, A. *et al.* Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 194, 1639–1648 (2001).
 45. Seifert, M. *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 209, 2183–2198 (2012).

46. Ghia, P. *et al.* ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1–3 (2007).
47. Wiestner, A. *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101, 4944–4951 (2003).
48. Crespo, M. *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1764–1775 (2003).
49. Matrai, Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematol. Amst. Neth.* 10, 39–46 (2005).
50. Güssow, D. *et al.* The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J. Immunol.* 139, 3132–3138 (1987).
51. Simonsson, B., Wibell, L. & Nilsson, K. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 24, 174–180 (1980).
52. Gentile, M. *et al.* Predictive value of β 2-microglobulin (β 2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* 94, 887–888 (2009).
53. The International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 17, 779–790 (2016).
54. Dreger, P. Allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 602–609 (2009).
55. Adkins, J. C., Peters, D. H. & Markham, A. Fludarabine. An update of its pharmacology and use in the treatment of haematological malignancies. *Drugs* 53, 1005–1037 (1997).
56. Gandhi, V. & Plunkett, W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 93–103 (2002).
57. Antineoplastic Agents. in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).

58. Ahlmann, M. & Hempel, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 661–671 (2016).
59. JE, C. & BS, K. Bendamustine for treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* 13, 1495–1505 (2012).
60. Pavlasova, G. & Mraz, M. The regulation and function of CD20: an ‘enigma’ of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica* 105, 1494–1506 (2020).
61. Anderson, K. C. *et al.* Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 63, 1424–1433 (1984).
62. Prevodnik, V. K., Lavrenčak, J., Horvat, M. & Novakovič, B. J. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn. Pathol.* 6, 33 (2011).
63. Shan, D., Ledbetter, J. A. & Press, O. W. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 673–683 (2000).
64. Alas, S. & Bonavida, B. Rituximab Inactivates Signal Transducer and Activation of Transcription 3 (STAT3) Activity in B-Non-Hodgkin’s Lymphoma through Inhibition of the Interleukin 10 Autocrine/Paracrine Loop and Results in Down-Regulation of Bcl-2 and Sensitization to Cytotoxic Drugs1. *Cancer Res.* 61, 5137–5144 (2001).
65. Boross, P. & Leusen, J. H. W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.* 2, 676–690 (2012).
66. Smith, M. R. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359–7368 (2003).
67. Petrie, R. J. & Deans, J. P. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2886–2891 (2002).
68. Pavlasova, G. *et al.* Rituximab primarily targets an intra-clonal BCR signaling proficient CLL subpopulation characterized by high CD20 levels. *Leukemia* 32, 2028–2031 (2018).

69. V, S. & M, M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur. J. Haematol.* 94, (2015).
70. Illidge, T. *et al.* Obinutuzumab in hematologic malignancies: lessons learned to date. *Cancer Treat. Rev.* 41, 784–792 (2015).
71. Freeman, C. L. & Sehn, L. H. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *Br. J. Haematol.* 182, 29–45 (2018).
72. Ivanov, A. *et al.* Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 119, 2143–2159 (2009).
73. Herter, S. *et al.* Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2031–2042 (2013).
74. Cragg, M. S. *et al.* Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101, 1045–1052 (2003).
75. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, Muth G, Ziegler-Landesberger D, Van Puijenbroek E, Lang S, Duong MN, Reslan L, Gerdes CA, Friess T, Baer U, Burtscher H, Weidner M, Dumontet C, Umana P, Niederfellner G, Bacac M, Klein C. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther.* 2013 Oct;12(10):2031-42.
76. Humphries, L. A. *et al.* Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase Cgamma Src homology 2-Src homology 3 linker. *J. Biol. Chem.* 279, 37651–37661 (2004).
77. Woyach, J. A. *et al.* Bruton’s tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 123, 1207–1213 (2014).
78. de Rooij, M. F. M. *et al.* The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion

- and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2590–2594 (2012).
79. Ponader, S. *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 119, 1182–1189 (2012).
 80. Vanhaesebroeck, B. *et al.* P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4330–4335 (1997).
 81. Brown, J. R. *et al.* Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3791–3802 (2012).
 82. Brown, J. R. The PI3K pathway: clinical inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 43, 260–264 (2016).
 83. Guo, H., Samarakoon, A., Vanhaesebroeck, B. & Malarkannan, S. The p110 δ of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J. Exp. Med.* 205, 2419–2435 (2008).
 84. Reittie, J. E., Yong, K. L., Panayiotidis, P. & Hoffbrand, A. V. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma* 22, 83–90, follow. 186, color plate VI (1996).
 85. Jurlander, J. *et al.* Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89, 4146–4152 (1997).
 86. Ghia, P., Chiorazzi, N. & Stamatopoulos, K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J. Intern. Med.* 264, 549–562 (2008).
 87. Lasica, M. & Anderson, M. A. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *J. Pers. Med.* 11, 463 (2021).
 88. Marques-Piubelli, M. L. *et al.* Expression of BCL2 alternative proteins and association with outcome in CLL patients treated with venetoclax. *Leuk. Lymphoma* 62, 1129–1135 (2021).
 89. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310 (2010).

90. Fischer, K. *et al.* Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 127, 208–215 (2016).
91. Chai-Adisaksopha, C. & Brown, J. R. FCR achieves long-term durable remissions in patients with IGHV-mutated CLL. *Blood* 130, 2278–2282 (2017).
92. Shanafelt, T. D. *et al.* Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 381, 432–443 (2019).
93. Eichhorst, B. *et al.* First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 17, 928–942 (2016).
94. Goede, V. *et al.* Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N. Engl. J. Med.* 370, 1101–1110 (2014).
95. Hoyos, V., Savoldo, B. & Dotti, G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies. *Haematologica* 97, 1622–1631 (2012).
96. Scholler, J. *et al.* Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 4, 132ra53 (2012).
97. Lundstrom, K. RNA Viruses as Tools in Gene Therapy and Vaccine Development. *Genes* 10, 189 (2019).
98. Abou-el-Enein, M. *et al.* Scalable Manufacturing of CAR T Cells for Cancer Immunotherapy. *Blood Cancer Discov.* 2, 408–422 (2021).
99. Campbell, A. *et al.* Concise Review: Process Development Considerations for Cell Therapy. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1155–1163 (2015).
100. Wang, X. & Rivière, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. Oncolytics* 3, 16015 (2016).

101. Novartis five-year Kymriah® data show durable remission and long-term survival maintained in children and young adults with advanced B-cell ALL. *www.novartis.com/news* (2022).
102. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM, Deol A, Reagan PM, Stiff P, Flinn IW, Farooq U, Goy A, McSweeney PA, Munoz J, Siddiqi T, Chavez JC, Herrera AF, Bartlett NL, Wieszorek JS, Navale L, Xue A, Jiang Y, Bot A, Rossi JM, Kim JJ, Go WY, Neelapu SS. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019 Jan;20(1):31-42.
103. Albinger, N., Hartmann, J. & Ullrich, E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Ther.* 28, 513–527 (2021).
104. Hill, J. A., Giralt, S., Torgerson, T. R. & Lazarus, H. M. CAR-T - and a side order of IgG, to go? - Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Rev.* 38, 100596 (2019).
105. Frey, N. & Porter, D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 25, e123–e127 (2019).
106. Lerkvaleekul, B. & Vilaiyuk, S. Macrophage activation syndrome: early diagnosis is key. *Open Access Rheumatol. Res. Rev.* Volume 10, 117–128 (2018).
107. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology.* 1997 Oct;37(2-3):117-32.
108. Gust, J., Ponce, R., Liles, W. C., Garden, G. A. & Turtle, C. J. Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Front. Immunol.* 11, 577027 (2020).
109. Cappell, K. M. *et al.* Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 38, 3805–3815 (2020).

110. Mancikova, V. & Smida, M. Current State of CAR T-Cell Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5536 (2021).
111. Porter, D. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 7, 303ra139 (2015).
112. Fedorov, V. D., Themeli, M. & Sadelain, M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci. Transl. Med.* 5, 215ra172 (2013).
113. Fraietta, J. A. *et al.* Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 24, 563–571 (2018).
114. Mosquera Orgueira, A., Antelo Rodríguez, B., Díaz Arias, J. Á. & Bello López, J. L. Identification of new putative driver mutations and predictors of disease evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 9, 78 (2019).
115. Ramsay, A. J. *et al.* Next-generation sequencing reveals the secrets of the chronic lymphocytic leukemia genome. *Clin. Transl. Oncol.* 15, 3–8 (2013).
116. Koboldt, D. C. *et al.* VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 22, 568–576 (2012).
117. Rimmer, A. *et al.* Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nat. Genet.* 46, 912–918 (2014).
118. Dees, N. D. *et al.* MuSiC: identifying mutational significance in cancer genomes. *Genome Res.* 22, 1589–1598 (2012).
119. Gonzalez-Perez, A. & Lopez-Bigas, N. Functional impact bias reveals cancer drivers. *Nucleic Acids Res.* 40, e169 (2012).
120. Tamborero, D., Gonzalez-Perez, A. & Lopez-Bigas, N. OncodriveCLUST: exploiting the positional clustering of somatic mutations to identify cancer genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 2238–2244 (2013).

121. Meyer, M. J. *et al.* mutation3D: Cancer Gene Prediction Through Atomic Clustering of Coding Variants in the Structural Proteome. *Hum. Mutat.* 37, 447–456 (2016).
122. Puente, X. S. *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 526, 519–524 (2015).
123. Mosquera Orgueira, A., Antelo Rodríguez, B., Díaz Arias, J. Á. & Bello López, J. L. Identification of new putative driver mutations and predictors of disease evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 9, 78 (2019).
124. L. Phan *et al.* ALFA: Allele Frequency Aggregator. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/> (2020).
125. Cunningham, F. *et al.* Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 50, D988–D995 (2022).
126. Chow, J. & Heard, E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 359–366 (2009).
127. Brown, C. J., Carrel, L. & Willard, H. F. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1333–1343 (1997).
128. Carrel, L. & Willard, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400–404 (2005).
129. Tukiainen, T. *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* 550, 244–248 (2017).
130. Dunford, A. *et al.* Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat. Genet.* 49, 10–16 (2017).
131. Shriver, S. P. *et al.* Sex-Specific Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor: Relationship to Smoking History and Risk of Lung Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 92, 24–33 (2000).
132. Bellott, D. W. *et al.* Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508, 494–499 (2014).

133. Johnston, C. M. *et al.* Large-Scale Population Study of Human Cell Lines Indicates that Dosage Compensation Is Virtually Complete. *PLOS Genet.* 4, e9 (2008).
134. Horvath, L. M., Li, N. & Carrel, L. Deletion of an X-inactivation boundary disrupts adjacent gene silencing. *PLoS Genet.* 9, e1003952 (2013).
135. Frankish, A. *et al.* GENCODE 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D916–D923 (2021).
136. Morales, J. *et al.* A joint NCBI and EMBL-EBI transcript set for clinical genomics and research. *Nature* 604, 310–315 (2022).
137. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D480–D489 (2021).
138. Urbitsch, P., Salzer, M. J., Hirschmann, P. & Vogt, P. H. Arylsulfatase D gene in Xp22.3 encodes two protein isoforms. *DNA Cell Biol.* 19, 765–773 (2000).
139. Parenti, G., Meroni, G. & Ballabio, A. The sulfatase gene family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 386–391 (1997).
140. Sjöstedt, E. *et al.* An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* 367, eaay5947 (2020).
141. Fabregat, A. *et al.* Reactome graph database: Efficient access to complex pathway data. *PLoS Comput. Biol.* 14, e1005968 (2018).
142. Warde-Farley, D. *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 38, W214–220 (2010).
143. van Rappard, D. F., Boelens, J. J. & Wolf, N. I. Metachromatic leukodystrophy: Disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 261–273 (2015).
144. Lakhota, S., Sharma, A., Shrivastava, G. P. & Jain, S. K. Maroteaux-Lamy syndrome. *Indian J. Pediatr.* 71, 933–935 (2004).
145. Zhang, L., Hu, H., Liang, D., Li, Z. & Wu, L. Prenatal Diagnosis in a Fetus With X-Linked Recessive Chondrodysplasia Punctata: Identification and Functional Study of a Novel Missense Mutation in ARSE. *Front. Genet.* 12, 722694 (2021).

146. Bartke, N. & Hannun, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S91-96 (2009).
147. Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. & Hannun, Y. A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* 20, 1010–1018 (2008).
148. Paciotti, S., Albi, E., Parnetti, L. & Beccari, T. Lysosomal Ceramide Metabolism Disorders: Implications in Parkinson's Disease. *J. Clin. Med.* 9, 594 (2020).
149. Ogretmen, B. & Hannun, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 604–616 (2004).
150. Ekiz, H. A. & Baran, Y. Therapeutic applications of bioactive sphingolipids in hematological malignancies. *Int. J. Cancer* 127, 1497–1506 (2010).
151. Bhattacharyya, S., Feferman, L., Terai, K., Dudek, A. Z. & Tobacman, J. K. Decline in arylsulfatase B leads to increased invasiveness of melanoma cells. *Oncotarget* 8, 4169–4180 (2016).
152. Bhattacharyya, S. & Tobacman, J. K. Steroid sulfatase, arylsulfatases A and B, galactose-6-sulfatase, and iduronate sulfatase in mammary cells and effects of sulfated and non-sulfated estrogens on sulfatase activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 20–34 (2007).
153. Bahramian, S. *et al.* Evaluation of Arylsulfatase D (ARSD) and long noncoding RNA ARSD-AS1 gene expression in breast cancer patients and their association with oncogenic transcription factors. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 25, 1805–1813 (2020).
154. Lin, Y. *et al.* ARSD, a novel ER α downstream target gene, inhibits proliferation and migration of breast cancer cells via activating Hippo/YAP pathway. *Cell Death Dis.* 12, 1042 (2021).
155. Lin, Y., Fan, L., Zhang, R., Pan, H. & Li, Y. ARSD is responsible for carcinoma and amyloidosis of breast epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 101, 151199 (2022).
156. Allain, E. P. *et al.* Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in

- chronic lymphocytic leukemia patients. *Ann. Hematol.* 97, 1649–1661 (2018).
157. Bagger, F. O. *et al.* BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res.* 44, D917-924 (2016).
 158. Trojani, A. *et al.* Gene expression profiling identifies ARSD as a new marker of disease progression and the sphingolipid metabolism as a potential novel metabolism in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* 11, 15–28 (2011).
 159. Haverty, P. M. *et al.* Reproducible pharmacogenomic profiling of cancer cell line panels. *Nature* 533, 333–337 (2016).
 160. Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823 (2006).
 161. Nakatsu, N. *et al.* Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol. Cancer Ther.* 4, 399–412 (2005).
 162. Quentmeier, H. *et al.* The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci. Rep.* 9, 8218 (2019).
 163. Lanemo Myhrinder, A. *et al.* Molecular characterization of neoplastic and normal “sister” lymphoblastoid B-cell lines from chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 54, 1769–1779 (2013).
 164. Rosén, A. *et al.* Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection. *Oncoimmunology* 1, 18–27 (2012).
 165. Stacchini, A. *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk. Res.* 23, 127–136 (1999).
 166. Grywalska, E. *et al.* Programmed cell death 1 expression and Epstein-Barr virus infection in chronic lymphocytic leukaemia: a prospective cohort study. *Cancer Manag. Res.* 11, 7605–7618 (2019).

167. Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative ‘null’ and ‘T’ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621–626 (1977).
168. Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 301–308 (2004).
169. Bloembergen, D., Darin, M., McComb, S., & Weeratna, R. Building a better CAR: emerging high-throughput in vitro tools for CAR selection and optimization. *BioInsights* (2019).
170. Boucher, J. C. *et al.* CD28 Costimulatory Domain–Targeted Mutations Enhance Chimeric Antigen Receptor T-cell Function. *Cancer Immunol. Res.* 9, 62–74 (2021).
171. Duong, C. P. M. *et al.* Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach. *PLoS ONE* 8, e63037 (2013).
172. Alonso-Camino, V., Sánchez-Martín, D., Compe, M. & Álvarez-Vallina, L. S., Luis. Lymphocyte Display: A Novel Antibody Selection Platform Based on T Cell Activation. *PLoS ONE* 4, e7174 (2009).
173. Huang, Z. *et al.* Engineering light-controllable CAR T cells for cancer immunotherapy. *Sci. Adv.* 6, eaay9209 (2020).
174. Hassani, M. *et al.* Engineered Jurkat Cells for Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen on Prostate Cancer Cells by Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptor. *Iran. Biomed. J.* 24, 81–88 (2020).
175. Bloembergen, D. *et al.* A High-Throughput Method for Characterizing Novel Chimeric Antigen Receptors in Jurkat Cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 16, 238–254 (2020).
176. Hille, F. *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 172, 1239–1259 (2018).
177. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832 (2013).

178. Liu, H. *et al.* CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 3676–3678 (2015).
179. Labun, K. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 47, W171–W174 (2019).
180. Concordet, J.-P. & Haeussler, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 46, W242–W245 (2018).
181. Oliveros, J. C. *et al.* Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, W267–W271 (2016).
182. Naeem, M., Majeed, S., Hoque, M. Z. & Ahmad, I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells* 9, 1608 (2020).
183. Shen, B. *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods* 11, 399–402 (2014).
184. Gopalappa, R., Suresh, B., Ramakrishna, S. & Kim, H. (Henry). Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption. *Nucleic Acids Res.* 46, e71 (2018).
185. Vakulskas, C. A. & Behlke, M. A. Evaluation and Reduction of CRISPR Off-Target Cleavage Events. *Nucleic Acid Ther.* 29, 167–174 (2019).
186. Liang, X. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* 208, 44–53 (2015).
187. Palmer, D. & Ng, P. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 8, 846–852 (2003).
188. Hartman, Z. C., Appledorn, D. M. & Amalfitano, A. Adenovirus vector induced Innate Immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.* 132, 1–14 (2008).

189. Srivastava, A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 21, 75–80 (2016).
190. Pauwels, K. *et al.* State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr. Gene Ther.* 9, 459–474 (2009).
191. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173–1183 (2013).
192. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* 154, 442–451 (2013).
193. Maeder, M. L. *et al.* CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* 10, 977–979 (2013).
194. Konermann, S. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583–588 (2015).
195. Klein, U. *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 17, 28–40 (2010).
196. Simonetti G, Bertilaccio MT, Ghia P, Klein U. Mouse models in the study of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and therapy. *Blood.* 2014 Aug 14;124(7):1010-9.
197. Bichi, R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6955–6960 (2002).
198. Planelles, L. *et al.* APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* 6, 399–408 (2004).
199. Katsumata, M. *et al.* Differential effects of Bcl-2 on T and B cells in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11376–11380 (1992).
200. Dubey, M. & Ph.D. FDA-Approved CAR T Therapy Evaluated in NSG Mice. *The Jackson Laboratory.* <https://www.jax.org/news-and-insights/> (2018).
201. Shultz, L. D., Ishikawa, F. & Greiner, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 118–130 (2007).

202. Shultz, L. D. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6477–6489 (2005).
203. Walker, C. & Streisinger, G. Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics* 103, 125–136 (1983).
204. Guerra-Varela, J. *et al.* ‘A Zebra in the Water’: Inspiring Science in Spain. *Zebrafish* 13, 241–247 (2016).
205. Rakus, K. *et al.* Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for the viral infections of fish. *J. Fish Dis.* 42, 923–934 (2019).
206. Avdesh, A. *et al.* Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J. Vis. Exp. JoVE* e4196 (2012).
207. Lee, L. M. J., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A. & Hendrix, M. J. C. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 1560–1570 (2005).
208. Tulotta, C. *et al.* Imaging of Human Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Micrometastasis in a Zebrafish Xenogeneic Engraftment Model. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1451, 155–169 (2016).
209. Mercatali, L. *et al.* Development of a Patient-Derived Xenograft (PDX) of Breast Cancer Bone Metastasis in a Zebrafish Model. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E1375 (2016).
210. Drabsch, Y., He, S., Zhang, L., Snaar-Jagalska, B. E. & ten Dijke, P. Transforming growth factor- β signalling controls human breast cancer metastasis in a zebrafish xenograft model. *Breast Cancer Res. BCR* 15, R106 (2013).
211. Veinotte, C. J., Dellaire, G. & Berman, J. N. Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Dis. Model. Mech.* 7, 745–754 (2014).

212. Nicoli, S. & Presta, M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat. Protoc.* 2, 2918–2923 (2007).
213. Tang, Q. *et al.* Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish. *Nat. Methods* 11, 821–824 (2014).
214. Zhao, S., Huang, J. & Ye, J. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 34, 80 (2015).
215. Rajan, V., Dellaire, G. & Berman, J. N. Modeling Leukemogenesis in the Zebrafish Using Genetic and Xenograft Models. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1451, 171–189 (2016).
216. Cabezas-Sainz, P. *et al.* Morphological Abnormalities and Gene Expression Changes Caused by High Incubation Temperatures in Zebrafish Xenografts with Human Cancer Cells. *Genes* 12, 113 (2021).
217. Pascoal, S. *et al.* A Preclinical Embryonic Zebrafish Xenograft Model to Investigate CAR T Cells in Vivo. *Cancers* 12, 567 (2020).
218. He, X. *et al.* Visualization of human T lymphocyte-mediated eradication of cancer cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 22910–22919 (2020).
219. Pulte, D. *et al.* Trends in survival of chronic lymphocytic leukemia patients in Germany and the USA in the first decade of the twenty-first century. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 9, 28 (2016).
220. www.cdn.origene.com. Recommended lentivirus MOI for common cell lines.
221. Lahmidi, S., Strunk, U., Smiley, J. R., Pearson, A. & Duplay, P. Herpes simplex virus 1 infection of T cells causes VP11/12-dependent phosphorylation and degradation of the cellular protein Dok-2. *Virology* 511, 66–73 (2017).
222. Fernández-Ponce, C. *et al.* Ultrastructural Localization and Molecular Associations of HCV Capsid Protein in Jurkat T Cells. *Front. Microbiol.* 8, (2018).
223. Boso, G. & Somia, N. V. Characterization of Resistance to Rhabdovirus and Retrovirus Infection in a Human Myeloid Cell Line. *PLoS ONE* 10, e0121455 (2015).

224. Liu, H. *et al.* CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 3676–3678 (2015).
225. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio* (Brachydanio) rerio. <https://norecopa.no/textbase/a-guide-for-the-laboratory-use-of-zebrafish-danio-brachydanio-rerio>.
226. Cao, J. *et al.* An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. *Nucleic Acids Res.* 660 (2016).
227. Rosenbluh, J. *et al.* Complementary information derived from CRISPR Cas9 mediated gene deletion and suppression. *Nat. Commun.* 8, 15403 (2017).
228. Stringer, B. W. *et al.* A reference collection of patient-derived cell line and xenograft models of proneural, classical and mesenchymal glioblastoma. *Sci. Rep.* 9, 4902 (2019).
229. Gorzynski, J. E. *et al.* Ultrarapid Nanopore Genome Sequencing in a Critical Care Setting. *N. Engl. J. Med.* 386, 700–702 (2022).
230. Quijada-Álamo, M. *et al.* CRISPR/Cas9-generated models uncover therapeutic vulnerabilities of del(11q) CLL cells to dual BCR and PARP inhibition. *Leukemia* 34, 1599–1612 (2020).
231. Hirakawa, M. P., Krishnakumar, R., Timlin, J. A., Carney, J. P. & Butler, K. S. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Biosci. Rep.* 40, BSR20200127 (2020).
232. Bunnik, E. M. & Le Roch, K. G. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Adv. Wound Care* 2, 490–498 (2013).
233. Wassef, M. *et al.* Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods San Diego Calif* 121–122, 45–54 (2017).
234. Li, B., Ren, N., Yang, L., Liu, J. & Huang, Q. A qPCR method for genome editing efficiency determination and single-cell clone screening in human cells. *Sci. Rep.* 9, 18877 (2019).
235. Cosenza, L. C. *et al.* Efficient CRISPR-Cas9-based genome editing of β -globin gene on erythroid cells from homozygous β 039-thalassemia patients. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 21, 507–523 (2021).

236. Herskovitz, J. *et al.* CRISPR-Cas9 Mediated Exonic Disruption for HIV-1 Elimination. *eBioMedicine* 73, (2021).
237. Atkins, A. *et al.* Off-Target Analysis in Gene Editing and Applications for Clinical Translation of CRISPR/Cas9 in HIV-1 Therapy. *Front. Genome Ed.* 3, 673022 (2021).
238. Malinin, N. L. *et al.* Defining genome-wide CRISPR-Cas genome-editing nuclease activity with GUIDE-seq. *Nat. Protoc.* 16, 5592–5615 (2021).
239. Gilbert, L. A. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159, 647–661 (2014).
240. Wang, X. *et al.* Transcriptional repression of endogenous genes in BmE cells using CRISPRi system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 111, 103172 (2019).
241. Mandegar, M. A. *et al.* CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs. *Cell Stem Cell* 18, 541–553 (2016).
242. Agrawal, N. *et al.* RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 67, 657–685 (2003).
243. Manghwar, H. *et al.* CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* 7, 1902312 (2020).
244. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).
245. Rozovski, U., Keating, M. J. & Estrov, Z. Why Is the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Mutation Status a Prognostic Indicator in Chronic Lymphocytic Leukemia? *Acta Haematol.* 140, 51–54 (2018).
246. Quijada-Álamo, M. *et al.* Dissecting the role of TP53 alterations in del(11q) chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Transl. Med.* 11, e304 (2021).
247. Pruvot, B. *et al.* Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica* 96, 612–616 (2011).
248. Bentley, V. L. *et al.* Focused chemical genomics using zebrafish xenotransplantation as a pre-clinical therapeutic platform for T-

- cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 70–76 (2015).
249. Advani, R. H. *et al.* Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 88–94 (2013).
 250. O’Brien, S. *et al.* Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol.* 17, 1409–1418 (2016).
 251. O’Brien, S. *et al.* Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood* 131, 1910–1919 (2018).
 252. Mato, A. R. *et al.* Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica* 103, 874–879 (2018).
 253. Berglöf, A. *et al.* Targets for Ibrutinib Beyond B Cell Malignancies. *Scand. J. Immunol.* 82, 208–217 (2015).
 254. Bilancio, A. *et al.* Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. *Blood* 107, 642–650 (2006).
 255. Herman, S. E. M. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116, 2078–2088 (2010).
 256. Brown, J. R. *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123, 3390–3397 (2014).
 257. Woyach, J. A. *et al.* BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 1437–1443 (2017).
 258. Ahn, I. E. *et al.* Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 129, 1469–1479 (2017).

259. Murali, I. *et al.* Activation of the MAPK pathway mediates resistance to PI3K inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 138, 44–56 (2021).
260. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–733 (2011).
261. Ledford, H. Last-resort cancer therapy holds back disease for more than a decade. *Nature* 602, 196 (2022).
262. Chmielewski, M. & Abken, H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 1145–1154 (2015).
263. Razeghian, E. *et al.* A deep insight into CRISPR/Cas9 application in CAR-T cell-based tumor immunotherapies. *Stem Cell Res. Ther.* 12, 428 (2021).
264. Zhao, Z. *et al.* CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget* 9, 5208–5215 (2017).
265. Kawalekar, O. U. *et al.* Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 44, 380–390 (2016).
266. Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F. & Zhang, X. Engineering CAR-T cells. *Biomark. Res.* 5, 22 (2017).
267. Transfection of mammalian cells by electroporation. *Nat. Methods* 3, 67–68 (2006).
268. Dullaers, M. *et al.* Side-by-side comparison of lentivirally transduced and mRNA-electroporated dendritic cells: implications for cancer immunotherapy protocols. *Mol. Ther.* 10, 768–779 (2004).
269. Mitchell, M. J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 101–124 (2021).
270. Billingsley, M. M. *et al.* Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. *Nano Lett.* 20, 1578–1589 (2020).
271. Prommersberger, S. *et al.* CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther.* 28, 560–571 (2021).

272. Sharma, N. *et al.* Efficient sleeping beauty DNA transposition from DNA minicircles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e74 (2013).
273. An, N. *et al.* Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells. *Oncotarget* 7, 10638–10649 (2016).
274. Mancikova, V. *et al.* Performance of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in genetically defined classes of chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunother. Cancer* 8, e000471 (2020).
275. Hay, K. A. *et al.* Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor–modified T-cell therapy. *Blood* 130, 2295–2306 (2017).
276. Frey, N. V. *et al.* Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 38, 2862–2871 (2020).
277. Fraietta, J. A. *et al.* Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 127, 1117–1127 (2016).
278. Gauthier, J. *et al.* Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure. *Blood* 135, 1650–1660 (2020).
279. Siddiqi, T. *et al.* Phase 1 TRANSCEND CLL 004 study of lisocabtagene maraleucel in patients with relapsed/refractory CLL or SLL. *Blood* 139, 1794–1806 (2022).
280. Huhn, D. *et al.* Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98, 1326–1331 (2001).
281. Zah, E., Lin, M.-Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M. C. & Chen, Y. Y. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol. Res.* 4, 498–508 (2016).
282. Alvarez-Fernández, C. *et al.* Memory stem T cells modified with a redesigned CD30-chimeric antigen receptor show an enhanced antitumor effect in Hodgkin lymphoma. *Clin. Transl. Immunol.* 10, e1268 (2021).

283. Sportoletti, P. *et al.* NK Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6665 (2021).
284. Grote, S. *et al.* Adapter chimeric antigen receptor (AdCAR)-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for universal tumor targeting. *Oncoimmunology* 9, 1825177 (2020).
285. Liu, E. *et al.* Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N. Engl. J. Med.* 382, 545–553 (2020).

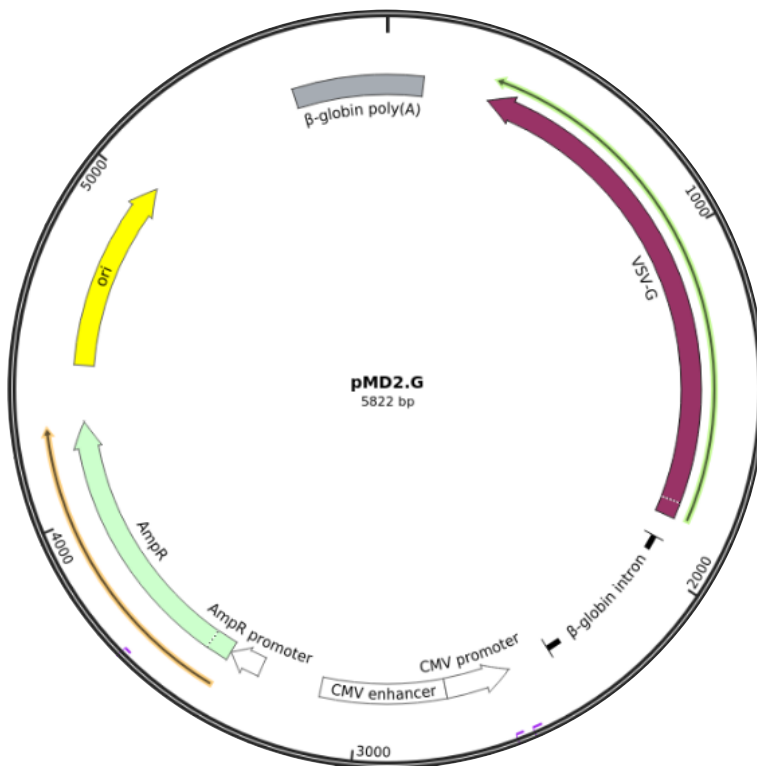
ANEXOS

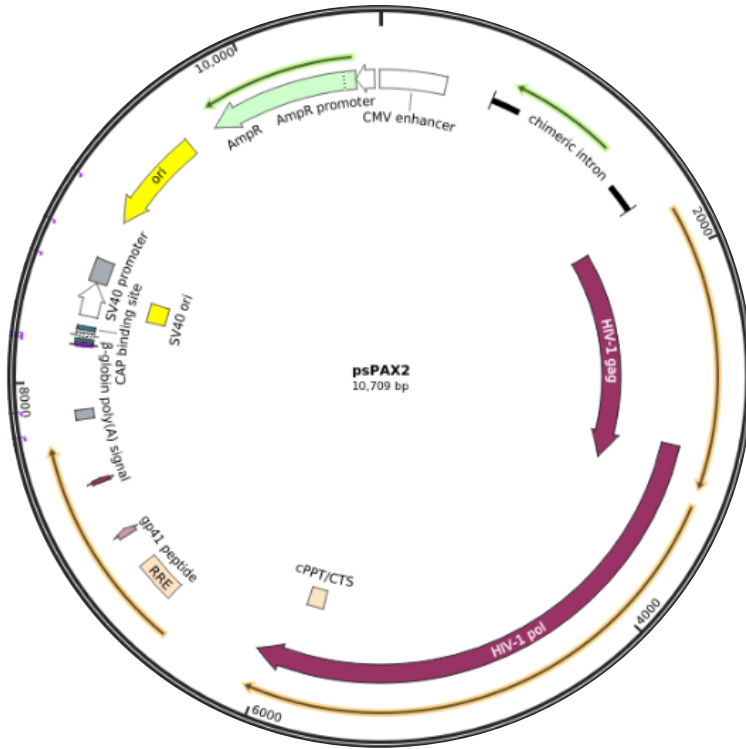
9. ANEXOS

9.1. ESQUEMA PLÁSMIDOS EMPLEADOS

9.1.1. Sistema de empaquetamiento viral.

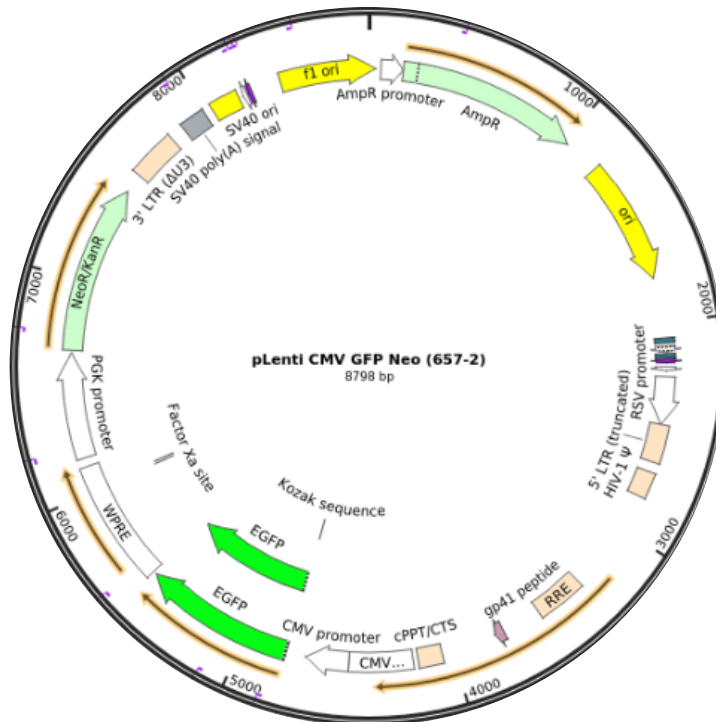
El sistema de empaquetamiento viral está compuesto por los plásmidos pMD2.G (Addgene#12259) y psPAX2 (Addgene#12260):





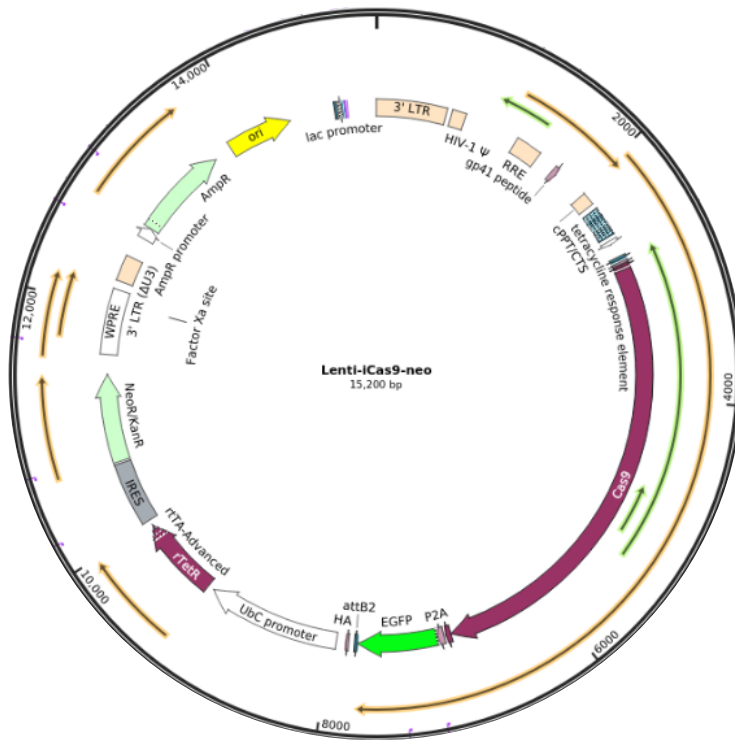
9.1.2. Plásmidos de transferencia.

Para la titulación viral se empleó el plásmido pLenti CMV GFP Neo (Addgene#657):

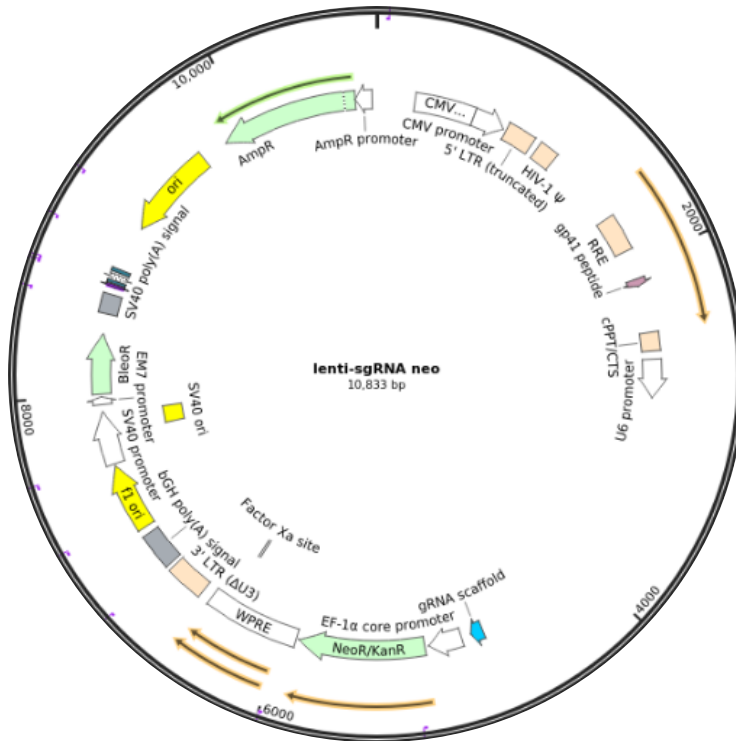


El vector de transferencia para dCas9 fue el plásmido pLX_311_KRAB-dCas9 (Addgene# 96918), para iCas9 el vector empleado fue Lenti iCas9-Neo (Addgene#85400):

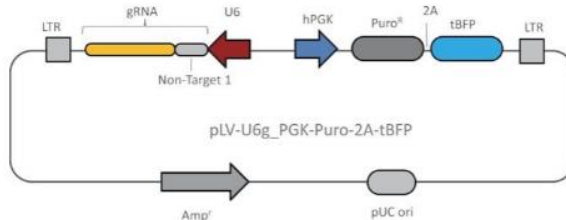




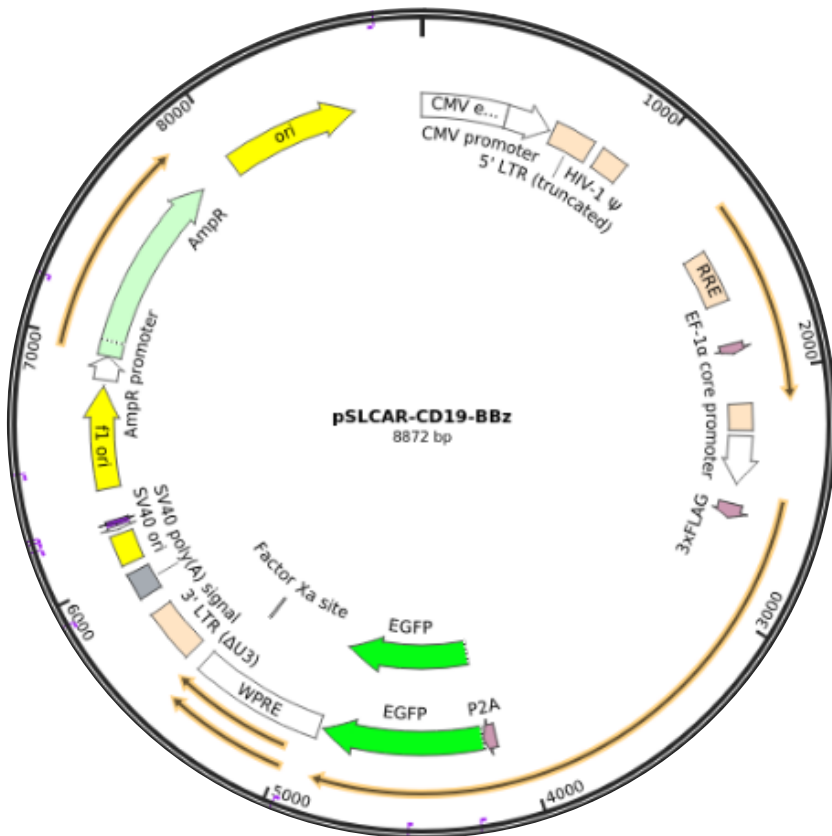
Para incluir las guías empleadas para generar la línea celular HG-3 Knock-down para el gen ARSD, se empleó el vector de transferencia pLenti sgRNA-Neo (Addgene#104992):



Las guías para generar la línea celular HG-3 Knock-out para el gen ARSD fueron integradas comercialmente por Sigma-Merck en el vector de transferencia LV04.



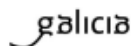
Para integrar el CAR anti CD19 en la línea celular Jurkat se empleó el vector de transferencia pSLCAR-CD19-BBz (Addgene#135992).



9.2. AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO 2020-2025



Xefatura territorial de Lugo
Servizo de Gandería
Ronda da Muralla, 70
Lugo



RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 01/20/LU-003
Interesado: **Ana Quelle Regaldie**
Procedemento: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
Data de inicio: 1 de marzo de 2020
Forma de inicio: solicitude da interesada

ANTECEDENTES

A interesada, como responsable do proxecto “**El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente**” presentou con data 12 de febreiro de 2020 solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto : El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente

Nome do centro usuario: Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).

Persoa responsable do proxecto: Ana Quelle Regaldie

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo) Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).

Clasificación do proxecto : Tipo III.

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

Artigo 88 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE núm. 236, do 2 de outubro) establece que a resolución que poña fin ao procedemento decidirá todas as cuestións formuladas polos interesados e aquelas outras derivadas del.

Esta xefatura territorial é competente para ditar resolución de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009, do 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural. O Servizo Provincial de Gandería de Lugo revisou a documentación presentada coa solicitude e visto o informe favorable da avaliación do proxecto, de data 30 de xaneiro de 2020 emitido polo órgano habilitado, e o Comité de Ética da Universidade de Santiago de Compostela, esta xefatura territorial resolve AUTORIZAR o proxecto solicitado.

Publicado en 2021
Tráxese do sitio web de Galicia



Xacobeo 2021

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 ANOS e unha vez que transcorran deberán renovala.

A autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandería.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme cos artigos 121 e 122 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas.

Documento asinado electronicamente á marxe

Antonio José GLEZANS FONTAL, MANUA OLGA
Código Verificación:
00000000 12 40044

9.3. INFORME COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEAA)



VICERREITORADO DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur
15702 Gariño de Compostela
Tel: 981 547 040 - Fax: 981 547 077
Correo electrónico: ceftto@usc.es
<http://www.usc.es>

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo, tras evaluar el Proyecto titulado “El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente” del que es Investigadora responsable D^a. Ana Quelle Regaldie, acordó con fecha 30 de enero de 2020 emitir

INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho Proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario de la Facultad de Veterinaria, con número de registro ES270280346401 (AE-LU-003), y siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa (en concreto, en relación con el artículo 27.2 y el apartado 1.b de la cláusula de salvaguarda enunciada en la disposición adicional segunda).

En Lugo, a 30 de enero de 2020

Fdo.: La presidenta

Sonia Vázquez Rodríguez

*Supervisora das instalacións de experimentación,
cria e subministro de animais de laboratorio da
Universidade de Santiago de Compostela*

Responsable administrativo:	Nombre: Montserrat Valcárcel Armesto Cargo: Vicerreitora de Coordinación do Campus de Lugo	VºBº Firma y sello
-----------------------------	---	------------------------

9.4. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de leucemias y linfomas.	33
Tabla 2: Estimación nuevos casos y muertes de todos los cánceres y leucemia para el año 2022. Fuente	35
Tabla 3: Estadiajes clínicos de la LLC según el Sistema Rai.	41
Tabla 4: Estadiajes clínicos de la LLC según el Sistema Binet.....	42
Tabla 5: Grupos de riesgo en LLC-IPI.	47
Tabla 6: Primera línea de tratamiento de LLC. (Guía nacional de LLC).	49
Tabla 7: Tratamientos propuestos para pacientes con LLC R/R. (Guía nacional de LLC)	54
Tabla 8: Descripción de los SNVs en <i>ARSD</i> ¹²³	60
Tabla 9: Frecuencias alélicas SNVs <i>ARSD</i>	61
Tabla 10: Plásmidos empleados	92
Tabla 11: Estimación UT producidas mediante el sistema GoStix. ...	98
Tabla 12: Anticuerpos en la inmunodetección.	105
Tabla 13: Reacción PCR.	107
Tabla 14: Cebadores empleados en PCR y secuenciación.	107
Tabla 15: Reacción de retrotranscripción.	112
Tabla 16: Reacción <i>PrimeTime Probe</i>	113
Tabla 17: <i>TimePrime Probes</i> empleadas en qPCR.....	114
Tabla 18: Cebadores empleados en la secuenciación de los posibles <i>off-targets</i>	115
Tabla 19: Componentes de la reacción de digestión enzimática (BsmBI).	118
Tabla 20: Reacción formación oligodúplex.....	120
Tabla 21: Reacción ligación.	120
Tabla 22: Cebadores empleados en la verificación del clonaje.....	121
Tabla 23: Reacción qPCR <i>SYBR Green</i>	123
Tabla 24: Cebadores empleados en la qPCR <i>SYBR Green</i>	124
Tabla 25: sgRNAs diseñadas para el knock-out del gen <i>ARSD</i> y posibles <i>off-targets</i>	146
Tabla 26: sgRNAs diseñadas para el knock-down del gen <i>ARSD</i> y posibles <i>off-targets</i>	153

9.5. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia en porcentaje de la LLC.....	36
Figura 2: Supervivencia en porcentaje de la LLC.....	37
Figura 3: Incidencia en porcentaje de la LLC según la ascendencia....	38
Figura 4: Supervivencia a 5 años para pacientes con LLC según el año de diagnóstico	48
Figura 5: Estructura CAR en <i>Yescarta</i> (<i>Kite Pharma</i>) y <i>Kymriah</i> (<i>Novartis</i>).....	56
Figura 6: Proceso general de la terapia CAR-T.....	57
Figura 7: Expresión del gen <i>ARSD</i> en distintos órganos humanos.....	65
Figura 8: Expresión del gen <i>ARSD</i> en células del sistema inmune.....	65
Figura 9: Activación de la proteína <i>ARSD</i> en el retículo endoplasmático.....	66
Figura 10: Interacciones propuestas para la proteína <i>ARSD</i>	67
Figura 11: Vías de producción de ceramida en los lisosomas.....	68
Figura 12: Expresión del gen <i>ARSD</i> en pacientes del estudio MILE....	70
Figura 13: Línea celular HG-3 en cultivo.....	73
Figura 14: Componentes del sistema CRISPR.....	75
Figura 15: Mecanismos de reparación celular frente a DSBs.....	76
Figura 16: Acción de la enzima SpCas9 <i>versus</i> SpCas9-nickasa.....	77
Figura 17: Representación de los sistemas CRISPRi y CRISPRa.....	79
Figura 18: Sistema de empaquetamiento viral de segunda generación.	91
Figura 19: Determinación de la titulación viral mediante citometría...	95
Figura 20: MOI de la línea celular HG-3.....	99
Figura 21: Curvas de muerte obtenidas por exposición de antibióticos de selección de la línea celular HG-3 a 7 días.....	101
Figura 22: Temperaturas y tiempos empleados en PCR.....	108
Figura 23: Esquema de la metodología de qPCR <i>PrimeTime</i>	113
Figura 24: Esquema del proceso de clonación de las sgrNAs en el vector de transferencia lentiviral.....	118
Figura 25: Oligonucleótidos para la ligación con el vector de transferencia.....	119
Figura 26: Esquema de la metodología de qPCR <i>SYBR Green</i>	123
Figura 27: Positividad/negatividad en CD19 (PE) mediante citometría.....	130
Figura 28: Estrategia de gating empleada en citometría de flujo.....	131

Figura 29: Estudio de la inducción del promotor de Cas9.....	137
Figura 30: <i>Western blot</i> de la proteína Cas9 en la línea celular HG-3-iCas9.....	138
Figura 31: Guías para el <i>knock-out</i> del gen <i>ARSD</i>	139
Figura 32: Análisis de contribuciones-sgRNA Exón 3 (ICE Analysis).....	140
Figura 33: Análisis de contribuciones -sgRNA Exón 5 (ICE Analysis).....	140
Figura 34: Distribución de indels en función de su tamaño-sgRNA Exón 3 (ICE Analysis).....	141
Figura 35: Distribución de indels en función de su tamaño-sgRNA Exón 5 (ICE Analysis).....	141
Figura 36: Gráfico de discordancia- sgRNA Exón 3 (ICE Analysis) ..	142
Figura 37: Gráfico de discordancia-sgRNA Exón 5 (ICE Analysis) ..	142
Figura 38: Selección de clones mediante secuenciación Sanger.....	144
Figura 39: Expresión de <i>ARSD</i> en clones <i>knock-out</i>	145
Figura 40: Secuencias Sanger de posibles <i>off-targets</i> -sgRNA Exón 3.....	147
Figura 41: Secuencias Sanger de posibles <i>off-targets</i> -sgRNA Exón 5.....	148
Figura 42: <i>Western blot</i> de la proteína dCas9 en la línea celular HG-3-dCas9.....	149
Figura 43: Guías para el <i>knock-down</i> del gen <i>ARSD</i>	150
Figura 44: Expresión del gen <i>ARSD</i> en <i>bulks</i> celulares <i>knock-down</i> ..	151
Figura 45: Expresión del gen <i>ARSD</i> en clones <i>knock-down</i>	152
Figura 46: Expresión de los genes posibles <i>off-targets</i>	154
Figura 47: Efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en la proliferación celular mediante conteo celular.....	156
Figura 48: Efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en la proliferación celular mediante ensayo MTT.....	158
Figura 49: Embriones de pez cebra xenoinjertados con las células HG-3 y HG-3 ^{Kd-ARSD} clones 1 y 3 a 4 dpi.....	160
Figura 50: Embriones de pez cebra xenoinjertados con las células HG-3 y HG-3 ^{Kd-ARSD} clones 1 y 3 a 6 dpi.....	161

Figura 51: Efecto de la infraexpresión del gen <i>ARSD</i> en el <i>fold change</i> proliferativo mediante ensayo <i>xenograft</i> en pez cebra.....	162
Figura 52: Efecto de la expresión diferencial del gen <i>ARSD</i> en respuesta al tratamiento con ibrutinib e idelalisib.....	163
Figura 53: Expresión de GFP de la línea celular Jurkat con el CAR anti CD19-GFP.....	164
Figura 54: Imagen de la expresión de GFP de la línea celular CAR anti CD19-GFP.....	165
Figura 55: Activación específica de las células CAR anti CD19.....	166
Figura 56: Medidas de intensidad de expresión en CD69 de las células CAR-T.....	167
Figura 57: Citotoxicidad de las células CAR-T en ratio 1:1.....	168
Figura 58: Viabilidad de células CD19 ⁺ ratio 1:1.....	168
Figura 59: Imágenes del cocultivo de células CAR-T.....	169
Figura 60: Citotoxicidad de las células CAR-T en ratio 5:1.....	169
Figura 61: Viabilidad de células CD19 ⁺ ratio 5:1.....	170
Figura 62: Imágenes del cocultivo de células CAR-T.....	170
Figura 63: Flujo de trabajo propuesto en la plataforma.....	173



La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B caracterizada por el crecimiento clonal y acumulación de células B típicamente CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺ y CD23⁺ en la médula ósea, sangre y órganos linfoides. El objetivo general de esta tesis es sentar las bases para la generación de una plataforma que permita afrontar los retos que supone la interpretación biomédica de la gran cantidad de datos generados tras tecnologías-ÓMICAS. En esta dirección, como prueba de concepto, se lleva a cabo la generación de modelos celulares knock-down/-out para el gen ARSD mediante CRISPR, a partir de la línea celular HG-3. Además, se desarrollan estudios comparativos de proliferación así como de respuesta a terapia celular dirigida con el objetivo de discernir la posible implicación de ARSD en el contexto de la enfermedad.