



# **UNIVERSIDAD DEL SURESTE**

## **ESCUELA DE MEDICINA**

**“CRIPR/ CAS9 PARA LA DETECCION DEL  
CANCER”**

**Materia: BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CLINICA**

**Presenta: Melanny Guadalupe Román Salazar**

**Dr. Hugo Najera Mijangos**

**Semestre: 8°**

**Grupo: “A”**

**Comitán de Domínguez, Chiapas a de 5 de marzo del 2021**

# **Direccionamiento in vivo CRISPR / Cas9 de oncogenes de fusión para la eliminación selectiva de células cancerosas**

Los oncogenes de fusión (FO) son comunes en muchos tipos de cáncer y son impulsores poderosos del desarrollo de tumores. Debido a que su expresión es exclusiva de las células cancerosas y su eliminación induce la apoptosis celular en los cánceres impulsados por FO, los FO son dianas terapéuticas atractivas. Sin embargo, es un desafío apuntar específicamente a los productos quiméricos resultantes. Basado en la tecnología CRISPR / Cas9, aquí diseñamos una estrategia de edición de genes simple, eficiente y no específica del paciente a través de la selección de dos intrones de los genes involucrados en el reordenamiento, lo que permite una interrupción robusta del FO específicamente en células cancerosas. Como prueba de concepto de su potencial, demostramos la eficacia de la orientación basada en intrones de factores de transcripción o FO de tirosina quinasa en la reducción de la carga tumoral / mortalidad en modelos in vivo.

En el contexto de la terapia génica del cáncer, está claro que dirigirse a un solo gen a menudo es insuficiente para eliminar las células cancerosas; sin embargo, muchos tipos de cánceres son adictos a la presencia de un solo evento oncogénico que puede reprogramar las células desregulando las moléculas y (epi)-genéticas<sup>2</sup> e iniciar la tumorigénesis. Este es el caso de los denominados oncogenes de fusión (FO), que son genes quiméricos resultantes de fusiones en marco de las secuencias codificantes de dos genes implicados en un reordenamiento cromosómico<sup>3</sup>. Si bien la naturaleza de los FO puede ser diversa, se clasifican principalmente en factores de transcripción o tirosina quinasas que involucran.

Los FO son hallazgos genómicos recurrentes en el cáncer humano y se caracterizan por puntos de corte genómicos específicos del paciente que ocurren en regiones intrónicas, que rara vez alteran las secuencias codificantes. El análisis de los datos de The Cancer Genome Atlas sugiere que los OC impulsan el desarrollo de más del 16% de los cánceres humanos<sup>8</sup>, incluidos los cánceres mesodérmicos (típicamente leucemias, linfomas y sarcomas). También se han encontrado FO en cánceres epiteliales, incluidos los de próstata<sup>9</sup>, colorrectal<sup>10</sup>, mama<sup>11</sup> o melanoma<sup>12</sup>, y hasta la fecha se han identificado más de 350 FO recurrentes que involucran > 300 genes diferentes.

Tecnología Regularmente / basados en Cas9 Interspaced Short palindrómica Repeats (CRISPR) en clúster ha revolucionado genoma edición de células de mamífero, y puede generar roturas en cualquier ubicación deseada en los nuevos horizontes genoma de apertura para gen terapéutico de edición para las mutaciones monogénicas o somáticas correctas apuntado.

Los mismos dos RNA de guía únicos (sgRNA) permiten el direccionamiento de diferentes isoformas o cada punto de corte específico del paciente de un FO dado y, por lo tanto, es un enfoque universal para los FO asociados al cáncer. El análisis *in vitro* y los modelos de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) muestran que la administración de componentes CRISPR / Cas9 dirigidos a un FO da como resultado un control del crecimiento tumoral específico y eficaz. Nuestros hallazgos proporcionan una prueba de concepto para una estrategia de edición del genoma altamente eficiente y sin puntos de interrupción específica que se dirige a los FO como un enfoque innovador para la eliminación selectiva de células cancerosas.

## **Resultados**

La focalización intrónica mediada por CRISPR permite la interrupción de FO

Nuestro fundamento fue idear un enfoque de edición del genoma para interrumpir específicamente los FO en las células cancerosas que cumpla con dos criterios estrictos: i) no afectaría las secuencias exónicas o la expresión de los alelos de tipo salvaje involucrados en el reordenamiento, y ii) sería factible independientemente de la isoforma FO o del punto de corte específico del paciente. Para probar este enfoque, primero usamos un modelo celular de sarcoma de Ewing, uno de los cánceres más comunes en niños / adolescentes caracterizado por una translocación cromosómica que fusiona el dominio de transactivación de la proteína de unión al ARN EWSR1 con el dominio de unión al ADN de una Proteína ETS, más comúnmente FLI1. La fusión EWSR1-FLI1 (EF) actúa como factor de transcripción dominante y las células son adictas a la expresión de EF 27, 28, 29. Existen dos isoformas EF principales que fusionan el exón 7 de *EWSR1* con el exón 5 (EF tipo 2) o el exón 6 de *FLI1* (EF tipo 1)

### **La eliminación mediada por CRISPR reduce selectivamente los productos FO**

Primero examinamos la capacidad de LVCas9\_EF para generar deleciones de EF en A673 y también en células de sarcoma de Ewing RD-ES, que albergan diferentes isoformas de EF. El vector pLV-U6sgNT-EFSCas9) único no dirigido (en adelante denominado LVCas9\_NT) se utilizó como control. El análisis de PCR de las regiones genómicas que abarcan los sitios de escisión intrónica, reveló una banda de PCR verificada por secuenciación de Sanger tanto en células A673 como en células RD-ES. De manera consistente, la RT-PCR y el análisis de transferencia de Western confirmaron que la expresión simultánea de sgE3 y sgF8 inducía una pérdida robusta de ARNm y proteína EF, respectivamente. Se diseñó un ensayo de expresión a base de qRT-PCR cuantitativa para FO para estimar las tasas de eliminación, y encontramos una significativa disminución 4,5 veces en la expresión FO en A673 células editados en el día 3 después de la transducción (pt).

### **La deleción de FO controla el crecimiento tumoral en modelos PDX**

Para investigar más a fondo la utilidad del enfoque, utilizamos tres modelos de sarcoma de Ewing de xenoinjerto derivado del paciente (PDX). Los modelos se

establecieron mediante la implantación subcutánea de PDX de sarcoma de Ewing en ratones inmunodeficientes, que se dejaron desarrollar durante 12 días (tumores ~ 150 mm<sup>3</sup> de tamaño). El análisis FISH mostró la presencia de la translocación t(11; 22).

### **Generación, titulación, transducción de lentivirus**

Se produjeron lentivirus recombinantes mediante transfección transitoria de plásmidos de células HEK293T / 17. Brevemente, las células se sembraron a  $1,1 \times 10^7$  células / placa en placas de 15 cm el día antes de la transfección, y se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio utilizando 14,6 y 7,9 µg de plásmidos de empaquetamiento de segunda generación (psPAX2 y pMD.2G, Addgene # 12260 y # 12259, respectivamente) y 22,5 µg del plásmido de transferencia apropiado dependiendo del experimento.