

# Análisis transcriptómico y modelización en *C. elegans* de las mutaciones *IDH2* R140 y R172

Elisa González Romero<sup>1</sup>, Beatriz Rosón Burgo<sup>1</sup>, Alessandro Liquori<sup>1</sup>, Mariam Ibáñez<sup>2,3</sup>, Mireia Boluda-Navarro<sup>1</sup>, Mireya Morote-Faubel<sup>1</sup>, Cristina Martínez<sup>1</sup>, Alejandra SanJuan-Pla<sup>1</sup>, Claudia Sargas<sup>1</sup>, Cristian García<sup>1</sup>, Marta Llop<sup>3,4</sup>, Eva Barragan<sup>3,4</sup>, Pau Montesinos<sup>2</sup>, Guillermo Sanz<sup>2</sup>, Miguel Ángel Sanz<sup>2</sup>, José María Millán<sup>5,6,7</sup>, Rafael Vázquez-Manrique<sup>5,6,7\*</sup> y José Vicente Cervera<sup>2\*</sup>. (\*Igual contribución)

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Hematología, IIS La Fe, Valencia, ES. <sup>2</sup>Servicio de Hematología. HUyP La Fe, Valencia. <sup>3</sup> CIBER de oncología (CIBERONC). <sup>4</sup> Unidad de Biología Molecular, HUyP La Fe, Valencia, <sup>5</sup>Grupo de Investigación Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, IIS La Fe, Valencia. <sup>6</sup>CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid. <sup>7</sup>Unidad Mixta de Investigación en Enfermedades Raras IIS La Fe-CIPF, Valencia.

## INTRODUCCIÓN

Las distintas entidades dentro de la leucemia mieloide aguda (LMA) se han clasificado recientemente en función del perfil mutacional. Asociando las subclases con las características clínicas de los pacientes destacan las dos mutaciones más recurrentes en el gen Isocitrato Deshidrogenasa (*IDH2*), la R140 y la R172. Ambas mutaciones producen una proteína mutada capaz de convertir el  $\alpha$ -ketoglutarato en el oncometabolito 2-hidroxiglutarato. A pesar de resultar en contextos equiparables, los pacientes se clasifican en subgrupos distintos. Además la concurrencia con otras alteraciones genéticas es más frecuente en R140 que en R172, la cual tiende a generar una subclase independiente.

En este trabajo se han evaluado los cambios transcriptómicos entre pacientes con ambas mutaciones y se han desarrollado sendos modelos *in vivo* en *Caenorhabditis elegans*. Estos modelos de fácil manipulación nos permitirán mimetizar la repercusión molecular y funcional de estas alteraciones por encontrarse en vías moleculares básicas y conservadas.

## MÉTODOS

Para el estudio comparativo del transcriptoma se han utilizado los valores de expresión génica procedentes del estudio BeatAML (<http://www.vizome.org/>). Tras seleccionar los pacientes con mutaciones R140 (36 casos) y R172 (4 casos) se ha realizado un análisis de expresión diferencial utilizando el paquete R *limma*. Los genes significativos ( $P < 0,05$ ) obtenidos se han comparado en la cohorte independiente del TCGA de pacientes con LMA.

Para desarrollar los modelos *in vivo* hemos aplicado el sistema de edición CRISPR/Cas9 mediante la estrategia co-CRISPR que permite, además de editar nuestro gen de interés, editar el gen *dyp-10*. Esta modificación altera la morfología del gusano dando lugar a un fenotipo Rol con movilidad alterada. Se ha usado un mix con la nucleasa Cas9, sgRNA y un DNA molde con cada una de las mutaciones y otro mix similar para editar el gen *dyp-10*. Esto se realizó en una cepa salvaje y en un modelo de agregación de poliglutaminas.

## RESULTADOS

El análisis de expresión identificó 53 genes con un perfil significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes. Entre ellos, destacaba la sobreexpresión de *ENO2* ( $P = 0,02$ ) en los pacientes con R172. Se trata de una enzima que parece estar involucrada en el metabolismo de la glucosa y en la vía de HIF-1, que interviene en múltiples procesos tumorales. Su incremento de expresión se ha asociado a una mayor recaída en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

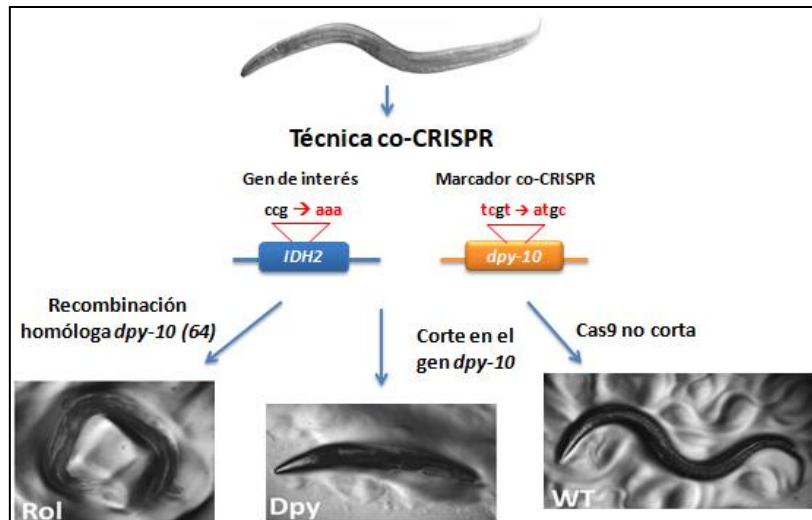
En los modelos *in vivo*, se confirmó por secuenciación la presencia de cada una de las mutaciones y la ausencia de posibles modificaciones inespecíficas (off targets) derivadas de la técnica CRISPR/Cas9. Los off targets analizados fueron los genes *Y43F4B.5*, *F32H5.3*, *C37H5.13* y *F35D2.2*.

### CONCLUSIONES

Mediante un análisis comparativo del transcriptoma ha sido posible identificar de forma preliminar algunas rutas, entre las cuales la que involucra *ENO2*. Con el fin de verificar estas variaciones transcriptómicas así como evaluar el impacto funcional de estas alteraciones se han desarrollado con éxito modelos *in vivo* de *C. elegans* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

Para determinar la existencia de alteraciones metabólicas originadas por la acumulación del oncometabolito se está poniendo a punto en nuestro modelo *in vivo* un ensayo de agregación de poliglutaminas. Dicho ensayo permitirá medir la variación de la acumulación de poliglutaminas en función de la presencia de oncometabolito.

Financiación: FEDER CB16/12/00284, PI16/00665, PI16/01113, PT17/0015/0043, PI18/1472; PROMETEOII/2015/008, ACIF/2018/256; GVA/2018/004; Becas Predoctorales JAP de Valencia de la AECC, FEHH: 2017-2018; 2018-2019.



**Figura 1. Esquema de la técnica co-CRISPR.** Se inyecta un mix de RNP con sgRNAs para editar el gen *IDH2* y el gen marcador *dpy-10*. Si este último gen es editado introduciendo una modificación puntual, se observa una alteración de la morfología dando lugar a un fenotipo Rol, los animales no pueden desplazarse en línea recta, sino en círculo. La edición del gen marcador indica que todos los elementos CRISPR han actuado correctamente y que es más probable que se haya editado también nuestro gen de interés. Por otra parte, si la nucleasa Cas9 corta el gen marcador pero no se incorpora el cambio puntual, en la descendencia se observa un fenotipo *Dymppy*, que consiste en animales más cortos y más anchos que los salvajes. Y si se ha producido un fallo en la inyección o la Cas9 no ha sido capaz cortar el gen *dpy-10* no se altera el fenotipo del gusano. Es estos dos casos, cuando los animales no son ni Rol ni *Dymppy*, es menos probable encontrar animales que hayan incorporado nuestra mutación de interés.