



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDiCINA

TESIS DOCTORAL

***ESTUDIO DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA HERRAMIENTA
DE EDICIÓN GENÓMICA CRISPR/CAS9 EN LA LEUCEMIA
MIELOIDE CRÓNICA***

ELENA VUELTA RAMOS

SALAMANCA, 2022

Universidad de Salamanca, Departamento de Medicina
Centro de Investigación del Cáncer - IBMCC



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÓMICA CRISPR/CAS9 EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

ELENA VUELTA RAMOS

Directores:

Dr. Ignacio García-Tuñón Llanio.

Prof. Dr. Manuel Sánchez Martín.

Tutora:

Prof. Dra. María Carmen Guerrero Arroyo.

SALAMANCA, 2022

El **Dr. Ignacio García-Tuñón LLanio**, investigador postdoctoral del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, el **Dr. Manuel Sánchez Martín**, profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, como directores, y la **Dra. María Carmen Guerrero Arroyo**, profesora titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, como tutora.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “ESTUDIO DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÓMICA CRISPR/CAS9 EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA”, que presenta **D^a Elena Vuelta Ramos**, graduada en Biotecnología, ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratorio 12 del Centro de Investigación del Cáncer y la Unidad de Transgénesis de la Universidad de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 14 de septiembre de 2022.

Fdo. Dr. Ignacio García-Tuñón LLanio

Fdo. Prof. Dr. Manuel Sánchez Martín

Fdo. Prof. Dra. María Carmen Guerrero Arroyo

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III co-financiado por la Unión Europea (PI17/01895), Novartis Farmacéutica S.A., Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/29-2020) de la Universidad de Salamanca y la iniciativa “Jabones Solidarios” de la asociación “Bomberos Ayudan” de Madrid.

Durante el transcurso de este trabajo, Elena Vuelta Ramos ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral de la Universidad de Salamanca cofinanciado con el Banco de Santander (convocatoria 2018).

Agradecimientos

Resumen

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa que tiene su origen en el compartimento de las células madre hematopoyéticas (CMH). Con una causa citogenética muy marcada, la LMC surge a partir de la traslocación recíproca $t(9;22)(q34;q11.2)$, que resulta en la formación del denominado cromosoma filadelfia (Ph), el cual codifica para el oncogén de fusión *BCR/ABL*. Es la oncoproteína p210 BCR/ABL, y en particular, su actividad tirosina quinasa (TK) constitutiva la que impulsa y explica toda la patogenia de la LMC. Actualmente, el tratamiento estándar para la enfermedad son los inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs), cuya irrupción en la rutina clínica cambió profundamente el panorama terapéutico de la enfermedad, ofreciendo unas tasas de éxito sin precedentes. Sin embargo, la necesidad de administración crónica, los efectos secundarios derivados y la aparición de resistencias a estos fármacos, hacen que hasta un 33% de los pacientes finalmente requieran de otros tratamientos alternativos.

En este escenario de búsqueda de nuevas terapias, el aspecto monogénico de la enfermedad, unido a la viabilidad de las terapias *ex vivo* para los trastornos hematológicos, hacen de la LMC una excelente candidata para las estrategias de terapia génica. La capacidad de abolir cualquier secuencia codificante mediante el sistema de edición CRISPR/Cas9 ofrece una poderosa oportunidad terapéutica para los pacientes con LMC. En este sentido, la elección de un sistema de edición efectivo en la generación de alelos nulos es crucial para el éxito de la terapia. Por ello, en el presente trabajo se ha evaluado la efectividad de eliminación del gen *BCR/ABL* de diferentes estrategias basadas en el sistema CRISPR/Cas9.

Una vez obtenido un eficiente sistema de edición, basado en la generación de deleciones específicas en el dominio TK de *ABL*, se analizó su potencial terapéutico, utilizando para ello un modelo murino de LMC y ensayos de trasplantes ortotópicos de células madre leucémicas (CML) de pacientes con LMC. En ambos sistemas, las CML editadas fueron capaces de restaurar una hematopoyesis fisiológica en el nicho medular de ratones inmunodeficientes NSG, proporcionando un beneficio terapéutico significativo. Sin embargo, y pese a los prometedores resultados obtenidos, lograr una cura definitiva de la enfermedad pasa por garantizar la inexistencia de eventos residuales sin editar. Para ello, se desarrolló una nueva aproximación, que combina el sistema CRISPR/Cas9 con una estrategia de trampa génica (CRISPR-Trap) y permite la selección

específica de las células editadas. El sistema CRISPR-Trap demostró su efectividad al seleccionar adecuadamente las células en las que el oncogén *BCR/ABL* había sido eliminado mediante la expresión de una proteína fluorescente, resultando en una significativa inhibición tumoral *in vitro* e *in vivo*.

De esta forma, y aunque serán necesarios nuevos estudios para aumentar la seguridad y eficiencia del proceso de edición, todos estos resultados han demostrado el potencial de una estrategia de terapia génica, basada en la eliminación genómica de *BCR/ABL* en las CMH, como tratamiento definitivo para la leucemia mieloide crónica. Del mismo modo, abre la puerta al uso de esta tecnología como opción terapéutica para la eliminación de genes implicados en diferentes patologías hematológicas.

Índice

INTRODUCCION.....	3
1. LA HEMATOPOYESIS Y NEOPLASIAS HEMATOPOYETICAS.	3
2. LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.	6
2.1 <i>Perspectiva histórica.</i>	6
2.2 <i>Epidemiología y clínica de la leucemia mieloide crónica.</i>	7
2.3 <i>Origen clonal de la leucemia mieloide crónica.</i>	10
2.4 <i>Tratamientos convencionales.</i>	11
2.5 <i>Aspectos moleculares de la LMC.</i>	17
3. LAS NUCLEASAS DE EDICIÓN GENÓMICA.....	24
3.1 <i>Origen y mecanismo de acción.</i>	24
3.2 <i>Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN).</i>	26
3.3 <i>Las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs).</i>	27
3.4 <i>El sistema CRISPR/Cas9.</i>	29
4. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA.	32
4.1 <i>Evolución del sistema CRISPR/Cas9.</i>	32
4.2 <i>Aplicaciones terapéuticas del sistema CRISPR/Cas9.</i>	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. CULTIVOS CELULARES Y PACIENTES.	45
1.1 <i>Líneas celulares y condiciones de cultivo.</i>	45
2. ELECTROPORACIÓN Y MICROINYECCIÓN.....	48
2.1 <i>Electroporación de plásmidos.</i>	48
2.2 <i>Electroporación de ribonucleoproteínas.</i>	50
2.3 <i>Edición genómica de embriones murinos.</i>	53
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	54
3.1 <i>Extracción de ADN y PCR.</i>	54
3.2 <i>Caracterización de la edición genómica.</i>	55
3.3 <i>Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR.</i>	57
3.4 <i>Western blot.</i>	58
3.5 <i>Inmunofluorescencia.</i>	58
3.6 <i>Secuenciación del transcriptoma (RNAseq).</i>	59
3.7 <i>Análisis de los off-targets.</i>	61
4. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.	62
4.1 <i>Modelo murino de leucemia mieloide crónica.</i>	62

4.2	<i>Obtención de embriones en fase de cigoto para microinyección.</i>	62
4.3	<i>Transferencia embrionaria.</i>	62
4.4	<i>Trasplante de células madre hematopoyéticas.</i>	63
4.5	<i>Ensayos de xenoinjerto.</i>	64
4.6	<i>Procesamiento muestras.</i>	65
4.7	<i>Análisis de la hematopoyesis mediante citometría de flujo.</i>	65
4.8	<i>Inmunohistoquímica</i>	66
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
6.	DECLARACIÓN ÉTICA.	67

RESULTADOS 71

1.	EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA, <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> , DE DIFERENTES APROXIMACIONES DEL SISTEMA CRISPR/Cas9 PARA LA GENERACIÓN EFICIENTE DE ALELOS NULOS EN EL ONCOGÉN <i>BCR/ABL</i> .	71
1.1	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dirigido contra los sitios de procesamiento intrónico incrementa la eficiencia de generación de alelos nulos in vitro.</i>	72
1.2	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dirigido contra los sitios de procesamiento intrónico incrementa la eficiencia de generación de alelos nulos in vivo.</i>	79
1.3	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dirigido contra los sitios de procesamiento intrónico de BCR/ABL aumenta la eficiencia para anular la proliferación celular dependiente del oncogén.</i>	82
1.4	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dual permite la generación de deleciones específicas en la secuencia codificante de BCR/ABL, generando alelos nulos de forma eficiente.</i>	85
1.5	<i>El análisis de los posibles off-targets no mostró diferencias entre las distintas guías utilizadas.</i>	89
2.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SISTEMA CRISPR/Cas9 PARA ELIMINAR LA EXPRESIÓN DE <i>BCR/ABL</i> EN CÉLULAS MADRE MURINAS Y HUMANAS, Y SU HABILIDAD PARA REESTABLECER LA HEMATOPOYESIS FISIOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE LMC.	91
2.1	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén BCR/ABL, suprimiendo sus efectos oncogénicos, en la línea celular murina de LMC Boff-p210.</i>	91
2.2	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente BCR/ABL en células madre leucémicas murinas, restaurando su capacidad multipotente y evitando el sesgo mieloide.</i>	95
2.3	<i>Las células madre leucémicas murinas editadas mediante CRISPR/Cas9 en contra de BCR/ABL generan una hematopoyesis fisiológica.</i>	98
2.4	<i>El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén BCR/ABL, suprimiendo sus efectos oncogénicos, en la línea celular humana de LMC K562.</i>	101

2.5 El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente BCR/ABL en células madre leucémicas humanas, derivadas de pacientes de LMC, restaurando su capacidad multipotente y evitando el sesgo mieloide.....	104
3. DISEÑO DE UN SISTEMA CRISPR/CAS9 ALTERNATIVO QUE INTRODUZCA UN REPORTERO EN AQUELLAS CÉLULAS EN LAS QUE LA EXPRESIÓN DE <i>BCR/ABL</i> HA SIDO ELIMINADA, PERMITIENDO ASÍ SU SELECCIÓN PARA SU POSTERIOR TRASPLANTE.	111
3.1 El sistema CRISPR-Trap sin promotor endógeno permite la integración específica del donador de trampa génica en el locus <i>BCR/ABL</i> , pero no ofrece un sistema sólido de selección de las células corregidas.	112
3.2 El sistema CRISPR-Trap dirige eficazmente la integración específica del ADN donador de trampa génica en el locus <i>BCR/ABL</i>	117
3.3 El alelo recombinado <i>BCR/Venus</i> se expresa correctamente en detrimento de la expresión de su versión nativa <i>BCR/ABL</i>	120
3.4 El sistema CRISPR-Trap permite la selección de las células en las que se ha eliminado <i>BCR/ABL</i>	121
3.5 El sistema CRISPR-Trap dirigido hacia <i>BCR/ABL</i> promueve la apoptosis e inhibe la proliferación en la línea celular de LMC K562.	122
3.6 El sistema CRISPR-Trap inhibe la actividad tumoral de <i>BCR/ABL</i> , produciendo un beneficio terapéutico en un modelo de xenoinjerto de LMC.	124
DISCUSIÓN	129
1. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 DUAL PROPORCIONA MAYOR EFICIENCIA EN LA GENERACIÓN DE ALELOS NULOS EN EL ONCOGÉN <i>BCR/ABL</i> , REPECTO A SISTEMAS DE UNA GUIA ÚNICA.	131
2. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 DUAL ELIMINA LOS EFECTOS ONCOGÉNICOS DE <i>BCR/ABL</i> Y REESTABLECE LA HEMATOPOYESIS FISIOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE LMC.	135
3. LA APROXIMACIÓN CRISPR-TRAP PERMITE LA SELECCIÓN DE LAS CÉLULAS EN LAS QUE LA EXPRESIÓN DE <i>BCR/ABL</i> HA SIDO ELIMINADA PARA SU POSTERIOR TRASPLANTE.	140
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA.....	151
ANEXO I: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS EN EL PERIODO DE LA TESIS DOCTORAL.....	172
ANEXO II: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.	176

Lista de Abreviaturas

AAV: Virus adenoasociado.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosina trifosfato.

Cas: Proteínas asociadas a CRISPR.

CFU-GM: Unidades formadoras de colonias, del inglés *colony formation unit*, de granulocitos y macrófagos.

CMH-CP: Célula madre hematopoyética de corto plazo.

CMH-LP: Célula madre hematopoyética de largo plazo.

CMH: Célula madre hematopoyética.

CML: Célula madre leucémica.

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, del inglés *Cluster Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats*.

crRNA: RNA relacionado con CRISPR, del inglés *CRISPR related RNA*.

CTP: Codón de terminación prematura.

DBS: Ruptura de doble cadena, del inglés *double strand break*.

FACS: Separación celular por citometría activada por fluorescencia, del inglés *fluorescent activated cell sorting*.

GDP: Guanidina difosfato.

GFP: Proteína verde fluorescente, del inglés *green fluorescent protein*.

GMP: Progenitor de granulocitos/monocitos.

GTP: Guanidina trifosfato.

HDR: Reparación mediada por homología, del inglés *homology-directed reapi*.

HLA: Antígenos leucocitario humano, del inglés *human leukocyte antigens*.

IE-sgRNA: ARN guía dirigida a la región exónica.

INDEL: Inserción/delección.

kDa: Kilo Dalton.

KI: del inglés *knock in*.

KO: del inglés *knock out*.

LLA: Leucemia linfoblástica aguda.

LMC: Leucemia mieloide crónica.

M-bcr: Región de punto de ruptura mayoritaria, del inglés *major breakpoint cluster región*.

m-bcr: Región de punto de ruptura minoritaria, del inglés *minor breakpoint cluster región*.

MAPK: Proteínas quinasa activadas por mitógenos, del inglés *mitogen activated protein kinase*.

MEP: Progenitor de megacariocitos/eritrocitos.

NGS: Secuenciación masiva, del inglés *next generation sequencing*.

NHEJ: Unión de extremos no homólogos, del inglés *non-homologous end joining*.

NLS: Señal de localización nuclear, del inglés *nuclear localization signal*.

NMD: Decaimiento de ARN sin sentido, del inglés *nonsense-mediated RNA decay*.

NSG: NOD SCID GAMMA, del inglés *non obese diabetic severus combined immunodeficiency IL-3R gamma*

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador, del inglés *protospacer adjacent motif*.

pb: pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffer saline*.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.

pegRNA: ARN guía de editor de calidad, del inglés *prime editor guide RNA*.

Ph: Cromosoma Filadelfia.

PLC: Precursor linfoide común.

PMC: Precursor mieloide común.

PMP: Precursor multipotente común.

q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*.

RNA-seq: Secuenciación masiva del ARN, del inglés *RNA sequencing*.

RNP: Ribonucleoproteína.

RT: retrotranscripción.

SA: secuencia aceptora del procesamiento intrónico, del inglés *splicing acceptor*.

SC: Clon derivado de célula única, del inglés *single cell derived clone*.

SD-sgRNA: ARN guía dirigida al sitio de procesamiento intrónico.

SD: Desviación típica, del inglés *standard deviation*.

SD: Sitio donador del procesamiento intrónico, del inglés *splicing donor*.

SEM: Error típico de la media, del inglés *estándar error of mean*.

sgRNA: guía simple de ARN, del inglés *single-guide RNA*.

TALEN: Nucleasa efectora similar a activadores de la transcripción, del inglés *transcription activator-like effector nuclease*.

TKI: Inhibidor de tirosina quinasa, del inglés *tyrosine kinase inhibitor*.

TMO: Trasplante de médula ósea.

trackRNA: ARN transactivador, del inglés *transactivator RNA*.

U.F.: Unidades de fluorescencia.

WT: del inglés *wild type*.

ZFN: Nucleasa de dedos de zinc, del inglés *zinc finger nuclease*.

μ-bcr: Región de punto de ruptura micro, del inglés *micro breakpoint cluster región*.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA HEMATOPOYESIS Y NEOPLASIAS HEMATOPOYÉTICAS.

La hematopoyesis es un proceso altamente complejo mediante el cual se forman, desarrollan y maduran todo el conjunto de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y trombocitos). En el adulto, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, donde existe una constante renovación de dichos componentes sanguíneos gracias a la existencia de una singular población de células multipotentes: las células madre hematopoyéticas (CMH). Las CMH se caracterizan por su capacidad de multipotencia, por la que son capaces de dar lugar a todos los linajes hematopoyéticos, y de autorrenovación, por la que aseguran, mediante divisiones asimétricas, la producción de nuevas CMH [1]. Suponen entre el 0,01 y 0,2% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea e históricamente han sido las primeras células troncales adultas en ser aisladas con éxito [2]. Desde entonces han supuesto una verdadera revolución en el ámbito clínico, impulsando el campo de la terapia celular al suponer una valiosa herramienta para el tratamiento de múltiples enfermedades hematológicas mediante su trasplante [1].

Tradicionalmente, su identificación y aislamiento se ha llevado a cabo mediante experimentos de trasplantes de médula ósea utilizando ratones letalmente irradiados en los que se estudiaba la capacidad de injerto de dichas células [3]. Gracias a este tipo de experimentos se identificaron una serie de marcadores de superficie que permitieron aislar específicamente la población celular CMH. Las células hematopoyéticas primitivas no expresan marcadores de linaje (Lin⁻) lo que permite distinguirlas del conjunto de células diferenciadas. En la hematopoyesis humana, las CMH pueden identificarse a través de los marcadores de superficie CD34, CD133, CD90 y CD117, no obstante, en la mayoría de los casos, el marcador de elección es el CD34, que juega un papel importante tanto en la adhesión intercelular como en la comunicación con la matriz extracelular [4].

A medida que se ha ido avanzando en su identificación y caracterización se ha evidenciado la enorme heterogeneidad subyacente, en términos de potencialidad y capacidad proliferativa, en esta población celular. Ya en la década de los 90 se identificaron dos tipos de CMH atendiendo a su potencialidad; las células madre hematopoyéticas de largo plazo (CMH-LP) y las células madre hematopoyéticas de corto plazo (CMH-CP) [5]. Las CMH-LP son capaces de producir todos los tipos celulares sanguíneos durante toda la vida del individuo, generando nuevas células madre que

mantienen la potencialidad y pueden injertar tras sucesivos trasplantes [6]. Por el contrario, las CMH-CP carecen de esta capacidad de autorrenovación a largo plazo, pudiendo reconstituir los compartimentos linfoide y mieloide únicamente durante un corto periodo de tiempo [7].

Las CMH representan la cúspide de la compleja jerarquía hematopoyética, la cual ha ido evolucionando desde las iniciales propuestas clásicas hasta las actuales, de mayor

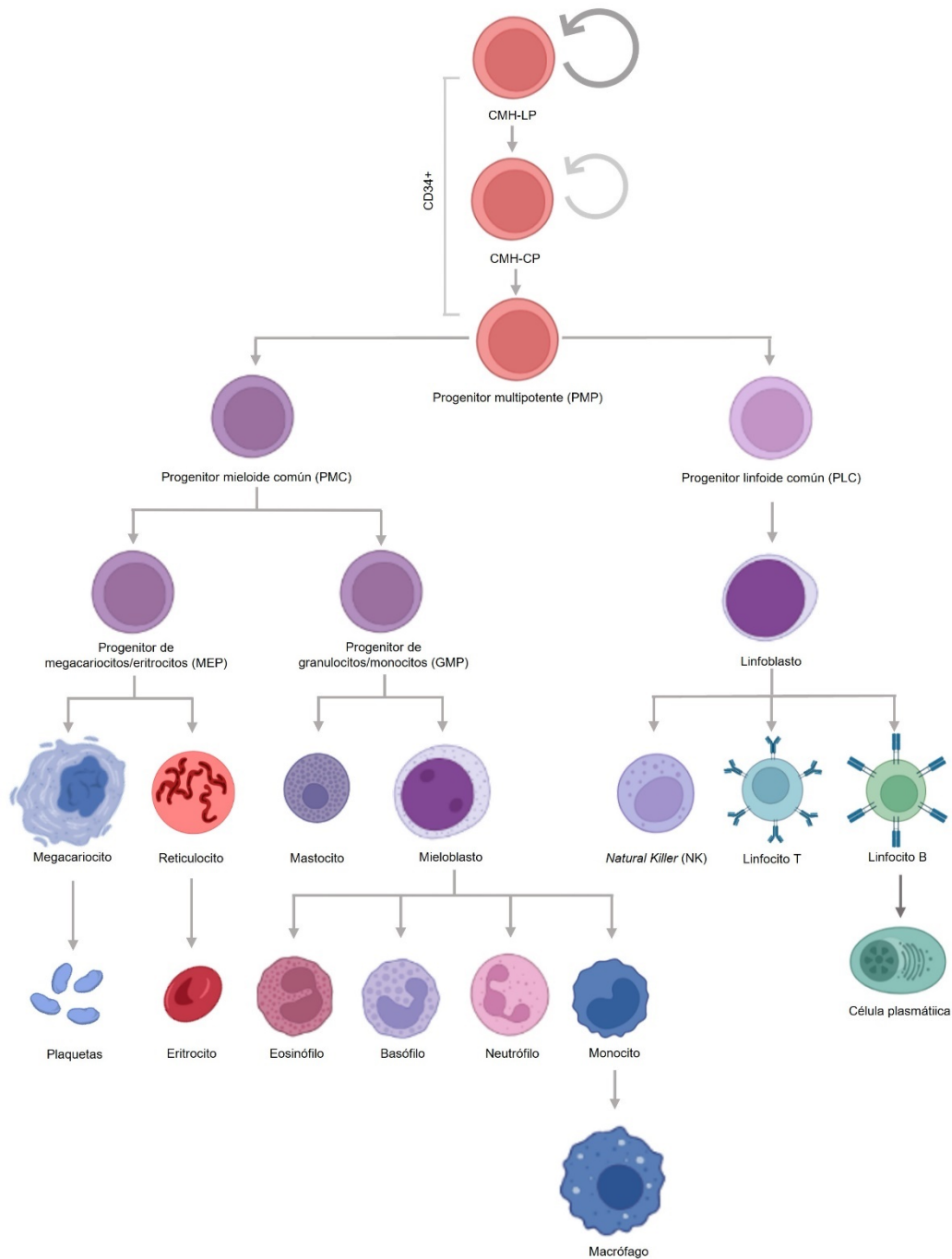


Figura 1. Jerarquía hematopoyética. Representación esquemática de la organización del sistema hematopoyético, donde se muestra, al inicio, las células madre hematopoyéticas (CMH), que dan origen a los progenitores hematopoyéticos mieloide y linfoide (PMC y PLC, respectivamente) y finalmente, a las células hematopoyéticas maduras, que se encuentran en la circulación sanguínea.

complejidad, y aún en continua revisión [8–12] (Figura 1). De forma simplificada, en el prevaleciente modelo hematopoyético, las CMH dan lugar a progenitores multipotentes (PMP) [8], de los que descienden las células progenitoras comprometidas con el linaje mieloide (precursor mieloide común, PMC) y linfoide (precursor linfoide común, PLC). El PMC va a dar lugar a progenitores de megacariocitos/eritrocitos (MEP), del que se derivarán los eritrocitos, megacariocitos y plaquetas, y a progenitores de granulocitos/monocitos (GMP), que generarán las células mieloides: mastocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos [13]. Por su parte, el PLC producirá el conjunto de células linfoides: células asesinas naturales o *natural killers*, linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas (Figura 1). Todos estos procesos de diferenciación y autorrenovación de las CMH son regulados por complejos mecanismos intrínsecos y extrínsecos donde juega un papel importante el entorno o nicho donde se encuentran.

Además del componente hematopoyético conformado por las CMH, el nicho medular presenta una zona endosteal, formada por osteocitos y osteoblastos, y una zona vascular formada por células endoteliales y mesenquimales [14]. Tanto los elementos celulares como los humorales (citoquinas y factores de crecimiento) presentes en el nicho hematopoyético juegan un papel fundamental en la protección, proliferación y maduración de las CMH [15]. Más aun, recientes estudios han demostrado que una remodelación estructural y funcional del nicho puede contribuir al desarrollo y mantenimiento de neoplasias proliferativas. Por ejemplo, la presencia de células madre leucémicas (CML) en el nicho hematopoyético provoca una modificación del mismo, creando un ambiente favorable para las CML, donde pueden evadir la quimioterapia, adquiriendo resistencias a ésta [16]. Así mismo, esta remodelación del microambiente medular puede contribuir al deterioro de la hematopoyesis fisiológica contribuyendo a muchos de los síntomas clínicos derivados de las neoplasias hematológicas. Por todo ello, dilucidar los mecanismos subyacentes en la interacción entre las CML y el nicho hematopoyético puede ofrecer nuevas estrategias terapéuticas para eliminar las células leucémicas quiescentes presentes en muchas neoplasias, como es el caso de la leucemia mieloide crónica (LMC) [17].

2. LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

2.1 Perspectiva histórica.

En 1841, en Glasgow, el equipo de David Craigie identificó un paciente con un cuadro clínico que incluía fiebre, esplenomegalia y leucocitosis. Tres años más tarde, el grupo examinó un segundo paciente con una sintomatología muy similar. Estas observaciones alentaron al médico y patólogo Hughes Bennett a realizar una autopsia y publicar sus hallazgos en la revista *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, en el año 1845 [18]. De manera simultánea, en Berlín, Rudolf Virchow observó un caso similar y redactó un estudio que se publicaría solo cinco semanas después del artículo de Bennett [19]. Sin embargo, Bennett y Virchow diferían en la interpretación de sus respectivos hallazgos: mientras Bennett proponía que la enfermedad tenía un origen infeccioso Virchow rechazaba atribuir a la piemia los síntomas patológicos, acuñando el término “Weisses Blut” o “Sangre blanca” aludiendo al incremento de células sanguíneas existente en los pacientes. Una década después, Friederich describe por primera vez la leucemia aguda [20] y, en 1872, Ernst Neumann señala el origen medular de las células leucémicas [21]. Sin embargo, los avances en las técnicas de tinción conseguidos a finales de siglo fueron imprescindibles para distinguir definitivamente entre las formas agudas y crónicas de las leucemias mielógenas [21,22], así como entre estas, las linfocíticas y los linfomas [23].

En los años posteriores, la LMC fue diferenciándose gradualmente de otras mielofibrosis y enfermedades mieloproliferativas aludiendo a diferentes características clínicas y patológicas, sin embargo, no fue hasta casi 100 años después cuando se obtuvo la primera pista real sobre su patogenia. Así, en 1960 Nowell and Hungerford publicaron el histórico descubrimiento de un cromosoma anormalmente pequeño presente en las células sanguíneas de siete pacientes con leucemia granulocítica (conocida ahora como LMC)[24]. El hallazgo fue rápidamente confirmado por otros grupos al advertir la existencia del denominado “cromosoma Filadelfia” (Ph) en el 90% de los pacientes que presentaban características clínicas de LMC [25,26] (Figura 2). Una década más tarde, con la introducción de nuevas y mejores técnicas de bandeo cromosómico, el cromosoma Filadelfia fue finalmente caracterizado, identificándose en primer lugar como una versión truncada del cromosoma 22 (22q-) [27]. Finalmente, en 1973, Rowley demostró que la formación de dicho cromosoma era resultado de la traslocación entre el segmento distal

del brazo largo del cromosoma 22 y la porción distal del brazo largo del cromosoma 9 [t(9;22) (q34; q11)][28] (Figura 2). Por último, uno de los grandes hitos en la comprensión de la LMC llegó en la década de los 80, cuando se demostró que, como resultado de la traslocación entre los cromosomas, el protooncogén *c-abl*, presente en el cromosoma 9 (q34), se trasponía a la llamada “breakpoint cluster región” (BCR), localizada en el cromosoma 22 (q11), dando lugar al gen de fusión *BCR/ABL* [29–31] (Figura 2). El descubrimiento del oncogén *BCR/ABL*, codificante para la proteína quimérica de 210 kb p210^{bcr/abl} [32], sentó las bases de todo estudio molecular sobre los mecanismos patogénicos de la LMC, evidenció el vínculo existente entre las alteraciones citogenéticas y el desarrollo de neoplasias y ofreció una diana terapéutica hacia la que se orientarían todos los siguientes tratamientos.

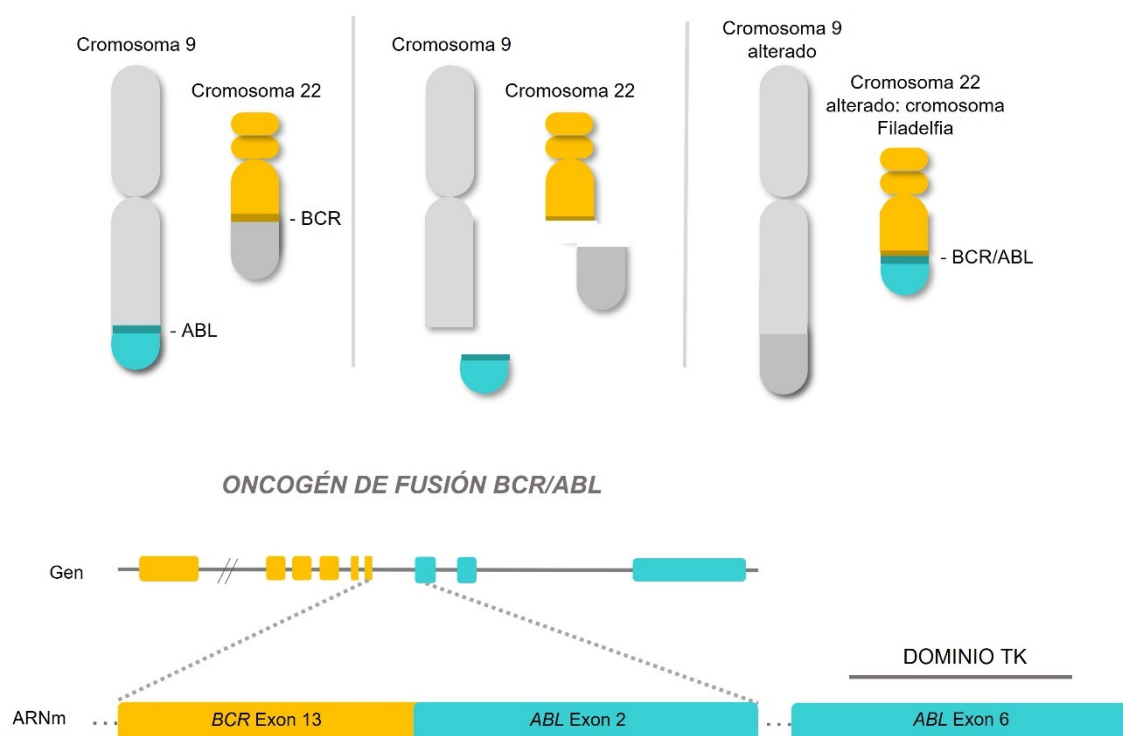


Figura 2. Origen del oncogén *BCR/ABL*. Representación esquemática de la traslocación t(9;22) (q34; q11), que da lugar al cromosoma Filadelfia (arriba) y del oncogén de fusión *BCR/ABL*, generado como resultado de dicha traslocación cromosómica (abajo).

2.2 Epidemiología y clínica de la leucemia mieloide crónica.

La LMC tiene una incidencia anual en el mundo de 1 a 2 casos entre 100.000 y una prevalencia de alrededor de 1 entre 17.000, representando entre el 15 y el 20% de todos los casos nuevos de leucemia [33]. Es poco frecuente su presentación en la infancia y en personas menores de 40 años la tasa de aparición es baja, incrementándose

exponencialmente con la edad. Según la Sociedad Americana Contra el Cáncer, la edad promedio en el momento del diagnóstico es de aproximadamente 64 años [34,35]. Los hombres muestran una incidencia algo mayor que las mujeres con una ratio hombre/mujer de 1,3-1,5:1 [36].

El único factor de riesgo probado es la exposición a altas dosis de radiación ionizante [37]. No obstante, diversos estudios apuntan a que la distancia física entre los genes *BCR* y *ABL* en linfocitos y en células CD34⁺ es más corta de lo que cabría esperar [38], pudiendo ser este fenómeno físico el que favoreciese los eventos de translocación entre ambos genes. La posible contribución de productos químicos, como el benceno, ha sido objeto de debate sin obtener resultados concluyentes por lo que la gran mayoría de casos la enfermedad parece manifestarse de manera esporádica, sin causas de predisposición conocidas.

El diagnóstico se basa en la detección de la característica distintiva de la enfermedad; la presencia del cromosoma Filadelfia [35]. Las técnicas citogenéticas convencionales, la hibridación fluorescente in situ (del inglés, FISH) y la PCR en tiempo real (qRT-PCR) son técnicas comúnmente usadas en el diagnóstico de la LMC así como en la evaluación de la respuesta a la terapia [39].

Los síntomas más comunes de la LMC incluyen astenia, pérdida de peso, anemia, dolor abdominal, episodios de infección y esplenomegalia [35]. Sin embargo, una gran proporción de pacientes es asintomática y su diagnóstico ocurre tras exámenes médicos eventuales en las que se observa un recuento anormal de células sanguíneas [35].

Clínicamente, la LMC suele considerarse una enfermedad trifásica (Figura 3). La primera de las fases es la denominada fase crónica, caracterizada por ser una etapa indolente en la que se diagnostican hasta el 90% de los nuevos casos de LMC. En esta etapa, que puede durar entre 3 y 8 años, las células madre leucémicas (CML) responden a factores de crecimiento, pero las vías de diferenciación mieloproliferativas adquieren ventaja y los progenitores mieloides y otras células diferenciadas comienzan a acumularse en la sangre y los tejidos extramedulares[40] (Figura 3B). Sin una terapia efectiva, la enfermedad progresa hacia la fase acelerada, de duración variable, en la que comienzan a detectarse células inmaduras (blastos) en la circulación sanguínea, para acabar en la fase aguda de la enfermedad, comúnmente conocida como crisis blástica (Figura 3C). Los criterios diagnósticos utilizados en la fase acelerada y la aguda dependen de la proporción de blastos en sangre, siendo de entre el 10 y el 20% en la fase acelerada y de más del 20% en la crisis blástica [41]. Ambas fases se caracterizan por un arresto en la maduración del

linaje linfóide o mieloide, una infiltración progresiva de blastos en sangre y la acumulación de nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas en las CML [42]. Así pues, en la última de las etapas de la patología, la crisis blástica puede tener un fenotipo mieloide (50%), linfóide (25%) o ambos (25%) [41], denotando el origen troncal de la enfermedad. Finalmente, la insuficiencia medular, ocasionada por la falta de diferenciación hematopoyética y la infiltración masiva de blastos, lleva a la aparición de infecciones, trombosis y anemias, reduciendo la supervivencia de los pacientes a meses o incluso semanas [43].

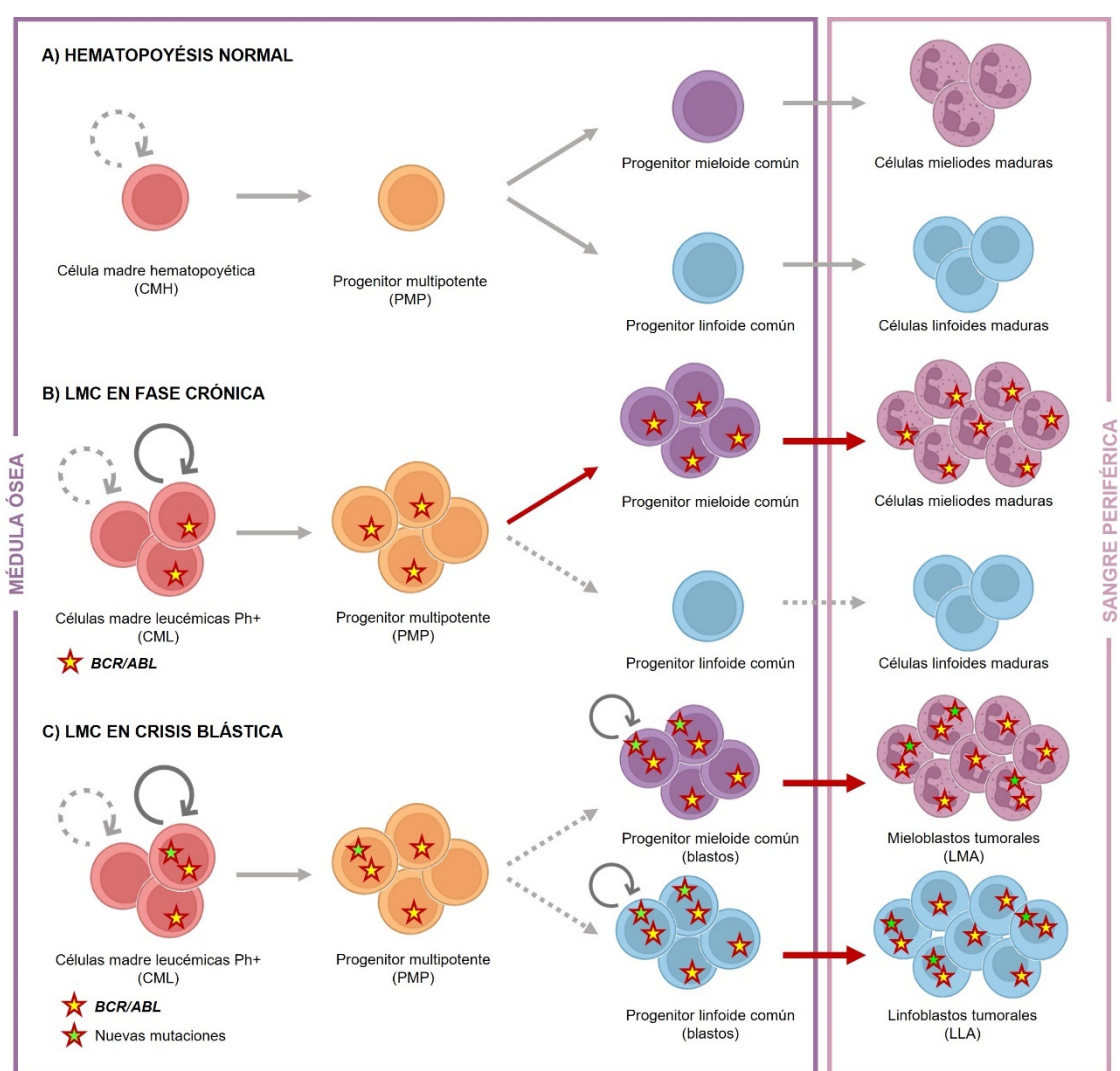


Figura 3. Fases clínicas de la leucemia mieloide crónica. (A) Hematopoyesis normal caracterizada por la existencia de células madre hematopoyéticas con una capacidad de autorrenovación y multipotencia controlada, lo que da lugar a una hematopoyesis equilibrada entre los linajes mieloide y linfóide. (B) En la fase crónica, la vía de diferenciación mieloproliferativa adquiere una ventaja proliferativa y se produce una expansión mieloide masiva. (C) La crisis blástica se caracteriza por una detención de la maduración en el linaje mieloide o linfóide. Aparecen nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas acumuladas en las células madre leucémicas (CML) y las células blásticas salen de la médula ósea a la sangre periférica.

2.3 Origen clonal de la leucemia mieloide crónica.

El cromosoma Filadelfia fue el primer ejemplo de anomalía citogenética directamente asociada con el desarrollo de una neoplasia [28]. Durante los primeros años tras su descubrimiento, su consistencia como evento genético causal fue cuestionada, en parte debido a la limitada resolución de los análisis cariotípicos de la época y en parte debido a la confusión de la LMC con otros trastornos mieloproliferativos. Sin embargo, la mejora en los métodos de cultivo celular y el desarrollo de técnicas de bandeo cromosómico de mayor resolución han permitido desenmascarar numerosas anomalías citogenéticas subyacentes al desarrollo de tumores específicos [44–46]. De esta forma, la LMC contribuyó a la verificación de la teoría somática del cáncer, propuesta originalmente por Boveri en 1914, la cual establece el origen del cáncer en una célula individual que presenta cambios genéticos [47].

La evidencia que apoya en las CMH el origen de la LMC ha ido acumulándose desde que Fialkow y cols. demostraron su naturaleza clonal mediante el examen de polimorfismos ligados al cromosoma X presentes en mujeres con LMC en fase crónica [48]. La presencia del cromosoma Filadelfia en precursores de eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos restringe el origen de la traslocación inicial a las células troncales hematopoyéticas de las que derivan todos estos linajes. No obstante, existen ciertas controversias en la literatura científica que demuestran la complejidad de los mecanismos moleculares que conducen a la progresión leucémica en la LMC. Por ejemplo, la detección de transcritos *BCR/ABL* en células sanguíneas de individuos sanos [49,50] ha generado dudas sobre el papel del oncogén en función de la etapa de diferenciación dentro del linaje hematopoyético. Una de las explicaciones más aceptadas para este fenómeno es la posibilidad de que la traslocación ocurra en precursores hematopoyéticos maduros y no desemboque en el desarrollo de leucemia al ser eliminada su descendencia a través de la diferenciación y la apoptosis. Sin embargo, a pesar de estos descubrimientos y gracias a numerosos experimentos de sobreexpresión de *BCR/ABL* en líneas celulares hematopoyéticas [51,52] y en modelos animales [53,54], hoy en día está ampliamente aceptado que la traslocación t(9;22) y la subsecuente expresión del oncogén de fusión es el evento iniciador en la LMC. No obstante, los mecanismos por los que emergen las CML, responsables de la transformación leucémica, parecen requerir de una mayor multiplicación del número de copias de *BCR/ABL*, posibles mutaciones secundarias y fenómenos de inestabilidad genómica [55].

Las CML residen en el nicho medular en un estado quiescente y se caracterizan por una gran heterogeneidad en sus mecanismos genéticos, epigenéticos y transcripcionales. Las nuevas aproximaciones genómicas, utilizando técnicas de célula única (del inglés, *single cell*) han brindado la oportunidad de identificar distintas subpoblaciones de CML [52], y la búsqueda de antígenos de superficie específicos para su selección constituye uno de los mayores retos actuales en el desarrollo de nuevos tratamientos [56,57].

En el mantenimiento y quiescencia de las CML en el nicho hematopoyético resulta esencial para el desarrollo y progreso de la leucemia mieloide crónica. En este proceso participan diversos mecanismos paracrinos y autocrinos que pueden ser dependientes o independientes de la actividad de *BCR/ABL* [58]. Varios estudios sugieren que la inactivación de la oncoproteína p210^{*BCR/ABL*} disminuye la expresión de CXCR4, un receptor de quimioquinas, promoviendo la liberación de las CML del nicho medular hacia la sangre [59]. Por el contrario, el aumento de los niveles de proteína CXCR4, promovido por la actividad exacerbada de la oncoproteína, desencadena la retención de las CML en el microambiente medular, induciendo su quiescencia [59]. Así pues, la comunicación con el nicho hematopoyético y las moléculas de señalización asociadas con la autorrenovación y la supervivencia, son dos componentes clave para la persistencia a largo plazo de las CML quiescentes [60]. El papel que juegan estas CML quiescentes, responsables de la aparición de resistencias a la terapia, así como de las posibles recurrencias tras la retirada del tratamiento, hace fundamental la búsqueda de nuevas aproximaciones destinadas a su identificación y eliminación.

2.4 Tratamientos convencionales.

Quimioterapia y radioterapia.

La historia del tratamiento de la LMC puede considerarse uno de los grandes hitos de la medicina moderna en terapia contra el cáncer. Durante el siglo XIX y en gran parte del siglo XX, los tratamientos disponibles para la enfermedad no resultaban demasiado exitosos. En 1786, Thomas Fowler creó la solución de Fowler [61], que era en realidad una solución de trióxido de arsénico (As_2O_3) al 1% en bicarbonato de potasio. Desde entonces, dicha solución se convirtió en el pilar de la medicina del siglo XIX, utilizándose

para el tratamiento de múltiples afecciones, entre las cuales se encontraba la leucemia [62]. Años más tarde, el médico alemán Lissauer publicó el primer informe del uso de arsénico en un paciente en estadios muy avanzados de la enfermedad, observando una notable mejora en su salud [63]. Es interesante comentar que, en 1882, Arthur Conan Doyle, el famoso autor de las historias de Sherlock Holmes que en ese momento trabajaba como médico general en Birmingham, escribió para *The Lancet* una breve carta documentando el uso de arsénico para tratar a un paciente con LMC [64]. Desde entonces y a lo largo de la segunda mitad del siglo XIX, el arsénico se utilizó de manera intermitente en el tratamiento de la LMC, demostrando su capacidad para controlar la fiebre, reducir el recuento de glóbulos blancos, disminuir el tamaño del bazo y mitigar el grado de anemia de los pacientes [61].

La radioterapia entró en la práctica clínica a principios del siglo XX y podría considerarse el primer tratamiento eficaz y fiable para la LMC [65]. De esta forma, la radiación se consagró como terapia estándar para la enfermedad durante los siguientes 50 años, donde su uso dirigido al bazo de los pacientes con LMC demostró una reducción de la esplenomegalia y una mejoría en su estado de salud general [65,66]. El rápido desarrollo de los agentes alquilantes orales después de La Segunda Guerra Mundial condujo a la introducción del busulfán en 1953 [67]. Su uso en el tratamiento de la LMC demostró ser muy eficaz para controlar las características clínicas de la patología durante largos periodos de tiempo, desplazando en gran medida a la radioterapia ya por la década de los 60 [68]. La hidroxycarbamida (hidroxiurea) fue entonces introducida en Estados Unidos, sin embargo, su uso tardó en extenderse en Europa, donde el busulfán continuó utilizándose durante algunos años [69]. Finalmente, los estudios prospectivos demostraron que los pacientes tratados con hidroxiurea tenían una mayor tasa de supervivencia que los tratados con busulfán, no obstante, si esto se debió a los efectos beneficiosos de la hidroxiurea o a los efectos citotóxicos, posteriormente descritos, del busulfán no quedó del todo esclarecido [70]. Es importante destacar que ninguno de los agentes anteriormente mencionados tenía la capacidad de reducir el número de células Filadelfia⁺ presentes en la medula ósea salvo en casos excepcionales, donde se empleaban sobredosis de fármacos y se llevaba a los pacientes a episodios de aplasia severa. La introducción del interferón- α (IFN- α) en la década de los 70 logró una remisión citogenética, al menos parcial, en pacientes con LMC en fase crónica y una minoría de estos, alcanzó una remisión citogenética completa que permitió la discontinuación del tratamiento sin recaída posterior [71]. Así, el IFN- α desplazó gradualmente tanto al

busulfán como a la hidroxiurea en el tratamiento de la LMC diagnosticada en fase crónica si el paciente no era candidato para un trasplante alogénico de médula ósea [68,72].

Trasplante alogénico de médula ósea.

El trasplante alogénico de médula ósea fue la única opción terapéutica para la LMC con el potencial de curar definitivamente la enfermedad y fue el tratamiento de elección para los pacientes de LMC en fase crónica en la década de los 90 [73,74]. Aún hoy en día, el trasplante alogénico de médula ósea constituye la única y última alternativa terapéutica para muchos pacientes de LMC, es ampliamente utilizado en otras patologías hematológicas que carezcan de tratamiento efectivo [75] y supone la única terapia curativa que implica la eliminación definitiva del defecto genético subyacente. La historia del trasplante alogénico de médula ósea comienza en la década de los 70. Durante esta época se llevaron a cabo intentos esporádicos de alotrasplantes para tratar pacientes con LMC en fases avanzadas, sin embargo, estos primeros intentos no resultaron exitosos y llevaban asociada una altísima tasa de mortalidad bien por complicaciones derivadas del trasplante o bien por la persistencia de leucemia [74,76,77]. A mediados de la década de los 80, una serie de informes describieron resultados favorables de alotrasplantes realizados a pacientes de LMC donde el donante del trasplante era un hermano genéticamente idéntico [73]. Así, el descubrimiento de los antígenos leucocitarios humanos (del inglés *human leukocyte antigens* o HLA) presentes en la superficie de la mayoría de células del cuerpo [78] y, más concretamente, de la necesidad de determinar la compatibilidad de HLA entre el donante y el receptor del trasplante para evitar la respuesta inmune, fue clave para lograr el éxito de los trasplantes alogénicos [79]. Las tasas de morbilidad y de mortalidad, atribuibles principalmente a la enfermedad de injerto contra huésped y a las infecciones, fueron todavía apreciables, pero la mayoría de los pacientes sobrevivieron al procedimiento y las recaídas durante los tres años posteriores al trasplante fueron relativamente poco frecuentes [76,77]. No obstante, y pese los grandes avances conseguidos, que posicionaron al alotrasplante de medula ósea como el tratamiento de elección en la LMC, los importantes efectos secundarios de los regímenes ablativos previos al trasplante, la dificultad para encontrar donantes HLA-compatibles y, especialmente, la llegada de los inhibidores de la tirosina quinasa (del inglés *tyrosine kinase inhibitors* o TKIs), desplazaron parcialmente el uso de esta terapia [74,77]. Desde

entonces el alotrasplante de medula ósea ha sido utilizado como una opción de tratamiento de último recurso, si bien, en la actualidad dicho procedimiento vuelve a jugar un papel importante en la gestión de los pacientes resistentes a los TKIs.

Los inhibidores tirosina quinasa.

La noción de que la LMC podría tratarse con agentes que inhibieran la actividad TK de BCR/ABL comenzó a gestarse prácticamente desde el descubrimiento de la oncoproteína. Sin embargo, la historia del desarrollo de los TKIs no estuvo exenta de dificultades y escepticismos. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en la competencia con el trifosfato de adenosina (ATP) o el sustrato proteico de la quinasa, por lo que la actividad de BCR/ABL se inhibiría a nivel proteico (Figura 4). Así, una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica era la posibilidad de desarrollar un compuesto con acción hacia proteínas quinasa específicas, pues, cabría esperar que este tipo de compuestos inhibieran otras quinasas, produciendo una toxicidad clínica inaceptable. En este contexto, a principios de la década de los 90, Alexander Levitzki y compañeros, estudiaron una serie de compuestos, denominados trifostinas que inhibían la actividad TK de la oncoproteína en la línea celular de LMC K562 [80]. No obstante, y pese a los prometedores resultados obtenidos, dichos compuestos nunca llegaron a aplicarse en la clínica. Fue en este incierto escenario, cuando Brian Druker, en colaboración con científicos del Ciba-Geigy (ahora Novartis), comenzó a estudiar los derivados de la 2-fenilaminopirimidina con la expectativa de que se consiguiera desarrollar un compuesto que pudiera administrarse por vía oral e inhibir a la oncoproteína BCR/ABL. Los datos preclínicos, publicados en 1996 sugirieron que el compuesto, originalmente denominado CGP57-148B, inducía la apoptosis selectiva de la línea celular K562 e inhibía la proliferación de unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) derivadas de pacientes de LMC, mientras que no afectaba a las CFU-GM Filadelfia negativas [80–82]. De forma prácticamente simultánea comenzaron los ensayos en animales, donde el compuesto, renombrado como ST1571, continuó exhibiendo prometedores resultados al inhibir, de forma dosis dependiente, el crecimiento tumoral in vivo [83]. Finalmente, el compuesto entró en la práctica clínica en 1998 y, por supuesto, es ahora ampliamente conocido como mesilato de imatinib o simplemente como imatinib.

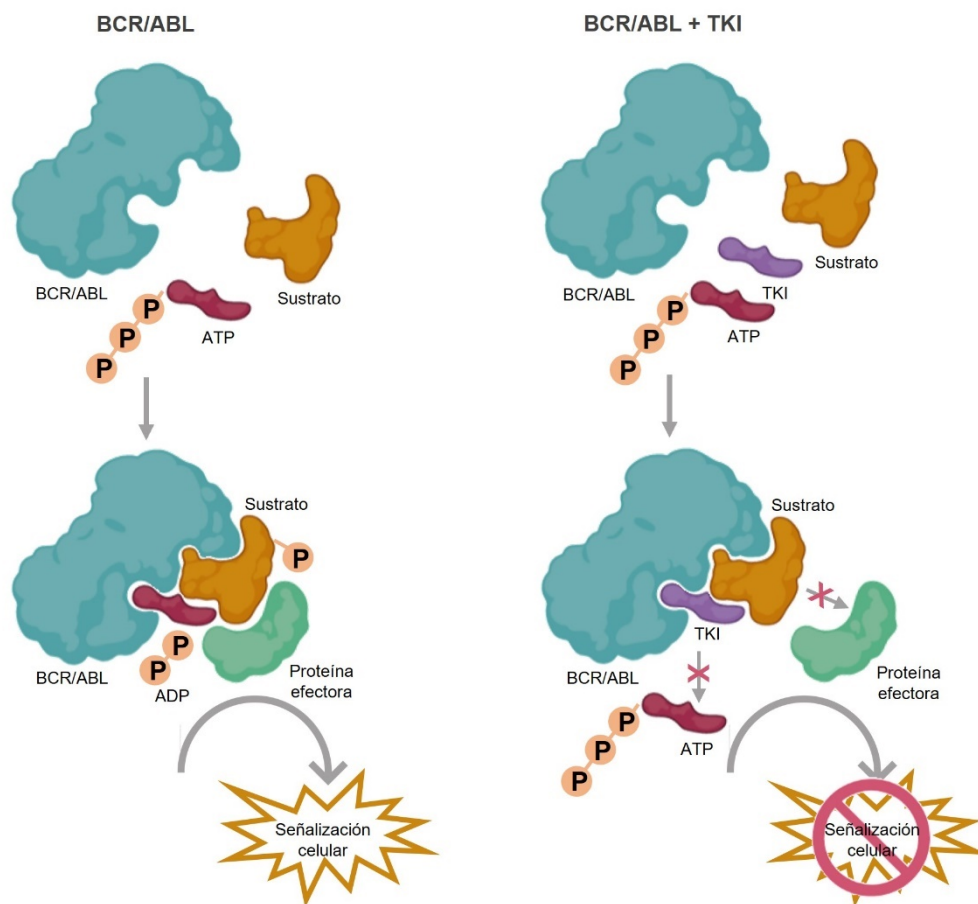


Figura 4. Los inhibidores tirosina quinasa (TKI). Representación esquemática del mecanismo de acción de los TKIs. Los TKIs inhiben a la oncoproteína BCR/ABL, al competir por el sitio de unión del ATP. Cuando se unen a la oncoproteína bloquean su actividad catalítica tirosina quinasa.

Los TKIs llegaron a la rutina clínica tras casi 50 años de investigación básica desde la descripción original del cromosoma Filadelfia. Su notable actividad a la hora de inducir remisiones completas en los pacientes representó la confirmación definitiva del papel central de BCR/ABL en la LMC y supuso un verdadero hito en el tratamiento de la enfermedad. Hoy en día, los TKIs siguen constituyendo la terapia de elección para la LMC. Gracias a ellos los pacientes de LMC en fase crónica, que antes de 2001 tenía una supervivencia media a los ocho años del 20%, ahora tienen una tasa del 87% y una esperanza de vida que se equipara al de personas sanas de su misma edad [84,85]. No obstante, a pesar del éxito alcanzado con los tratamientos basados en los TKIs, aún quedan obstáculos por superar. Una de las principales preocupaciones de los fármacos TKIs es que no abordan la causa etiológica de la enfermedad y el evento oncogénico causante permanece sin corregir. Esta noción es especialmente importante al tener en cuenta que los TKIs no eliminan completamente las CML, si no que existen CML

BCR/ABL positivas residuales en la médula ósea [86]. Como se ha mencionado anteriormente, estas CML residuales “oncogénicamente quiescentes” reciben señales de protección por parte del nicho medular, son resistentes a la acción de los TKIs y están estrechamente implicadas en la aparición de recaídas [87] (Figura 5). Así pues, la medicación oral continuada es necesaria y la interrupción del tratamiento solo es una opción para aquellos pacientes que hayan conseguido una respuesta molecular completa. Una administración ininterrumpida de los TKIs favorece la aparición de notables efectos adversos y hace que un porcentaje significativo de los pacientes adquiera resistencias a los fármacos [88] (Figura 5).

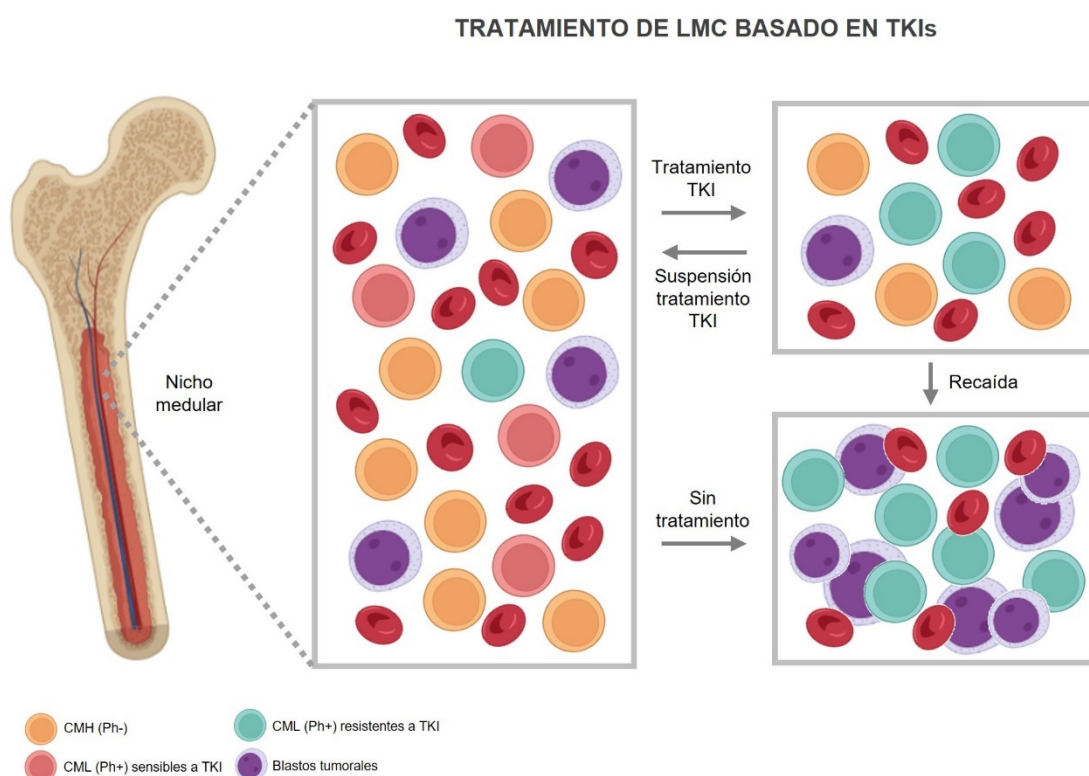


Figura 5. Terapia mediante TKIs para la leucemia mieloide crónica. El tratamiento estándar para la enfermedad, basado en la administración de los inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), son eficientes para silenciar la oncoproteína *BCR/ABL* en las células madre leucémicas (CML). La interrupción del tratamiento puede conducir a una recaída debido a la existencia de células *BCR/ABL* positivas residuales. Así mismo, la aparición de CMLs resistentes a los TKIs durante el tratamiento puede provocar una recaída de la enfermedad.

La identificación de varias formas de resistencias a los TKIs, normalmente causadas por la aparición de mutaciones puntuales en el dominio TK de la oncoproteína *BCR/ABL* [88], han impulsado enormemente la creación de nuevos TKIs de segunda y tercera generación [89]. No obstante, pese a los destacables esfuerzos de la comunidad científica en la generación de nuevos fármacos, que han abierto enormemente el abanico de posibilidades para gestionar la aparición de resistencias, estas siguen suponiendo un

importante problema. Actualmente, se estima que hasta un 33% de los pacientes de LMC no alcanzan una respuesta óptima al tratamiento [90], por lo que la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas resulta crucial para estos casos.

2.5 Aspectos moleculares de la LMC.

Desde que el oncogén de fusión *BCR/ABL* fue descrito en la década de los ochenta, los esfuerzos de la comunidad científica se han centrado en esclarecer sus funciones moleculares en el desarrollo y mantenimiento de la LMC. La fusión oncogénica *BCR/ABL* es compleja, conteniendo múltiples sitios funcionales que pueden contribuir al fenotipo leucémico de la enfermedad.

El gen *ABL* es el homólogo humano del protooncogén *v-abl*, hallado por primera vez en el genoma del virus de la leucemia murina de Abelson (*a-MuLV*) [91]. La proteína ABL humana, de 145 kDa, se expresa de manera ubicua, posee dos isoformas que surgen del procesamiento alternativo del primer exón y presenta actividad tirosina quinasa (TK) [92].

La actividad TK de ABL, que recae en su dominio proteico SH1 [93], se encuentra estrechamente regulada a través de otros dominios estructurales (SH2 y SH3) que le permiten la interacción con otras proteínas [94,95] (Figura 6). En el extremo C-terminal de la proteína se encuentran las señales de localización nuclear (del inglés *nuclear localization signals*, NLS) [96], el motivo de unión al ADN [97] y el motivo de unión a los filamentos de actina [98] (Figura 6). Tanto la regulación de la actividad TK como la localización celular de la proteína son aspectos importantes que se ven alterados en la proteína de fusión p210^{*BCR/ABL*} y explican su actividad oncogénica. Así, mientras que la proteína endógena ABL es capaz de desplazarse entre el núcleo y el citoplasma [96], la oncoproteína p210^{*BCR/ABL*} se localiza en el citoplasma [99], donde a través de su actividad catalítica, altera múltiples rutas celulares. En cuanto a su función, ABL participa en diferentes procesos celulares tales como la regulación del ciclo celular [100], la respuesta al daño genotóxico [101] y la transmisión de información acerca del entorno celular mediante la señalización de integrinas [102]. Tiene un papel esencial durante el desarrollo embrionario, pues su eliminación en homocigosis en modelos murinos causa muerte perinatal, atrofia tímica y esplénica y linfopenia de células B y T [103]. Sin embargo, este papel esencial no parece mantenerse en el adulto, ya que los inhibidores de ABL, como

los TKIs en el tratamiento de la LMC, son bien tolerados por los pacientes, lo que enfatiza el papel redundante que juegan otras quinasas de la familia de ABL.

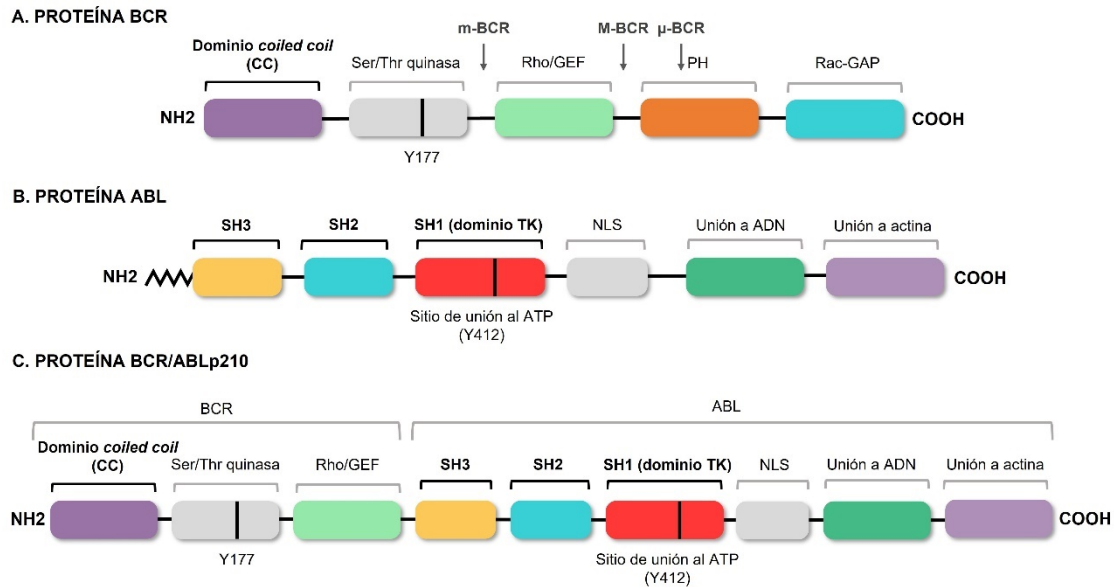


Figura 6. Dominios de la proteína BCR/ABL. Regiones proteicas localizadas en las proteínas BCR (A) y ABL (B), y las que se mantienen en la fusión (C). La figura destaca el dominio *coiled-coil* (CC) de BCR, que permite la dimerización de la oncoproteína, y los tres dominios SRC de ABL1, incluyendo el dominio tirosina quinasa (SH1) y los dominios reguladores (SH2 y SH3).

Por su parte, el gen *BCR* humano codifica para una proteína de 160 kDa que, al igual que *ABL*, se expresa de forma ubicua [92]. En el extremo N-terminal de la proteína encontramos un dominio serina-treonina quinasa por el que, posiblemente, BCR sea capaz de autofosforilarse [104] (Figura 6). A continuación, posee un dominio *coiled coil* que permite la formación de homotetrameros in vivo [105] (Figura 6). Este dominio de oligomerización es especialmente importante para la actividad de BCR/ABL, pues la tetramerización de la oncoproteína a través de este dominio se correlaciona tanto con su actividad TK como con su capacidad de unión a los filamentos de actina [105]. En la región central de la proteína encontramos su dominio RHOGEF (del inglés *Rho family guanine nucleotide exchange factors*) [106] que media el intercambio de guanidina trifosfato (GTP) por guanidina difosfato (GDP) en la familia de GTPasas RHO, pudiendo activar factores transcripcionales como NF-κB [107] (Figura 6). En el extremo C-terminal, la proteína posee un dominio para la activación de RAC, una GTPasa de la superfamilia de RAS que regula la polimerización de los filamentos de actina [108]. Además, la proteína BCR posee diversos residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados [109], siendo especialmente importante el 177, a través del cual se une a la proteína adaptadora GRB-2, implicada en la activación de la ruta de RAS [110] (Figura 6). Así

mismo, en células hematopoyéticas normales, ABL interactúa con BCR, a través de la fosforilación en dicho residuo Y177 [110,111]. La presencia de BCR/ABL en estas células llevaría a su inserción en los complejos multiproteicos fisiológicos, de los que forman parte BCR y ABL, causando su perturbación y desacople [112]. A diferencia de ABL, los ratones deficientes para BCR son totalmente viables, siendo el aumento de la actividad oxidativa en neutrófilos el único efecto detectado hasta el momento [113], lo que refleja la probable redundancia en sus vías de señalización.

El oncogén BCR/ABL.

La traslocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 t(9;22)(q34;q11) tiene como consecuencia molecular la yuxtaposición del extremo 5' de *BCR* y el extremo 3' de *ABL* [31]. Sin embargo, la localización exacta del punto de fusión entre ambos genes es variable, dando lugar a diferentes transcritos *BCR/ABL*, que en ocasiones se han correlacionado con el fenotipo patológico de la enfermedad, el pronóstico del paciente o la respuesta a la terapia [114,115].

Los puntos de fusión dentro de *ABL* ocurren a lo largo de una amplia región (de unos 300 kb) localizada en su extremo 5' y que engloba al primer y segundo exón alternativo del gen (1b y 1a) [115]. Independientemente de la ubicación exacta del punto de ruptura, el procesamiento del transcrito de fusión va a acoplar la secuencia de *BCR* al segundo exón (a2) de *ABL* [116] (Figura 7). La pérdida del primer exón es la única modificación que sufre la secuencia de *ABL* en la formación del oncogén de fusión *BCR/ABL*, aunque esta pérdida, por sí sola, no le confiere potencial oncogénico [117]. A diferencia de lo que ocurre con *ABL*, los puntos de ruptura de *BCR* son mucho más variables, localizándose en una de las tres regiones denominadas *breakpoint cluster regions* (bcr) [31,118,119] (Figura 7). En la mayoría de pacientes de LMC y en aproximadamente un tercio de pacientes Filadelfia positivos de leucemia linfoblástica aguda (Ph⁺ LLA), la ruptura se produce dentro de un área de 5,8 kb que va desde el exón 12 al exón 16 de *BCR* (originalmente denominados exones b1 y b5), definida como la región de punto de ruptura mayoritaria o M-bcr [31] (Figura 7). A pesar de que el punto preciso de ruptura dentro de la región M-bcr puede variar y dar lugar a transcritos de fusión atípicos [50,120], en la mayoría de los casos la escisión tiene lugar entre los exones 13 y 14 (b2 y b3) o entre los exones 14 y 15 (b3 y b4), dando lugar a los transcritos

quiméricos b2a2 y b3a2 (Figura 7). Ambos transcritos, expresados de forma dual en un 10% de los pacientes [121], dan lugar a una proteína de fusión de 210 kDa ($p210^{BCR/ABL}$). Sin embargo, en el resto de pacientes de LLA y en parte de los pacientes de LMC el punto de ruptura para *BCR* se encuentra en una región de 54,4kb (denominada punto de ruptura minoritario o m-bcr) localizada en el extremo 3' del primer intrón del gen; por lo que en el transcrito resultante el primer exón de *BCR* (e1) se fusiona directamente al segundo exón de *ABL* (a2) [122–124]. En este caso, el ARNm resultante (e1a2) codifica para una proteína de 190 kDa ($p190^{BCR/ABL}$) (Figura 7) con una actividad TK cinco veces mayor a la de la oncoproteína $p210^{BCR/ABL}$ [125]. Numerosos estudios in vitro [125,126] e in vivo, utilizando modelos animales [54,114] han ratificado esta exacerbada actividad oncogénica de la proteína $p190^{BCR/ABL}$, que concuerda con su frecuente detección en las formas agudas de leucemia [127]. Finalmente, la tercera región de puntos de ruptura para *BCR*, denominada μ -bcr, la encontramos aguas abajo del exón 19 del gen (e19) y, tras su traslocación con la secuencia de *ABL*, da lugar a transcritos codificantes para una proteína de 230 kDa ($p230^{BCR/ABL}$) [128] (Figura 7). La expresión de la oncoproteína $p230^{BCR/ABL}$ suele correlacionarse, aunque con excepciones [129], con la leucemia neutrofílica crónica (LNC), de un curso más indolente que el de la LMC y una transformación blástica más ralentizada o inexistente [128].

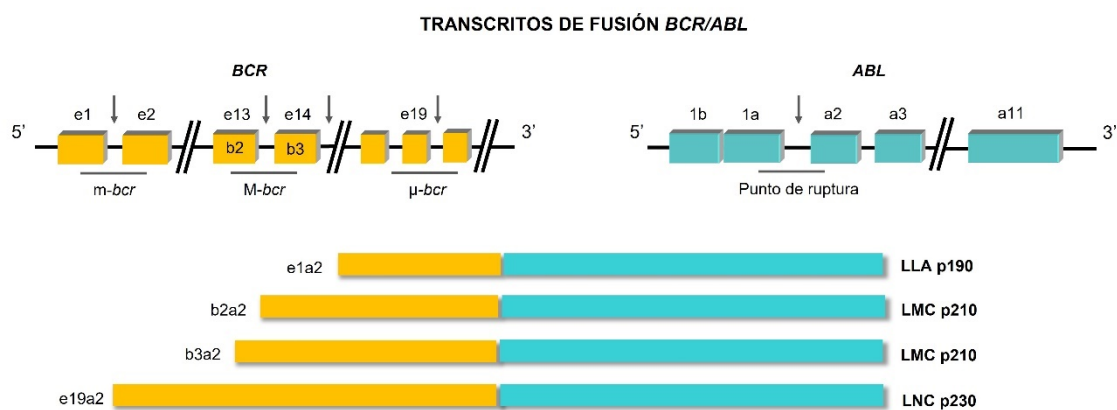


Figura 7. Localización de puntos de ruptura entre los genes *BCR* y *ABL*. Arriba: Representación esquemática de la estructura de los genes *BCR* y *ABL*, indicándose con flechas los puntos de ruptura más frecuentes para ambos genes. Abajo: Diferentes combinaciones producen diferentes transcritos de fusión y diferentes resultados proteicos.

Toda la investigación acumulada durante los últimos años sobre los diferentes reordenamientos genéticos existentes en torno a la formación de *BCR/ABL* nos han brindado una valiosa información acerca de las funciones moleculares de ambos genes implicados. Uno de los aspectos más llamativos es la frecuente conservación de la

secuencia de *ABL* que se mantiene en el oncogén, que contrasta con la amplia variabilidad existente para el fragmento de *BCR*. Apoyando este concepto, encontramos interesantes estudios acerca de otros genes de fusión implicados en enfermedades neoplásicas, como es el caso de la fusión *TEL/ABL*, encontrada en casos raros de LLA [130,131], que parece indicar que el fragmento de *BCR* puede ser incluso reemplazado por otra secuencia y aun así causar la aparición de leucemia. Así, hoy en día está ampliamente aceptado el papel de *ABL* como principio transformador de la enfermedad, mientras que la fracción de *BCR* parece dictar el fenotipo patológico de la misma.

Efectos moleculares provocados por BCR/ABL.

Bajo condiciones fisiológicas, la actividad TK de *ABL*, implicada en numerosas vías de señalización del ciclo celular, se encuentra estrechamente regulada. Sin embargo, la activación constitutiva de la actividad TK de *BCR/ABL* altera diversos mecanismos celulares, tales como la adhesión celular [132], la señalización por mitógenos [133] o la apoptosis [134], que desembocan en la transformación leucémica de las células.

Las propiedades de adhesión celular, tanto a las células del estroma del nicho medular como a la matriz extracelular, se ven disminuidas en las CML [132,135]. Este fenómeno, además, tiene como consecuencia directa un escape de las CML a la regulación de la proliferación, normalmente inhibida tras la adhesión al estroma. El interferón- α (IFN- α), utilizado como fármaco en el tratamiento de la LMC, parece revertir este defecto en la adhesión [136]. Los análisis del perfil de expresión génica de las CML han revelado un descenso en la expresión de moléculas de adhesión como CD44 o NR4A1 [137], implicadas en el mantenimiento de la quiescencia y en el desprendimiento del nicho. Las CMH normales son sensibles al gradiente de CXCL12 (SDF-1), que promueve su migración al nicho, mediante estimulación de su receptor CXCR4 que activa tanto a CDC42 como a RAC (Figura 8). Sin embargo, en las CML, la actividad TK de *BCR/ABL* activa a CDC42 y RAC a través de la fosforilación de VAV1, causando su insensibilización a CXCL12 [138] (Figura 8). Finalmente, la proteína CRKL, una de las principales dianas de *BCR/ABL* [139], está implicada en la regulación de la motilidad celular [140] y en la adhesión celular mediada por integrinas [141], proteínas indispensables en la interacción entre las células troncales y el estroma.

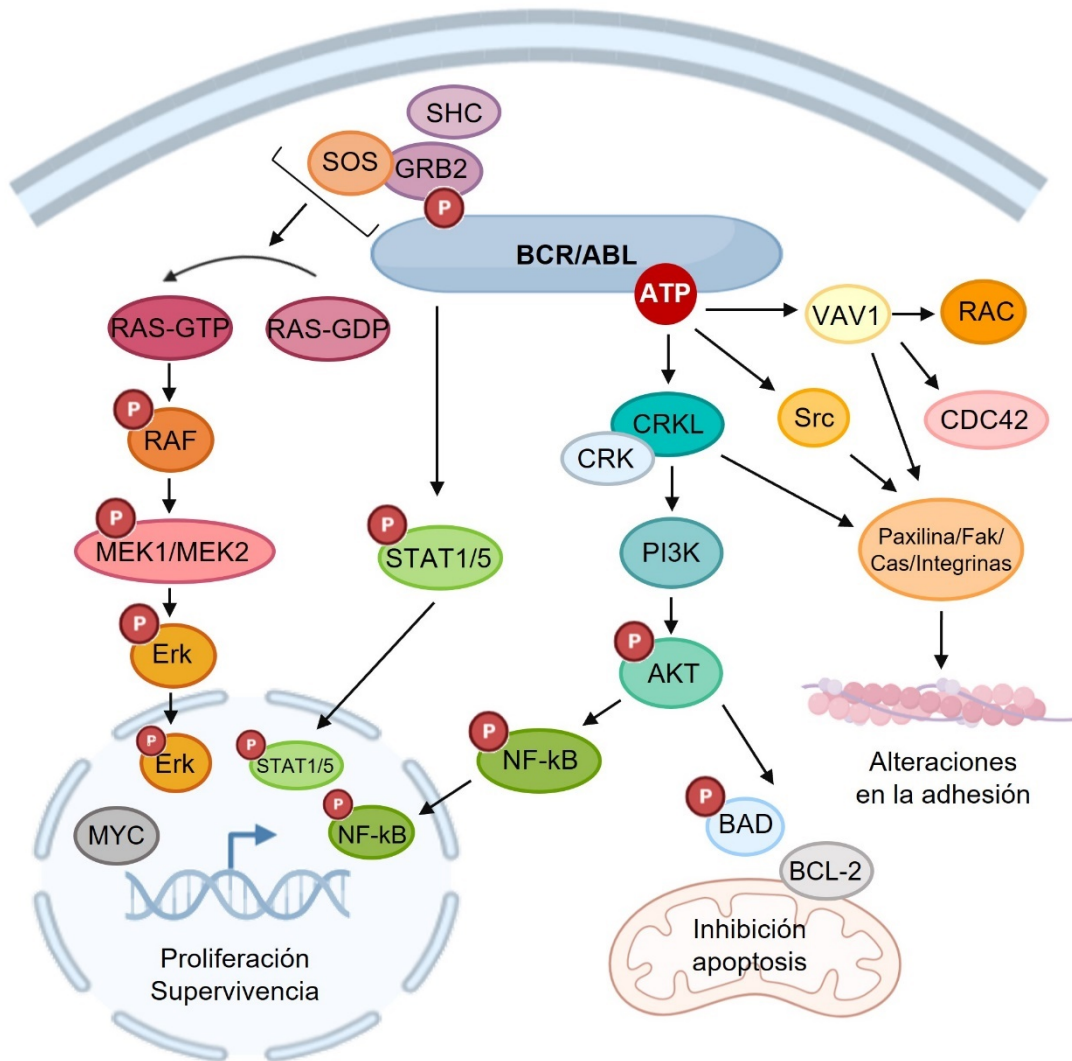


Figura 8. Vías de señalización activadas por BCR/ABL. Señalización intracelular de los principales procesos celulares alterados por la actividad TK de BCR/ABL, tales como la proliferación, la apoptosis y la adhesión celular.

En cuanto al papel de BCR/ABL en las rutas de señalización mediadas por mitógenos, la actividad TK del oncogén influye en vías moleculares tan críticas como las de las MAP quinasas, PI3K, AKT y activa factores de transcripción como STAT o MYC. En la ruta de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), BCR/ABL activa a RAS a través de la molécula adaptadora GRB-2 [142]. La autofosforilación de la oncoproteína en su tirosina 177 proporciona un sitio de unión directo para GRB-2 que, tras la unión con la proteína SOS, estabiliza a RAS en su forma activa (unida a GTP) [142] (Figura 8). SHC y CRKL son proteínas adaptadoras capaces de activar a RAS y ambas son sustratos directos de BCR/ABL [139,143]. La activación constitutiva de RAS

y el subsecuente reclutamiento de la serina-treonina quinasa RAF en la membrana celular inicia una cascada de señalización a través de las serina-treonina quinasas MEK1/MEK2 y ERK, que finalmente conduce a la activación de la transcripción génica [144] (Figura 8). En la ruta de las fosfoinositol-3 quinasas (PI3K), BCR/ABL forma complejos multiméricos con las PI3 quinasas y las moléculas adaptadoras CRK y CRKL [141]. La activación de las PI3 quinasas conduce a la activación de la serina-treonina quinasa AKT [145], implicada en la señalización celular antiapoptótica [146]. De esta forma, BCR/ABL emula el patrón generado por los factores de crecimiento fisiológicos, manteniendo una señalización anti apoptótica constitutiva (Figura 8). Por otra parte, el papel de BCR/ABL en la ruta de las Janus-quinasas-transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (JAK-STAT) vuelve a explicar la capacidad del oncogén para transformar líneas celulares dependientes de factores de crecimiento en independientes del mismo. A diferencia de la activación de la ruta JAK-STAT mediante estímulos fisiológicos, BCR/ABL puede activar directamente a las proteínas STAT1 y STAT5, sin la fosforilación previa de las proteínas JAK [147] (Figura 8). Por último, la activación del protooncogén MYC mediada por BCR/ABL tiene lugar a través del dominio SH2 de la oncoproteína [148] y parece estar mediada por RAS/RAF, las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y el factor de transcripción E2F que activa en última instancia el promotor de MYC [149].

Como ha sido descrito, el efecto anti apoptótico producido por BCR/ABL está ligado a la actividad TK de la oncoproteína y normalmente se correlaciona con la activación de RAS [133,150]. Sin embargo, las vías por las que se media esta inhibición de la apoptosis son complejas e implican la actividad de diversas moléculas señalizadoras. BCR/ABL puede bloquear la liberación del citocromo C de las mitocondrias y con ello, ocasionar la inhibición de la ruta de las caspasas [151,152]. Además, la inhibición de la apoptosis puede estar mediada por BCL-2, proteína antiapoptótica que se encuentran sobreexpresadas por BCR/ABL de manera RAS [153] o PI3 quinasa [145] dependiente (Figura 8). Otro vínculo entre BCR/ABL y la inhibición de la apoptosis consiste en la fosforilación de la proteína proapoptótica BAD, mediada tanto por AKT como por RAF-1 [154,155], que provoca su secuestro en el citosol e impide su traslocación a la membrana mitocondrial (Figura 8). Finalmente, es posible que BCR/ABL también inhiba la apoptosis al disminuir la expresión de la proteína de unión a la secuencia consenso del interferón (ICSBP) [156]. Este fenómeno se relacionaría directamente con la evidencia

de que ratones deficientes para ICSBP desarrollan un síndrome proliferativo [157] y explica, al menos en parte, el éxito de la terapia con IFN- α en la LMC.

3. LAS NUCLEASAS DE EDICIÓN GENÓMICA.

3.1 Origen y mecanismo de acción.

Las técnicas de modificación genética han sido la base de las investigaciones biomédicas y biotecnológicas durante las últimas décadas. Incluso en los estudios clásicos de Mendel, Morgan y Avery, el estudio de los genes siempre ha estado ligado al análisis de sus modificaciones y, desde entonces, la comunidad científica centró sus esfuerzos en conseguir manipular las secuencias de ADN de forma específica y precisa. Durante muchas décadas, la posibilidad de inducir mutaciones en sitios específicos del genoma quedo relegada a ciertos organismos y contextos celulares determinados. Este era el caso de los métodos de *gene targeting* llevados a cabo en levaduras y ratones entre la década de los 70 y los 80 [158–160]. Sin embargo, estos métodos eran dependientes de los mecanismos de recombinación homóloga celulares, que eran notablemente específicos, pero altamente ineficientes. El alto coste económico y complejidad técnica de los métodos de modificación, selección y caracterización de las células, unidos a la imposibilidad de cultivar células madre embrionarias de otras especies más allá del ratón limitaron en gran medida el uso de esta técnica [161].

En este contexto tan limitante, la llegada de las nucleasas de edición génica revolucionó por completo el ámbito científico. Su gran versatilidad hizo factible la posibilidad de editar cualquier secuencia genómica en cualquier organismo y la relativa sencillez de su diseño permitió que la nueva tecnología se instaurara rápidamente en la rutina de los laboratorios [162]. Las nucleasas de edición genómica basan su mecanismo de acción en la generación de rupturas de doble cadena (del inglés *double-strand breaks* o DSB) en el genoma que estimulan los mecanismos celulares de reparación del ADN (Figura 9). El primero de estos mecanismos es la reparación por unión de extremos no homólogos (del inglés *non-homologous end-joining* o NHEJ) mediante el cual la célula repara el DSB mediante la unión de los dos extremos libres de ADN bajo actuación de la ligasa IV [163]. Este proceso no requiere la presencia de una molécula homóloga y por tanto no está restringido a fases concretas del ciclo celular [163]. La clave de las modificaciones genéticas generadas empleando esta vía de reparación es que, durante el

proceso de unión de los extremos, la célula introduce mutaciones aleatorias mediante la inserción o deleción (INDELS) de unos pocos nucleótidos. Como resultado, la secuencia codificante diana se modifica, con una alta frecuencia, su marco de lectura se verá alterado y en la mayoría de los casos esto generará un alelo nulo o *knock out* (KO). Ésta es la base de los experimentos de silenciamiento génico y de generación de animales deficientes o KO. El otro mecanismo principal de reparación del ADN es la vía de reparación mediada por homología (del inglés *homology-directed repair* o HDR). Cuando el DSB es reparado por HDR es necesaria la presencia de una molécula homóloga, por lo que esta vía se produce de manera natural mayoritariamente en las fases S y G2 del ciclo celular, donde las cromátidas hermanas son más accesibles [164]. El proceso implica la invasión de la molécula homóloga por parte del extremo 3' sobresaliente y la posterior recombinación, mediada por la recombinasa RAD51 [165]. La vía HDR explota este fenómeno de recombinación homóloga para introducir una secuencia de ADN donadora exógena de forma específica en el sitio del DSB (Figura 9). Así, mediante este mecanismo de reparación es posible introducir o corregir mutaciones puntuales en secuencias específicas, reemplazar genes concretos o bien, insertar con precisión secuencias deseadas a partir de un ADN donador. A este mecanismo celular se debe la generación de modelos animales con secuencias reemplazadas o *knock in* (KI).

Actualmente disponemos de tres clases de nucleasas programables, capaces de generar DSB en prácticamente cualquier objetivo deseado: las nucleasas de dedos de zinc (del inglés *zinc-finger nucleases* o ZFN), las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (del inglés *transcription activator-like effector nucleases* o TALENs) y, por supuesto, el popular sistema CRISPR/Cas9 (del inglés *Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) [166]. Aunque ésta última es la que actualmente domina en todos los laboratorios de investigación del mundo, tanto las ZFNs como las TALENs aún son utilizadas en diversos campos de investigación biomédicos y agrícolas. Todas estas nucleasas de edición genómica basan su mecanismo de acción en la capacidad de reconocer secuencias concretas de ADN (dominio de unión al ADN) y escindir el enlace fosfodiéster (dominio nucleasa) [166].

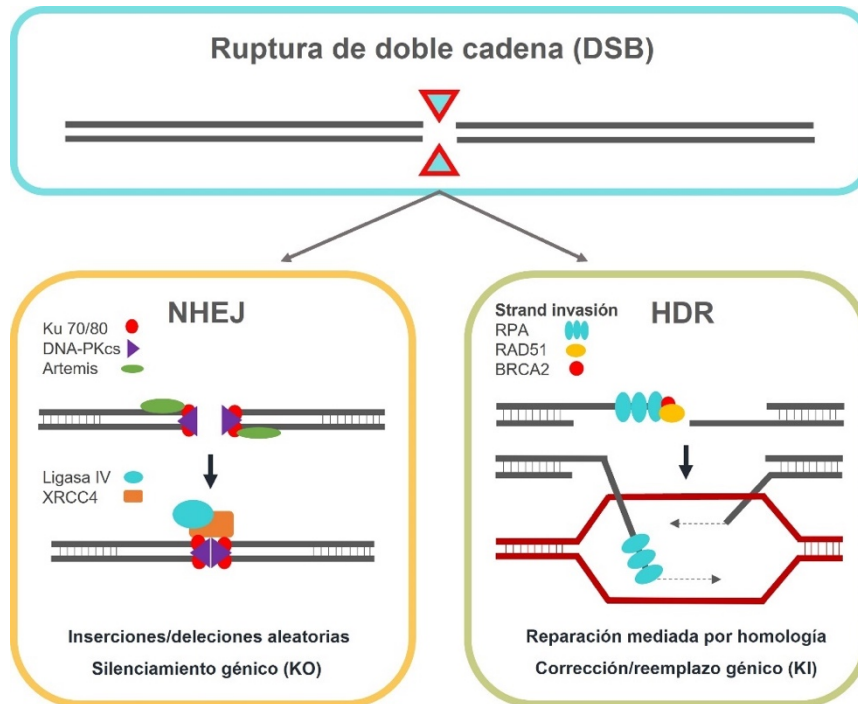


Figura 9. Mecanismos celulares de reparación del ADN. El mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ) implica la acción de las proteínas ku70/80, DNA-PKcs y Artemis, con capacidad para unirse a los extremos libres de ADN que se generan. Los extremos de ADN resecaados se unen por la acción de la ligasa IV con la inserción de un número variable de nucleótidos (INDELS) que, en la mayoría de los casos, conducen a la generación de alelos nulos. La vía de reparación dirigida por homología (HDR) comienza con la resección de los extremos de ADN liberados. Las proteínas RPA, Rad51 y BRCA2 actúan uniendo y protegiendo el ADN de cadena sencilla que se genera. Mediante la recombinación homóloga, la vía de la HDR permite la introducción de plantillas de ADN procedentes de donantes exógenos en el lugar de la rotura de la doble cadena (DSB), sustituyendo la secuencia genómica objetivo.

3.2 Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN).

Las ZFN son proteínas de fusión artificiales formadas por un dominio nucleasa, derivado de la enzima de restricción FokI, y un dominio de unión al ADN proveniente de un tipo de factores de transcripción eucariotas: las proteínas de dedos de zinc. Esta región proteica de dedos de zinc consiste en un módulo de reconocimiento formado por entre tres y seis dedos de zinc unidos en tándem, cada uno de los cuales puede reconocer tres nucleótidos, generando así una ZFN capaz de unirse a secuencias de entre 9 y 18 nucleótidos [167] (Figura 10A). De esta forma, mediante el ensamblaje modular de distintas combinaciones de dedos de zinc, el sistema permite diseñar ZFN específicas que reconozcan secuencias de ADN concretas, que posteriormente serán escindidas mediante el dominio nucleasa FokI (Figura 10A). Esta nucleasa debe dimerizar para llevar a cabo un DSB en la hebra de ADN, lo que implica que deben utilizarse dos dominios ZFN para formar una nucleasa funcional. Ambos monómeros se situarán próximos, separados por

entre cinco y siete pares de bases, interactuando con sus secuencias diana, localizadas a izquierda y derecha del sitio de corte. El requisito de dimerización permite además duplicar la longitud de la secuencia diana a reconocer, incrementando la especificidad del sistema [168] (Figura 10B).

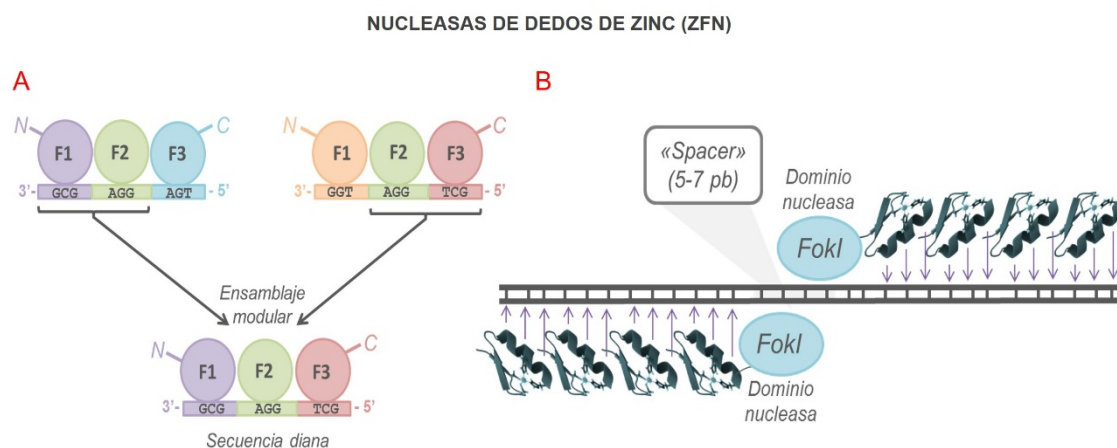


Figura 10. Nucleasas de edición de dedos de zinc (ZFNs). (A) Diseño del sistema ZFNs mediante el ensamblaje de distintas combinaciones de ZFs. (B) ZFN en su forma dimerizada y funcional, capaz de producir DSBs mediante el dominio nucleasa.

La principal desventaja del sistema radica en la complejidad de su diseño. La gran dependencia del contexto de los dedos de zinc, que hace que su especificidad varíe en función del resto de posibles sitios de unión de dedos de zinc de su entorno [167], complica en gran medida su diseño y hace necesaria la inversión de grandes cantidades de tiempo y dinero. Pese a estos inconvenientes, las ZFN han sido ampliamente utilizadas en el campo de la investigación, su capacidad para corregir alteraciones génicas *in vivo* ha sido demostrada en numerosos estudios [169,170] y con su descubrimiento se abrió un enfoque prometedor para el tratamiento de patologías genéticas mediante terapia génica.

3.3 Las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs).

Al igual que las ZFNs, las TALENs basan su mecanismo de acción en la unión entre un dominio nucleasa de corte inespecífico (FokI) y un dominio de unión al ADN de diseño específico para cada secuencia. En el caso de las TALENs, el dominio de unión al ADN está compuesto por unas repeticiones altamente conservadas derivadas de efectores

de tipo activador de la transcripción (TALE). Las proteínas TALE fueron encontradas originalmente en bacterias del género *Xanthomonas*, que las secretaban a fin de alterar la transcripción de ciertos genes en la célula hospedadora [171]. Por otra parte, de forma similar a lo que ocurre con los ZFNs, el dominio nucleasa de FokI debe dimerizar para activarse. De esta forma, dos TALENs tienen que unirse al DNA quedando próximas entre sí, para permitir la dimerización de los dominios FokI y la generación de los DSBs (Figura 11A).

La gran ventaja que ofrecen las TALENs en comparación con las ZFN radica en la facilidad y sencillez de su diseño. Mediante el uso de un simple código proteína-ADN, que relaciona los dominios de repetición TALE con los nucleótidos para los que tiene afinidad, se pueden diseñar una gran cantidad de módulos TALE específicos para cada secuencia genómica diana (Figura 11B). Cada uno de los dominios TALE se une de forma precisa a un único nucleótido gracias a dos aminoácidos hipervariables, presentes en

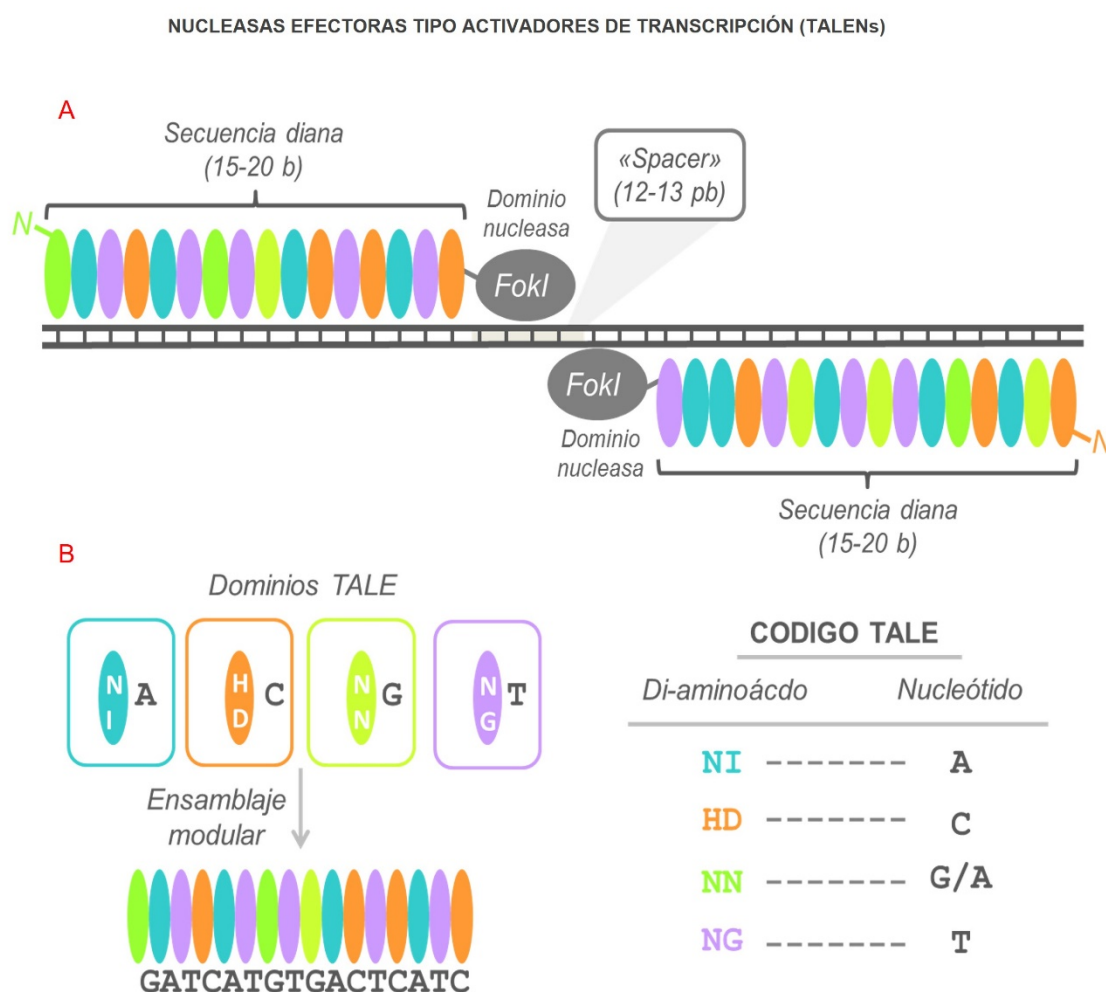


Figura 11. Nucleasas de edición TALENs. (A) TALENs en su forma dimerizada y funcional, capaz de producir DSBs mediante el dominio nucleasa. (B) Diseño del sistema TALENs mediante un código péptido-ADN.

posiciones concretas de cada dominio de repetición. Tras este descubrimiento, la generación y producción de dominios TALE fue ampliamente estudiada, lo que derivó en el desarrollo de una gran cantidad de protocolos de ensamblaje [172]. La facilidad del diseño, las altas tasas de escisión y el prácticamente ilimitado rango de secuencias objetivo sobre las que pueden actuar, convirtieron a las TALENs en unas excelentes herramientas de edición génica ampliamente utilizadas en diversas investigaciones biomédicas [173,174].

3.4 El sistema CRISPR/Cas9.

La instauración durante la pasada década de las nucleasas de edición genómica (ZFNs y TALENs) permitió la generación de numerosos animales modificados genéticamente [175,176] y con ellas llegó una tecnología que impulsaría enormemente el campo de la transgénesis. Sin embargo, estas herramientas se vieron rápidamente superadas con la llegada de la revolucionaria tecnología CRISPR/Cas9 [177]. La simplicidad de este sistema ofrece una herramienta efectiva, de bajo coste y universal que supuso una nueva era en el campo de la terapia génica.

El sistema CRISPR/Cas9 tiene su origen en un sistema de inmunidad adaptativa encontrado en la mayoría de arqueas y casi un 50% de las bacterias, que protege a dichos organismos frente a la infección por fagos (Figura 12). Este rudimentario sistema inmune se encuentra codificado en un locus donde se concatenan una serie de secuencias palindrómicas repetidas, separadas por otro tipo de secuencias “espaciadoras” diferenciales, todas ellas precedidas por una secuencia líder rica en AT [178]. El investigador español Francisco Mojica fue el primero en describir, en 1993, esta matriz de secuencias repetidas en tándem, gracias a sus investigaciones en la arquea *Haloferax mediterranei* [179]. Anteriormente, se describió una estructura similar en *Escherichia coli*, encontrándose una conexión con las eubacterias [180]. Mojica acuñó el acrónimo de CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) y Ruud Jansen lo utilizó en una publicación por primera vez en 2002 [181]. Tres años más tarde llegó el sorprendente descubrimiento de que estas secuencias espaciadoras desconocidas mostraban un alto porcentaje de similitud con secuencias encontradas en varios tipos de bacteriófagos [182,183], lo que sembró la idea de que este sistema podía representar en realidad un tipo de memoria inmunológica. Finalmente, en 2007, Barrangou y cols.

demonstraron que el sistema CRISPR era un rudimentario sistema inmune procariota que protege a dichos organismos contra las infecciones de ADN exógeno (Figura 12) [184]. Los investigadores también estudiaron el papel de las proteínas asociadas a CRISPR: las proteínas Cas. Descubrieron el papel de la proteína Cas7, que parecía estar implicada en la generación de nuevos espaciadores y, más importante, revelaron el papel de la proteína Cas9, cuya función era la de escindir, mediante un DSB, el ADN invasor [185]. Posteriormente se demostró que los diferentes espaciadores entremezclados con las secuencias repetidas en tándem de la matriz CRISPR eran expresados en forma de pequeños ARN que servían como guía para el sistema, al poseer homología parcial con la secuencia diana. Estos pequeños ARNs de CRISPR, denominados crRNAs (del inglés

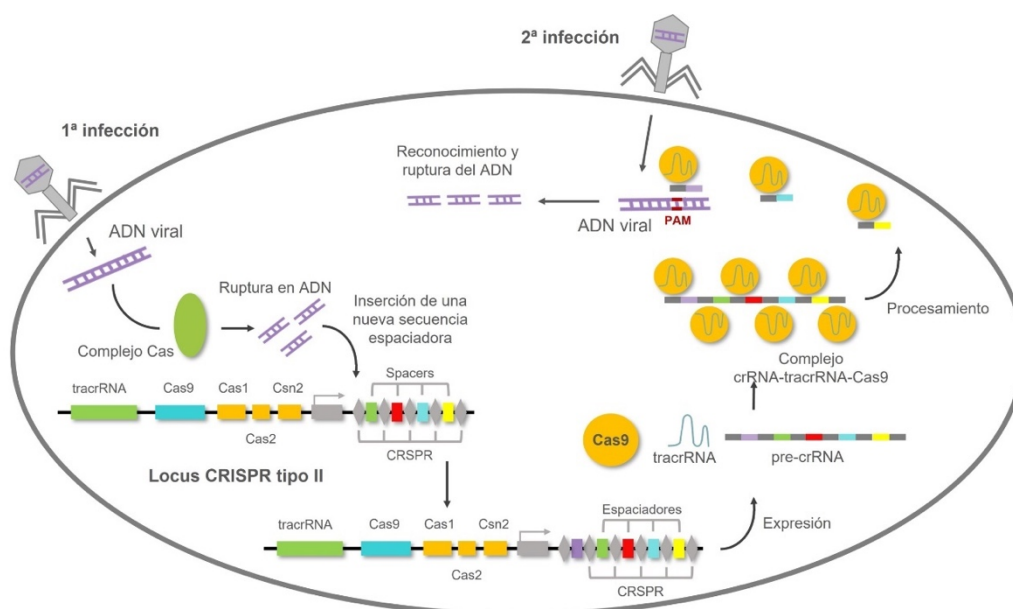


Figura 12. Sistema de inmunidad adaptativa mediado por CRISPR, presente en arqueas. Mecanismo celular inmune mediado por CRISPR/Cas9, mediante el cual es capaz de degradar ADN viral tras una segunda infección.

CRISPR related RNA) eran los responsables de la resistencia a la infección y podían ser transferidos de una cepa resistente a una que no lo fuera, induciendo resistencia en la segunda [186,187].

El hallazgo de que los crRNAs guiaban a la nucleasa Cas9 a escindir el genoma invasor, recordó nuevamente al mecanismo de las anteriores nucleasas de edición génica (con un dominio de reconocimiento del ADN y un dominio de escisión de este) y abrió las puertas a utilizar el sistema como una tecnología de edición génica, altamente específica y direccionable. Cabe destacar que el único requisito para la actividad de la nucleasa Cas9 es la existencia de un motivo PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*)

de tres nucleótidos, en el extremo 3' de la secuencia diana [188]. La consecuencia de la actividad de la proteína Cas9 será un único corte de doble cadena, que generará extremos romos en el ADN, tres nucleótidos “aguas arriba” de la secuencia PAM. Finalmente, el descubrimiento del ARN transactivador (del inglés *trans-activator RNA* o *tracrRNA*), completó el rompecabezas que aclaraba el mecanismo de acción del sistema [189]. El *tracrRNA* actúa como elemento estructural, hibridando parcialmente con el *crRNA* y con la endonucleasa Cas9, permitiendo el ensamblaje de todos los componentes y formando la ribonucleoproteína [190].

Para simplificar aún más el sistema, las científicas Doudna y Charpentier demostraron que los dos ARNs (*crRNA* y *tracrRNA*) podían funcionar *in vitro* cuando se fusionaban en un ARN único (del inglés *single guide RNA* o *sgRNA*) [190]. Ellas, al igual que Siksnys, demostraron que la nucleasa Cas9 era capaz de cortar ADN purificado *in vitro* y el sistema podía programarse diseñando *sgRNAs* a medida [191]. Estos descubrimientos mostraron la oportunidad del uso del sistema como nucleasa de edición del genoma, sin embargo, la cuestión clave que quedaba por resolver era si el sistema CRISPR también funcionaría en células de mamíferos. A mediados del 2012, Feng Zhang, diseñó un sólido sistema de tres componentes que consistía en la nucleasa Cas9 aislada de *Streptococcus thermophilus*, un *tracrRNA* y una matriz CRISPR para dirigirse a 16 sitios del genoma humano y murino [191]. Así, Zhang respondió a la pregunta y demostró que el sistema era capaz de inducir mutaciones en uno o varios genes al mismo tiempo, generando indels por la vía de NHEJ [192]. Poco tiempo después se demostró que el sistema CRISPR también permitía la inserción de nuevas secuencias en el sitio diana, explotando la vía HDR, cuando se aportaba un ADN molde [192]. Actualmente, el sistema CRISPR/Cas9 es universalmente utilizado en laboratorios de todo el mundo. La herramienta de edición ha sido ampliamente utilizada en investigación, tanto para estudios *in vitro* [193,194], como para la generación de animales modificados genéticamente [195–199] y, más recientemente, aplicada al campo de la terapia génica [199,200].

4. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA.

4.1 Evolución del sistema CRISPR/Cas9.

La prometedora aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en terapia génica trajo consigo un nuevo campo de investigación de búsqueda constante de actualizaciones y mejoras del sistema de edición, que hoy en día continúa avanzando. Uno de los primeros objetivos de los investigadores fue la búsqueda de nuevas proteínas Cas con diferentes propiedades, tales como tamaño de proteína, especificidad de sustrato o secuencias PAM alternativas. Pese a que la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), utilizada en la publicación original, sigue siendo, por mucho, la nucleasa más popular para la edición del genoma, hoy en día disponemos de una gran variedad de versiones de proteínas Cas con diferentes características. Uno de los grandes inconvenientes de la proteína SpCas9 es su gran tamaño (de 163 kDa) que imposibilita su entrega utilizando virus adenoasociados, uno de los vectores más utilizados en terapia génica. En busca de variantes más pequeñas, los investigadores descubrieron en 2015 la Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), de 130 kDa, que sí podía ser empaquetada en este tipo de vectores virales [201]. La SaCas9 ha sido muy utilizada en experimentos *in vivo* con ratones donde se ha logrado la edición genómica de órganos específicos mediante la administración viral del sistema CRISPR/Cas9 [201]. En 2015, el equipo de Zhang informó sobre un sistema CRISPR novedoso y más preciso descubierto en *Acidaminococcus* y *Lachnospiraceae*, cuya nucleasa asociada hoy se conoce como Cas12a (inicialmente denominada Cpf1) [202]. La nucleasa Cas12a es más pequeña que SpCas9, requiere solo de un ARN (independiente de tracrRNA) y genera DSB de extremos protuyentes. Otra característica importante de la proteína es su secuencia PAM, del tipo TTTV (donde V es A, G o C), lo que amplió la aplicabilidad del sistema a secuencias genómicas ricas en timina, que hasta entonces resultaban inaccesibles [203,204]. En 2017, Zhang y sus colaboradores volvieron a asombrar a la comunidad científica al informar sobre un novedoso sistema CRISPR de edición de ARN: el sistema CRISPR/Cas13 [205]. La nucleasa Cas13 es capaz de dirigirse y degradar el ARNm, lo que permite reducir la expresión génica sin producir alteraciones genómicas definitivas. Actualmente disponemos de diferentes versiones ortólogas de la nucleasa Cas13 que han demostrado ser eficaces *in vivo* en embriones murinos y de pez cebra [206,207].

Además de aprovechar las proteínas Cas naturales, los investigadores comenzaron a rediseñar *in vitro* la nucleasa Cas9, con el objetivo principal de mejorar su fidelidad. Una de las principales y más analizadas limitaciones del sistema CRISPR/Cas9 es la mutagénesis fuera del sitio diana (término conocido como *off-target*), producida cuando los ARNs “guía” del sistema hibridan con otras regiones del genoma para los que tuvieran homología parcial [208]. Está demostrado que la SpCas9 puede tolerar varios desajustes de nucleótidos, que varían en función de su distribución y posición en la secuencia de ARN [209]. El fenómeno de los *off-targets* puede tolerarse en según qué procedimientos, como es el caso de la generación de modelos murinos modificados genéticamente, donde, a través del retrocruzamiento de animales, es posible segregar la modificación deseada. Sin embargo, en muchas otras ocasiones y, en especial, en el caso de la terapia génica, la generación de *off-targets* resulta inadmisibles. Para solventar este inconveniente, la comunidad científica ha trabajado en diferentes alternativas. En un primer intento, la proteína Cas9 se utilizó de forma dimérica, como ocurría con los ZFN o las TALEN. Así, Cas9 se convirtió en una nickasa que no inducía DBS, sino cortes en una sola hebra del DNA (del inglés *nicks*) [210]. Estos *nicks* individuales en el genoma se reparan con alta fidelidad, sin embargo, al producir dos *nicks* simultáneos y cercanos (separados por menos de 100 pb) mediante el uso de un par de sgRNAs se inician los mecanismos de reparación de DSBs. De esta forma se consiguió aumentar la especificidad del sistema, minimizando su actividad *off-target*. Otra alternativa surgió en 2016, con la llegada de las proteínas Cas9 de alta fidelidad. Mediante ingeniería de proteínas, se modificaron diferentes residuos de la nucleasa, evitando la unión inespecífica al ADN [211]. Actualmente, existen muchas más variantes de Cas9 de alta fidelidad, capaces incluso de discernir entre secuencias que difieren en solo un par de bases [212], sin embargo, ninguna de estas versiones parece retener la misma eficiencia de edición dentro de la secuencia diana que la SpCas9 original.

En 2016, con el surgimiento de la era de la “edición de bases”, el laboratorio de David Liu desarrolló un nuevo enfoque que pretendía eludir la problemática de los *off-targets* [213]. La generación de estas mutaciones fuera de sitio está estrechamente relacionada con la producción de DSB. Estos DSB, aunque permiten la generación de alelos KO y facilitan la introducción de ADN exógeno, también suponen una elevada tasa de inestabilidad genómica, que puede incluso conducir a reordenamientos citogenéticos [214]. Así, sorteando el riesgo de generación de DSB, los denominados editores de base permiten la conversión directa e irreversible de un nucleótido objetivo en otro de manera

programable. Mediante la fusión de una Cas9 inactiva (del inglés *dead Cas9* o dCas9) con un dominio enzimático desaminasa, el sistema permite la conversión de nucleótidos específicos, del tipo citosina por timina ($C \rightarrow T$) y guanina por adenina ($G \rightarrow A$), sin la necesidad de DSB [213]. Actualmente, el sistema ha demostrado ser aplicable a múltiples organismos y gracias a él se han obtenido diversos animales modificados genéticamente [215–217]. No obstante, los editores de base solo permiten la conversión entre nucleótidos, pero no son capaces de introducir delecciones o inserciones. Para superar estas limitaciones, en el 2019, se introdujo otra sorprendente innovación del sistema CRISPR: los denominados “editores de calidad” o *prime editors* [218]. Los *prime editors* utilizan una Cas9 nickasa fusionada a una transcriptasa inversa, guiada por un ARN dual (del inglés *prime editor guide RNA* o *pegRNA*). Este pegRNA alberga, además de la secuencia diana que guiará a la Cas9, la secuencia molde para que la transcriptasa inversa sintetice *de novo* la modificación genética deseada dentro del sitio diana, a partir del *nick* generado por la nucleasa. De esta forma, el sistema permite realizar inserciones, delecciones o conversiones de nucleótidos, sin necesidad de DSB ni de secuencias de ADN molde, y de una manera excepcionalmente precisa [218]. Actualmente, los *prime editors* se encuentran en una fase temprana de su desarrollo, no obstante, ya han demostrado ser aplicables a diversos organismos y los resultados obtenidos hasta ahora resultan muy prometedores [219]. Dada su precisión, especificidad y baja tasa de mutaciones *off-target*, los *prime editors* tienen un enorme potencial clínico para tratar patologías humanas mediante terapia génica.

4.2 Aplicaciones terapéuticas del sistema CRISPR/Cas9.

La introducción de la terapia génica en la clínica brindó esperanza a miles de pacientes con enfermedades genéticas y opciones terapéuticas limitadas. Durante sus primeros años, la terapia génica se basó en el uso de vectores virales para la entrega de transgenes terapéuticos [220,221]. El primer ensayo clínico en el que se utilizó terapia génica fue aprobado en 1990, para la enfermedad monogénica de deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID) y sus resultados no fueron del todo óptimos [222]. Pese a estos modestos resultados, la terapia génica seguía entusiasmando a la comunidad científica por el enorme potencial terapéutico que suponía. Sin embargo, los ensayos clínicos iniciales no alcanzaban el éxito deseado, y los efectos adversos asociados fueron mucho

más graves de lo esperado, causando la muerte de muchos pacientes [223,224]. Estos trágicos eventos generaron una gran preocupación sobre la seguridad de la terapia génica, y durante algunos años, esta aproximación terapéutica quedó relegada de la clínica.

Sin embargo, con la irrupción de las nucleasas de edición genómica, y especialmente, del sistema CRISPR/Cas9, la terapia génica encontró el impulso que necesitaba y que la retornaría a la práctica clínica. Una de las grandes mejoras que trajo el sistema de edición fue la posibilidad de corregir *in situ* mutaciones genéticas, frente a lo conseguido con las aproximaciones tradicionales, que introducían el gen terapéutico en otros locus, con la problemática que esto entrañaba. No obstante, otra de las problemáticas de la terapia génica aún no se encuentra del todo superada y es la de los métodos de entrega de los componentes del sistema CRISPR/Cas9. Uno de los avances conseguidos en este aspecto, fue el desarrollo de vectores virales más seguros, algo que se ha logrado, al menos parcialmente, con la introducción de los virus adenoasociados, que continúan siendo muy utilizados en terapia [225]. Además, otras modalidades de entrega han sido descritas y métodos nuevos y más eficientes continúan desarrollándose. Los componentes CRISPR también pueden ser empaquetados en vectores no virales (incluyendo el sgRNA y la secuencia codificante para la Cas9), pueden entregarse en forma de ARN (sgRNA y el ARN mensajero para la Cas9) o pueden aportarse en forma de ribonucleoproteína (la proteína Cas9 preensamblada a su sgRNA) [226] siendo muy popular esta última versión por su alta tasa de eficiencia [227]. Entre los métodos no virales de entrega, aparece el uso de nanopartículas, ya sean poliméricas o lipídicas, en las que se encapsularán los componentes en alguna de las versiones anteriormente mencionadas, o los péptidos penetrantes celulares, con un mecanismo de acción similar al de las nanopartículas [228]. Asimismo, existen métodos físicos, como la microinyección, aunque su uso predominante es en la generación de animales modificados genéticamente, y la electroporación/nucleofección [228]. Recientemente, la nucleofección como método de entrega está siendo ampliamente utilizada, especialmente en aproximaciones *ex vivo*, aunque también puede ser utilizada *in vivo* para la edición de ciertos tejidos [229].

En la actualidad, existen diversos ensayos clínicos basados en el sistema CRISPR/Cas9 y su número aumenta cada año. Todos ellos se encuentran aún en fases muy tempranas, por lo que, aún en el mejor de los casos, su implantación en la rutina clínica requerirá de algunos años más. Los ensayos clínicos iniciados actualmente pueden dividirse en siete áreas de tratamiento diferentes: cáncer, enfermedades oculares,

diabetes, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, VIH, trastornos del plegamiento de proteínas y trastornos hematopoyéticos. La mayoría de ellos se basan en aproximaciones *in vivo*, es decir, la edición génica ocurre dentro del propio organismo del paciente y en todos ellos el fundamento terapéutico es la eliminación del gen alterado, mediante sgRNAs que corten la secuencia codificante del mismo, evitando su expresión. La primera terapia génica *in vivo* basada en CRISPR en llegar a la fase de ensayos clínicos fue para la amaurosis congénita de Leber (LCA), una enfermedad ocular hereditaria que causa ceguera infantil. Aprovechando la particular situación del órgano, que se encuentra aislado del resto del organismo, los componentes del sistema CRISPR fueron aportados, utilizando virus adenoasociados (AAV), mediante inyección directa en el globo ocular [230]. En el caso de la terapia contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en la que se dirigió al sistema CRISPR contra la secuencia del virus almacenada en las células huésped, también se aportaron los componentes del sistema mediante AAVs, pero en este caso su inyección fue sistémica, vía inyección intravenosa [231]. Enfoques similares se han utilizado en los ensayos clínicos de la enfermedad inflamatoria angioedema hereditario (HAE) [232] y en la amiloidosis hereditaria por transtiretina (hATTR) [233], donde el tratamiento también fue vía intravenosa, pero evitando los vectores virales, al utilizar nanopartículas lipídicas para encapsular los componentes CRISPR. Otro novedoso empleo del sistema de edición se está poniendo en práctica en el tratamiento de enfermedades infecciosas del tracto urinario. Este, supone el primer ensayo clínico en el que se usa el sistema CRISPR/Cas9 para tratar una enfermedad infecciosa y el primero en el que se utiliza la nucleasa Cas3 [234], capaz de degradar por completo secuencias largas de ADN. La estrategia se basa en la utilización de fagos, portadores del sistema CRISPR/Cas3, diseñados para dirigirse y destruir la secuencia genómica de tres cepas de *E. coli*, causantes de alrededor del 95% de las infecciones del tracto urinario [235]. Por otra parte, este último año la empresa de CRISPR Therapeutics (fundada por Emmanuelle Charpentier) ha comenzado un novedoso ensayo clínico para el tratamiento de la diabetes de tipo I. Su objetivo es el de diferenciar, a partir de células humanas pluripotentes, progenitores pancreáticos y modificarlos genéticamente mediante CRISPR para eliminar genes que permitan evitar el rechazo por parte del sistema inmunitario, permitiendo el posterior trasplante de dichas células [236]. Mención aparte merece la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Brevemente, este tipo de terapias se basan en la recolección de linfocitos T autólogos del paciente, su edición mediante CRISPR/Cas9 *in vitro*, añadiéndoles un

antígeno quimérico capaz de dirigirse hacia las células tumorales, y su reinfusión al paciente por vía intravenosa. Esta aproximación es, sin duda, una de las de mayor recorrido dentro de las terapias basadas en CRISPR y su aplicación en el tratamiento de neoplasias hematológicas fue aprobada para uso clínico en 2017 [237,238].

En los últimos años, la investigación sobre tratamientos para los trastornos sanguíneos ha experimentado un gran impulso. Actualmente, existen dos ensayos clínicos para el tratamiento de la anemia falciforme y la betatalasemia [239]. El enfoque adoptado para tratar ambos trastornos se basa en una aproximación *ex vivo*, pues la edición celular ocurre fuera del cuerpo y son las células ya editadas las que se trasplantan al paciente. Así, el primer paso para estos tratamientos es recolectar las CMH propias del paciente, a continuación, dichas células serán corregidas *in vitro* mediante el sistema CRISPR/Cas9. A continuación, mediante procesos ablativos, se eliminarían las CMH del paciente, portadoras de la mutación responsable de la enfermedad, para finalmente, trasplantar, mediante administración intravenosa, las CMH autólogas corregidas. Este tipo de aproximación es posible gracias a las propiedades únicas de autorrenovación y multipotencia de las CMH, capaces de generar todo el linaje hematopoyético, lo que las convierte en objetivos ideales para la corrección genética de enfermedades hereditarias. Asimismo, las terapias *ex vivo*, disfrutaban de una serie de ventajas que incluyen una mayor seguridad, ya que los componentes del sistema CRISPR solo entran en contacto con sus células diana, y una mayor viabilidad técnica que mejoraría la eficiencia del proceso. Además, cuando estas células tienen la capacidad de sobrevivir y expandirse en cultivo, como es el caso de las CMH, puede llevarse a cabo un control de calidad de edición mucho más estricto, que permitiría incluso aplicar de métodos de selección de las células correctamente editadas. Todo ello explica el gran auge y desarrollo observado en las nuevas técnicas de edición genómica para su aplicación terapéutica en hematología. Y, aunque será necesaria la realización de estudios para garantizar la eficacia y seguridad de las técnicas, la terapia génica en enfermedades hematológicas parece tener un futuro prometedor.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La leucemia mieloide crónica o LMC, representa cerca del 15% de las leucemias en adultos, y más del 90% de los pacientes que la padecen albergan el cromosoma Filadelfia, que codifica para la oncoproteína BCR/ABL. La LMC fue la primera neoplasia humana asociada con una anomalía cromosómica concreta y constituye un modelo ejemplar de cáncer en el que todos los aspectos patológicos pueden ser atribuidos a un único oncogén. El papel central de *BCR/ABL* en el inicio y mantenimiento del fenotipo leucémico sentó las bases para el desarrollo del tratamiento estándar actual para la enfermedad: los inhibidores tirosina quinasa (TKIs).

La irrupción de los TKIs en la rutina clínica de la LMC cambió profundamente el panorama terapéutico de la enfermedad. Actualmente, la mayoría de los pacientes responden de forma óptima al tratamiento y presentan una esperanza de vida similar a la de personas sanas de su misma edad. Sin embargo, la necesidad de administración crónica, los efectos secundarios derivados y la aparición de resistencias a estos fármacos, hacen que hasta un 33% de los pacientes finalmente requieran de otros tratamientos alternativos.

En este escenario de búsqueda de nuevas terapias, la terapia génica en enfermedades hematopoyéticas ha experimentado en los últimos años un avance sin precedentes en términos de seguridad y eficacia. La enorme revolución impulsada por sistema de edición CRISPR/Cas9, que hizo verdaderamente factible editar cualquier secuencia genómica, unida a la viabilidad de la terapia celular *ex vivo* basada en las células madre hematopoyéticas (CMH), han posibilitado el desarrollo de estrategias de terapia génica para el tratamiento de la LMC. De esta forma, sería posible llevar a cabo una aproximación que permitiera la recolección de las células madre leucémicas (CML) de un paciente de LMC, portadoras del oncogén *BCR/ABL*, editar dichas células *in vitro* mediante el sistema CRISPR/Cas9, eliminando la expresión del oncogén y, finalmente, reinfundir dichas células corregidas al paciente, mediante autotrasplante, evitando además la posibilidad de rechazo del injerto.

Por todo ello, nos planteamos como hipótesis que ***el sistema de edición CRISPR/Cas9 dirigido hacia el oncogén BCR/ABL es capaz de eliminar su expresión en las células madre leucémicas, constituyendo una nueva estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.*** A fin de comprobarla, en el presente trabajo, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar la eficiencia, *in vitro* e *in vivo*, de diferentes aproximaciones del sistema CRISPR/Cas9 con el fin de seleccionar la estrategia más adecuada para la generación de mutaciones que produzca alelos nulos en el oncogén *BCR/ABL*.
- Evaluar la capacidad del sistema CRISPR/Cas9 seleccionado para eliminar la expresión de *BCR/ABL* en células madre leucémicas murinas, y estudiar su capacidad para reestablecer la hematopoyesis fisiológica en un modelo murino de trasplante ortotópico de leucemia mieloide crónica.
- Analizar la capacidad terapéutica de la eliminación, mediante CRISPR/Cas9, de la expresión de *BCR/ABL* en células madre leucémicas de pacientes de leucemia mieloide crónica, así como la hematopoyesis derivada de ellas en modelos murinos xenoinjerto ortotópicos.
- Diseñar un sistema CRISPR/Cas9 alternativo que permita la introducción de un reportero en aquellas células en las que la expresión de *BCR/ABL* ha sido eliminada, proporcionando así un método para su selección y su posterior trasplante.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES Y PACIENTES.

1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

La línea celular murina Boff-p210 deriva de la línea celular hematopoyética pro-B Baf/3, dependiente de interleucina 3 (IL-3). Ha sido generada mediante transfección del ADNc del oncogén de fusión *BCR/ABL*p210 humano, lo que le confiere una capacidad de crecimiento y supervivencia de forma independiente de IL-3 [240,241]; ambas líneas fueron una donación de Guerrero C. Las células Boff-p210 fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Ref. 21969-035 Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), suplementado con un 10% de suero fetal bobino (FBS; Ref. 10270-106 Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Ref. 15140-122, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.). Las células parentales Baf/3, dependientes de IL-3 se cultivaron en el mismo medio suplementado con un 20% de medio condicionado, obtenido a partir de la línea celular WEHI-3, como fuente de IL-3. Por su parte, la línea celular murina WEHI-3 fue mantenida en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Ref. 12440053, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), suplementado con un 10% de FBS y un 1% de penicilina/estreptomicina.

La línea celular humana K562, proveniente de un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC), y portadora de la translocación cromosómica t(9;22), y por tanto *BCR/ABL* positiva, fue adquirida de la colección DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen). Las células K562 fueron mantenidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Ref. 21875-034, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), suplementadas con un 10% de suero fetal bobino (FBS) y un 1% de penicilina/estreptomicina.

Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. La presencia de micoplasma se analizó frecuentemente en todas las líneas celulares mediante el kit MycoAlert® (Ref. LT07-118, Lonza, Suiza), utilizando únicamente células libres de micoplasma en todos los experimentos realizados.

Aislamiento y cultivo de células madre hematopoyéticas murinas.

Las células madre hematopoyéticas murinas se aislaron a partir de muestras de médula ósea de ratón, mediante el lavado de fémures y tibias con una jeringa conteniendo 2 ml de FBS al 10% en PBS. A continuación, las muestras fueron lisadas mediante incubación a 4°C durante 20 minutos con un buffer de lisis de eritrocitos (0,15g/L EDTA, 1g/L KHCO₃ y 8,3g/L NH₄Cl). Posteriormente, la fracción celular Lin⁻ fue aislada mediante separación magnética (AutoMACs[®], Milenity Biotech, Alemania), empleando el kit Direct Lineage Cell Depletion Kit (Ref. 130-090-858, Milenity Biotech, Alemania). Tras su aislamiento, las células fueron mantenidas en cultivo con medio IMDM (Ref. Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), suplementado con un 2% de FBS y, al menos durante 24 horas, en presencia de citoquinas: interleucina-3 (mIL-3; 10 µg/mL; Ref. 213-13), interleucina-6 (mIL-6; 10 µg/mL; Ref. 216-16), trombopoyetina (mTPO; 50 µg/mL; Ref. 315-14) y factor de crecimiento de células madre (mSCF; 50 µg/mL; Ref. 250-03) (Preprotech EC Ltd., Reino Unido).

Aislamiento y cultivo de células madre hematopoyéticas humanas.

Las células madre hematopoyéticas humanas (fracción CD34⁺) fueron aisladas a partir de muestras de médula ósea de pacientes de LMC al diagnóstico, o bien de individuos sanos. Las muestras se obtuvieron a través del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, tras obtener el consentimiento informado de los donantes. Las muestras se lisaron mediante incubación a 4°C durante 10 minutos con un buffer de lisis de eritrocitos (0,15g/L EDTA, 1g/L KHCO₃ y 8,3g/L NH₄Cl). A continuación, la fracción celular CD34⁺ fue aislada mediante separación magnética (AutoMACs[®], Milenity Biotech, Alemania), empleando el kit CD34 Microbead Kit UltraPure (Ref. 130-100-453, Milenity Biotech, Alemania). Una vez aisladas, las células fueron cultivadas en medio IMDM (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), suplementado con un 2% de FBS y, al menos durante 24 horas, en presencia de citoquinas: interleucina-3 (hIL-3; 10 µg/mL; Ref. 200-03), interleucina-6 (hIL-6; 10 µg/mL; Ref. 200-06), trombopoyetina (hTPO; 50 µg/mL; Ref. 300-18), factor de crecimiento de células madre (hSCF; 50 µg/mL; Ref. 300-07) y ligando de la tirosina quinasa 3 (hFlt3-L; 10 µg/mL; Ref. 300-19) (Preprotech EC Ltd., Reino Unido).

Análisis de la apoptosis y ciclo celular.

La apoptosis celular se cuantificó mediante citometría de flujo con el kit de detección de apoptosis de anexina V-Dy634 (ANXVVKDY, Immunostep, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron 5×10^5 células, se lavaron dos veces en PBS y se marcaron con anexina V-DY-634 y yoduro de propidio (PI) como colorante no vital, a fin de permitir la discriminación entre células vivas (anexina V negativas, PI negativas), células apoptóticas tempranas (anexina V positivas, PI negativas) y células necróticas o apoptóticas tardías (anexina V positivas, PI positivas). Paralelamente, se analizó la distribución de las células en las fases del ciclo celular midiendo el contenido de ADN. Para ello, se recogieron 5×10^5 células, se lavaron dos veces en PBS y se permeabilizaron con etanol al 70% durante 30 minutos a 4°C, finalmente, las células fueron marcadas con PI (10 mg/ml; Ref. J66764.MC, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.) y cuantificadas mediante citometría de flujo.

Ensayo de proliferación celular.

Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 2×10^4 células en el caso de las hCML electroporadas y $1,5 \times 10^4$ células en el caso de las K562 del conjunto de células electroporadas o de la fracción celular Venus⁺, en placas de 48 pocillos. Las células se recogieron a las 48, 72 y 96 horas y el número de células vivas se cuantificó mediante citometría de flujo.

Ensayo de formación de colonias.

Para el ensayo de formación de colonias, 1×10^3 células CD34⁺, electroporadas con Cas9 (control) y editadas para *BCR/ABL* fueron lavadas en PBS y resuspendidas en 100 µL de medio IMDM (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.). A continuación, los 100 µL se añadieron sobre 1 mL de metilcelulosa, previamente calentada a 37° (STEMCELL Technologies MethoCult™ GF, Ref. H84434, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.). La mezcla fue sembrada en placas de 35 mm, mediante una jeringa de 2 mL y las placas se incubaron a 37°C, en una atmosfera del 100% de humedad y un 5% de CO₂. Tras 12 días, las colonias mieloides y eritroides generadas fueron contadas bajo la lupa.

Separación celular activada por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo.

48 horas después de la electroporación mediante plásmido con las sgRNAs IE, SD o el sistema dual (sgRNA ABL-TKs), las células K562 y Baf/3, positivas para GFP, fueron seleccionadas mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS), utilizando FACS Aria (BD Biosciences, CA, EE. UU.), estableciendo los grupos de células K562 y Baf/3 editadas.

Para el establecimiento de clones derivados de célula única (*single cell*) de Boff-p210, las células electroporadas mediante RNP, con el sistema CRISPR dual, compuesto por dos crRNAs ABL-TKs y un tracrRNA fluorescente marcado con ATTO[®] 550 (Ref. 1075928, Integrated DNA Technology, Bélgica), se seleccionaron mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS), utilizando el citómetro FACS Aria (BD Biosciences, CA, EE. UU.), 48 horas después de la electroporación. Se sembraron células individuales en una placa de 96 pocillos para establecer los clones SC-ABL-TKs y SC-Cas9, utilizándose este último como control.

La separación de las células K562 Venus⁺, electroporadas con el sistema CRISPR-Trap, se llevó a cabo 24 horas tras la electroporación, utilizando FACS Aria (BD Biosciences, CA, EE. UU.).

Para el análisis de la apoptosis, el ciclo celular y el conteo de células vivas, se empleó el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, CA, EE. UU.). Todos los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo (vX.0.7. TreeStar, OR, EE. UU.).

2. ELECTROPORACIÓN Y MICROINYECCIÓN.

2.1 Electroporación de plásmidos.

Diseño del sistema CRISPR/Cas9 y clonaje de las sgRNAs.

El plásmido pX458 (plásmido Adgene #48138) [242], que contiene la secuencia codificante de la nucleasa Cas9, la secuencia codificante de la GFP y un sitio de clonación

para las sgRNAs, fue digerido con la enzima Bpil (New England Biolabs, MA, EE.UU.). Las sgRNAs se clonaron bajo el control del promotor U6, quedando fusionadas a la secuencia del ARN *scaffold*, incluida en el vector, conformando así una sgRNA funcional. Para clonar las sgRNAs en el vector se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios para cada sgRNA que incluían dos secuencias sobresalientes de 4 pb (Tabla 1). Las secuencias de las sgRNAs se diseñaron con la herramienta web BreakingCas, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para cada sgRNA.

Nombre	Directo	Reverso
IE- <i>mTyr</i> sgRNA	<u>CACCG</u> AATAGGACCTGCCAGTGCTC	<u>AAACG</u> AGCACTGGCAGGTCTATTTC
SD- <i>mTyr</i> sgRNA	<u>CACCG</u> TATAGTGCACTTTACCTGCC	<u>AAACG</u> GCAGGTAAGATGCACTATAC
IE- <i>hTYR</i> sgRNA	<u>CACCG</u> GTGTCAATGGATGCACTGCT	<u>AAACG</u> AGCAGTGCACTCCATTGACACC
SD- <i>hTYR</i> sgRNA	<u>CACCG</u> ATCATTCTTCTCCTCTTGGC	<u>AAACG</u> CCAAGAGGAGAAGAATGATC
IE- <i>hABL</i> sgRNA	<u>CACCG</u> CTCGTCAGCCATGGAGTACC	<u>AAACG</u> GTACTCCATGGCTGACGAG
SD- <i>hABL</i> sgRNA	<u>CACCG</u> CCGTGAAGACCTTGAAGGT	<u>AAACG</u> ACCTTCAAGGTCTTCACGGCC
<i>hABL</i> -sgRNA-TK1	<u>CACCG</u> ATCACTGAGTTCATGACCTA	<u>AAACG</u> TAGGTCATGAAGTCAAGTAT
<i>hABL</i> -sgRNA-TK2	<u>CACCG</u> CTCGTCAGCCATGGAGTACC	<u>AAACG</u> GTACTCCATGGCTGACGAG

Se diseñaron dos sgRNAs para el locus *Tyr* de ratón. Una de ellas, IE-*mTyr*-sgRNA, se dirige a la secuencia codificante del exón 1 del locus *Tyr*, y la otra, SD-*mTyr*-sgRNA, se dirige a la unión entre el exón 1 y el intrón 1-2 del gen. Así mismo, se diseñaron otras dos sgRNAs para apuntar a las secuencias homologas del gen *TYR* humano (IE-*hTYR*-sgRNA y SD-*hTYR*-sgRNA). De forma similar, se diseñaron dos sgRNA contra el dominio TK del locus *ABL* humano: IE-*hABL*-sgRNA, que se dirige a la secuencia codificante del exón 6, y SD-*hABL*-sgRNA, que se dirige a la secuencia donante del splicing en 5' del exón 4. De igual forma, se diseñaron las sgRNAs *hABL*-sgRNA-TK1 y *hABL*-sgRNA-TK2, componentes del sistema CRISPR dual dirigido hacia el exón 6 del gen *ABL* humano, capaces de inducir una delección específica de 101 pb.

Los dos oligonucleótidos complementarios, utilizados para conformar cada sgRNA (Tabla 1), se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se enfriaron gradualmente mediante una rampa de temperatura de 5°C/min hasta alcanzar los 25°C para permitir su hibridación. A continuación, fueron fosforilados mediante la enzima T4

polinucleótido quinasa (New England Biolabs, MA, EE. UU.) en los extremos 3' y, finalmente, fueron insertados en el sitio de clonación Bpil del plásmido Px458 linealizado mediante una reacción de ligación (T4 Ligasa; New England Biolabs, MA, EE. UU.). Se usaron 2 µL de la reacción de ligación para transformar bacterias competentes *E.coli* DH5α, que fueron sembradas a fin de obtener colonias aisladas de las que se extraerá el plásmido usando el kit EndoFree® Plasmid Maxi (Ref. 12362, Qiagen, Hilden, Alemania). Finalmente, la correcta inserción de las sgRNAs se comprobó mediante secuenciación por Sanger utilizando el oligonucleótido U6 (5'-GTGAGGGCCTATTTCCCATGA-3').

Electroporación mediante Amaxa Nucleofector®.

Las células murinas Baf/3 y las células humanas K562 fueron electroporadas con el plásmido Px458, conteniendo las sgRNAs, IE o SD, contra los loci *TYR* (murino y humano) y *ABL* humano, utilizando el Amaxa Nucleofector II® (Lonza, Basilea, Suiza). Se electroporaron 2x10⁶ células Baf/3 con 15 µg de plásmido en 100 µL de tampón de electroporación (KCl mM, MgCl₂ 15 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 120 mM pH 7,2, succinato de sodio 25 mM, manitol 25 mM), usando el programa X00. Para las células K562, se electroporaron 1x10⁶ células con 10 µg de plásmido, en 100 µL de buffer de electroporación, usando el programa T016.

2.2 Electroporación de ribonucleoproteínas.

Diseño del sistema CRISPR/Cas9.

En la mayoría de los pacientes con LMC, la región de fusión de *BCR/ABL* comprende la región de punto de ruptura mayoritaria de *BCR* (M-bcr), entre los exones 13 y 14 del gen, y la región en 5', anterior al exón 2 de *ABL*. Sin embargo, los puntos de corte genómicos, específicos de ambos genes involucran regiones de 3 kb para *BCR* y de 200 kb para *ABL*, haciendo que la secuencia de fusión de cada paciente sea virtualmente única.

En el caso de la electroporación del sistema CRISPR/Cas9 en forma de ribonucleoproteína, las sgRNA empleadas se aportaron en forma de heterodúplex de

ARN, conformado por el crRNA diseñado, conteniendo la secuencia diana y el tracrRNA, de secuencia común, capaz de unirse a la nucleasa Cas9. Para el sistema CRISPR/Cas9 dual, se diseñaron dos crRNAs (*hABL*-sgRNA-TK1 y *hABL*-sgRNA-TK2) dirigidas hacia el dominio TK de *ABL* (Tabla 2). Ambas sgRNAs se diseñaron a fin de inducir una pequeña delección, de 101 pb, en el exón 6 de *ABL*, destruyendo el dominio TK del gen y desencadenando una mutación de cambio de marco aguas abajo. Para editar específicamente el oncogén de fusión *BCR/ABL*, en la aproximación CRISPR-Trap, se secuenció la región de fusión genómica de las células K562 y se diseñó un crRNA específico (sgRNA-*BCR/ABL*; Tabla 2), dirigida a la secuencia de unión entre *BCR* y *ABL*. Las secuencias de las sgRNAs *ABL*-TK1, *ABL*-TK2 y *BCR/ABL* se diseñaron con la herramienta web BreakingCas, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>), y fueron adquiridas en forma ARN (Integrated DNA technologies, IA, EE. UU.).

Tabla 2. sgRNAs diseñadas.

Nombre	Secuencia
<i>hABL</i> -sgRNA-TK1	ATCACTGAGTTCATGACCTA
<i>hABL</i> -sgRNA-TK2	CTCGTCAGCCATGGAGTACC
<i>hBCR/ABL</i> -sgRNA	TGATAAAACCCACTCCACAG

Clonaje del vector CRISPR-Trap y obtención del ADN donador.

Los vectores CRISPR-Trap pTC201B HA *BCR/ABL* SA-T2A-Venus y pTC201B HA *BCR/ABL* SA-T2A-CMV-Venus se generaron a partir del vector pTC201B, cedido por Tian Chi [243](Plásmido Addgene nº 52193; <http://n2t.net/addgene:52193>), que contiene el casete Neo-IRES-GFP, precedido por una secuencia aceptora del *splicing* (SA). Los brazos de homología 5' y 3' de la secuencia de fusión *BCR/ABL* se obtuvieron mediante PCR a partir del ADN genómico de células K562 y posteriormente se insertaron flanqueando el casete del vector a través de los sitios de restricción ClaI y XhoI, respectivamente. El casete reportero inicial Neo-IRES-GFP se eliminó usando los sitios de restricción NotI y Sall, y se reemplazó por las construcciones CMV-Venus o T2A-Venus, obtenidas mediante PCR a partir del plásmido pShuttle, cedido por Zheng-Xu Wang (Plásmido de addgene #62621; <http://n2t.net/addgene:62621>).

La molécula de ADN donador de doble cadena (donor), que contiene el casete de interferencia SA-T2A-Venus o SA-CMV-Venus, flanqueado por los brazos de homología *BCR/ABL*, de 491 y 327 pb, respectivamente, se obtuvo mediante amplificación por PCR de los vectores CRISPR-Trap, utilizando los oligonucleótidos Donor F y R (Tabla 3). El producto de PCR fue purificado utilizando un kit de purificación (NZYTech, Lisboa, Portugal), se fosforiló mediante la polinucleótido quinasa T4 (NEB), se volvió a purificar y finalmente, se eluyó en dH₂O hasta una concentración final de 200 ng/μL.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la generación del ADN donador de Trampa Génica

Nombre	Secuencia
Donor F	ACCCACATCCCACATCACCC
Donor R	CATGGTCTCCACTATCAAGGG

Formación del ribonucleocomplejo y electroporación mediante Neon Transfection System®.

Las sgRNAs fueron preparadas mezclando en cantidades equimolares el crRNA, conteniendo la secuencia diana (Integrated DNA Technologies, Lovania, Bélgica), con el tracrRNA (Integrated DNA Technologies, Lovania, Bélgica) hasta una concentración final de 44 μM. Ambos RNAs fueron hibridados, formando un dúplex, mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido de un descenso progresivo de la temperatura, hasta 25°C. El complejo ribonucleoproteico se obtuvo incubando 22 pmol del dúplex anterior con 18 pmol de proteína Cas9 (Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3; Ref. 1081059, Integrated DNA Technologies, Lovania, Bélgica). Para cada electroporación, se empleó 1 μL de ribonucleoproteína, 2 μL de *enhancer* de electroporación (200 μM) (Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer; Ref. 1075916, Integrated DNA Technologies, Lovania, Bélgica) y 7 μL de la suspensión celular. Asimismo, para los experimentos llevados a cabo con el sistema CRISPR-Trap, se añadió a la mezcla de electroporación 1 μL del ADN donador (200 ng/μL).

Las células fueron electroporadas utilizando el *Neon Transfection System®* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), empleando el kit de 10 o 100 μL y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los parámetros de electroporación y el número de células empleadas para cada tipo celular se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de electroporación con Neon Transfection System®.

Células	Voltaje (v)	Amplitud (ms)	Número de pulsos	Número de células/10 μ L
Baf/3	1700	2	1	3x10 ⁵
Boff-p210	1700	2	1	3x10 ⁵
K562	1450	10	3	2x10 ⁵
mLin ⁻	1700	2	1	3x10 ⁵
hCD34 ⁺	1600	10	3	2x10 ⁵

2.3 Edición genómica de embriones murinos.

Transcripción in vitro de los componentes CRISPR/Cas9.

Las secuencias de las sgRNAs se amplificaron mediante PCR, usando como molde el vector pX458 en el que fueron previamente clonadas y unos oligonucleótidos conteniendo el promotor de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5' (Tabla 5). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando un kit de purificación (NZYTech, Lisboa, Portugal) y se utilizaron como molde para la transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa T7. Para ello, se empleó el kit MEGAshortscript® (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.), incubando la reacción de transcripción a 37°C durante toda la noche, tras lo cual, se añadió 1 μ L de DNasa y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Los transcritos se purificaron mediante RNEasy® Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), eluyéndose en tampón de microinyección de embriones (Embriomax®) libre de RNAsas (Milipore, MA, EE. UU.).

De forma similar, la secuencia codificante para la nucleasa Cas9 fue previamente amplificada por PCR, usando oligonucleótidos que contenían el promotor de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5' (Tabla 5). Los productos de PCR purificados se usaron como molde para la transcripción *in vitro* del ARNm de la Cas9, al que se añadió un CAP en el extremo 5' (mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.) y la cola de polyA en el extremo 3' (Poly(A) Tailing Kit, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.). Finalmente, los transcritos se purificaron mediante el RNEasy® Mini Kit, eluyéndose en tampón de microinyección de embriones (Embriomax®) libre de RNAsas.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la transcripción in vitro de las sgRNAs y el ARNm de Cas9.

Nombre	Secuencia
T7 IE-mTyrsgRNA F	TAATACGACTCACTATAGGAATAGGACCTGCCAGTGCTC
T7 SDE-mTyrsgRNA F	TAATACGACTCACTATAGGTATAGTGCATCTTACCTGCC
gRNA R	GCACCGACTCGGTGCCACT
T7-Cas9 F	TAATACGACTCACTATAGGGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGA
Cas9 R	CTTTTCTTTTTTGCCTGGCC

Los ARNs transcritos, tanto de sgRNAs como del ARNm de Cas9, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificados mediante un Chip de ARN Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent, CA, EE. UU.) y el NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.).

Microinyección de embriones murinos.

Los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en forma de ARN (ARNm de Cas9 y sgRNA) fueron microinyectados en el pronúcleo masculino de embriones en fase de una célula, a las concentraciones de 20ng/μL de sgRNA y 20 ng/μL de ARNm de Cas9. La solución se centrifugó 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C y se transfirió a una aguja de microinyección previamente preparada mediante un estirador de pipetas (Sutter Instrument Company, CA, EE. UU.). Una vez preparada la estación de microinyección, los embriones se transfirieron a portaobjetos excavados con medio M2, donde fueron microinyectados. Finalmente se incubaron nuevamente a 37°C en medio KSOM para continuar su desarrollo, hasta dos células para su transferencia a hembras pseudopreñadas, o hasta la fase de blastocisto para su análisis molecular.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1 Extracción de ADN y PCR.

Para la extracción del ADN de embriones en estado de blastocito (3,5 días post coito o dpc), se llevó a cabo un protocolo adaptado a pequeñas cantidades de ADN. Brevemente, los embriones fueron lavados tres veces en medio M2, tras lo cual, cada

embrión fue incubado en 10 µL de tampón de lisis (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,5, Tritón X-100 0,1%, Proteinasa K 4 mg/mL) a 55°C durante una hora y, finalmente, se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. 2 µL de la solución se utilizaron como molde para llevar a cabo dos reacciones de PCR consecutivas (*nested* PCR) de 30 y 20 ciclos, respectivamente (Tabla 6).

El genotipado de las camadas se llevó a cabo mediante la extracción de ADN genómico de biopsias de la cola. En primer lugar, se digirieron las biopsias de cola con una solución de lisis (sacarosa 0,25 M, Tris 0,05 M pH 7,5, KCl 0,025 M, MgCl₂ 0,005 M, SDS 1%, EDTA 0,02 M, proteinasa K 10 mg/mL) a 55°C durante toda la noche. Al día siguiente, se llevó a cabo la extracción del ADN por el método del fenol-cloroformo. Se agregaron 450 µL de fenol-cloroformo a 500 µL de la solución de digestión, se centrifugó 10 minutos a 12.000 rpm, transfiriendo la fase superior a un nuevo tubo con 1 mL de etanol al 100% y se centrifugó nuevamente. El ADN genómico precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de dH₂O. Finalmente, se utilizó 1 µL del ADN como molde para la amplificación mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 6).

El ADN genómico de las líneas celulares empleadas (Baf/3, Boff p210 y K562) fue extraído mediante el kit NZY Tissue gDNA Isolation kit (Ref. MD0488, NZYTech, Lisboa, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 µL del ADN genómico extraído fue utilizado en las amplificaciones, mediante PCR, de las regiones genómicas de interés (Tabla 6). Todas las PCRs se realizaron utilizando la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase (Ref. F-530XL, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.).

3.2 Caracterización de la edición genómica.

Evaluación de la eficiencia de corte de las sgRNAs.

La región genómica de interés en la que se incluye el sitio de corte de las sgRNAs empleadas fue amplificada mediante PCR. Tras su visualización en gel de agarosa, los productos de PCR fueron purificados mediante un kit de purificación NZYGelpure (Ref. MB011, NZYTech, Lisboa, Portugal) y secuenciados mediante el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos directo (F) y reverso (R) (Tabla 6). La eficiencia de edición de las diferentes sgRNAs, así como las posibles mutaciones inducidas, se

analizaron gracias al algoritmo de predicción Traking of Indels by Decomposition (TIDE) (<https://tide-calculator.nki.nl>; Netherlands Cancer Institute).

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias genómica diana.

Nombre	Secuencia
IE- <i>mTyr</i> F	GTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCC
IE- <i>mTyr</i> R	AAACATGGGTGTTGACCCATTGT
SD- <i>mTyr</i> F	ATATGGAGGGACATTGATTTTG
SD- <i>mTyr</i> R	GGAGGTGCTAACAATACAGTG
<i>hTYR</i> F	TGAGTGCCCCAGAGAAGGAC
<i>hTYR</i> R	TGCAATGAGTGTCAGGTGAGA
IE- <i>hABL</i> F	AGTCAGAATCCTTCAGAAGGCT
IE- <i>hABL</i> R	CTGAATTTAGCCCTGGATGCAT
SD- <i>hABL</i> F	GCTGTTCCCTGTTTCCTTCAG
SD- <i>hABL</i> R	AATTCCGTGGCGCCAATGAAG
<i>hABL</i> -TKs F	TCCATTATCCAGCCCCAAAGCG
<i>hABL</i> -TKs R	GATGGGGAACCTGGCTCCAGC
<i>mAbl</i> -TK F	AGTCAGAATCCTTCAGAAGGCT
<i>mAbl</i> -TK R	CTGAATTTAGCCCTGGATGCAT
Out 5' F	ATCAAGGATCTCCGGGCAGC
Out 3' R	CCAAGGCAAATCTGGGAGTTG
In 5' F	TCCACTCAGCCACTGGATTTAAGCA
In 3' R	GGGTATTTCTGTTGGGTATGG
Venus F	TGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
Venus R	GGACACGCTGAACTTGTGGC

Caracterización de las variantes alélicas generadas mediante secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, NGS).

A fin de identificar individualmente las diferentes secuencias editadas, se empleó la tecnología de secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS), utilizando los mismos oligonucleótidos que en la secuenciación mediante Sanger, con sus respectivos adaptadores añadidos.

Los amplicones purificados se mezclaron a partir de soluciones equimolares y se diluyeron hasta una concentración final de 0,2 ng/μL. La librería indexada de extremos pareados (*paired-ends*) se preparó mediante el kit de preparación de muestras de ADN Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, CA, EE. UU.) y la secuenciación se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina (NextSeq or MiSeq, 300 cycles). La cobertura media (mediana) obtenida por base fue de 27.538 lecturas (rango 2.096-

88.976). Las lecturas obtenidas fueron alineadas con el genoma de referencia del ratón, usando el software bwa-0.7.12. Para la visualización del alineamiento de las lecturas y la confirmación de las variantes obtenidas se utilizó el visor Integrative Genomics Viewer, versión 2.3.26 (IGV, Broad Institute, MA, EE. UU.).

Caracterización de las variantes alélicas generadas mediante subclonaje.

Los productos de PCR purificados se clonaron en el vector pBluescript, empleando el sitio de corte EcoRV. La reacción de ligación se llevó a cabo con los fragmentos de PCR fosforilados mediante la T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs, MA, EE. UU.) y el plásmido digerido con EcoRV. 2 µL de la ligación se usaron para transformar bacterias competentes *E.coli* DH5α, que fueron sembradas en placas de LB-agar-ampicilina (100µg/mL) con 5 µL de IPTG y 20 µL de X-Gal. Se tomaron colonias aisladas blancas (con inserto) y se extrajo su ADN plasmídico mediante un kit de miniprep (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). La correcta inserción de los fragmentos se visualizó mediante digestión de 1 µL de plásmido purificado con 0,5 µL de las enzimas EcoRI y HindIII durante una hora a 37°C. Las muestras positivas que contenían inserto se secuenciaron mediante el método de Sanger, utilizando el oligonucleótido M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), a fin de observar cada una de las secuencias subclonadas de forma individual.

3.3 Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR.

La extracción del ARN total de las células se realizó mediante el kit RNEasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. 100 ng de ARN total fueron usados para su retrotranscripción *in vitro*, usando el kit SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix® (Ref. 12574026, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.).

El ADNc se utilizó como molde para amplificar por PCR las secuencias editadas. El producto de amplificación de estas RT-PCRs fue visualizado en electroforesis en gel de agarosa, purificado y secuenciado mediante el método de Sanger. Así mismo, el ADNc fue utilizado para llevar a cabo diferentes qPCRs (Tabla 7), empleando Fast SYBR®

Green Master Mix (Ref. 4385612) y el termociclador StepOne (Applied Biosystems, CA, EE. UU.), a fin de cuantificar los niveles de expresión de los genes editados. La expresión del ARNm de *GAPDH* fue utilizada como control interno (oligos GAPDH qPCR F y R, tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de la expresión génica mediante qPCR.

Nombre	Secuencia
BCR qPCR F	TTTCTGAATGTCATCGTCC
ABL qPCR R	TTGGGCTTCACACCATTCCCC
ABL Ex6 qPCR F	AGTGCAACCGGCAGGAGGTGA
ABL Ex7 qPCR R	CAGTTTCGGGCAGCAAGATC
ABL Ex7 qPCR F	GTCCGACGTCTGGGCATTG
ABL Ex8 qPCR R	GCTCGCATGAGTTCATAGACC
CMV qPCR R	GCGGGCCATTACCGTAAG
GAPDH qPCR F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH qPCR R	CACCACCTTCTTGATGTCATCA

3.4 Western blot.

La expresión de la oncoproteína BCR/ABL se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot, utilizando un anticuerpo de cabra anti-ABL humano (1:1000, Ref. K0217, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). Se utilizó un anticuerpo anti-cabra, conjugado con peroxidasa de rábano (1:10000; NA931V, GE Healthcare, IL, EE. UU.) como anticuerpo secundario. Los anticuerpos se detectaron mediante Western ECL[®] (RPN2209, GE Healthcare, IL, EE. UU.). Como control, la expresión de β -actina se cuantificó utilizando un anticuerpo de ratón anti- β -actina (1:20000; Sigma Aldrich, EE. UU.).

3.5 Inmunofluorescencia.

Para el análisis de inmunofluorescencia, las células se fijaron y permeabilizaron en portaobjetos recubiertos con polilisina (Ref. 631-1349, VWR, PA, EE. UU.). Después del bloqueo, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos anti-ABL (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.) a una dilución de 1:1000 durante 2 horas. El anticuerpo de cabra anti-ratón Cy5[®] (Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.) se utilizó como anticuerpo

secundario (1:1000; 1h). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6'-diamidina-2-fenilindol; Ref. D1306, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.) diluido en PBS (25mg/mL), durante 3 minutos en agitación a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en PBS y los portaobjetos se montaron con el reactivo Vectashield® (Ref. H-1000-10, Vector Laboratories, CA, EE. UU.). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5DMI-6000B (Leica Biosystems, Alemania).

3.6 Secuenciación del transcriptoma (RNAseq).

El RNAseq se realizó utilizando TruSeq Stranded mRNA (Illumina, CA, EE. UU.). En todas las muestras, el ARN se analizó siguiendo las recomendaciones del fabricante para el protocolo “TruSeq Stranded mRNA Reference Guide-Illumina”. Las bibliotecas se secuenciaron en la plataforma NextSeq550 (Illumina, CA, EE. UU.), con una longitud de lectura de 2 x 75 nucleótidos. Brevemente, los archivos bcl se desmultiplexaron en BaseSpace a fin de generar archivos fastq. El control de calidad de los datos sin procesar se realizó con fastQc (v0.11.8), la contaminación de globina se evaluó con HTSeq Count, la pantalla FastQ evaluó la contaminación por ARN ribosómico y otras posibles fuentes de contaminación (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y micoplasma). Se utilizó STAR (v020201) para la alineación (genoma de referencia hg19) y Feature Counts (v1.4.6, University of Melbourne, Australia) para generar la matriz de recuento de lecturas. DESeq2 se utilizó para el análisis diferencial de la expresión génica y el mapa de calor (*Heatmap*) se realizó en R. Finalmente, se utilizó el análisis de enriquecimiento de GO (<http://geneontology.org>) para evaluar el conjunto de genes diferencialmente expresados.

Tabla 8. Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq). Top-50 genes diferencialmente expresados en las hCML editadas para *BCR/ABL*.

ID gen	log2(FC)	StdErr	P-value	P-adj	Cromosoma	Nombre
ENSG00000170271.11_10	182.262.586.087.336	0.167265029768949	1,20E-13	1,67E-10	chr5	FAXDC2
ENSG00000101162.4_5	201.238.585.424.012	0.190656319028233	4,81E-12	3,36E-08	chr20	TUBB1
ENSG00000240583.13_7	207.633.385.800.393	0.214940831942659	4,46E-08	2,07E-04	chr7	AQP1
ENSG00000133742.14_9	166.531.959.919.622	0.19573857855205	1,77E-03	6,18E+00	chr8	CA1
ENSG00000187017.17_10	2.148.704.098.682	0.275407331649818	6,10E-01	1,70E+03	chr1	ESPN

ENSG00000070190.13_7	170.353.685.507.739	0.224269639517254	3,06E+00	7,10E+03	chr4	DAPP1
ENSG000000236320.4_6	164.382.234.601.053	0.220599128194736	9,22E+00	1,84E+04	chr17	SLFN14
ENSG00000079308.19_10	185.579.456.515.958	0.250855589155334	1,38E+01	2,14E+04	chr2	TNS1
ENSG00000059804.16_7	-13.475.526.467.443	0.181885233869008	1,27E+01	2,14E+04	chr12	SLC2A3
ENSG000000187678.10_7	-131.562.675.413.384	0.180360645961277	3,00E+01	4,18E+04	chr5	SPRY4
ENSG000000164442.10_8	114.807.080.397.031	0.164043884528062	2,59E+02	3,28E+05	chr6	CITED2
ENSG000000288046.1_1	191.577.465.613.379	0.274679876175111	3,07E+01	3,57E+05	chr6	AL031123.5
ENSG000000152078.10_9	127.737.301.931.391	0.185571334936746	5,84E+02	6,27E+04	chr1	TLCD4
ENSG000000249992.2_5	-141.811.292.238.118	0.206594492747519	6,68E+02	6,66E+05	chr3	TMEM158
ENSG000000119715.15_8	-125.608.671.071.612	0.185044554147731	1,14E+03	1,06E+06	chr14	ESRRB
ENSG000000271736.2_10	166.599.520.352.707	0.256237859652474	7,94E+03	6,51E+06	chr1	LINC02772
ENSG000000250361.9_10	1.201.310.250.332	0.184759665908621	7,93E+03	6,51E+06	chr4	GYPB
ENSG00000017427.17_8	-132.503.013.329.346	0.208329267867194	2,01E+04	1,56E+07	chr12	IGF1
ENSG000000275832.5_6	159.310.817.012.968	0.256040854878134	4,91E+03	3,60E+07	chr17	ARHGAP23
ENSG000000204161.14_9	-125.429.266.480.427	0.205633203188976	1,06E+05	7,36E+07	chr10	TMEM273
ENSG000000172927.3	-118.065.071.924.079	0.193773150494021	1,11E+05	7,36E+07	chr11	MYEOV
ENSG000000106123.12_7	-131.267.192.852.619	0.216310889476686	1,29E+05	8,19E+07	chr7	EPHB6
ENSG000000135838.13_4	113.087.003.101.607	0.186745223067732	1,40E+05	8,48E+07	chr1	NPL
ENSG000000120833.14_9	-102.708.390.101.602	0.170141729272033	1,57E+05	9,14E+06	chr12	SOCS2
ENSG000000066926.12_7	102.265.537.129.981	0.170176907923596	1,86E+05	1,04E+08	chr18	FECH
ENSG000000140406.4_8	-121.033.444.488.182	0.202905299430191	2,45E+05	1,31E+08	chr15	TLNRD1
ENSG000000110092.4_5	-132.826.021.334.637	0.224391728084593	3,23E+04	1,67E+08	chr11	CCND1
ENSG000000168016.15_10	116.109.350.423.073	0.198072196700517	4,57E+05	2,28E+08	chr3	TRANK1
ENSG000000196660.11_5	117.894.341.556.974	0.201693261625304	5,06E+05	2,43E+08	chr1	SLC30A10
ENSG000000150593.18_7	12.286.600.135.224	0.210934659713151	5,72E+05	2,57E+08	chr10	PDCD4
ENSG000000169877.10_5	151.726.631.767.348	0.260852951357333	6,01E+05	2,62E+08	chr16	AHSP
ENSG000000125968.9_7	-139.082.327.600.343	0.240113167349784	6,94E+04	2,93E+07	chr20	ID1
ENSG000000173262.12_12	-144.068.528.461.838	0.251855825834795	1,06E+06	4,36E+08	chr12	SLC2A14
ENSG000000151276.23_7	-100.428.425.189.555	0.177616688510427	1,57E+05	6,24E+08	chr3	MAGI1
ENSG000000004939.15_7	143.687.949.163.195	0.255605895079277	1,89E+06	7,34E+08	chr17	SLC4A1
ENSG000000116016.14_7	-125.262.220.086.134	0.225475237775885	2,77E+06	1,04E+09	chr2	EPAS1
ENSG000000100336.17_7	-103.519.936.930.711	0.186624053163915	2,91E+06	1,07E+09	chr22	APOL4
ENSG000000286380.1_4	120.881.699.122.073	0.22615548852235	9,04E+06	3,07E+09	chr7	AC084864.2
ENSG000000169508.7_6	-139.257.259.612.626	0.262800206007578	1,16E+07	3,78E+09	chr13	GPR183
ENSG000000167286.10_4	-132.891.346.712.867	0.25310662719863	1,52E+07	4,60E+09	chr11	CD3D
ENSG000000213694.6_7	-140.048.693.211.981	0.267504699044048	1,65E+07	4,79E+08	chr9	S1PR3
ENSG000000163536.13_4	121.503.314.069.853	0.23277160537862	1,79E+07	5,10E+08	chr3	SERPINI1
ENSG000000110324.11_5	-138.995.030.689.859	0.270464069620975	2,76E+07	7,70E+09	chr11	IL10RA
ENSG000000159840.16_7	-105.546.690.896.564	0.205904056219041	2,96E+06	8,09E+09	chr7	ZYX
ENSG000000006747.15_6	10.187.711.695.359	0.198916883637416	3,03E+07	8,13E+09	chr7	SCIN
ENSG000000232759.1_6	-134.363.037.336.318	0.26289850098669	3,21E+06	8,44E+09	chr7	AC002480.1
ENSG000000188672.19_8	104.541.172.588.359	0.206646682216038	4,22E+07	1,06E-4	chr1	RHCE

ENSG00000163431.13_9	140.145.736.601.304	0.278742847787545	4,96E+06	1,21E-4	chr1	LMOD1
ENSG00000069812.11_6	129.933.450.290.007	0.26298887953341	7,79E+07	1,87E-4	chr1	HES2

3.7 Análisis de los *off-targets*.

Los tres principales off-target predichos para cada sgRNA se analizaron mediante el ensayo de escisión de la nucleasa T7 (T7E1 o ensayo *surveyor*), siguiendo las indicaciones del fabricante (Ref. 1075931, Integrated DNA Technologies, Belgica). Las secuencias genómicas diana se amplificaron por PCR. Para formar los complejos de heterodúplex, los productos de PCR se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos, tras lo cual, se realizaron dos rampas de descenso de temperatura (95-85°C, -2°C/seg y 85-25°C, 0,3°C/seg). Finalmente, los heterodúplex formados se incubaron 1 hora a 37°C con la enzima T7E1 y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los 3 principales eventos off-target

Nombre	Diana	Directo	Reverso
IE-mTyr sgRNA	<i>Crebbp</i>	GATGCATGTGTGGAGGTCAGA	AAGTGTGTATGTGTTACATGTG
	<i>Pcsk9</i>	GCAGTAGATTTGCAAAGCCCC	CTCTAAAGTCCCAAGCATGTGG
	<i>Mgat5</i>	TAAGCACTGGCTGTCTGAGAG	GGAAATCACCCAGTGCTGACC
SD-mTyr sgRNA	<i>Urb5</i>	AGAACCTTAGGGTGGATGGAG	TGCAATTCAGTAAGTACCAATGTT
	<i>Akap7</i>	TAGGCCACTTTTAATAAGTGTGC	ACAGAGGGCCTATGCACAGG
	<i>Pygb</i>	AGGGTCACCATAACCACATGAG	TGGGCACTACTACCAAAGCAC
IE-hTYR sgRNA	<i>MIR2052</i>	TCTTGAAGAGTTTCAAGCCAGTG	GTTGTTTGTCCCAATCACATAG
	<i>PTPN7</i>	GAGATCGCACCATGGCATTCC	TACCTGTGGGTGGGCTGGGA
	<i>NAV2</i>	ATGTTTTAAGTACTGAGATTGCTG	CCTTAATTCCCCTCGCCATGAA
SD-hTYR sgRNA	<i>CABYR</i>	CAGAAATGCAGCTGAACCTATTG	GGGGGGAGACCAACTTGGG
	<i>COL27A1</i>	GAGCCTCCACTCCACTCCC	ATGCAGCTCACCTCCAGGA
	<i>CCNJ</i>	AGCCATCATATTGTCTTTACTCCT	GAGATGGAGTCTTGCTCTGTC
IE-hABL sgRNA	<i>YWHAG</i>	CTCCATCTCGTCTCACTGTAAC	CCCGGCCTCAAATTTCTTTTGG
	<i>SHANK2</i>	GAGACATCTTGCTGTGCTG	CCAGGTTTTTCAGAGCCCTAG
	<i>AGBL4</i>	CATAACAGAACTCCGCAAAACC	CTAGACACAGAGTCTTGCTCTG
SD-hABL sgRNA	<i>ANKH</i>	GGGGGGATGAAAGAAACAACCTG	GCCTCCCAAGTAGCTGGGAT
	<i>DAG1</i>	CGTCAGTCTGCAGGGTCAGG	CCAAACCCAAGGGAGACAAGG
	<i>OR2A3P</i>	CAGATGGCAATGGAGATAAAGG	TAACTTTACTAGGAAACGTTTCACAG
hABL-sgRNA-TK1	<i>RUNX2</i>	TCCCTCTGTGTCAGCATGTAGG	CCAATCCTACTGTGAAGTGAAG
	<i>ELL2</i>	CTACAACTCTATAACATTACCGC	AAGTTTGAAGTACATCCAAGCC
	<i>STRN</i>	CAAACCCTACAAAACCTAACCC	TGGATGATGGGTTTCCCTACC
hABL-sgRNA-TK2	<i>ACSF3</i>	TGTCCCAGGAGATCTGCAGG	GAAAAGATGTGCTTCTGGCCC
	<i>PSTPIP1</i>	TCTCCACATGGCACAGATGG	CTTCCAGTCAGTACATGCACAC
	<i>LOC105376345</i>	TCCTCTGCCTCCTGTTTCAGG	GAGTAAATGGACAATCGC

4. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

4.1 Modelo murino de leucemia mieloide crónica.

Como modelo murino de leucemia mieloide crónica se empleó el ratón transgénico C57BL/6 Tgp210, desarrollado por Honda y colaboradores [244], que expresa el ADNc humano de *BCR/ABL* p210 bajo el control del promotor Tec murino. El locus Tec codifica para una quinasa citoplasmática que se expresa preferencialmente en células precursoras hematopoyéticas. Utilizando este modelo transgénico, se obtuvieron ratones fundadores que desarrollaban leucemia mieloide aguda (LMA), sin embargo, la progenie transgénica exhibió un trastorno mieloproliferativo que mimetizaba la LMC humana, tras un periodo de latencia de 4 a 8 meses.

4.2 Obtención de embriones en fase de cigoto para microinyección.

Mediante la superovulación de hembras B6/CBA de entre 4 y 6 semanas de edad, se obtuvieron embriones en fase de una célula. Para ello, se administraron de forma intraperitoneal 5 UI de PMSG (Gonadotropina Sérica Equina, Foligon, MSD) y, 48 horas después, 5 UI de HCG (Gonadotropina coriónica humana, Sigma), tras lo cual, se cruzaron con machos B6/CBA. Al día siguiente, las hembras que presentaban tapón vaginal fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los cuernos uterinos fueron aislados y los embriones contenidos en el ántrix de los oviductos extraídos en medio de lavado M2, donde se separaron del cúmulo de células foliculares mediante tratamiento con hialuronidasa. Finalmente, se transfirieron entre 25 y 30 embriones a medio KSOM cubierto por aceite mineral (EmbryoMax[®] Ref. ES-005-C, Merck, Alemania) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de la microinyección.

4.3 Transferencia embrionaria.

24 horas después de la microinyección, se seleccionaron aquellos embriones que progresaron a fase de dos células y se transfirieron a hembras pseudogestantes CD1, de entre 8 y 10 semanas de edad. La obtención de dichas hembras en estado de pseudo-

preñez se consiguió al cruzarlas con machos vasectomizados. Al día siguiente, las hembras que presentaron tapón vaginal fueron las elegidas para la transferencia de los embriones al interior del oviducto a través del infundíbulo.

4.4 Trasplante de células madre hematopoyéticas.

Después de 24 horas en cultivo enriquecido con citoquinas, $1,8 \times 10^6$ células Lin- de ratones transgénicos C57BL/6 Tgp210 o células CD34⁺ humanas de pacientes con LMC fueron divididas en dos grupos para someterse a electroporación, únicamente con la nucleasa Cas9 (control) o bien con todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9. Como controles de la hematopoyesis murina patológica y fisiológica, se utilizaron ratones transgénicos Tgp210 y ratones WT C57BL/6, respectivamente.

Tabla 10. Análisis mediante FACs de las poblaciones hematopoyéticas de los ratones donantes de CMH.

	ID	NSG	%Gr1 ⁺	%B220 ⁺	Edad (meses)	Género
Ratones Tgp210 (n=5)	9974		77.1	10.6	12	M
	10309		48.8	8	10	H
	10819		51.8	27.4	9	M
	10979		62.6	6.6	11	M
	10978		85.7	3.17	11	M
Ratones WT (n=5)	18016		17.4	37.6	9	H
	10315		16	33.8	6	M
	10316		12.6	33.8	10	H
	9632		12.7	63.8	6	M
	9444		30.8	63.4	6	M
Donantes de CMH (n=6)	7802	1/2	65.2	11.5	16	H
	9451	3/4	81.5	3.1	14	H
	9977	5/6	63.7	1.9	13	M
	9976	7/8	63.9	5.9	13	M
	9450	9/10	64.8	6.6	14	H
	9783	11/12	77.3	10.6	12	H
Donantes de CMH (n=3)	9784	Donor#1	35.4	38.5	12	H
	10981	Donor#2	52.3	12.4	10	H
	10817	Donor#3	68.8	3.2	11	M

Por otro lado, en los trasplantes de médula ósea (TMO) humano-ratón, 9×10^5 células CD34⁺ sin electroporar, de pacientes de LMC y de individuos sanos, fueron trasplantadas a modo de controles.

Las células madre hematopoyéticas (CMH), electroporadas y no electroporadas, fueron inyectadas en la vena lateral de la cola de ratones NSG (NOD scid gamma null, cepa #005557, Charles River, España), de entre 4 y 5 semanas de edad, previamente irradiados con una dosis subletal (2Gy, 4 horas antes de la inyección). Los ratones fueron irradiados en el servicio de Isopos Radioactivos y Radioprotección de NUCLEUS, Universidad de Salamanca. El punto final del experimento fue establecido a los 120 para los TMO ratón-ratón y 180 días, para los TMO humano-ratón, momento en el que se sacrificaron los animales por sobredosis de anestésico.

4.5 Ensayos de xenoinjerto.

Se utilizaron 10 ratones (5 ratones por grupo) NSG (NOD scid gamma null, cepa #005557, Charles River, España), de entre 4 y 5 semanas de edad. Los xenoinjertos tumorales se indujeron mediante inyección subcutánea de suspensiones celulares que contenían 4×10^5 células en 0,1 mL de medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.) y 0,1 mL de Matrigel (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix; Ref. CLS354234, Merk, NY, EE. UU.) en el flanco del ratón. Antes de la inyección, se separaron, mediante citometría activada por fluorescencia, 4×10^5 células Venus⁺, a partir de células electroporadas control (Cas9 + donador) y células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap completo (CRISPR/Cas9 + donador). Así mismo, se separó el mismo número de células parentales K562 vivas, utilizadas a modo de control. Las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer (VWR, PA, EE. UU.) y la viabilidad celular se determinó mediante tinción con azul de tripano (Sigma, MO, EE. UU.). En el primer grupo de ratones, se inyectaron células parentales K562 en el flanco izquierdo y células Venus⁺ de la condición control (Cas9 + donador) en el flanco derecho; en el segundo grupo, se inyectaron células parentales K562 en el flanco izquierdo y células seleccionadas por el sistema CRISPR-Trap (condición CRISPR/Cas9 + donador) en el flanco derecho. Los tumores se midieron a los 9, 12, 15, 19, 22 y 23 días tras la inyección y su volumen se calculó como se describe en trabajos previos [245], mediante la fórmula $a^2b\pi/6$ (donde a y b son, respectivamente, los diámetros más pequeño y grande). Los ratones fueron

sacrificados mediante sobredosis de anestésico 23 días después de la inyección de las células, después de lo cual se recogieron y pesaron los tumores generados.

4.6 Procesamiento muestras

En las necropsias, tras un examen macroscópico general, externo e interno, de las cavidades torácica y abdominal, se extrajeron el bazo y la médula ósea de los animales. Las muestras de médula ósea fueron procesadas para su posterior análisis por citometría de flujo y los bazos extraídos fueron pesados y medidos.

La extracción de sangre periférica se llevó a cabo mediante punción del seno venoso submandibular. Para ello, se inmovilizó al animal estirando la piel del cuello para practicar estasis venosa en la región cefálica durante un corto periodo de tiempo. A continuación, se punzó con una aguja de 18 G el ángulo caudal mandibular del animal y la muestra de sangre fue recogida en tubos recubiertos con EDTA. Finalmente, se aplicó presión durante unos minutos con una gasa estéril en la zona de la punción hasta la recuperación del animal.

Se realizaron frotis de sangre con las muestras de sangre periférica obtenida. Se depositó una gota de sangre en el extremo de un portaobjetos y a continuación, empleando otro portaobjetos, se extendió la muestra sobre toda la superficie, obteniéndose una fina y homogénea película de sangre. Los frotis de sangre se fijaron con etanol y se tiñeron con hematoxilina-eosina, siguiendo los protocolos convencionales. La tinción de los frotis y el posterior análisis de las preparaciones fueron llevadas a cabo en colaboración con el servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer (Nucleus, Universidad de Salamanca).

4.7 Análisis de la hematopoyesis mediante citometría de flujo.

60 días después del TMO ratón-ratón, se extrajo sangre periférica de los ratones receptores, mediante punción del seno venoso submandibular, a fin de monitorizar la progresión de la enfermedad. 120 días después del TMO, coincidiendo con el punto final del experimento, los ratones receptores fueron anestesiados. Se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardíaca, tras lo cual se completó la eutanasia y se extrajo el

bazo. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante citometría de flujo. Los glóbulos rojos se lisaron mediante tampón de lisis de eritrocitos (0,15g/L EDTA, 1g/L KHCO_3 y 8,3g/L NH_4Cl) y las células restantes se lavaron dos veces en PBS. Las muestras se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluoróforos anti-mCD45 (PerCP-Cy5, Ref. 103131) de Biolegend, CA, EE. UU., y con anti-mB220 (PE, Ref. 553090), anti-mIgM (APC, Ref. 550676), anti-mCD4 (FITC, Ref. 103107), anti-mCD8 (APC, Ref. 552877), anti-Gr1 (APC-Cy7, Ref. 557661), anti-Mac1 (FITC, Ref. 553310) anti-Sca1 (PE, Ref. 553336) y anti-ckit (PE-Cy7, Ref. 558163), todos de BD Biosciences, CA, EE. UU.

En los TMO humano-ratón, se extrajeron muestras de sangre periférica de los ratones receptores mediante punción del seno venoso submandibular, a los 60 y 120 días tras el trasplante, a fin de monitorizar el injerto de células humanas y la progresión de la enfermedad. 180 días después del TMO, los ratones receptores fueron sacrificados y su médula ósea extraída mediante el lavado de las tibias y fémures. Las muestras fueron lisadas con buffer de lisis de eritrocitos (0,15g/L EDTA, 1g/L KHCO_3 y 8,3g/L NH_4Cl) y lavadas dos veces en PBS. Las células obtenidas fueron teñidas con anticuerpos conjugados con fluoróforos anti-hCD45 (FITC, Ref. 345808), anti-hCD34 (APC, Ref. 345804), anti-hCD14 (APC-H7, Ref. 641394), anti-hCD15 (FITC, Ref. 332778), todos de BD Biosciences, CA, EE. UU., anti-mCD45 (PerCP-Cy5, Ref. 103131, Biolegend CA, EE. UU.) y anti-hCD19 (PE-Cy7, Ref. 19PC3-100T, Immunostep, España). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences CA, EE. UU.) y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (TreeStar, OR, EE. UU.).

4.8 Inmunohistoquímica

Los tejidos tumorales fueron fijados con formaldehído al 10% en PBS durante toda la noche a temperatura ambiente, tras lo cual, fueron incluidos en parafina. Se desparafinaron secciones de tejido de 2 μm , se deshidrataron, se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3% (Merck, Alemania), se sometieron a recuperación de antígeno inducida por calor y se incubaron con una dilución 1:50 de anti-KI67 de conejo (Roche, Suiza) y un anticuerpo secundario Omnimap anti-conejo (Roche, Suiza). Las preparaciones teñidas se revelaron con diaminobencidina (DAB) y se contrastaron con hematoxilina.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Las diferencias entre grupos en los niveles de expresión de anexina V se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos en los niveles de expresión de *BCR/ABL* y *BCR/Venus*, se analizaron mediante T de Student (dos grupos) o ANOVA (tres o más grupos) de dos vías, con comparaciones post hoc de Tukey. Las diferencias entre los porcentajes de poblaciones hematopoyéticas se evaluaron mediante ANOVA de dos vías. La relación estadística entre los marcadores hCD14 y hCD117 se determinó mediante regresión lineal. Las variables no paramétricas se analizaron mediante Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El análisis estadístico de los off-targets se realizó mediante la prueba de chi-cuadrado. Los resultados experimentales se representaron como media $\pm$ SEM (error estándar de la media), excepto la cuantificación de los niveles de anexina V, en los que se representa media $\pm$ SD (desviación típica de la media). Se determinaron tres niveles de significancia estadística, para valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

6. DECLARACIÓN ÉTICA

Los estudios con muestras humanas y datos de pacientes siguieron la Ley de Investigación Biomédica Española 14/2007, RD 1716/2011, RD 1720/2007 y el Reglamento Europeo 2016/679 (Reglamento General de Protección de Datos). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación en Medicamentos Humanos (CEIC) del IBSAL, Salamanca, España (referencia PI5505/2017). Los ensayos con animales siguieron las directrices españolas y europeas para la experimentación con animales (RD 1201/05, RD 53/2013 y 86/609/CEE) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León (número de registro 359).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA, *IN VITRO* E *IN VIVO*, DE DIFERENTES APROXIMACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA GENERACIÓN EFICIENTE DE ALELOS NULOS EN EL ONCOGÉN *BCR/ABL*.

El sistema CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente utilizado para la generación de alelos nulos o *knock out* (KO), tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, empleando la vía celular de reparación NHEJ. La mayoría de estos ensayos tienen como secuencias diana aquellas contenidas en los exones codificantes de los genes, que son cruciales para su óptima expresión. La introducción de pequeñas inserciones y deleciones (INDELS) en la secuencia codificante ocasiona, en la mayoría de los casos, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (mutaciones *frameshift*), que normalmente, desencadenan la aparición de codones de parada prematuros y ocasionan el silenciamiento del gen. No obstante, debido a la aleatoriedad del tamaño de los INDELS generados, esta estrategia no siempre permite la generación de alelos nulos en un solo paso. En un porcentaje significativo de los casos, la introducción de INDELS en el gen diana lleva a un desfase en el marco de lectura que es múltiplo de tres (mutaciones +3 o -3). Cuando esto ocurre, el marco de lectura del gen es preservado, generando mutaciones en fase (del inglés *in frame*) que producen proteínas parcial o totalmente funcionales, dependiendo del residuo o residuos aminoacídicos afectados. Este fenómeno, que disminuye en gran medida la efectividad de la técnica, resulta especialmente problemático en estudios *in vivo*, donde no es posible la selección previa de las células correctamente editadas. Concretamente, en los ensayos de terapia génica para la eliminación de oncogenes, como es el caso de *BCR/ABL* en LMC, la elección de guías CRISPR eficientes en la generación de alelos KO, es crucial para el éxito de la terapia.

Por todo ello, como paso previo a la aplicación de nuestra estrategia terapéutica, nos propusimos evaluar y seleccionar el mejor método, basado en CRISPR, de generación de alelos nulos, desarrollando, a tal efecto, dos sistemas alternativos.

En la primera de las estrategias, se desarrolló un sistema CRISPR de guía única que garantizara una alta eficiencia de generación de alelos KO. Esta aproximación resulta especialmente interesante en el caso de las terapias génicas *in vivo*, donde comúnmente se emplean vectores virales, con limitada capacidad de empaquetamiento, y solo es

posible la utilización de una guía. En este sentido, a fin de solventar los problemas asociados a la utilización de guías dirigidas hacia secuencias codificante inmersas en los exones, una de las alternativas consistiría en utilizar guías exónicas localizadas en los sitios de procesamiento intrónico (*splicing*). De esta forma, sumada a la posibilidad de generar una mutación *frameshift* está la de interferir la vía canónica del *splicing*, esencial para el correcto procesamiento y expresión del gen. Así pues, se optó por explorar la eficiencia de generación de alelos nulos de guías CRISPR únicas, dirigidas hacia la secuencia canónica del sitio donador del *splicing* (5' SD), comparándolas con sus equivalentes, dirigidas hacia la secuencia interna exónica.

En la segunda de las estrategias, enfocada a una utilización *ex vivo* y con otro tipo de sistemas de entrega que permitan la utilización de más de una guía, se analizó la efectividad de silenciamiento génico de un sistema CRISPR dual. Diversos estudios demuestran que el empleo de dos guías CRISPR, situadas lo suficientemente cerca entre sí, conduce preferencialmente a la eliminación de la secuencia comprendida entre los sitios de corte de ambas guías [246,247]. Esta aproximación ofrece una serie de ventajas, como son la predictibilidad de pérdida de función del gen o la rápida monitorización de las células editadas mediante PCR. Considerando todos los beneficios derivados de este tipo de estrategia, diseñamos un sistema CRISPR dual en el que se evaluará la eficiencia de generación de alelos KO, así como la viabilidad de monitorización de dichos alelos.

En suma, el estudio de los diferentes abordajes para la generación de alelos nulos nos permitirá comparar y, finalmente, seleccionar la mejor aproximación que garantice un óptimo silenciamiento para el oncogén *BCR/ABL*.

1.1 El sistema CRISPR/Cas9 dirigido contra los sitios de procesamiento intrónico incrementa la eficiencia de generación de alelos nulos *in vitro*.

A fin de comparar la eficiencia de generación de alelos nulos entre guías CRISPR únicas dirigidas hacia secuencias internas exónicas (IE) y sus equivalentes, dirigidas hacia la secuencia donadora del *splicing* en el extremo 5' (SD), se diseñaron dos parejas de sgRNAs (IE y SD) dirigidas contra el exón 1 del gen de la tirosinasa humano y murino (Figura 13A y 13B, Tabla 1). El gen de la tirosinasa (*Tyr*), codifica para la enzima tirosinasa, encargada de la síntesis de melanina. Mutaciones KO, en homocigosis para el gen *Tyr* dan lugar a ratones albinos [248]. Por esta razón, el locus *Tyr* es considerado un

gen idóneo para monitorizar la eficiencia de edición génica. En este contexto, el uso del locus *Tyr* como gen diana para el sistema CRISPR/Cas9 nos permitirá evaluar la eficiencia las diferentes estrategias de edición mediante visualización del color del pelaje de los animales.

Se realizaron tres ensayos de electroporación independientes con cada sgRNA en la línea celular murina Baf/3 y en la línea celular humana K562. Tanto las guías IE-sgRNA como las SD-sgRNA fueron clonadas en el vector de expresión de mamíferos CRISPR-Cas9-GFP, que contiene la secuencia codificante para la Cas9, la secuencia codificante para el reportero GFP (del inglés *green fluorescent protein*) y el sitio de clonación para las sgARNs.

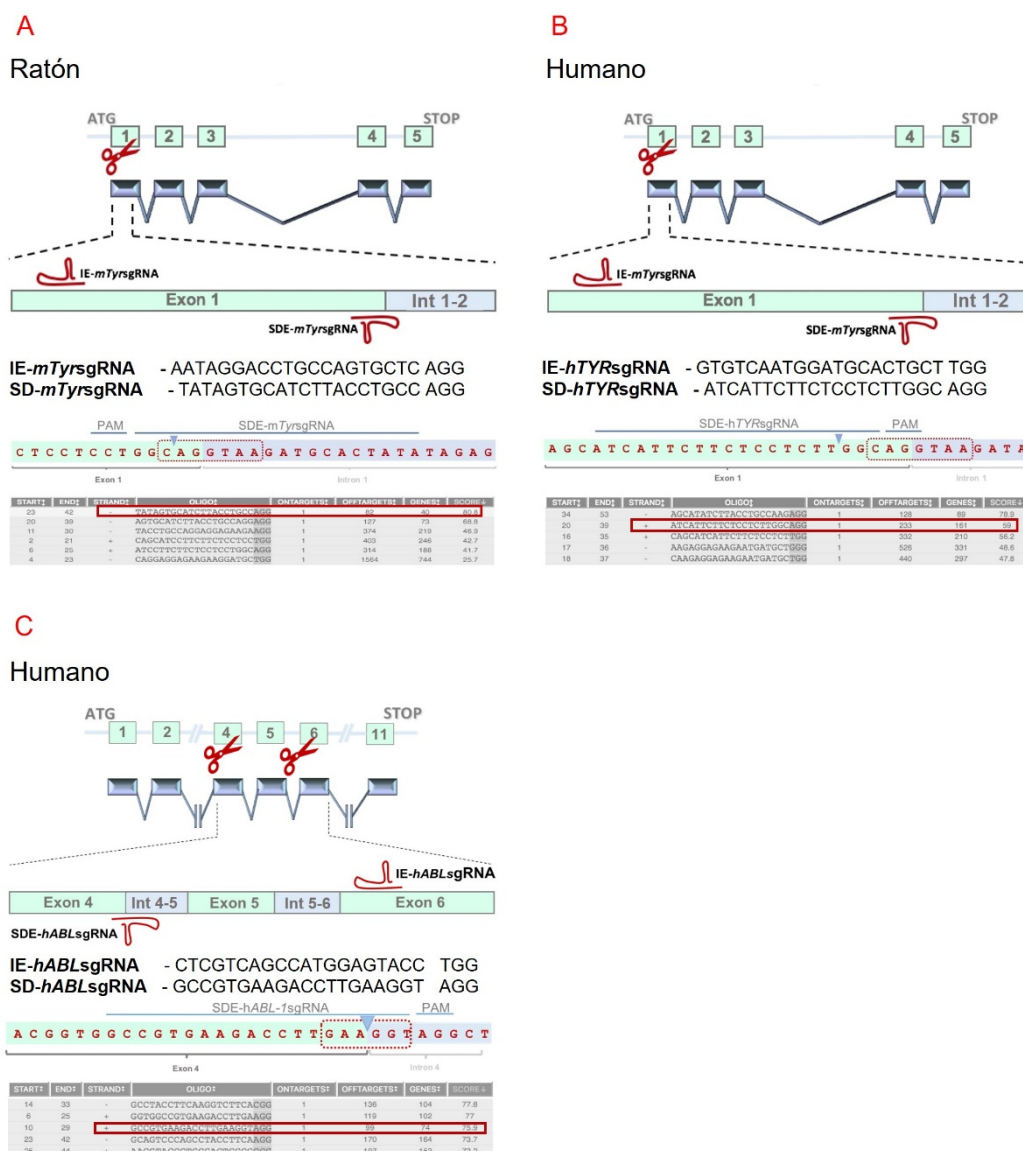


Figura 13. Diseño experimental de la edición genómica de los loci *Tyr* y *ABL* mediante el sistema CRISPR/Cas9. (A y B) Representación esquemática de los loci *Tyr* de ratón y humano. El diseño experimental CRISPR/Cas9 de las dos sgRNAs se representa en la secuencia del exón 1. Las SD-sgRNAs se dirigen al sitio de empalme entre el exón 1 y el intrón 1-2. Las IE-sgRNAs se dirigen a una posición central en la secuencia codificante del exón 1. (B) Representación esquemática del locus *ABL* humano y del diseño experimental CRISPR/Cas9 de las dos sgRNAs. Los SD-sgRNAs coinciden con el sitio de empalme entre el exón 4 y el intrón 4-5, y los IE-sgRNAs se dirigen a una secuencia codificante del exón 6. Se representan las secuencias de cada SD-sgRNA (línea azul) y su punto de corte esperado (punta de flecha azul) en la secuencia donante de empalme (caja roja de puntos). Además, se enumeran varios candidatos a SDE-sgRNAs con sus respectivas puntuaciones (el recuadro rojo corresponde a las sgRNAs seleccionadas).

Finalmente, el vector CRISPR-Cas9-GFP vacío fue utilizado como control. 24 horas después de la electroporación, se observó fluorescencia GFP en todas las condiciones, indicando la entrega efectiva de los componentes del sistema CRISPR (Figura 14A). Las células GFP⁺ fueron seleccionadas mediante citometría de flujo y secuenciadas mediante el método de Sanger. La secuenciación por Sanger de la región genómica de interés reveló la existencia de INDELS en torno al punto de corte esperado

para las guías, tanto en la condición IE-sgRNA como en la SD-sgRNA, no siendo así en la condición control (Figura 14B). El análisis de las secuencias mediante el algoritmo de predicción *Tracking of Indels by Decomposition* (TIDE) mostró frecuencias de edición similares para ambas guías (IE-sgRNA y SD-sgRNA) en las líneas celulares Baf/3 y K562. Así mismo, el algoritmo predijo ediciones similares para ambas guías y ambas líneas celulares, que correspondían a pequeñas deleciones de entre 1 y 7 nucleótidos (Figura 15).

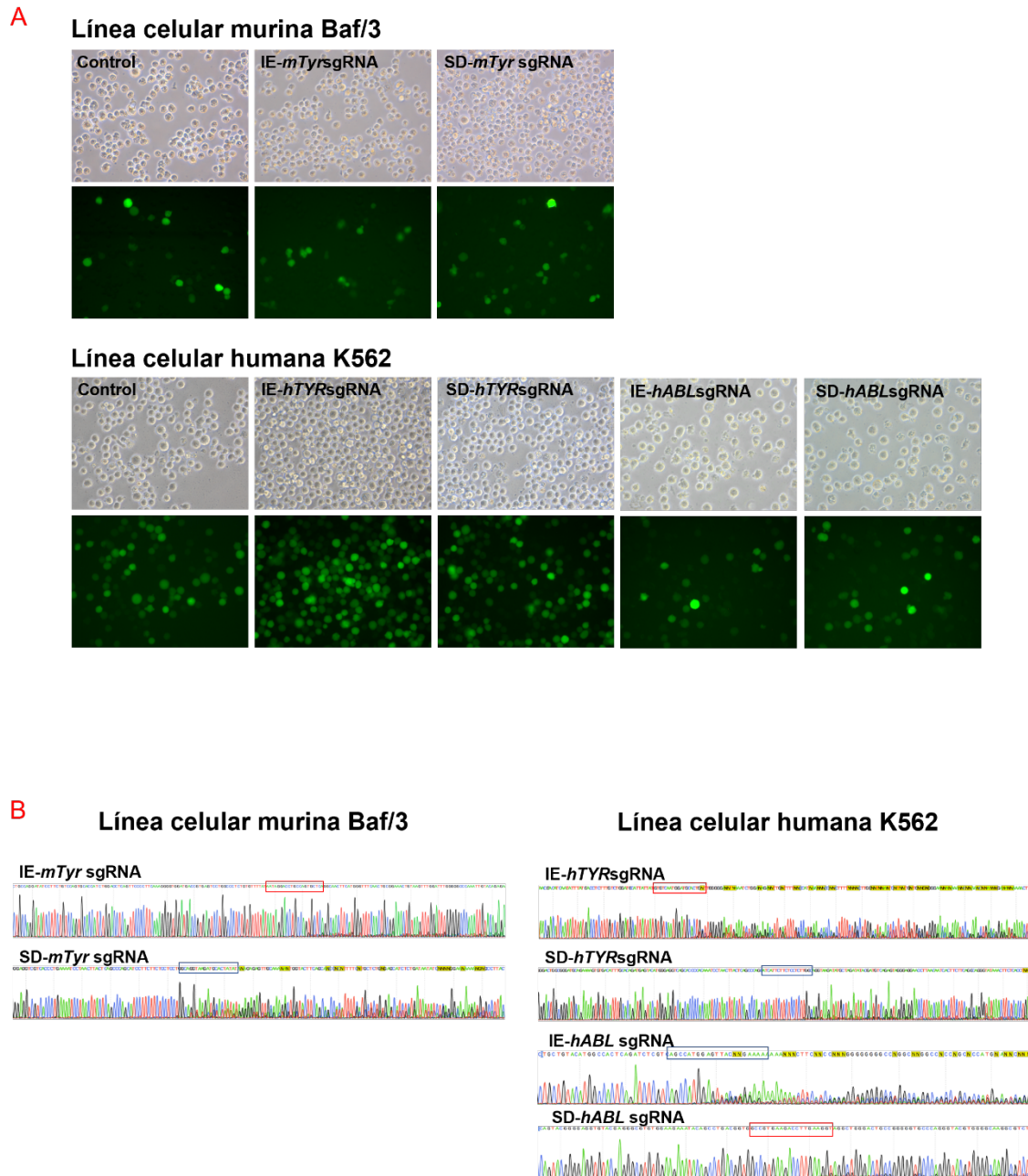
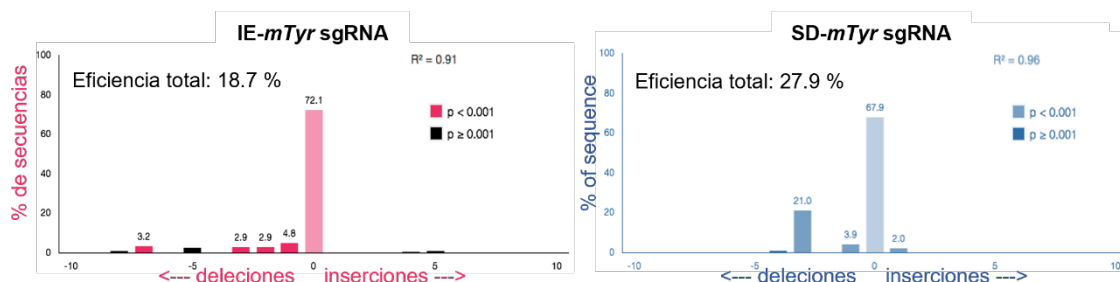


Figura 14. Edición in vitro mediada por CRISPR/Cas9 del locus *Tyr* en la línea celular de ratón Baf/3, y de los loci *TYR* y *ABL* en la línea celular humana K562. **(A)** Microscopía de fluorescencia de las células electroporadas con el vector px480 vacío (controles) y portadoras de cada una de las sgRNA. **(B)** Secuencias de las células editadas por CRISPR/Cas9 mediante IE-sgRNAs (recuadro rojo) y SD-sgRNAs (recuadro azul). Las células editadas mostraron una mezcla de secuencias alrededor del punto de corte esperado para cada sgRNA.

Línea celular murina Baf/3

Espectro INDELs



Línea celular humana K562

Espectro INDELs

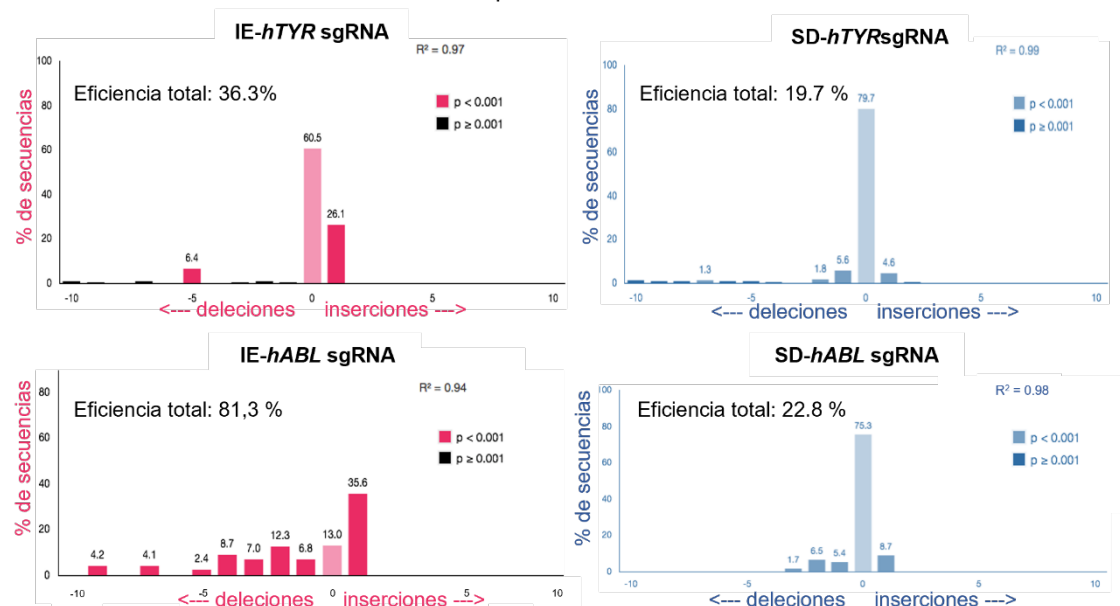


Figura 15. Análisis de descomposición TIDE de las secuencias editadas generadas en líneas celulares humanas y de ratón. Predicción del algoritmo de descomposición TIDE de la eficiencia global de la edición y de las variantes alélicas más comunes generadas para las IE-sgRNAs (paneles rojos) y para las SD-sgRNAs (paneles azules).

A fin de evitar la variabilidad en el proceso de entrega de los componentes CRISPR entre los experimentos, en los posteriores análisis nos centramos en el análisis de los alelos KO dentro del contexto de los alelos editados, obviando los alelos WT o bien reparados. Con el objetivo de caracterizar en mayor profundidad las mutaciones encontradas, estas se analizaron mediante secuenciación masiva (del inglés *Next Generation Sequencing* o NGS) (Figura 16). El análisis *in silico* de las mutaciones alélicas generadas por las IE-sgRNAs predijo un 77% de alelos KO en la línea celular murina Baf/3 (Figura 16C) y un 70% en la línea celular humana K562 (Figura 16D), todos ellos debidos a mutaciones de tipo *frameshift* que alteraban el marco de lectura del gen. Sin

embargo, los porcentajes restantes correspondían a mutaciones debidas a inserciones o deleciones de un numero de nucleótidos múltiplo de tres, por lo que preservarían el marco de lectura. Como resultado, este tipo de mutaciones eliminarían determinados aminoácidos de la secuencia proteica, pero no darían lugar a un fenotipo KO. Por otra parte, el análisis de las modificaciones alélicas encontradas en el grupo de las SD-sgRNAs (humana y murina) mostró que en el 100% de los casos las mutaciones daban lugar a alelos nulos, ya fuera por mutaciones en la secuencia canónica del *splicing* (mutaciones *sp donor site*), mutaciones de tipo *frameshift* o ambas simultáneamente (Figura 16C y D).

A

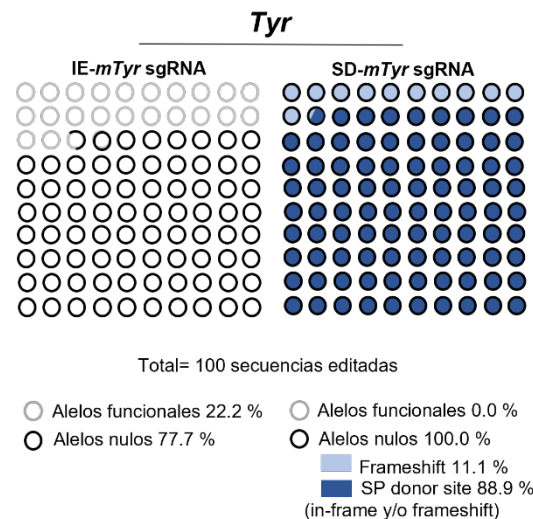
Línea celular murina Baf/3					
IE-mTyr sgRNA	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica	
WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC				
Ins C	TTTATAATAGGACCTGCCAGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift +1 bp	Stop	No	
Del G	TTTATAATAGGACCTGCCAGT-CTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -1 bp	Stop	No	
Del C	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGC-AGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -2 bp	Stop	No	
Del TC	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGC-AGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -2 bp	Stop	No	
Del TGCTCA	TTTATAATAGGACCTGCCAG-GGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	CS/-	Si	
Del ACCTGCCAGTCTCAGG	TTTATAATAGG-CAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -17 bp	Stop	No	
Del GCCAGTCTCAGGCAACT	TTTATAATAGGACCT-CITTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -18 bp	QCSGNF/-	Si	
Del TGCCAGT	TTTATAATAGGACCT-GCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -7 bp	Stop	No	
Del AGTGC	TTTATAATAGGACCTGCC-TCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -5 bp	Stop	No	
SD-mTyr sgRNA	Secuencia (Sitio de splicing; Exón; Intrón)	Mutación	Resultado	Traducción proteica	
WT	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAGTAAGATGCACTATATAGAG				
Ins A	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAGTAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift +1 bp	Stop	No	
Del G	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAG-TAAGATGCACTATATAGAG	Sp donor site -1 bp		No	
Del TAA	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAG-GATGCACTATATAGAG	Sp donor site -3 bp		No	
Del TAAG	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAG-ATGCACTATATAGAG	Sp donor site -4 bp		No	
Del GT	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAG-AAGATGCACTATATAGAG	Sp donor site -2 bp		No	
Del GGTA	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGA-AGATGCACTATATAGAG	Frameshift -1bp / Sp donor site -4 bp	Stop	No	
Del AGG	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGC-TAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -2bp / Sp donor site -3 bp	Stop	No	
Del AG	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGC-TAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -2bp / Sp donor site -2 bp	Stop	No	
Del GTAAG	AGCCAGCATCCTCTCTCTCCTGCGAG-ATGCACTATATAGAG	Sp donor site -4 bp		No	

B

Línea celular humana K562					
IE-hTYR sgRNA	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica	
WT	ATGCATTATTATGTGCAATGGATGCACTGCTGGGGGATCTGAAATCTG				
Ins t	ATGCATTATTATGTGCAATGGATGCACTGCTGGGGGATCTGAAATCTG	Frameshift	Stop	No	
Del TGAC	ATGCATTATTATGTGCAATGGA-TGCTGGGGGATCTGAAATCTG	Frameshift	Stop	No	
A-T	ATGCATTATTATGTGCAATGGATGCTCTGCTGGGGGATCTGAAATCTG	In frame		Si	
Del CA	ATGCATTATTATGTGCAATGGATG-CTGCTGGGGGATCTGAAATCTG	Frameshift	Stop	No	
Del C	ATGCATTATTATGTGCAATGGATGCA-TGCTGGGGGATCTGAAATCTG	Frameshift	Stop	No	
SD-hTYR sgRNA	Secuencia (Sitio de splicing; Exón; Intrón)	Mutación	Resultado	Traducción proteica	
WT	AGCCAGCATCATTCTCTCTCTGCGAGTAAGATATGCTAGATATAC				
Ins t	AGCCAGCATCATTCTCTCTCTTGGCAGTAAGATATGCTAGATATAC	Frameshift +1 bp	Stop	No	
Del G	AGCCAGCATCATTCTCTCTCTT-GCAGTAAGATATGCTAGATATAC	Frameshift -1 bp	Stop	No	
Del CTG	AGCCAGCATCATTCTCTCTCT- GCAGTAAGATATGCTAGATATAC	Frameshift -4 bp	Stop	No	
Del TGCGAGG	AGCCAGCATCATTCTCTCTCTCT- TAAGATATGCTAGATATAC	In frame -6 bp / Sp donor site -4 bp	WQ/-	No	
Del T	AGCCAGCATCATTCTCTCTCTC-TGGCAGTAAGATATGCTAGATATAC	Frameshift -1 bp	Stop	No	

C

Línea celular murina Baf/3



D

Línea celular humana K562

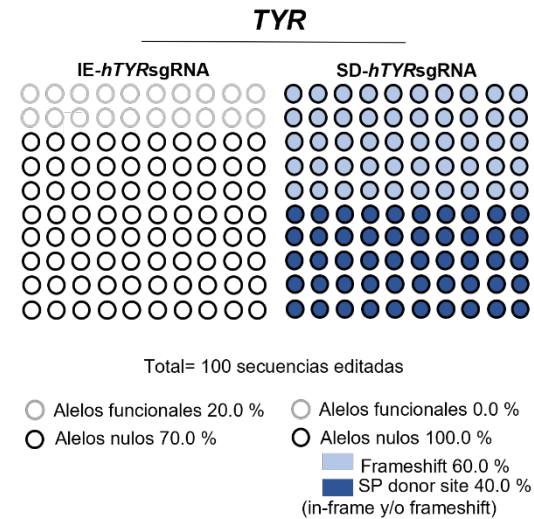


Figura 16. Análisis mediante secuenciación masiva (NGS) del locus *Tyr* en células editadas de ratón y humanas. (A) Edición genómica del locus murino *Tyr* utilizando sgRNAs contra una secuencia interna exónica (IE) o contra la secuencia donadora del *splicing* en 5' (SD). Análisis mediante NGS de las variantes alélicas generadas en células murinas Baf/3. (B) Edición genómica del locus humano *TYR* utilizando sgRNAs contra una secuencia interna exónica (IE) o contra la secuencia donadora del *splicing* en 5' (SD). Análisis mediante NGS de las variantes alélicas generadas en células humanas K562. (C y D) Representación gráfica de las mutaciones encontradas en células editadas por las IE-sgRNA y las SD-sgRNA, y su efecto previsto. Los círculos negros y grises representan los alelos nulos y los alelos funcionales, respectivamente, mientras que el fondo indica el tipo de mutación (azul oscuro: sitio donante de empalme en el marco y/o desplazamiento del marco; azul claro: desplazamiento del marco).

Con la intención de validar los resultados *in vitro*, se llevaron a cabo análisis *in vivo* mediante la microinyección de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en embriones en estado de una célula. Los embriones microinyectados se dividieron en dos grupos, uno de los cuales fue mantenido *in vitro* hasta la etapa de blastocisto, momento en el que se analizó mediante secuenciación masiva el conjunto de ediciones alélicas generadas. Por último y a modo de evaluación funcional de las mutaciones generadas en el gen de la tirosinasa, se estudiaron los fenotipos y genotipos de las camadas derivadas del otro grupo de embriones microinyectados con cada una de las guías (Figura 17).

IE-mTyrosRNA	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica
Del (TGCTCAG)	TTTATAATAGGCACTGCCAG=====GCAACTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -7 bp	Stop	No
Del (CAGTGC)	TTTATAATAGGACTCTG=====TCAGGCAACTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	QC/-	Si
Del (ATGTGC)	TTTATAATAGGACTCTGCC=====TCAGGCAACTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -5 bp	Stop	No
Del (GCTCAGGCAACTCATGGGTTTCAACTGCGGAAAGTGT)	TTTATAATAGGACTCTGCCAGT=====	Frameshift -38 bp	Stop	No
Ins A	TTTATAATAGGACTCTGCCAGTCACTCAGGCAACTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift +1 bp	Stop	No
Del (GCCAGTGCCT)	TTTATAATAGGACT=====CAGGCAACTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -9 bp	CQC/-	Si
Del (TCAGGC)	TTTATAATAGGACTCTGCCAGTGC=====AACTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	SG/-	Si
5D-mTyrosRNA	Secuencia (Sitio de splicing; Exón; Intrón)	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTGGCAGTAAGATGCACTATATAGAG			
Del CAGC	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTCTG=====TAAGATGCACTATATAGAG	In frame -3 bp/ Sp donor site -4 bp	Q/-	No
Del GGTAAGATGCA	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTCTGGCA=====CTATATAGAG	Frameshift -1bp / Sp donor site -4 bp	Stop	No
Del GCAGC	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTG=====TAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -4 bp / Sp donor site -4bp	Stop	No
Ins GG	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTGGGAGGTAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift +2bp / Sp donor site +2 bp	Stop	No
Del CA	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTG=====GGTAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -2 bp / Sp donor site -2bp	Stop	No
Del CTGGCAGG	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTC=====TAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -7 bp / Sp donor site -4bp	Stop	No
Del CAGC	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTCTG=====GTAAGATGCACTATATAGAG	In frame -3 bp / Sp donor site -3 bp	Q/-	No
G-T + Del TAA	AGCCGAGCATCTCTCTCTCTCTGGCATG=====GATGCACTATATAGAG	In frame / Sp donor site -3bp	Stop	No

19 y 25 embriones B6/CBA fueron microinyectados con el ARNm de la nucleasa Cas9 y las guías IE-sgRNA y SD-sgRNA, respectivamente. Dichos embriones fueron

cultivados *in vitro* hasta la fase de blastocisto (3,5 dpc), momento en el que se extrajo su ADN y se evaluó el conjunto de modificaciones alélicas generadas mediante secuenciación masiva (NGS) (Figura 17A).

Los análisis llevados a cabo mediante NGS mostraron diferentes porcentajes de edición para cada una de las guías: 63,4% para la guía IE-sgRNA y 20,7% para la guía SD-sgRNA (Figura 5B). La predicción *in silico* de las secuencias alélicas editadas, obtenidas de la microinyección con la guía IE-mTyr sgRNA, mostró un 67,57% de alelos nulos generados, todos ellos derivados de mutaciones tipo *frameshift*. El 42,8% restante correspondería a alelos generados por deleciones de 6 y 9 pares de bases, dando lugar a mutaciones del tipo cambio de aminoácido (del inglés *nonsynonymous*) (Figura 17B).

Por su parte, los alelos editados generados mediante microinyección con la guía SD-mTyr sgRNA derivarían en su totalidad (100%) en un fenotipo KO, al estar alterada en todos ellos la secuencia canónica del *splicing* (mutación *sp site*). Un 27% de dichos alelos contenían, además, mutaciones de tipo *frameshift* afectando a la secuencia codificante (mutación *frameshift/sp site*). Como consecuencia, todas las ediciones generadas mediante el sistema CRISPR/Cas9 dirigido a los sitios de procesamiento intrónico dieron lugar a alelos nulos (Figura 17B).

Finalmente, a fin de confirmar las predicciones *in silico*, se microinyectaron embriones en etapa de una célula con los componentes del sistema CRISPR/Cas9 y cada una de las dos sgRNAs para la obtención y estudio de las camadas derivadas. Los embriones obtenidos de la microinyección de cada condición experimental (IE-sgRNA o SD-sgRNA) fueron implantados en etapa de dos células en hembras pseudogestantes CD1 (Figura 18). El análisis fenotípico de las camadas derivadas mostró un mayor número de ratones albinos o mosaico en la condición sgRNA-SD (4 de 5) frente a la condición sgRNA-IE, donde todas las crías tenían pelaje coloreado (6 de 6) (Figura 18A). Una vez observado el fenotipo de la descendencia obtenida, se llevó a cabo un análisis genotípico de las mutaciones generadas y se analizaron los ratones de cada grupo mediante subclonaje y posterior secuenciación por Sanger.

La camada obtenida de la microinyección con la guía IE-mTyr sgRNA, en la que todas las crías presentaban coloración del pelaje, mostró dos tipos de alelos mutados:

alelos nulos generados por mutaciones de tipo *frameshift* y alelos mutados, que no conducían a un fenotipo KO, al surgir de mutaciones *in frame* (Figura 18B).

A



B

IE-mTyrsgRNA	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC			
Negro	Del CAGGCA	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	Si
	Del CAGTGC	TTTATAATAGGACCTGC-----TCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	Si
Negro	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
	Del GTGCTCAGGCA	TTTATAATAGGACCTGCCA-----ACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -11bp	Stop
Negro	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
	Del TGCTCAG	TTTATAATAGGACCTGCCAG-----GCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -7 bp	Stop
Negro	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
	Del CAGTGC	TTTATAATAGGACCTGC-----TCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	In frame -6 bp	QC/-
Negro	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
	Del TGCTCAG	TTTATAATAGGACCTGCCAG-----GCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift -7 bp	No
	Ins A	TTTATAATAGGACCTGCCAGTAGCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	Frameshift +1 bp	No
Negro	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
	WT	TTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC		Si
SD-mTyrsgRNA	Secuencia (Sitio de splicing; Exón; Intrón)	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG			
Negro	WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG		Si
	Del CAGGTA	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCG-----AGATGCACTATATAGAG	In frame -3 bp / Sp donor site -6 bp	Q/-
	Del G	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAG-----TAAGATGCACTATATAGAG	Sp donor site -2bp	No
Negro	WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG		Si
	WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG		Si
Mosaico	WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG		Si
	Del GGTA	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGA-----GATGCACTATATAGAG	Frameshift -1 bp / Sp donor site -5 bp	Stop
	Ins A	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift +1 bp / Sp donor site +1 bp	Stop
Mosaico	WT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGAGGTAAGATGCACTATATAGAG		Si
	Del CAGGTAAG	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCG-----ATGCACTATATAGAG	In frame -3 bp / Sp donor site -7 bp	Q/-
	Del GG / Ins CAT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCGCATGTAAGATGCACTATATAGAG	Sp donor site	No
Albino	Del A	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTCTGCG-----GGTAAGATGCACTATATAGAG	Frameshift -1 bp / Sp donor site -1bp	Stop
	Del CCTGGCAGGTA / Ins ATAT	AGCCGAGCATCCTTCTCTCTCTATATA-----AGATGCACTATATAGAG	In frame / Sp donor site	Stop

C

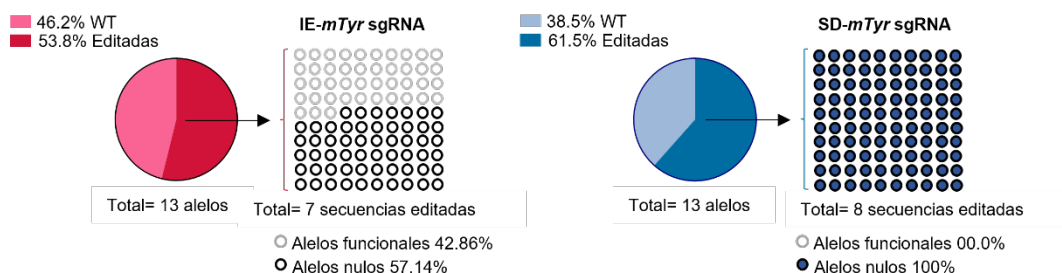


Figura 18. Análisis in vivo de la generación de alelos *Tyr* nulos mediante mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9. (A) Camadas obtenidas de la microinyección con la guía IE-mTyr sgRNA o SD-mTyr sgRNA. La mayoría de las crías de embriones editados con SD-mTyr sgRNA (4 de 5) mostraron un fenotipo mutante (1 albino y 2 mosaico). Mientras que el total (6 de 6) de las crías editadas con la guía IE-mTyr sgRNA mostraban coloración del pelaje. **(B)** Caracterización genotípica de los diferentes alelos de las crías. **(C)** Análisis gráfico de NGS de la edición mediada por CRISPR/Cas9 del locus *Tyr* en camadas de ratón. El genotipado de los ratones obtenidos de la microinyección con las IE-mTyr sgRNAs reveló que sólo el 57,14% de las secuencias editadas corresponden a alelos nulos, mientras que el 100% de los alelos modificados con SD-mTyr sgRNA dieron lugar a alelos nulos. Los círculos negros y grises corresponden a alelos nulos y funcionales, respectivamente.

La secuenciación por Sanger de las diferentes variantes alélicas generadas en el grupo de ratones obtenido con la microinyección de la guía SD-mTyr sgRNA identificaron alelos WT y alelos con mutaciones de tipo *frameshift* y/o mutaciones *sp site*. Interesantemente, tres de los cinco ratones obtenidos portaban un alelo con una mutación *in frame*, sin embargo, en todos estos casos existían además mutaciones en la secuencia del *splicing*, que garantizaban la producción de un alelo nulo. Como resultado, el total de los alelos editados encontrados eran de tipo KO (Figura 18C).

A fin de evaluar que sgRNA produjo una mayor proporción de alelos nulos dentro del total de editados, excluimos todas las secuencias WT en las que el sistema no había editado. Como resultado, obtuvimos un 57,14% de alelos nulos generados mediante la guía exónica SD-mTyr sgRNA. Sin embargo, el 100% de las ediciones generadas por parte de la guía dirigida hacia la secuencia del *splicing* constituían mutaciones de tipo KO (Figura 18C).

1.3 El sistema CRISPR/Cas9 dirigido contra los sitios de procesamiento intrónico de *BCR/ABL* aumenta la eficiencia para anular la proliferación celular dependiente del oncogén.

La línea celular K562, derivada de un paciente de LMC y portadora del oncogén de fusión *BCR/ABL* fue dividida en dos condiciones experimentales: electroporada con la guía IE-h*ABL* sgRNA, dirigida hacia una región exónica interna contenida en el exón 4 de *ABL* y electroporada con la guía SD-h*ABL* sgRNA, dirigida hacia la secuencia donadora del *splicing* en 5' del exón 6 (Figura 13C, Tabla 1). De forma similar a lo realizado para el gen *Tyr*, las células GFP⁺ fueron seleccionadas mediante citometría de flujo y la región genómica de interés fue secuenciada mediante Sanger (Figura 14). La secuenciación por Sanger mostró edición genómica en el punto de corte esperado para ambas sgRNAs y el análisis mediante TIDE predijo una variedad de pequeños INDELS generados en torno al punto de corte en ambos casos (Figura 15). El posterior análisis de las secuencias por subclonaje, reveló las variantes alélicas más frecuentes para cada guía. El 40% (4 de 10) de las variantes alélicas generadas por la guía IE-h*ABL* sgRNA correspondían a mutaciones de tipo *frameshift* que llevaban a la producción de alelos nulos. Sin embargo, el 60% de las ediciones restantes, correspondían a mutaciones *in frame*, de múltiplos de tres nucleótidos, que no lograrían un silenciamiento efectivo del

gen. Por el contrario, las ediciones generadas por la guía IE-hABL sgRNA darían lugar en el 100% (9 de 9) de los casos a alelos nulos. Ocho de las nueve variantes alélicas encontradas daban lugar a mutaciones en el sitio canónico del *splicing* (sp site) y en cuatro de ellas se producían además mutaciones de tipo *frameshift* (Figura 19).

A fin de evaluar la capacidad de ambas sgRNAs para aumentar la eficiencia en la

IE-hABL sgRNA	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGGAGTACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA			
Ins T	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGGAGTACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift +1 bp	Stop	No
Del GT	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGGA-----ACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift -2 bp	Stop	No
Del AC	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGGAGT-----CTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift -2 bp	Stop	No
Del AGT	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGG-----ACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	In frame -3 bp	EY/D	Si
Del GAGT	ACTCAGATCTCGTCAGCCATG-----ACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift -4 bp	Stop	No
Del ATGGAGT	ACTCAGATCTCGTCAGCC-----ACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift -7 bp	Stop	No
Del TGGAGTACC	ACTCAGATCTCGTCAGCCA-----TGGAGAAGAAAACTTCATCCA	In frame -9 bp	EYL/-	Si
Del GGA	ACTCAGATCTCGTCAGCCAT-----GTACCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	In frame -3 bp	E/-	Si
A>C	ACTCAGATCTCGTCAGCCATGGAGTCCCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	In frame	Y/S	Si
Del CCATGGAGTA	ACTCAGATCTCGTCAG-----CCTGGAGAAGAAAACTTCATCCA	Frameshift -10 bp	Stop	No
SD-hABL sgRNA	Secuencia (Sitio de splicing; Exón; Intrón)	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG			
Ins A	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	Frameshift +1 bp	Stop	No
Del GAA	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTT-----GTTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	In frame -3 bp / Sp donor Site -2 bp	K/-	No
Del G	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGA--GTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	Frameshift -1 bp / Sp donor Site -1 bp	Stop	No
Del AA	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTG--GTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	Frameshift -2 bp / Sp donor Site -2 bp	Stop	No
A>G	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	In frame / Sp donor Site	K/R	No
Del A	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTG--AGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	Frameshift -1 bp / Sp donor Site -1 bp	Stop	No
G>C	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	In frame / Sp donor Site	K/N	No
A>C	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	In frame / Sp donor Site	K/T	No
Del TGAA	CTGACGGTGGCCGTGAAGACCTT-----GTTAGGCTGGGACTGCCGGGGGTG	Frameshift -4 bp / Sp donor Site -2 bp	Stop	No

Figura 19. Análisis mediante secuenciación masiva (NGS) de células humanas K562 editadas con CRISPR/Cas9 en el locus *ABL*. Edición genómica del locus humano *ABL*, utilizando sgRNAs contra una secuencia interna exónica (IE) o contra la secuencia donadora del *splicing* en 5' (SD). Análisis mediante NGS de las variantes alélicas generadas en células humanas K562.

eliminación del oncogén de fusión, comparamos la capacidad para anular la proliferación celular ocasionada por la actividad oncogénica de *BCR/ABL*. 48 horas tras la electroporación, se evaluaron los efectos sobre la apoptosis y el ciclo celular de las células, mediante marcaje con Anexina V y yoduro de propidio, y posterior análisis por citometría de flujo. Los análisis mostraron como las células electroporadas con la guía SD-hABL sgRNA exhibían un mayor nivel de apoptosis (86,8%) que las electroporadas con la IE-hABL sgRNA (60,1%), mientras que las células control mostraban una apoptosis basal del 32,4% (Figura 20A). Así mismo, las células electroporadas con la guía SD-hABL sgRNA mostraban un 10% más de células con un contenido subG0 de ADN (45,3%) que las electroporadas con la guía IE-hABL sgRNA (34,5%) (Figura 20B). Finalmente, la cuantificación de la expresión de Anexina V de las células reveló una significativa mayor expresión del marcador apoptótico en la condición SD-hABL sgRNA ($568,2 \pm 8,4$ u.f.), en comparación con la condición IE-hABL sgRNA ($475,5 \pm 5,9$ u.f.) y con la condición control ($411,5 \pm 6,3$ u.f.) (Figura 20C).

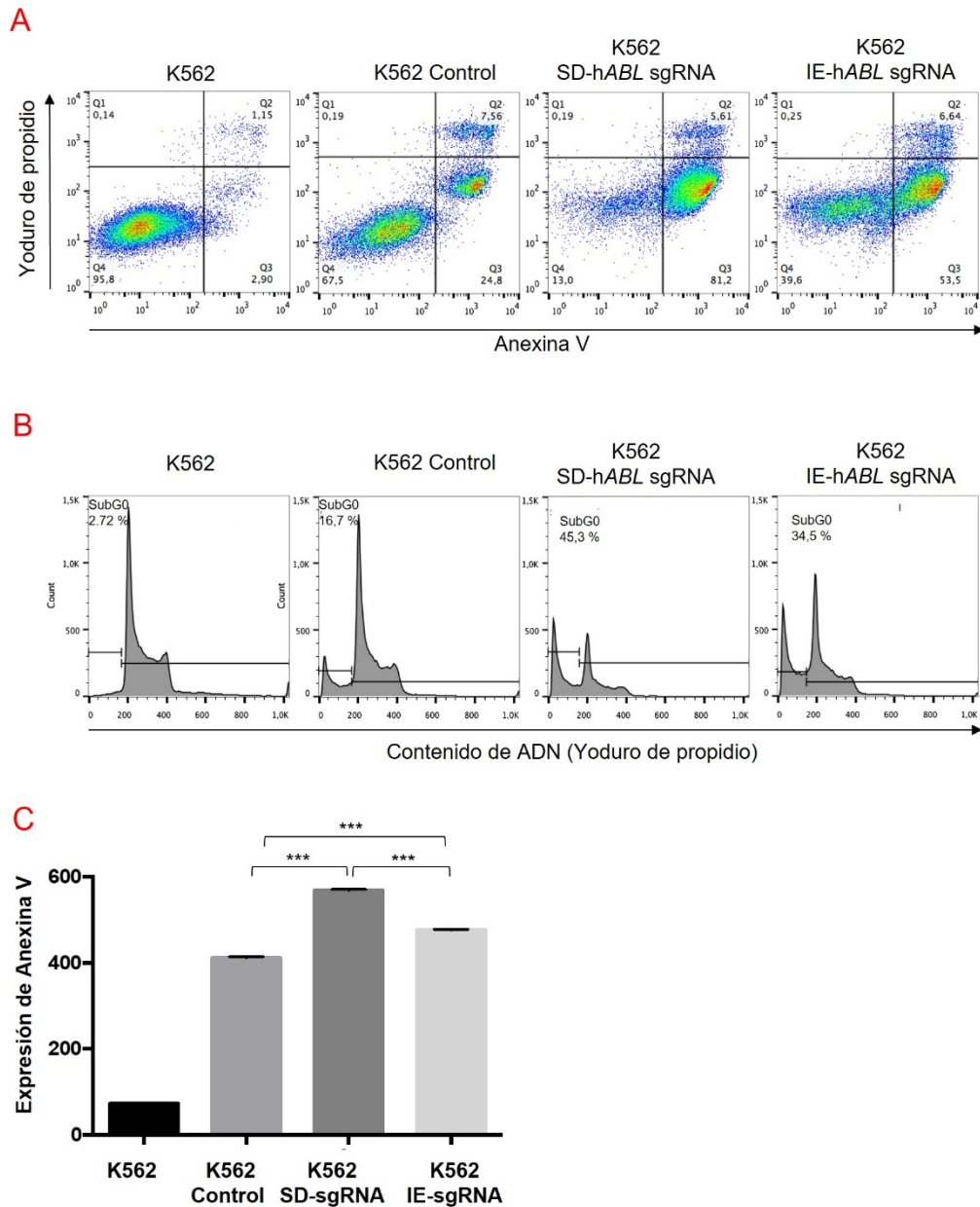


Figura 20. Análisis funcional de células K562 editadas con CRISPR/Cas9 dirigido contra el oncogén *BCR/ABL*. **(A)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de anexina V y yoduro de propidio de las células K562 electroporadas. **(B)** Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN, medido mediante tinción con yoduro de propidio, de las células K562 electroporadas. **(C)** Cuantificación de la expresión de Anexina V (u.f.) en las células K562 electroporadas. El gráfico muestra los resultados de tres experimentos independientes, se muestra media $\pm$ SD. ***, $p < 0.001$.

1.4 El sistema CRISPR/Cas9 dual permite la generación de deleciones específicas en la secuencia codificante de *BCR/ABL*, generando alelos nulos de forma eficiente.

A fin de explorar el potencial de una aproximación diferente basada en CRISPR/Cas9, para la generación eficiente de alelos *BCR/ABL* nulos, diseñamos un sistema de guías dual para la inducción de deleciones específicas en la secuencia *ABL* humano

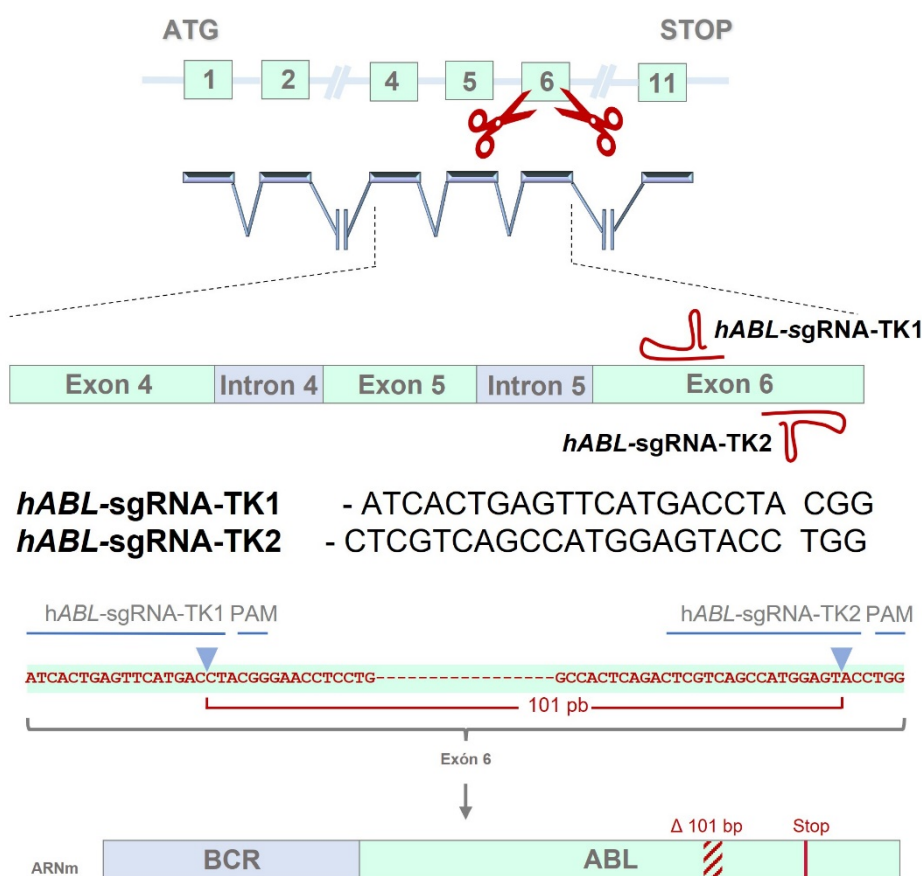


Figura 21. Representación esquemática del locus *ABL* humano y del diseño experimental CRISPR/Cas9 dual dirigido hacia la región TK de *BCR/ABL*. Se representan las secuencias de las guías hABL-sgRNA-TK1 y hABL-sgRNA-TK2 (línea azul) y su punto de corte esperado (punta de flecha azul) en el dominio TK del gen localizado en el exón 6. La deleción resultante de 101 pb generaría un codón de parada prematuro en el exón 7.

codificante del oncogén. Como ya se ha mencionado, este tipo de edición presenta una serie de ventajas en comparación con la estrategia de generación de INDELS mediante una única sgRNA, dada la eficiencia de modificación bialélica, la rápida identificación de las células editadas mediante PCR y la predictibilidad *in silico* de la edición a generar y, por tanto, de la pérdida de función del gen. Por todo ello, diseñamos dos sgRNAs dirigidas hacia el exón 6 de *ABL* contenido en el dominio TK (hABL-sgRNA-TK1 y hABL-sgRNA-TK2), separadas por 101 pb, que producirán preferentemente una deleción

específica en el locus (Figura 21, Tabla 1). La predicción *in silico* de la secuencia editada resultante mostró la generación de un codón STOP prematuro que conduciría a la producción de una proteína truncada sin actividad TK (Figura 21). Nuevamente, las sgRNAs diseñadas fueron clonadas, por separado, en el plásmido CRISPR-Cas9-GFP. La línea celular K562 fue electroporada de forma simultánea con ambas guías o con el plásmido vacío, a modo de control, y 24 horas después, las células GFP⁺ fueron seleccionadas mediante citometría de flujo (Figura 22A). La amplificación mediante PCR de la región genómica de interés (Tabla 6) mostró una banda de 473 pb, correspondiente

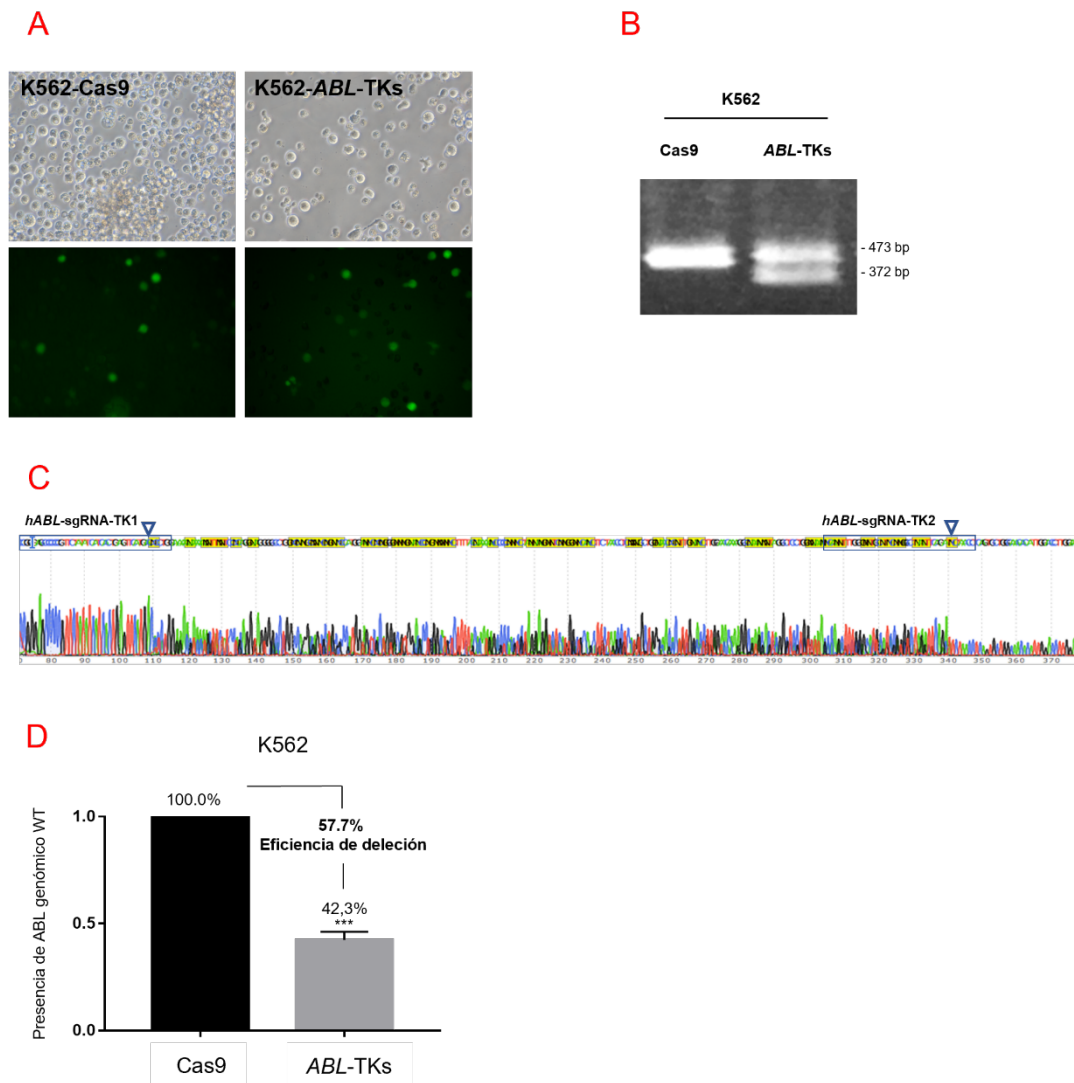


Figura 22. Edición *in vitro* mediada por CRISPR/Cas9 del locus *BCR/ABL* en la línea celular humana K562. **(A)** Microscopía de fluorescencia de células electroporadas con el vector px480 vacío (K562-Cas9) y portadoras de ambas sgRNAs (K562-ABL-TKs). **(B)** Amplificación por PCR del exón 6 de ABL en células K562 electroporadas con la nucleasa Cas9 (K562-Cas9) y con Cas9 unida a ambas sgRNAs (K562-ABL-TKs). **(C)** Secuenciación por Sanger de la región amplificada en la que se muestran las secuencias de ambas guías (recuadros azules). Las células editadas mostraron una mezcla de secuencias alrededor del punto de escisión esperado para cada sgRNA. **(D)** Cuantificación de los alelos de ABL WT. qPCR del ADN de la secuencia eliminada de ABL en las células K562 editadas. (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$).

al exón 6 de *BCR/ABL*, tanto en la condición control (K562-Cas9), como en la condición electroporada con ambas guías (K562-*ABL*-TKs). Sin embargo, en la condición K562-*ABL*-TKs se detectó una banda adicional, de 372 pb, sugiriendo la presencia de la delección generada por ambas sgRNAs (Figura 22B).

La posterior secuenciación por Sanger reveló una mezcla de secuencias a partir del punto de corte esperado por ambas guías, aludiendo así la existencia de la delección específica (Figura 22C). Con el propósito de determinar la eficiencia de edición conjunta por parte de ambas guías se llevó a cabo una qPCR sobre el ADN de las células electroporadas, utilizando un oligonucleótido directo en la región genómica de *ABL*, previa a la delección, y un oligonucleótido reverso hibridando en la región a deleccionar. Las células K562-*ABL*-TKs mostraron un 42,3% de secuencias WT con respecto al control sin editar K562-Cas9, exhibiendo, por tanto, una eficiencia de edición del 57,7%, correspondiente al porcentaje total de secuencias delecionadas (Figura 22D).

A fin de caracterizar específicamente las variantes alélicas generadas por la edición de las guías, los productos de PCR fueron subclonados y secuenciados por Sanger, obteniéndose únicamente tres tipos de secuencias: secuencias WT (10 de 24), una secuencia portadora de INDELS generados por cada una de las guías (1 de 24) y secuencias portadoras de la delección específica de 101 pb (13 de 24) (Figura 23A). Únicamente una de las 24 secuencias analizadas mostró la generación de INDELS

A

TKs- <i>hABL</i> sgRNAs	Secuencia	Mutación	Resultado	Traducción proteica
WT	CATGACCTACGGGAACCT-----CCATGGAGTACCTGG			
Ins C / Del GT	CATGACCTACGGGAACCT-----CCATGGA-ACCTGG	Frameshift -1 bp	Stop	No
Del 101 bp	CATGAC-----101bp-----ACCTGG	Frameshift -101 bp	Stop	No

B

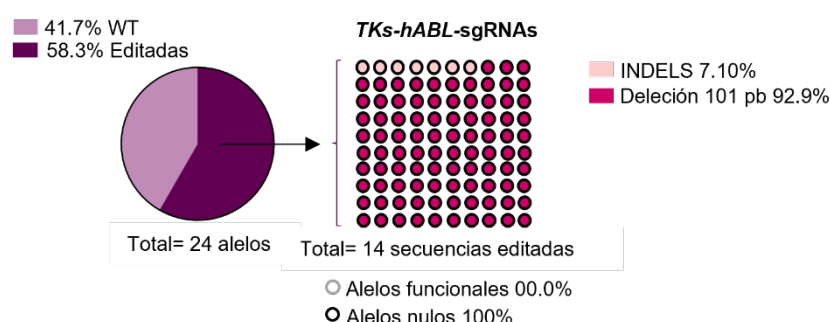


Figura 23. Análisis mediante secuenciación masiva (NGS) de células humanas K562 editadas con el sistema CRISPR/Cas9 dual en el locus *BCR/ABL*. (A) Análisis mediante NGS de las variantes alélicas generadas en células K562 electroporadas con ambas sgRNAs. (B) Análisis gráfico de NGS de la edición mediada por CRISPR/Cas9 del locus *BCR/ABL* en células K562. El análisis de las variantes alélicas generadas mostró únicamente dos tipos de ediciones que corresponden en su totalidad (100%) a alelos nulos. Los círculos negros y grises corresponden a alelos nulos y funcionales, respectivamente, mientras que el fondo indica el tipo de mutación (rosa oscuro: delección de 101 pb; rosa claro: INDELS aleatorios generados por cada una de las sgRNAs).

aleatorios en torno al punto de corte de cada una de las guías. En ella, la edición conjunta de ambas guías llevó a la producción de mutaciones de tipo *frameshift* que conducirían a la generación de un alelo nulo. Interesantemente, el resto de las ediciones encontradas (excluyendo las secuencias WT) correspondían a alelos portadores de la delección

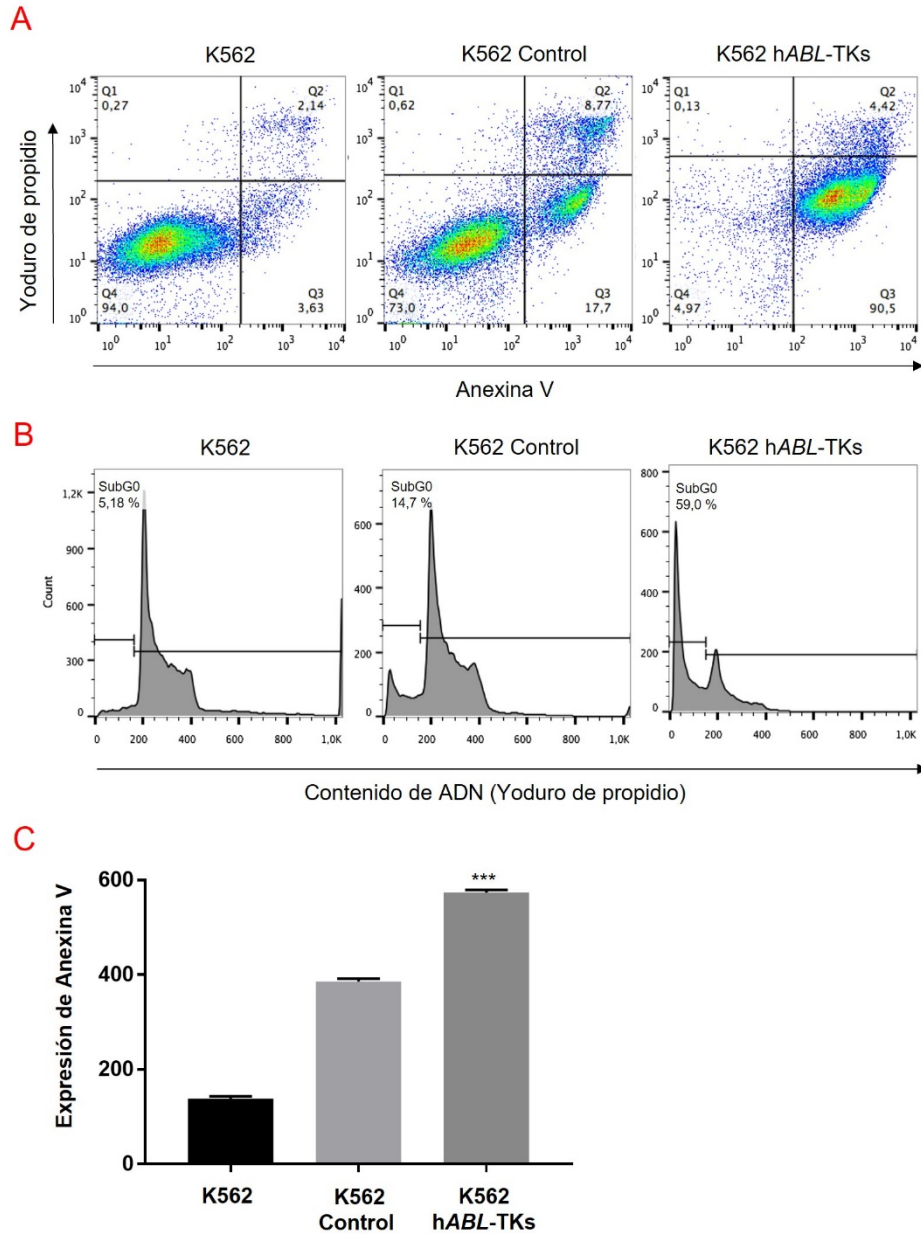


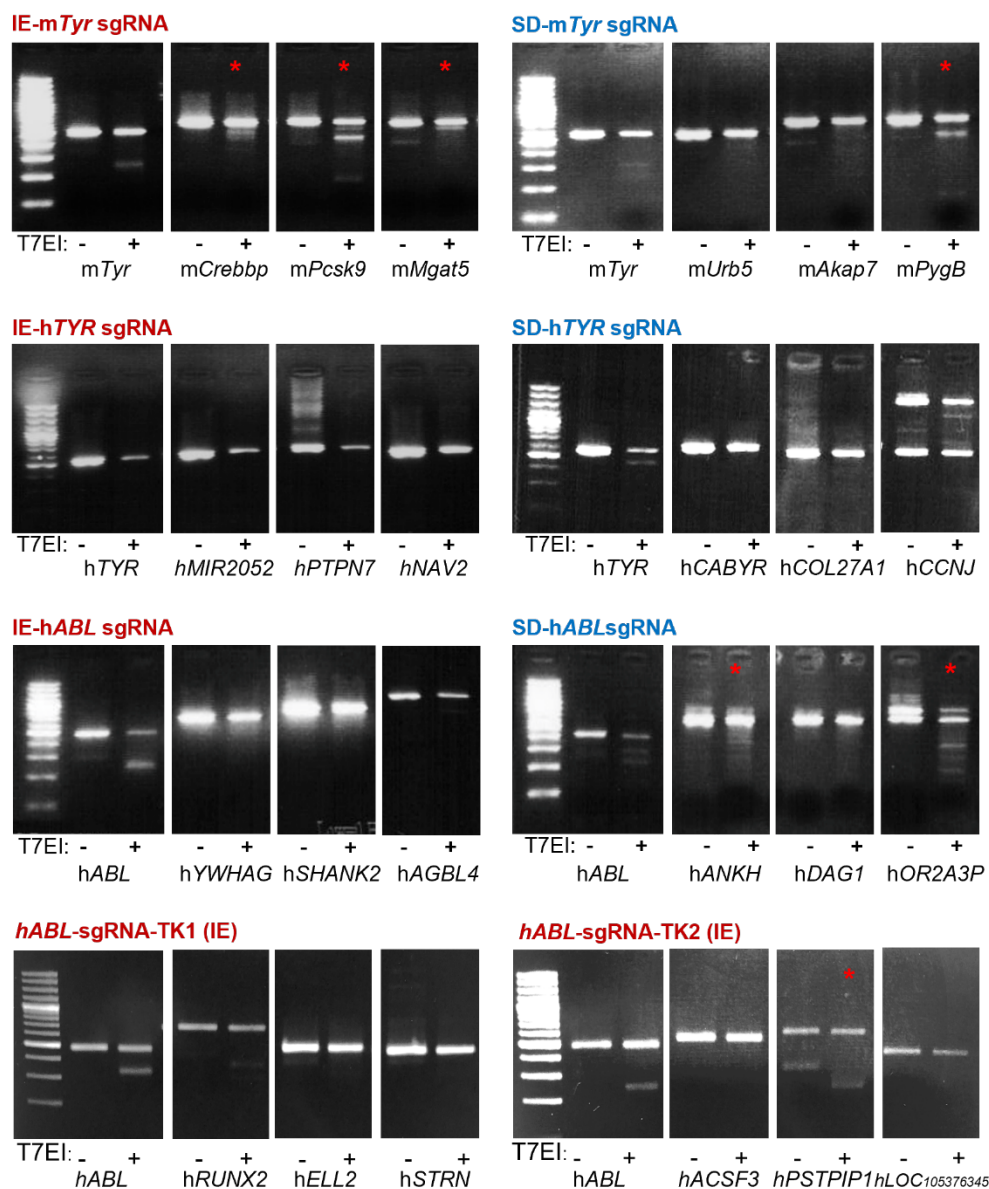
Figura 24. Análisis funcional de células K562 editadas con el sistema CRISPR/Cas9 dual para el oncogén *BCR/ABL*. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de anexina V y yoduro de propidio de las células K562 electroporadas. (B) Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN, medido mediante tinción con yoduro de propidio, de las células K562 electroporadas. (C) Cuantificación de la expresión de Anexina V (u.f.) en las células K562 electroporadas. El gráfico muestra los resultados de tres experimentos independientes, se muestra media $\pm$ SD. *, $p < 0.001$.**

específica de 101 pb, generada por ambas guías. Tal como predijo el análisis *in silico* inicial, como resultado de esta edición se generó una mutación específica, de tipo *frameshift* que llevaría al silenciamiento de la expresión génica (Figura 23B).

De manera similar a lo llevado a cabo con las guías únicas *hABL*-sgRNA-SD y *hABL*-sgRNA-IE, se evaluó el efecto biológico de la eliminación de *BCR/ABL* mediante el sistema de guías dual (*hABL*-sgRNA-TK1 y *hABL*-sgRNA-TK2) analizando los niveles de apoptosis y el ciclo celular. Para ello, 48 horas tras la electroporación, las células fueron marcadas con Anexina V y yoduro de propidio, y analizadas mediante citometría de flujo. Nuevamente, las células electroporadas con las sgRNAs (K562-*hABL*-TKs), mostraron elevados niveles de apoptosis (94,92%) en comparación con las células control K562-Cas9 (26,47%) y con las células parentales K562 sin electroporar (5,77%) (Figura 24A). En esta línea, los análisis de contenido de ADN celular mostraron un 59% de células con contenido de ADN subG0 para la condición K562-*hABL*-TKs, mientras que las células control K562-Cas9 y K562 parentales exhibieron un 14,7% y 5,18%, respectivamente (Figura 24B). Finalmente, la cuantificación de la expresión de Anexina V mostró un incremento significativo de la apoptosis celular en las células editadas K562-*hABL*-TKs ($573,7 \pm 5,7$ u.f.), con respecto a los controles sin editar K562-Cas9 ($385,7 \pm 6,1$ u.f.) y K562 parentales ($138 \pm 2,9$ u.f.) (Figura 24C).

1.5 El análisis de los posibles *off-targets* no mostró diferencias entre las distintas guías utilizadas.

Con el objetivo de analizar los posibles *off-targets* generados por cada una de las guías utilizadas y a fin de determinar si las guías SD-sgRNA veían afectada su actividad *off-target* con respecto a las IE-sgRNA, estudiamos los tres principales *off-targets* predichos para cada sgRNA de forma independiente (Tabla 9). Evaluamos la capacidad de cada sgRNA para inducir ediciones en el genoma fuera del sitio diana mediante la detección de los posibles heterodúplex formados en las secuencias editadas, utilizando el ensayo de nucleasa T7I *Surveyor*. Las guías exónicas (IE-sgRNAs) produjeron ediciones en el genoma fuera del sitio diana en 4 de las 11 secuencias analizadas y una proporción similar se obtuvo para las guías dirigidas a la secuencia canónica del *splicing* (SD-sgRNAs) que editaron en 3 de las 9 secuencias analizadas. El análisis estadístico posterior no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de guías ($p=0.092$) (Figura 25).



Off-target	IE-sgRNA	SD-sgRNA
No editadas	11	3
Editadas	4	6

Test exacto de Fisher $P=0.092$ n.s.

Figura 25. Análisis de los off-targets de las distintas sgRNAs. Análisis de los 3 principales *off-targets* en secuencias codificantes predichos para cada sgRNA utilizada. El panel muestra la secuencia amplificada de la diana y los 3 *off-targets* representativos, sin tratar y tratados con la endonucleasa T7I. La digestión revela la edición del genoma (asterisco rojo) cuando la secuencia *off-target* presenta mutaciones. La tabla muestra los resultados globales de todos los off-targets analizados. No se observaron diferencias en el número de *off-targets* editados por los IE-sgRNAs en comparación con los SDE-sgRNAs (prueba test exacto Fisher $p = 0,092$ n.s.).

2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA ELIMINAR LA EXPRESIÓN DE *BCR/ABL* EN CÉLULAS MADRE MURINAS Y HUMANAS, Y SU HABILIDAD PARA REESTABLECER LA HEMATOPOYESIS FISIOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE LMC.

Una vez evaluadas las eficiencias mostradas por las diferentes aproximaciones para la generación eficiente de alelos *BCR/ABL* nulos se seleccionó la estrategia CRISPR dual, dada su alta eficiencia, su gran consistencia en el tipo de ediciones generadas y la facilidad para la monitorización de las células editadas. Además, para todos los estudios posteriores, se decidió aportar los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en forma de complejo ribonucleoproteico (RNP), debido a la alta tasa de eficiencia demostrada en numerosos trabajos previos [249,250].

Con el objetivo de analizar el potencial terapéutico de la estrategia de edición anti-*BCR/ABL* se utilizaron dos modelos diferentes de LMC, uno murino y otro humano, para analizar el efecto terapéutico de la eliminación del oncogén por parte del sistema CRISPR/Cas9 *in vitro* y finalmente, *in vivo*, en un modelo de trasplante ortotópico.

2.1 El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén *BCR/ABL*, suprimiendo sus efectos oncogénicos, en la línea celular murina de LMC Boff-p210.

La línea celular murina de LMC Boff-p210, que expresa el ADNc del gen *BCR/ABL* humano bajo el control del promotor hematopoyético Tec, fue electroporada con los componentes del sistema CRISPR/Cas9 dual, en forma de RNP. Dicho sistema se basaba en la utilización de dos sgRNAs (*hABL*-sgRNA-TK1 y *hABL*-sgRNA-TK2) dirigidas hacia el exón 6 de *ABL*, contenido en el dominio TK, separadas por 101 pb, que producirán preferentemente una delección específica en el locus (Figura 26, Tabla 2). De igual manera, las células Boff-p210 fueron electroporadas con la nucleasa Cas9 sin sgRNAs, a modo de control. La amplificación, mediante PCR, de la región genómica de interés de las células electroporadas mostró una banda de 469 pb, correspondiente al exón 6 del gen en ambas condiciones experimentales (Boff-Cas9 y Boff-*ABL*-TKs) (Figura 27A, Tabla 6). Sin embargo, se detectó una banda adicional, de 368 pb, únicamente en la condición Boff-*ABL*-TKs, sugiriendo la presencia de la delección generada por ambas guías (Figura 27A). La posterior secuenciación por Sanger de los productos de PCR

reveló una mezcla de secuencias entre los puntos de corte esperados por ambas guías (Figura 27B).

Posteriormente, a fin de caracterizar en mayor profundidad la delección generada por el sistema, se aisló un clon derivado de una célula única (del inglés *single cell* o SC) portadora de la delección específica que afecta al dominio TK. La PCR del exón 6 de ABL mostró en este caso una única banda, de 368 pb en las células SC-ABL-TKs, mientras que en las células SC-Cas9 solo se detectó la banda de 469 pb, correspondiente a la región genómica sin editar (Figura 27A, Tabla 6). La delección específica de 101 pb fue finalmente confirmada mediante la secuenciación por Sanger del producto de PCR de las células SC-ABL-TKs (Figura 27B).

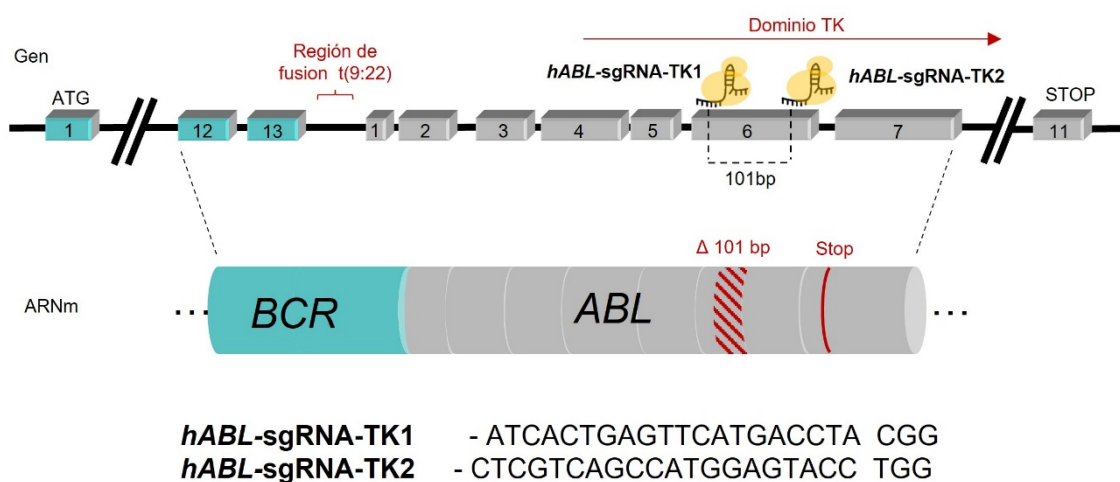


Figura 26. Diseño experimental del sistema CRISPR/Cas9 dual para eliminar el oncogén de fusión *BCR/ABL*. Detalle del gen de fusión *BCR/ABL*, resultante de la traslocación t(9:22), y el punto de corte esperado de ambas sgRNAs contra el exón 6 de *ABL*. La delección resultante de 101 pb generaría un codón de parada (STOP) prematuro en el exón 7.

Para determinar el efecto de la edición mediante CRISPR a nivel de ARNm y proteína, se cuantificó, a partir de los clones generados, la expresión de los transcritos *ABL* mediante retrotranscripción (RT-PCR) y PCR cuantitativa (qPCR, Tabla 7), y su expresión proteica mediante Western blot. Las células SC-ABL-TKs mostraron una secuencia de ARNm de menor tamaño, en comparación con las células control sin editar (SC-Cas9) (Figura 27C). La secuenciación mediante Sanger de estos productos de RT-PCR confirmó la existencia de un ARNm portador de la delección específica de 101 pb en las células SC-ABL-TKs, que daba lugar a una mutación de tipo *frameshift* y a la generación de un codón STOP prematuro en el exón 7 contiguo de *ABL* (Figura 27C). A fin de determinar si esta mutación *frameshift* desencadena los mecanismos celulares de degradación del ARN NMD (del inglés *Nonsense-mediated mRNA decay*), la PCR cuantitativa se realizó utilizando oligonucleótidos “aguas abajo” de la delección (unión de

los exones 7 y 8 de *ABL*). Como resultado, las células SC-*ABL*-TKs mostraron una significativa reducción de la expresión de *ABL*, de más del 90% ($2,6\% \pm 2,5$) en comparación con los clones control (SC-Cas9) (Figura 27D). El análisis de Western blot mostró cómo las células Boff-Cas9 y SC-Cas9 expresaban con normalidad la proteína BCR/*ABL* de 210 kDa (Figura 2E). Sin embargo, en las células SC-*ABL*-TKs no se

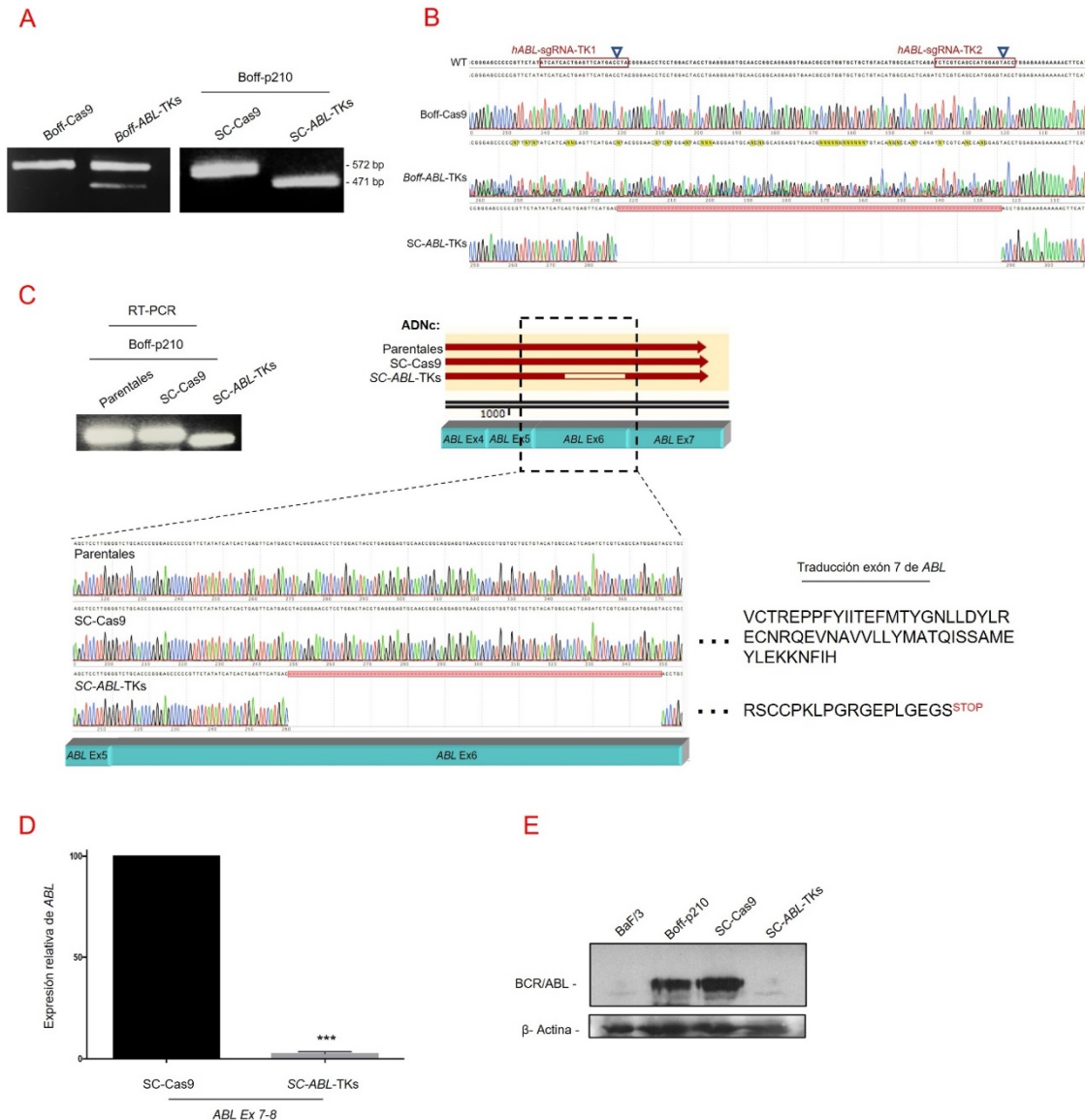


Figura 27. Análisis funcional del sistema CRISPR/Cas9 dual en la línea celular Boff-p210. (A) Amplificación por PCR del exón 6 de *ABL* en células Boff-p210 electroporadas únicamente con Cas9 (Boff-Cas9), con Cas9 y ambos sgRNAs (Boff-*ABL*-TK), y en clones derivados de célula única (SC-Cas9 y SC-*ABL*-TK). (B) Secuenciación Sanger de la región amplificada del exón 6 de *ABL*. (C) RT-PCR del exón 6 de *ABL* que muestra un transcrito de ARNm más pequeño en SC-*ABL*-TK que en las células control (parentales y SC-Cas9). La delección de 101 pb fue confirmada mediante secuenciación por Sanger en SC-*ABL*-TK. El análisis *in silico* muestra como esta delección genera un codón de parada (STOP) prematuro en el exón 7 de *ABL*. (D) PCR cuantitativa de la expresión de *ABL* en clones derivados de células Boff-p210 (SC) a nivel del exón 7-8. (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). (E) Western blot de BCR/*ABL* en células Baf/3, Boff-p210 y SCs.

detectó expresión de la proteína, tal y como ocurría en las células control Baf/3, carentes del oncogén *BCR/ABL* y utilizadas como control negativo (Figura 27E).

A fin de determinar el efecto biológico de la eliminación del oncogén *BCR/ABL* en las células murinas Boff-p210, se analizó el nivel de apoptosis, mediante la expresión de Anexina V, y el contenido de ADN, mediante la incorporación de yoduro de propidio, de las células control y editadas por el sistema CRISPR/Cas9. A diferencia de las células parentales Baf/3, sus derivadas Boff-p210 son independientes de interleucina 3 (IL-3) para su crecimiento y supervivencia, debido a la actividad oncogénica de *BCR/ABL*. Por ello, estudiaremos el efecto de la eliminación del oncogén en la línea celular Boff-p210 en ausencia de IL-3. 48 horas después de la electroporación y de la retirada de IL-3, observamos un nivel basal de apoptosis del 15,1% en las células control SC-Cas9, similar al obtenido en presencia de IL-3, mientras que este nivel alcanzó un valor medio del 99,1% en las células editadas SC-*ABL*-TKs (Figura 28A). De acuerdo con esto, la tinción con yoduro de propidio mostró un 94,5% de células en fase subG0 en la condición SC-*ABL*-TKs sin IL-3, mientras que las células sin editar (SC-Cas9) mostraban niveles basales (2,1%) (Figura 28B).

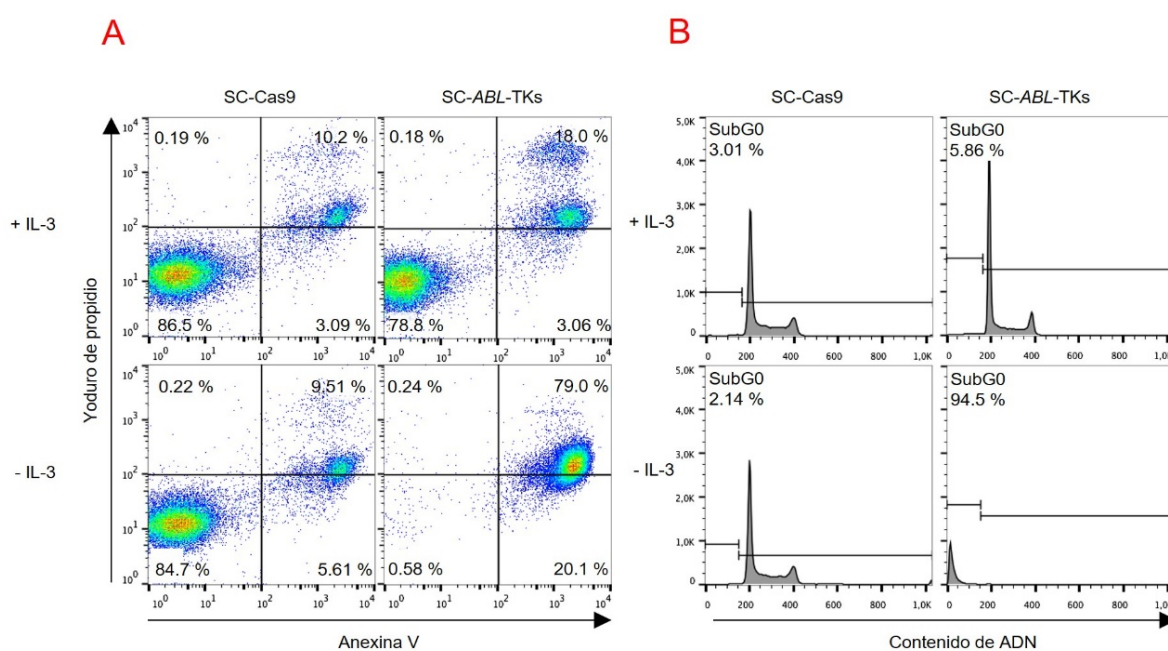


Figura 28. Análisis funcional del sistema CRISPR/Cas9 dual en la línea celular murina de LMC Boff-p210. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión Anexina V de células Boff-p210 SC en presencia o ausencia de IL-3. (B) Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN, medido mediante tinción con yoduro de propidio de células Boff-p210 SC en presencia o ausencia de IL-3.

2.2 El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente *BCR/ABL* en células madre leucémicas murinas, restaurando su capacidad multipotente y evitando el sesgo mieloide.

Una vez corroborada la capacidad del sistema de edición para eliminar *BCR/ABL* en una línea celular murina, esta aproximación se trasladó a células madre leucémicas murinas (CMLm). Para ello, se utilizó el modelo murino transgénico de LMC Tg-p210, que expresa el ADNc humano del oncogén *BCR/ABL* bajo el control del promotor hematopoyético Tec [244]. Las células Lin⁻ (células madre hematopoyéticas) fueron aisladas de la médula ósea de los ratones transgénicos en la fase crónica de la enfermedad, para ello, tomamos como criterio diagnóstico un número de granulocitos (células Gr1⁺) en sangre mayor del 60%. Las células Lin⁻ fueron electroporadas con todos los

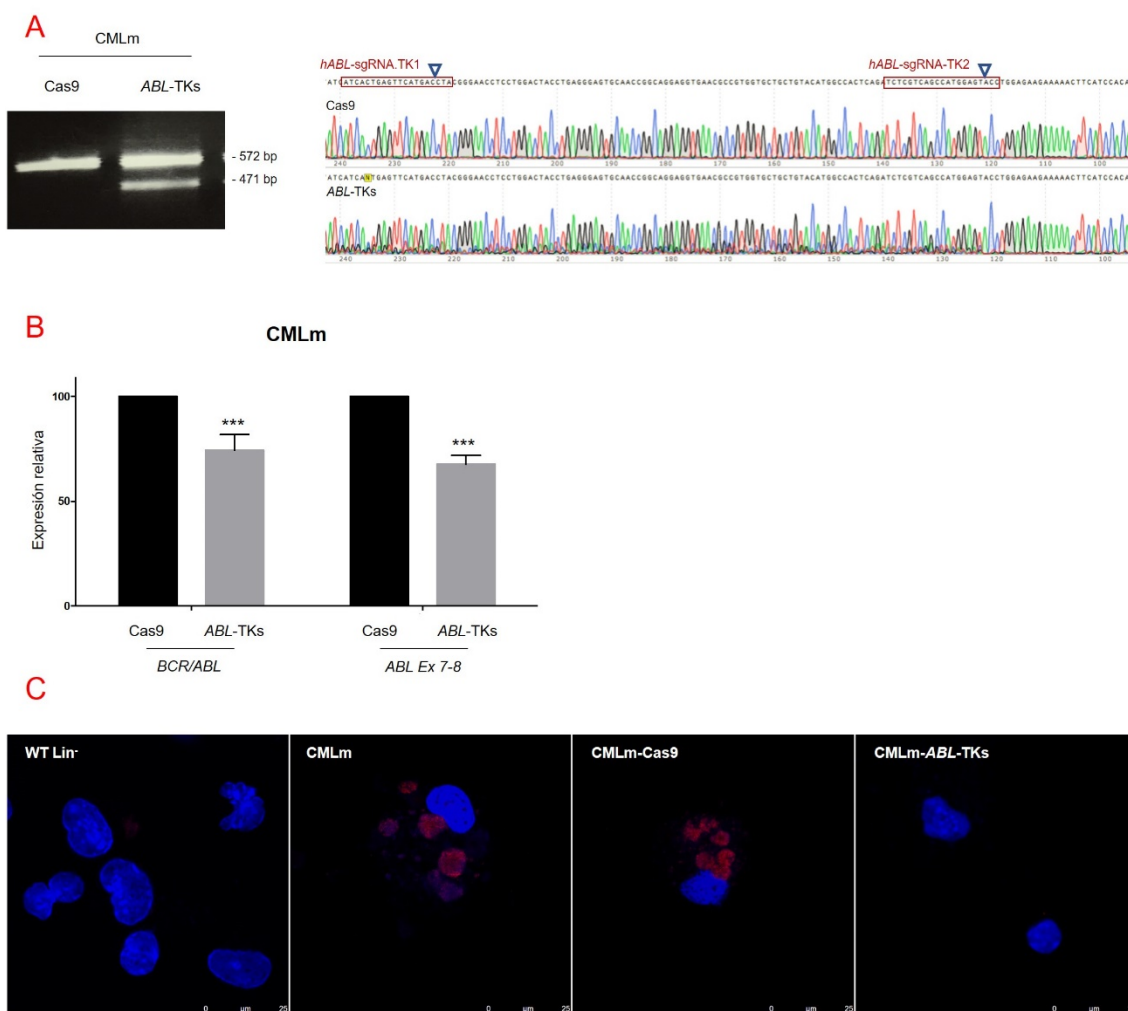


Figura 29. Sistema de edición CRISPR/Cas9 dual en células madre leucémicas de ratón. Se aislaron células madre leucémicas de ratón (CMLm) a partir de médula ósea de ratones modelo de LMC Tg-P210, y se electroporaron con Cas9 y con Cas9 unido a ambas sgRNAs (*ABL-TK*). **(A)** Ampliación por PCR de la secuencia genómica del exón 6 de *ABL* y secuenciación Sanger. **(B)** PCR cuantitativa del ARNm de *BCR/ABL* (punto de fusión) y del ARNm de *ABL* (exón 7-8) en células CMLm-Cas9 (control) y CMLm-*ABL-TKs* (editadas) (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). **(C)** Inmunofluorescencia de ABL humano en células de ratón CMLm.

componentes del sistema CRISPR dual o únicamente con la nucleasa Cas9, a modo de control. Nuevamente, la generación de la delección específica de 101 pb fue corroborada mediante PCR y posterior secuenciación por Sanger (Figura 29A, Tabla 6).

A continuación, se cuantificaron los niveles de expresión del oncogén en los grupos de células electroporadas mediante dos qPCRs (Tabla 7): una localizada “aguas arriba” de la delección, en la secuencia de fusión de *BCR/ABL* y otra localizada “aguas abajo” de la delección, en la unión de los exones 7 y 8 de *ABL*. Mientras que las CMLm control (CMLm-Cas9) mostraban altos niveles de expresión de *BCR/ABL*, las CMLm editadas (CMLm-*ABL*-TKs) exhibieron unos niveles de expresión significativamente menores, ($74,3 \pm 7,6\%$ y $67,7 \pm 4,2\%$, respectivamente) (Figura 29B). Consecutivamente, se observó mediante inmunofluorescencia una expresión menor de la oncoproteína en las células CMLm-*ABL*-TKs (Figura 29C).

Con el fin de investigar si las CMLm-*ABL*-TKs editadas eran capaces de mantener sus características multipotentes, injertamos dichas células y sus respectivas control (CMLm-Cas9) en ratones inmunodeprimidos NSG (NOD/SCID/IL2r^{null}) (Figura 30A). Se analizaron diversos linajes hematopoyéticos obtenidos a partir de sangre periférica de los ratones NSG trasplantados tras 120 días. Interesantemente, detectamos y aislamos, mediante citometría de fluorescencia (del inglés *Flourescent Activated Cell Sorter* o FACS), diferentes poblaciones hematopoyéticas, tales como granulocitos (Gr1⁺), linfocitos B (B220⁺) y linfocitos T (CD4⁺ o CD8⁺), derivadas de nuestras CMLm trasplantadas (Figura 30B). El análisis mediante FACS del ratón NSG-Cas9 mostró unos porcentajes celulares que denotaban un claro sesgo mieloide en la hematopoyesis generada, con altos niveles de células Gr1⁺ (74,3%) y un importante detrimento del linaje linfoide (2% de células B220⁺, 1,4% de células IgM⁺, 0,9% de células CD4⁺ y 1,2% de células CD8⁺). Sin embargo, la hematopoyesis derivada del trasplante de las CMLm editadas (ratón NSG-*ABL*-TKs) mostró porcentajes fisiológicos de leucocitos en sangre periférica. Las poblaciones linfoides B220⁺ (27,9%), IgM⁺ (13%), CD4⁺ (11,5%) y CD8⁺ (5,8%), mucho mayores que los observados en el ratón NSG-Cas9. Además, a diferencia del NSG-Cas9, la población mieloide Gr1⁺, descendió drásticamente hasta un valor normal del 36,4%, sugiriendo la abolición del sesgo mieloide característico de la patología (Figura 30B). La amplificación por PCR del exón 6 de *ABL* en todas las poblaciones hematopoyéticas obtenidas del ratón NSG-*ABL*-TKs mostró la presencia de la delección inducida de 101 pb, confirmando su origen a partir de las CML editadas trasplantadas (Figura 30C). La cuantificación de los niveles de ARNm de mostró una

menor expresión del oncogén *BCR/ABL* en las células $CD45^+$ derivadas del ratón NSG-*ABL*-TKs ($69,1 \pm 1,9\%$), en comparación con su control NSG-Cas9 (Figura 30D).

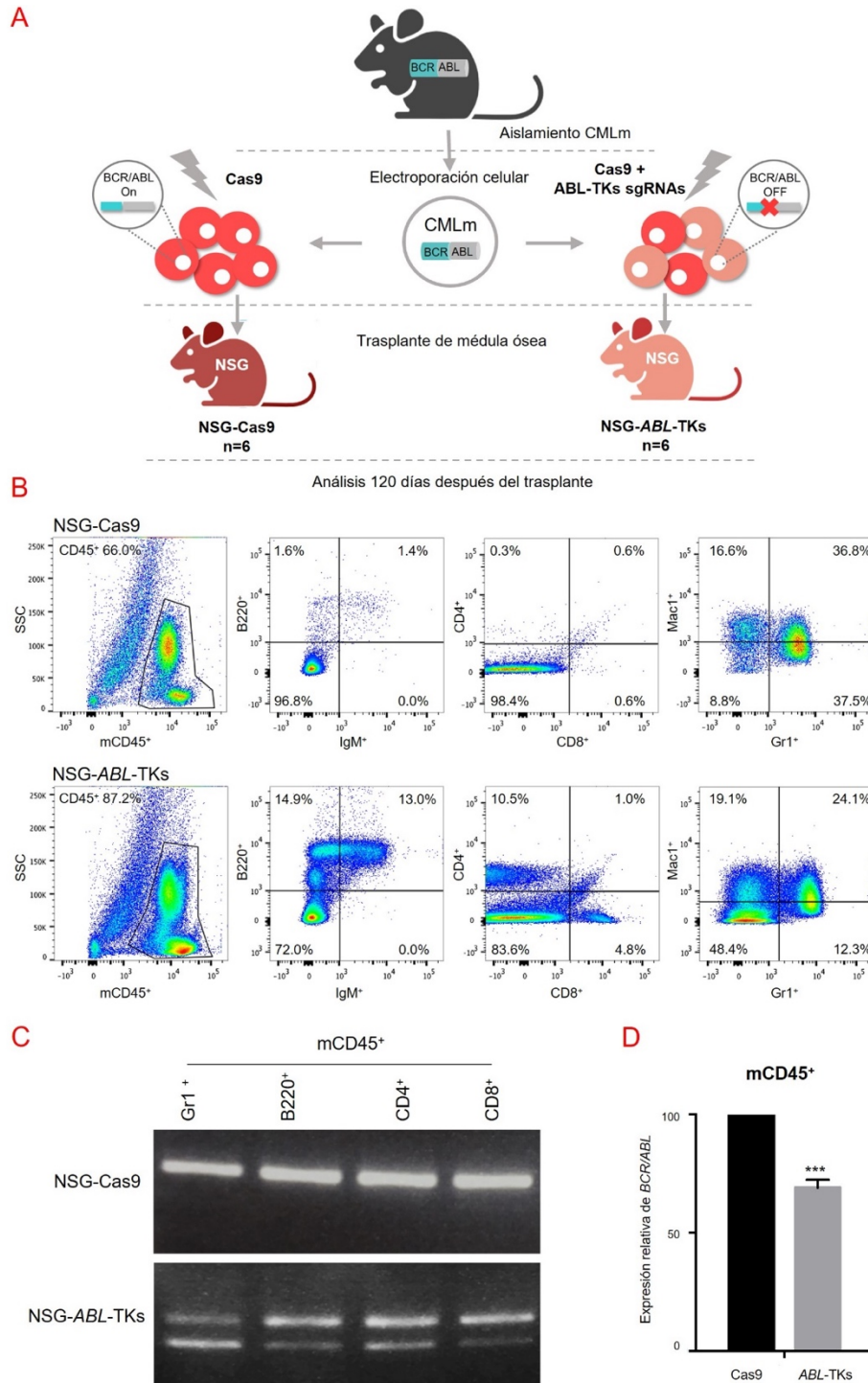


Figura 30. Análisis de la capacidad de injerto y multipotencia de las CMLm editadas con el sistema CRISPR/Cas9. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental y de los grupos de estudio. (B) 120 días después del trasplante, se analizaron las poblaciones de células $CD45^+$ de ratón de la sangre periférica y se aislaron por FACS. Se identificaron poblaciones linfoides ($B220^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$) y mieloides ($Gr1^+$ y $Mac1^+$) en las muestras de sangre. (C) Las muestras de ADN de las células $mCD45^+$ de los ratones NSG-Cas9 y NSG-*ABL*-TKs fueron amplificadas por PCR, revelando la presencia de la delección inducida por CRISPR/Cas9 en el exón 6 de *ABL* de las células $Gr1^+$, $B220^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$. (D) Cuantificación de la expresión de *BCR/ABL* en las células $mCD45$ recuperadas 120 días después del trasplante (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$).

2.3 Las células madre leucémicas murinas editadas mediante CRISPR/Cas9 en contra de *BCR/ABL* generan una hematopoyesis fisiológica.

A fin de determinar si el sistema de edición CRISPR dual es potencialmente útil como herramienta terapéutica en LMC, se realizaron diversos trasplantes de médula ósea, utilizando CMLm editadas y sin editar, siguiendo el siguiente esquema: (1) seis ratones NSG trasplantados con CMLm editadas por el sistema (NSG-*ABL*-TKs), (2) seis ratones NSG trasplantados con CMLm sin editar (NSG-Cas9), (3) cinco ratones transgénicos, modelo de LMC, como controles patológicos de la enfermedad (LMC-Tg) y (4) cinco ratones WT como controles fisiológicos (WT) (Figura 31A). Todas las CMLm fueron aisladas de la médula ósea de ratones transgénicos de LMC de, al menos un año de edad y, siguiendo nuestro criterio clínico para la enfermedad; con más de un 60% de células Gr1⁺ en sangre periférica. La delección inducida por el sistema CRISPR/Cas9 en las CMLm Lin⁻ fue confirmada por PCR y secuenciación por Sanger (Figura 29A). El análisis de las poblaciones hematopoyéticas en sangre periférica se realizó mediante FACS a los 120 días tras el trasplante, coincidiendo con el punto final del experimento. Se observaron síntomas de LMC, como esplenomegalia, en cuatro de los ratones NSG-Cas9 y en todos los controles transgénicos de LMC. Sin embargo, todos los bazo de los ratones NSG-*ABL*-TKs eran de un tamaño normal, similar al de los ratones WT (Figura 31B).

El porcentaje de células Gr1⁺ aumentó en todos los ratones NSG-Cas9, alcanzando un valor medio del $59,2 \pm 9,9\%$ en sangre periférica, similar al de los ratones transgénicos, modelo de LMC ($63,7 \pm 7,5\%$). En cambio, en los ratones NSG-*ABL*-TKs se detectó un porcentaje significativamente menor de células Gr1⁺ ($29,2 \pm 6,6\%$), alcanzando valores similares a los obtenidos en ratones WT ($17,9 \pm 3,4\%$) (Figuras 31C y D). En los ratones NSG-Cas9 se observaron niveles significativamente mayores de células mieloides Mac1⁺ ($55,2 \pm 8,2\%$), en comparación con los ratones NSG-*ABL*-TKs ($31,7 \pm 5,7\%$) y los ratones control WT ($19,6 \pm 1,5\%$) (Figura 31D). Finalmente, se observaron niveles bajos de poblaciones linfoides en todos los ratones NSG-Cas9 y LMC-Tg, que contrastaban con los valores normales hallados en los ratones WT así como en los NSG-*ABL*-TKs (Figura 31D).

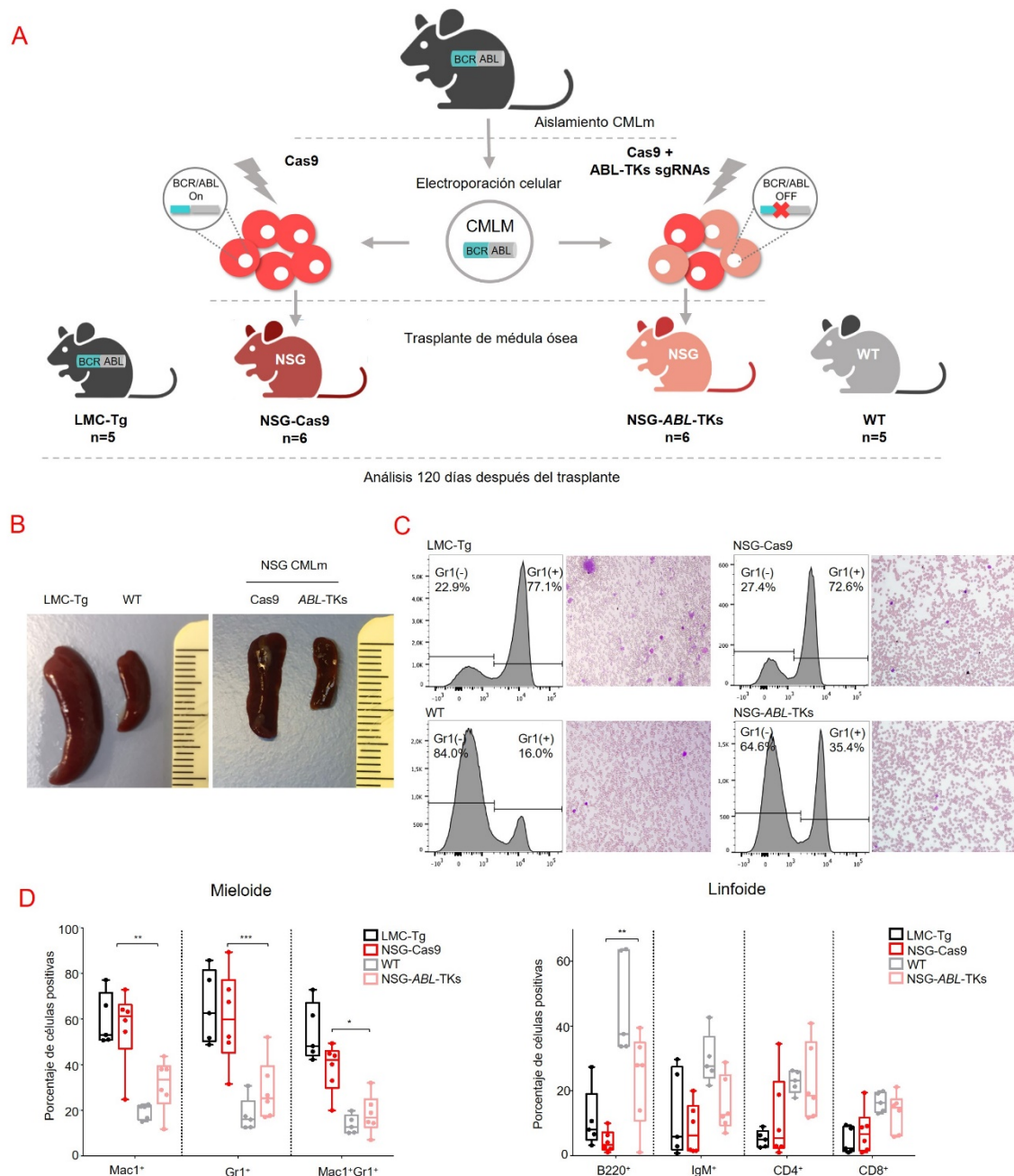


Figura 31. Evaluación terapéutica del sistema CRISPR/Cas9 dual en un modelo de ratón de LMC. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental y de los grupos de estudio. **(B)** Aspecto macroscópico y tamaño del bazo de los ratones transgénicos de LMC, ratones WT y ratones receptores del trasplante (NSG-Cas9 y NSG-ABL-TKs). **(C)** Cuantificación por FACS de las células Gr1⁺ y micrografía representativa de la sangre periférica teñida con hematoxilina. **(D)** Análisis FACS de las poblaciones hematológicas mieloides y linfoides generadas en la sangre periférica de los ratones receptores NSG tras el trasplante: NSG-ABL-TKs; (recuadro rosa), NSG-Cas9 (recuadro rojo). Los ratones transgénicos de LMC (recuadro negro) y los ratones WT (recuadro gris) se utilizaron como controles de la enfermedad de LMC y de la hematopoyesis normal (mediana $\pm$ SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Con el objetivo de estudiar la correlación entre el porcentaje de células Gr1⁺ y la etapa clínica de la enfermedad, evitando las diferencias interindividuales entre donantes, se realizaron tres ensayos de trasplante de médula ósea a partir de tres donantes de CMLm independientes. Se establecieron diferentes estadios clínicos de la enfermedad definidos como: “fase inicial”, Gr1⁺ $\leq$ 40% (Donante #1), “fase media”, Gr1⁺ $\geq$ 40% y $\leq$ 60%

(Donante #2) y “fase avanzada”, $\text{Gr1}^+ \geq 60\%$ (Donante #3) (Figura 32A, Tabla 10). Las CMLm de cada ratón transgénico de LMC fueron divididas en dos grupos: electroporadas con o sin guía del sistema CRISPR (NSG-*ABL*-TKs y NSG-Cas9). Ambos grupos fueron trasplantados de forma independiente en ratones NSG y la hematopoyesis resultante fue analizada a los 60 y 180 días después del trasplante. En el punto inicial del ensayo, los ratones transgénicos donantes de CML mostraron un 35,4% (Donante #1), 52,3% (Donante #2) y 63,9% (Donante #3) de células Gr1^+ . Dos meses después del trasplante, todos los ratones NSG-*ABL*-TKs mostraron niveles fisiológicos de células Gr1^+ (Donante #1, 23%; Donante #2, 8%; Donante #3, 35%) que se mantuvieron en valores similares 180 días después del trasplante. Por el contrario, en todos los ratones NSG-Cas9 la población celular Gr1^+ aumentó 60 días después del trasplante, alcanzando niveles patológicos a los 180 días (Donante #1, 52%; Donante #2, 62%; Donante #3, 72%) (Figura 32B).

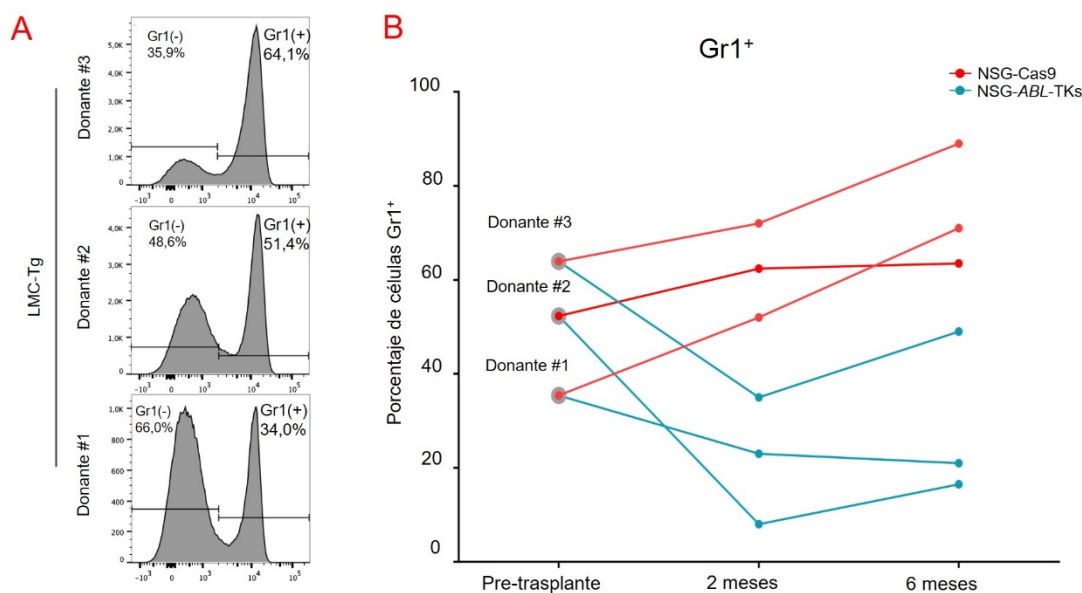


Figura 32. Evaluación terapéutica del sistema CRISPR/Cas9 dual en un modelo de ratón de LMC. (A) Porcentaje y evolución de la población de células Gr1^+ analizada en la sangre periférica de los NSG con injertos de CMLm de ratones transgénicos de LMC en diferentes estadios de la enfermedad (Donante #1, #2 y #3). Las CMLm se dividieron en dos grupos con el mismo número y se electroporaron con Cas9 (NSG-Cas9, línea roja) y con Cas9 unido a ambas sgRNAs (NSG-*ABL*-TKs, línea azul) antes del trasplante de médula ósea. (B) Análisis mediante citometría de flujo de la población Gr1^+ en sangre periférica de tres ratones transgénicos de LMC, en diferentes estadios de la enfermedad, utilizados como donantes de los trasplantes (Donante #1, #2 y #3).

2.4 El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén *BCR/ABL*, suprimiendo sus efectos oncogénicos, en la línea celular humana de LMC K562.

Con el objetivo de establecer si los resultados obtenidos en líneas celulares y células madre leucémicas murinas son reproducibles en células humanas, se utilizó la línea celular humana K562, derivada de un paciente con LMC. La edición de la línea celular K562 mediante el sistema CRISPR/Cas9 dual, vehiculizado en forma de plásmido, ha sido previamente evaluada en los experimentos descritos en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral (Figura 22). A fin de corroborar los resultados conseguidos empleando otro sistema de entrega, y caracterizar en mayor profundidad la eliminación genómica de *BCR/ABL*, la línea celular humana K562 fue electroporada con los componentes de nuestro sistema CRISPR dual, en forma de ribonucleoproteína. Nuevamente, la amplificación mediante PCR de la región del exón 6 de *ABL* mostró una banda de 473 pb tanto en la condición control (K562-Cas9), como en la condición editada (K562-*ABL*-TKs), además de una banda adicional de 372 pb en la última de las condiciones (Tabla 6). La secuenciación mediante Sanger corroboró la existencia de la delección de 101 pb en las células K562-*ABL*-TKs (Figura 33A).

La cuantificación de los niveles de expresión del oncogén, tanto en la región de fusión, como en la unión de los exones 7 y 8 de *ABL* (Tabla 7), mostró una significativa reducción de la expresión de *BCR/ABL* en las células editadas por el sistema (K562-*ABL*-TKs) ($42,6 \pm 7,7\%$ y $21,5 \pm 6,8$, respectivamente), con respecto al control sin editar (K562-Cas9) y las células parentales (Figura 33B). El análisis mediante Western blot de ABL y BCR/ABL reveló un menor nivel de expresión de ambas proteínas en las células K562-*ABL*-TKs (Figura 8C). En consecuencia, el ensayo de inmunofluorescencia de ABL, confirmó una importante reducción de células positivas para BCR/ABL en el grupo de células electroporadas con ambas sgRNAs (K562-*ABL*-TKs) (Figura 33C).

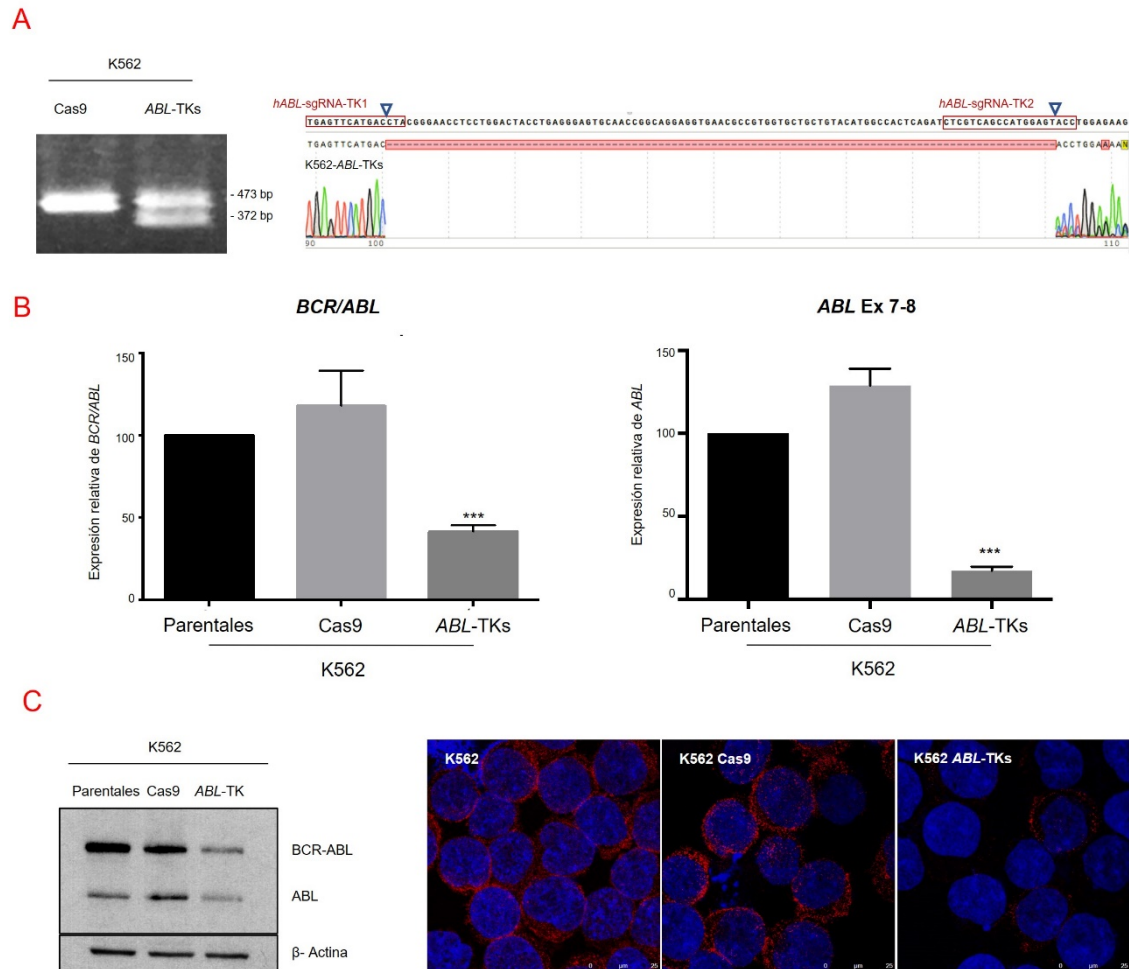


Figura 33. Análisis funcional del sistema CRISPR/Cas9 dual en la línea celular humana K562. (A) Amplificación por PCR del exón 6 de *ABL* en células K562 electroporadas con la nucleasa Cas9 (K562-Cas9) y con Cas9 unido a ambas sgRNAs (K562-ABL-TKs). La secuenciación Sanger de la región amplificada reveló una delección de 101 pb entre los puntos de corte esperados. (B) PCR cuantitativa del ARNm de *BCR/ABL* (izquierda) y *ABL* (derecha) en K562 (parentales), K562-Cas9 y K562-ABL-TKs (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). (C) Western blot de la proteína ABL en K562-Cas9 y K562-ABL-TKs (izquierda). Estos resultados fueron corroborados por inmunofluorescencia (derecha).

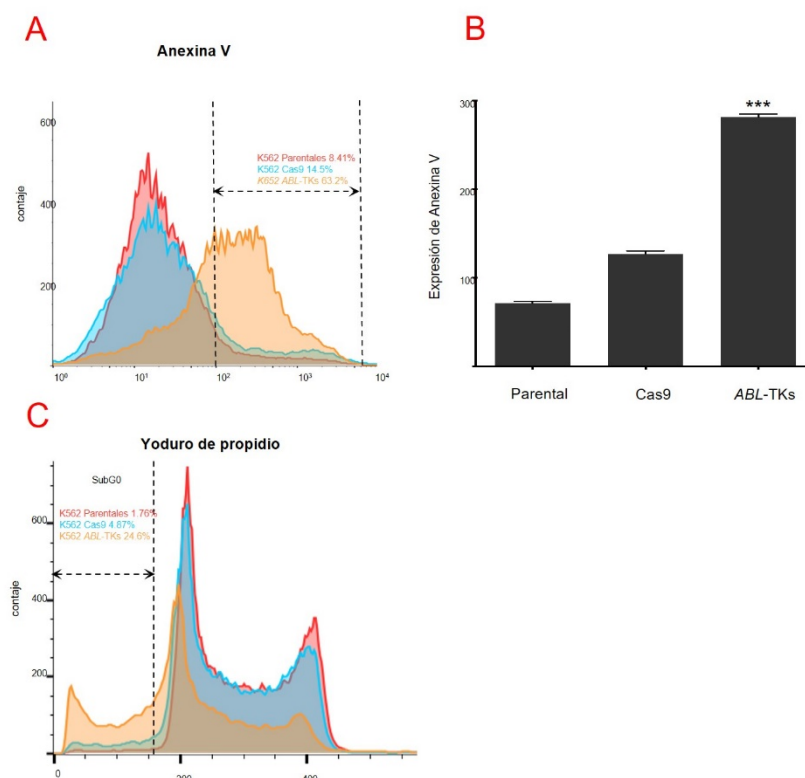


Figura 34. Análisis de la viabilidad celular en la línea celular humana de LMC K562 editadas por el sistema CRISPR/Cas9 dual. (A) Ensayo de apoptosis celular con Anexina V de células parentales, K562-Cas9, y K562-ABL-TKs. **(B)** Cuantificación de la expresión de Anexina V (u.f.) en las poblaciones celulares (media $\pm$ SD; *** $p < 0,001$). **(C)** Análisis del ciclo celular de las poblaciones celulares mediante la incorporación de yoduro de propidio.

El estudio del efecto *in vitro* de la eliminación de *BCR/ABL*, mediante el análisis de la apoptosis y el ciclo celular, mostró resultados similares a los obtenidos previamente en la edición de las células K562 empleando el sistema CRISPR dual en forma de plásmido (Figura 24). Una vez más, las células electroporadas con las sgRNAs dirigidas hacia *ABL* (K562-ABL-TKs), mostraron elevados niveles de apoptosis (63,2%) en comparación con las células control K562-Cas9 (14,5%) y con las células parentales (8,41%) (Figura 34A). Así mismo, la cuantificación de los niveles de Anexina V mostró un significativo incremento de la apoptosis en las células K562-ABL-TKs ($283,7 \pm 7,1$ u.f.) con respecto al control K562-Cas9 ($134 \pm 5,7$ u.f.) y las células parentales ($89,7 \pm 6,7$ u.f.) (Figura 34B). Finalmente, el marcaje mediante yoduro de propidio, del contenido de ADN celular reveló un 24,6% de células con un contenido de ADN subG0 para la condición K562-ABL-TKs, mientras que las células control K562-Cas9 y K562 parentales exhibieron un 4,87% y 1,76%, respectivamente (Figura 34C).

2.5 El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente *BCR/ABL* en células madre leucémicas humanas, derivadas de pacientes de LMC, restaurando su capacidad multipotente y evitando el sesgo mieloide.

A fin de corroborar la aplicabilidad de una terapia de edición de CML *ex vivo*, mediante CRISPR/Cas9, para el tratamiento de la LMC, en el siguiente grupo de experimentos se utilizaron las CML CD34⁺ de pacientes diagnosticados de LMC en fase crónica de la enfermedad. Las CMLh fueron electroporadas con o sin todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9 dual (CMLh-*ABL*-TKs y CMLh-Cas9) a fin de inducir la delección específica en el exón 6 de *BCR/ABL*. La existencia de la delección de 101 pb fue confirmada mediante PCR y posterior secuenciación por Sanger de las células CMLh-*ABL*-TKs (Figura 35A, Tabla 6). Así mismo, en dichas células, las PCRs cuantitativas de los niveles de ARNm de *BCR/ABL* mostraron una expresión significativamente más baja que en los controles ($39,3 \pm 5,4\%$ y $29,8 \pm 12,3\%$) (Figura 35B, Tabla 7). Estos resultados, fueron confirmados por Western blot, que demostraron una menor expresión de proteína BCR/ABL en las células CMLh-*ABL*-TKs, con respecto a los controles (Figura 35C).

Posteriormente, exploramos la capacidad del sistema CRISPR dual para abolir la actividad oncogénica de las CMLh *in vitro*, mediante análisis de proliferación, supervivencia y clonogenicidad. El ensayo de proliferación *in vitro* mostró como las células CMLh-Cas9 exhibían una alta tasa de proliferación tumoral, alcanzando las 32.300 ± 2.256 células a los cuatro días tras la electroporación. Sin embargo, las células CMLh-*ABL*-TKs mostraron una significativa reducción en su tasa proliferativa, dando lugar a un 70% menos de células (8.636 ± 673) que la condición control, tras cuatro días en cultivo (Figura 35D). En consecuencia, las CMLh-*ABL*-TKs exhibieron mayores niveles de apoptosis que las células control CMLh-Cas9 a los dos, tres y cuatro días tras la electroporación (Figura 35D). El ensayo de formación de colonias mostró una inhibición de la capacidad clonogénica de las CMLh editadas por el sistema (CMLh-*ABL*-TKs), obteniéndose un significativo menor número de colonias de tipo mieloide ($129 \pm 14,1$), frente a las $260,5 \pm 13,4$ obtenidas en la condición CMLh-Cas9 (Figura 35E).

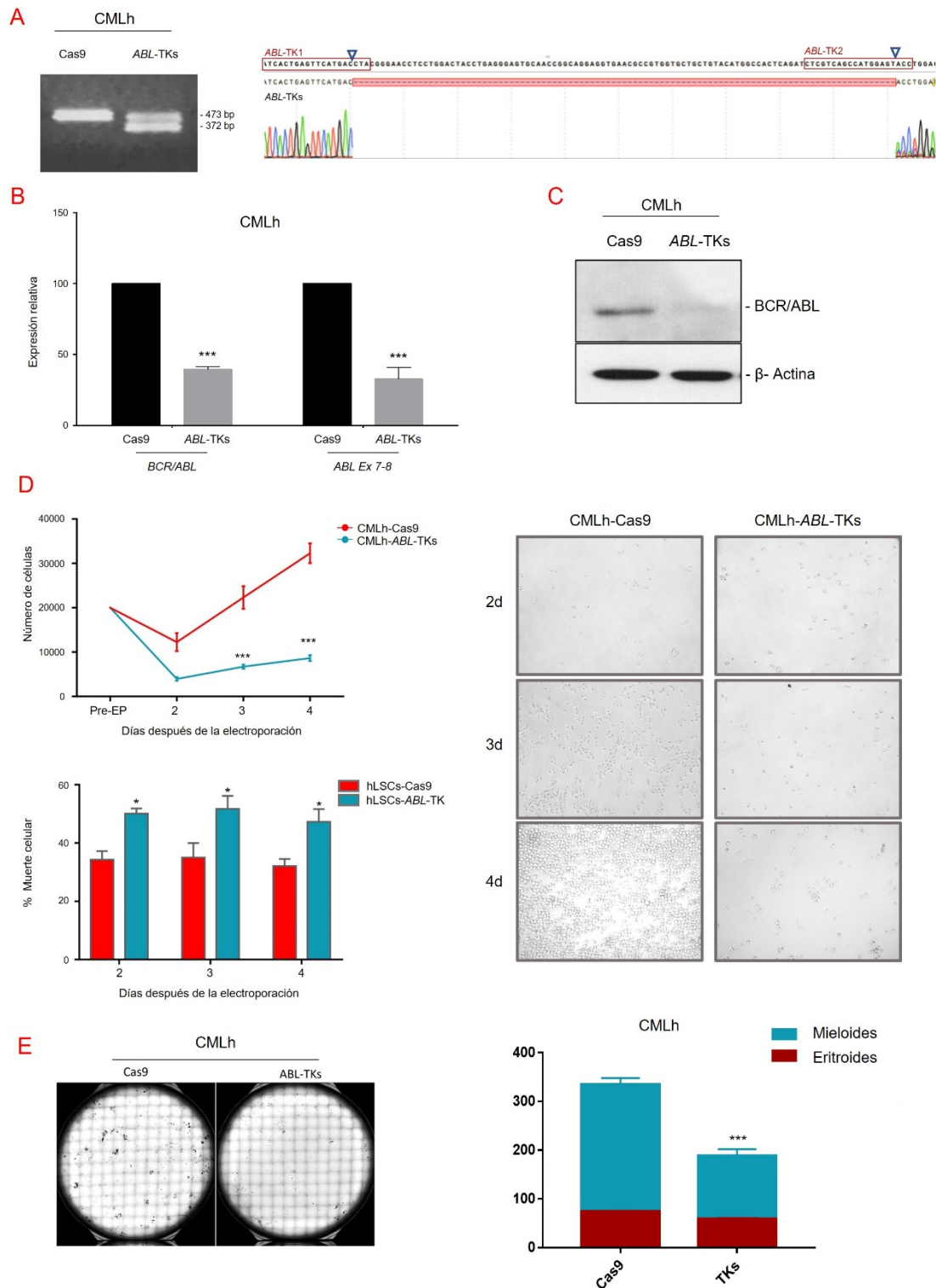


Figura 35. Efecto del sistema CRISPR/Cas9 dual en CML humanas. Se aislaron CML humanas CD34⁺ de biopsias de médula ósea de pacientes con LMC, y se electroporaron con/sin todos los reactivos CRISPR/Cas9. **(A)** Amplificación por PCR del exón 6 de *ABL* en CMLh de pacientes electroporados con Cas9 (CMLh-Cas9) y Cas9 unido a ambas sgRNAs (CMLh-ABL-TKs). Secuenciación Sanger del exón 6 de *ABL* de ambas poblaciones celulares. **(B)** PCR cuantitativa de *BCR/ABL* (región de fusión, izquierda) y *ABL* (exón 7-8, derecha) (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). **(C)** Western blot anti-ABL en células CMLh. Las células electroporadas con Cas9, utilizadas como control, mostraron una única banda correspondiente a *BCR/ABL* (~210 kDa). Sin embargo, las CMLh electroporadas con *ABL*-TKs mostraron un menor nivel de expresión de la proteína. **(D)** Análisis de proliferación celular y apoptosis *in vitro* de las CMLh tras la edición CRISPR/Cas9. Los niveles de proliferación y apoptosis de las CML se midieron 24, 48 y 96 h después de la electroporación con Cas9 (rojo) y *ABL*-TKs (azul) (media $\pm$ SEM; * $p < 0,05$). **(E)** Imágenes representativas (izquierda) y número absoluto de colonias (derecha) eritroides (rojo) y mieloides (azul) obtenidas tras 14 días de cultivo en la condición control (CML-Cas9) y en la condición editada (CML-ABL-TKs) (media $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$).

Con el objetivo de investigar posibles modificaciones en los mecanismos celulares, desencadenadas por la ausencia de la actividad de *BCR/ABL*, comparamos el perfil transcriptómico entre las CMLh sin editar (CMLh-Cas9) y las CMLh editadas (CMLh-*ABL*-TKs) mediante secuenciación masiva del ARN (del inglés *RNA-seq*) (Figura 36, Tabla 8). En este análisis se hallaron 89 genes diferencialmente expresados ($p < 0,05$) en las células editadas (CMLh-*ABL*-TKs) respecto a las células control (CMLh-Cas9), de los cuales 48 estaban sobreexpresados ($\log_2(\text{fold change}) > 0$) y 41 infraexpresados ($\log_2(\text{fold change}) < 0$).

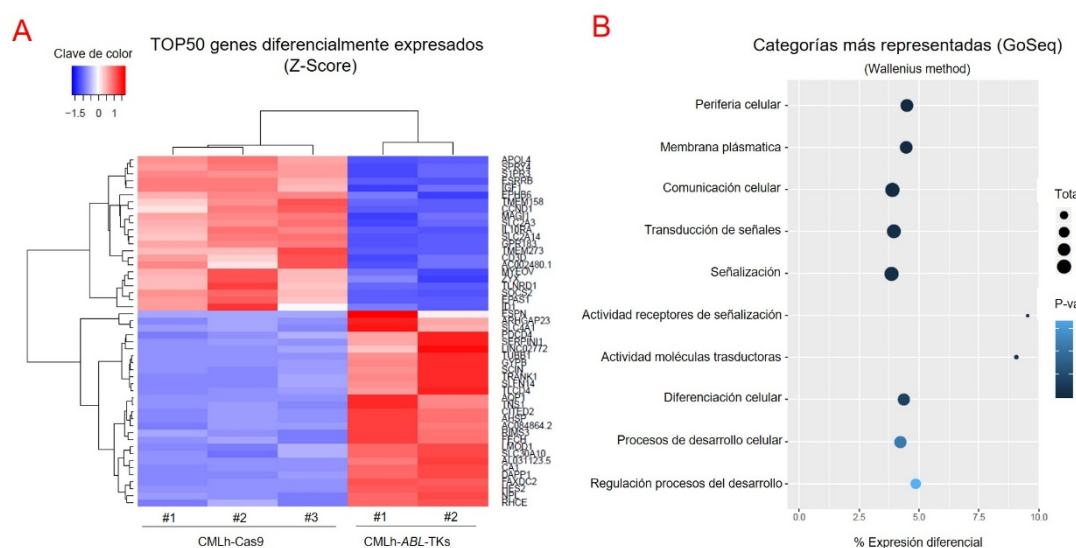


Figura 36. Análisis RNAseq de las CMLh editadas por el sistema CRISPR/Cas9 dual. **(A)** Heatmap de los 50 genes con mayor expresión diferencial. Se muestran tres réplicas de CMLh control (CMLh-Cas9) y dos réplicas de CMLh editadas (CMLh-*ABL*-TKs). Los genes sobreexpresados se muestran en rojo y los infraexpresados en azul. **(B)** Análisis GOseq de los procesos celulares (categorías) más representados según el conjunto de genes diferencialmente expresados. El tamaño de los puntos representa el total de genes diferencialmente expresados y la intensidad del color indica el p-valor.

A fin de determinar si las CMLh editadas mantenían sus características multipotentes siendo capaces de dar lugar a los linajes hematopoyéticos, las CMLs de 10 pacientes de LMC en fase crónica fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos de xenotrasplantes ortotópicos en ratones inmunodeprimidos NSG. Para ello, siete muestras de CML CD34⁺ fueron divididas en dos grupos, el primer grupo (7 muestras) fue electroporado con todos los reactivos del sistema CRISPR (NSG-CMLh-*ABL*-TKs), el segundo grupo (7 muestras) fue electroporado únicamente con la nucleasa Cas9 (NSG-CMLh-Cas9), tres muestras de CML CD34⁺ sin electroporar fueron utilizadas como controles patológicos (NSG-CMLh-CD34⁺) y, finalmente, tres muestras de CMH CD34⁺ de donantes sanos fueron utilizadas como controles sanos (NSG-CD34⁺-sanos) (Figura 37). Un total de 20 ratones NSG de la misma edad fueron utilizados como receptores de

trasplantes con estas células y las poblaciones hematopoyéticas humanas derivadas fueron analizadas a los 180 días en médula ósea (Figura 37). La detección de poblaciones hematopoyéticas humanas maduras, tanto en sangre periférica como en médula ósea de los ratones NSG trasplantados, corroboró el mantenimiento de las características multipotentes de las CMLh editadas. Tal y como muestra el análisis representativo mediante FACS de la Figura 38A, la hematopoyesis resultante del trasplante de las células

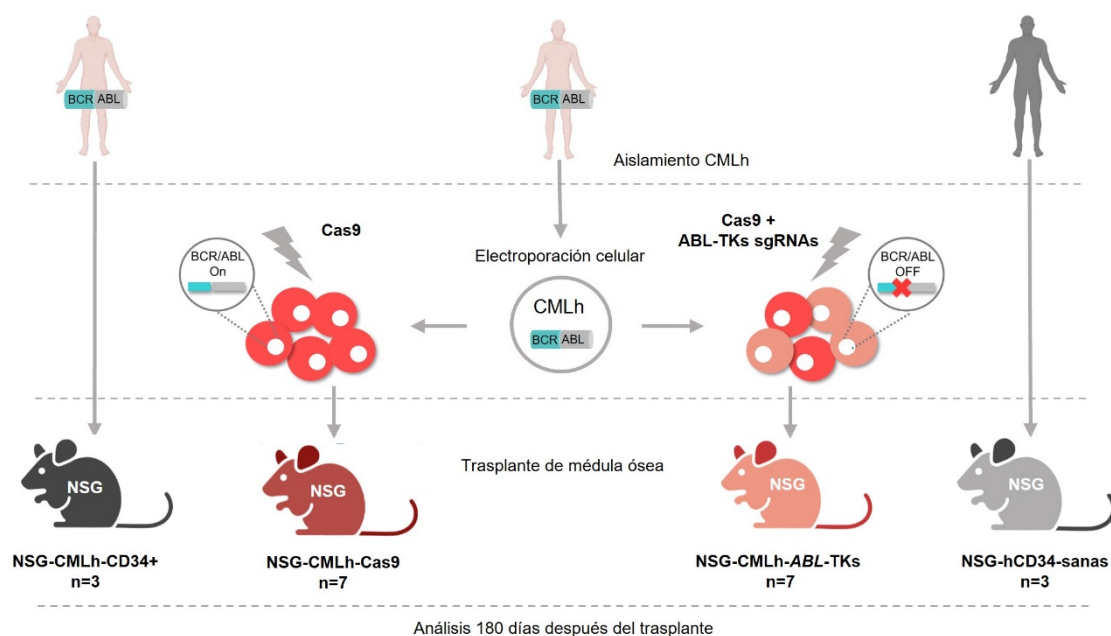


Figura 37. Evaluación de la capacidad multipotente y terapéutica de las CMLh editadas por CRISPR/Cas9 dual en un modelo ortotópico. Se aislaron CML humanas CD34⁺ de biopsias de médula ósea de pacientes de LMC, se electroporaron con el sistema CRISPR/Cas9 con y sin guía, y se trasplantaron a ratones NSG irradiados. Representación esquemática de los grupos de estudio y del procedimiento experimental.

control CMLh-Cas9 reflejaba un sesgo mieloide (58,7% de células hCD14⁺ y 92,9% de células hCD117⁺) que, además, se acompañaba de un detrimento de la población de células B linfoides (5,7% de células hCD19⁺). Interesantemente, el análisis representativo de la hematopoyesis generada en un ratón NSG-CMLh-ABL-TKs mostró unos porcentajes celulares fisiológicos para dichas poblaciones (29,1% de células hCD14⁺, 14,9% de células hCD117⁺ y 21,4% de células hCD19⁺) (Figura 38A). La expresión de BCR/ABL en las células hCD45⁺ aisladas de la médula ósea de ratones NSG-CMLh-ABL-TKs fue significativamente menor ($30,3 \pm 12,5\%$ y $33,2 \pm 17,7\%$, respectivamente) que la obtenida para los ratones control NSG-CMLh-Cas9 (Figura 38B).

Los análisis de médula ósea de los ratones NSG a los 180 días tras el trasplante revelaron niveles fisiológicos de células hCD14⁺ ($5,4 \pm 2,6\%$), hCD117⁺ ($15,5 \pm 8,7\%$) y hCD19⁺ ($84,9 \pm 3,9\%$) en todos los ratones NSG-CMLh-ABL-TKs. Por el contrario,

niveles patológicamente altos de células hCD14⁺ ($65,1 \pm 12,7\%$) y hCD117⁺ ($86,5 \pm 5,1\%$) y anormalmente bajos de células hCD19⁺ ($15,1 \pm 3,7\%$) fueron detectados en todos los ratones control NSG-CMLh-Cas9 (Figuras 38C). Finalmente, un análisis de regresión lineal entre las poblaciones celulares hCD117⁺ y hCD19⁺ de los ratones NSG trasplantados mostró una fuerte correlación inversa ($r^2 = 0,9212$) entre los ratones NSG-CMLh-*ABL*-TKs y los controles sanos (NSG-sanos-CD34⁺), con respecto a los ratones NSG-CMLh-Cas9 y los controles patológicos (NSG-CMLh-CD34⁺) (Figura 38D).

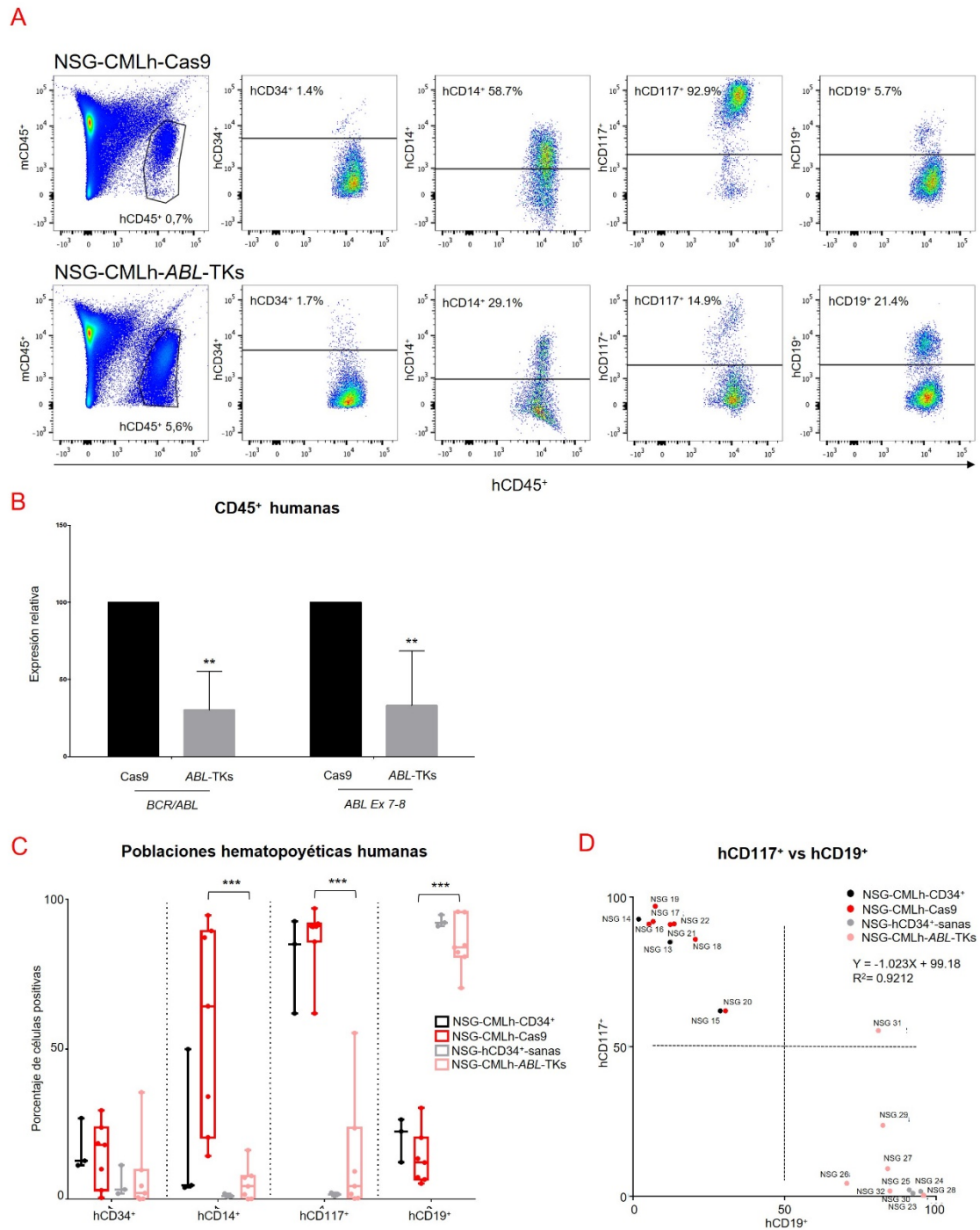


Figura 38. Análisis de la capacidad multipotente y evaluación terapéutica de CMLh editadas por CRISPR/Cas9 dual en un modelo de trasplante ortotópico. Se aislaron LSC humanas CD34⁺ de biopsias de médula ósea de pacientes con LMC, se electroporaron con el sistema CRISPR/Cas9, con y sin guías, y se trasplantaron a ratones NSG. **(A)** Análisis FACS de las poblaciones hematológicas humanas en la médula ósea 180 días después del trasplante. Los NSG con injertos de CMLh de pacientes electroporados con Cas9 se denominan NSG-hLSC-Cas9. Los injertos de NSG con CMLh de pacientes electroporados con Cas9 unido a ambas sgRNAs se denominan NSG-hLSC-ABL-TKs. **(B)** PCR cuantitativa de *BCR/ABL* (región de fusión, izquierda) y *ABL* (exón 7-8, derecha) en células hCD45⁺ de médula ósea de NSG 180 días después del trasplante. **(C)** Análisis FACS de la población de células humanas hCD45⁺ 180 días después del trasplante en ratones NSG. Los NSG con injertos de CMLh electroporadas con Cas 9 se denominan NSG-CMLh-Cas9 (cajas rojas) y con Cas9 unida a sgRNAs se denominan NSG-CMLh-ABL-TKs (cajas rosas). Los NSG con injertos sanos de hCD34⁺ (NSG- hCD34⁺-sanas, cajas grises) se utilizaron como controles normales. Los NSG con células hCD34⁺ no tratadas procedentes de un paciente con LMC (NSG-CMLh-CD34⁺; recuadros negros) se utilizaron como control de la enfermedad (mediana $\pm$ SEM, *** p <0.001). **(D)** Análisis de regresión lineal de las poblaciones celulares hCD117⁺ y hCD19⁺ en los injertos de ratones NSG. ($R^2=0,9212$).

3. DISEÑO DE UN SISTEMA CRISPR/CAS9 ALTERNATIVO QUE INTRODUZCA UN REPORTERO EN AQUELLAS CÉLULAS EN LAS QUE LA EXPRESIÓN DE *BCR/ABL* HA SIDO ELIMINADA, PERMITIENDO ASÍ SU SELECCIÓN PARA SU POSTERIOR TRASPLANTE.

La posibilidad de eliminar cualquier secuencia codificante mediante el sistema CRISPR/Cas9, empleando la vía de reparación celular NHEJ, ha ofrecido una valiosa oportunidad terapéutica para innumerables enfermedades de origen genético, especialmente aquellas de carácter monogénico, como es el caso de la LMC. Por ello, la implementación de un sistema CRISPR, dirigido hacia la secuencia codificante de *BCR/ABL*, como estrategia terapéutica en LMC ha sido el objetivo de los dos primeros capítulos de la presente tesis doctoral. No obstante, y pese a las mejoras en la eficiencia del sistema y en los métodos de entrega de este, en este tipo de aproximaciones, la existencia de células residuales sin editar se vuelve inevitable. En este contexto, uno de los mayores desafíos de la terapia génica *ex vivo* en LMC, como en otras neoplasias hematológicas, consiste en garantizar la ausencia de células sin editar, con actividad tumoral, que promoverían posibles recaídas post-trasplante. Precisamente, la naturaleza de las terapias *ex vivo* basadas CMH, que permiten el cultivo y la expansión *in vitro* de las células, posibilita la aplicación de métodos de selección de las CMH editadas previos a la realización del trasplante de médula ósea.

Por todo ello, en este último objetivo, diseñamos un sistema de edición alternativo que permita, no solo la eliminación del oncogén *BCR/ABL*, sino también la selección de las células en las que ha sido correctamente eliminado. Con este fin, se combinó una estrategia de trampa génica con la tecnología CRISPR/Cas9, desarrollando una nueva aproximación denominada **CRISPR-Trap**, que permita la introducción de un reportero en aquellas células en las que la expresión del oncogén ha sido eliminada, posibilitando así su selección para su posterior trasplante.

3.1 El sistema CRISPR-Trap sin promotor endógeno permite la integración específica del donador de trampa génica en el locus *BCR/ABL*, pero no ofrece un sistema sólido de selección de las células corregidas.

En primer lugar, como paso previo a la aplicación del sistema CRISPR-Trap, evaluamos la eficiencia del sistema de edición CRISPR/Cas9 que dirigirá la integración del ADN donador en el locus *BCR/ABL*. Para ello, se diseñó una guía dirigida a la secuencia específica de fusión del oncogén (sgRNA *BCR/ABL*) (Figura 39A) y la línea celular K562 fue electroporada con todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9 (Cas9 + sgRNA *BCR/ABL*). La amplificación por PCR de la región genómica de interés y su subsecuente secuenciación por Sanger mostró una mezcla de secuencias a partir del punto de corte esperado para la guía (Figura 39A, Tabla 6). Finalmente, el análisis de las secuencias mediante el algoritmo de predicción *Tracking of Indels by Decomposition* (TIDE) mostró una eficiencia de edición del 78,7% (Figura 39B).

A fin de evaluar las posibilidades de un método de selección CRISPR-Trap sin promotor, en el que la expresión del gen reportero esté dirigida por el promotor endógeno de *BCR*, diseñamos el casete de interferencia SA-Venus-polyA. El ADN donador de doble cadena, conteniendo el casete SA-Venus-polyA flanqueado por los brazos de homología para *BCR* y *ABL*, se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del vector pTC201B HA *BCR/ABL* SA-T2A-Venus (Figura 40A, Tabla 3).

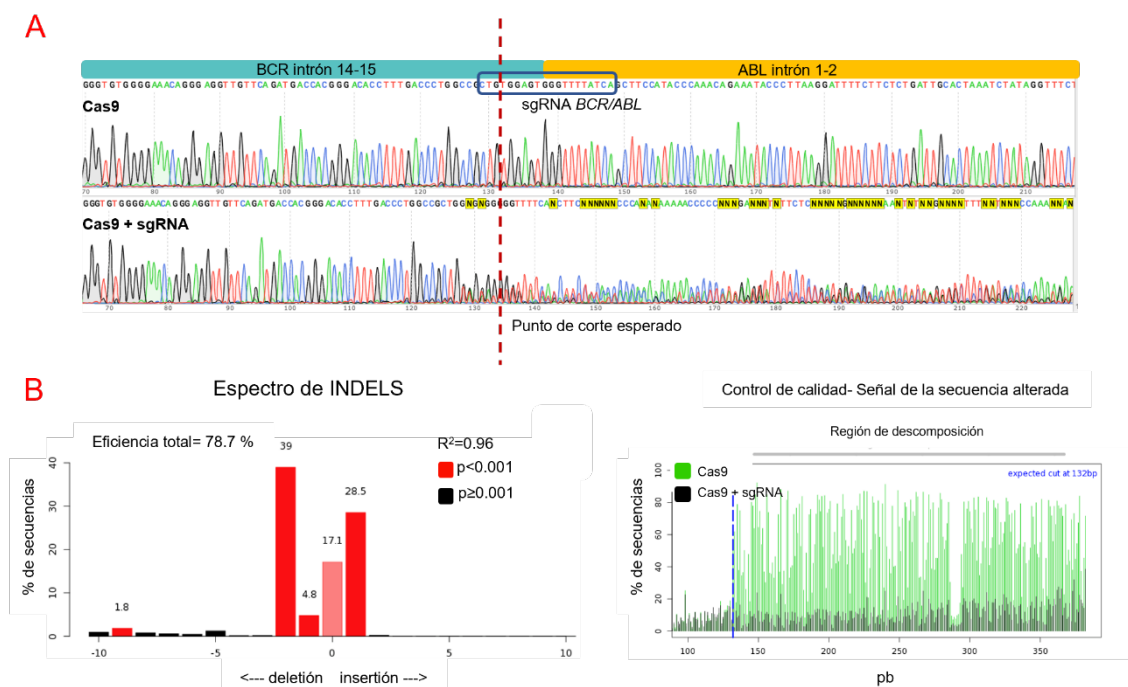


Figura 39. Evaluación de la eficiencia de edición del sistema CRISPR/Cas9 diseñado. (A) Secuenciación mediante Sanger de la región genómica de fusión *BCR/ABL*. Las células K562 electroporadas con CRISPR/Cas9 mostraron una mezcla de secuencias en el punto de corte esperado para la guía (línea roja punteada). (B) Análisis del algoritmo de descomposición TIDE de la secuencia editada, mostrando una alta eficiencia de corte para la guía. El panel de la derecha muestra la señal de la secuencia alterada en las células sin editar Cas9 (negro) y de las células editadas por el sistema (verde) y el punto de corte esperado (línea azul punteada).

La línea celular humana K562, portadora del oncogén de fusión *BCR/ABL*, fue dividida en tres grupos experimentales para su posterior electroporación con: a) el ADN donador (donor), b) el ADN donador y la Cas9 sin sgRNA (Cas9 + donador) y c), y con el ADN donador, la nucleasa Cas9 y una sgRNA dirigida hacia *BCR/ABL* (CRISPR/Cas9 + donador). 24 horas después de la electroporación, no se observaron células fluorescentes (Venus⁺) en ninguno de los tres grupos experimentales (Figura 40B). El resultado de la PCR sitio-inespecífica (In 5' F/Venus R, Figura 40A y C, Tabla 6), que amplifica una región contenida íntegramente en el ADN donador aportado, mostró una banda del tamaño esperado en las condiciones Cas9 + donador y CRISPR/Cas9 + donador, no siendo así en la condición electroporada únicamente con el ADN donador (donador) (Figura 40C). Sin embargo, la PCR sitio-

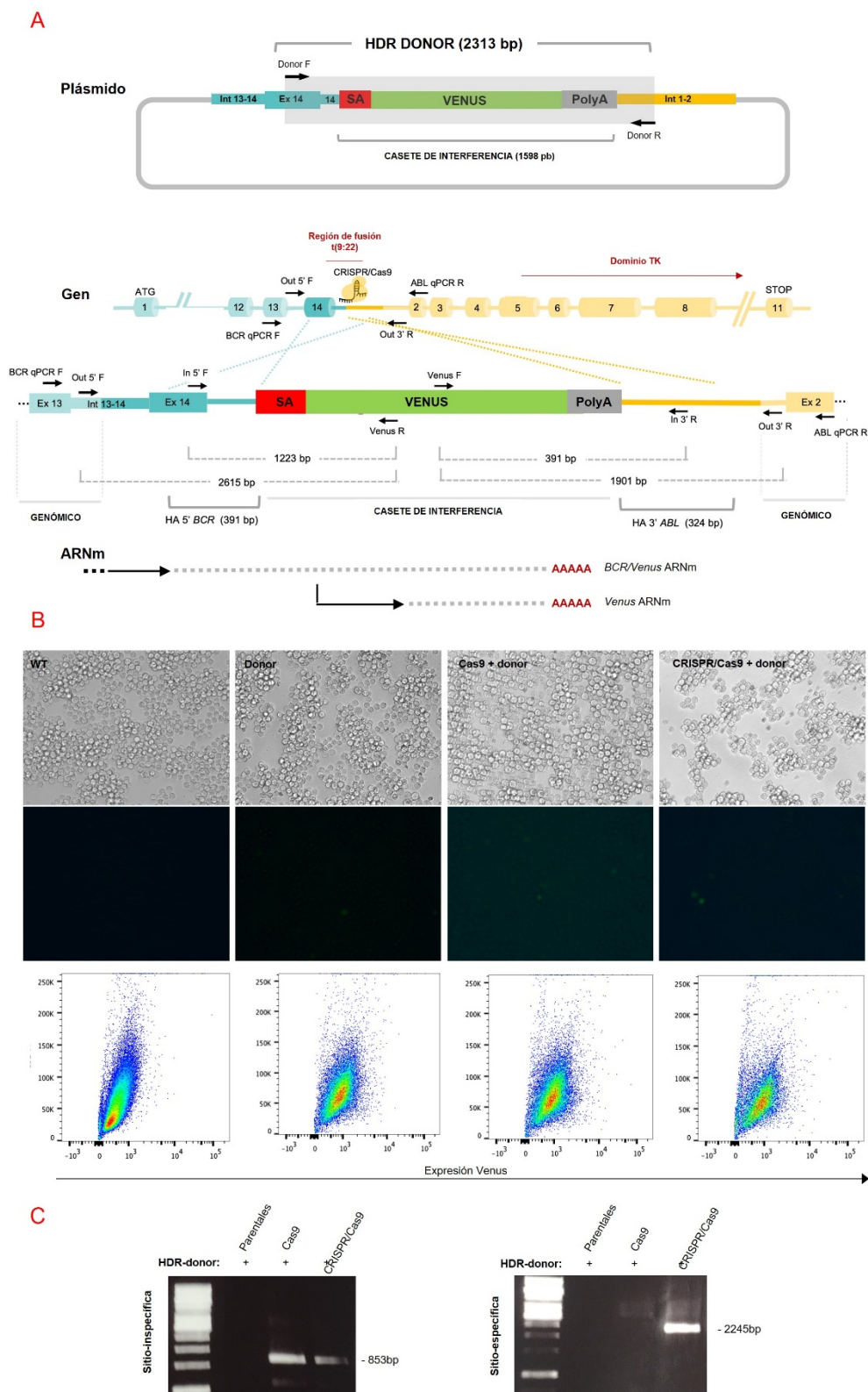


Figura 40. Electroporación de la línea celular K562 con el sistema CRISPR-Trap sin promotor. (A) Representación esquemática del vector de CRISPR-Trap. El vector alberga el casete de interferencia, que contiene una secuencia aceptora del *splicing* (SA), la secuencia T2A y la secuencia codificante para la proteína fluorescente Venus, flanqueado por brazos de homología para *BCR* y *ABL*. **(B)** Expresión de Venus en células K562 WT y electroporadas: únicamente con el ADN donador (donor), con el donador y la Cas9, sin guía (Cas9 + donor) o con todos los componentes del sistema CRISPR-Trap (CRISPR/Cas9 + donor). **(C)** PCR sitio-inespecífica (izquierda) y sitio-específica (derecha) de la unión entre el ADN genómico y el casete de interferencia en su extremo 5'.

específica (Out 5' F/Venus R, Figura 40A y C, Tabla 6), con un oligonucleótido directo hibridando en la región genómica de *BCR* y un oligonucleótido reverso hibridando en el casete, corroboró la correcta inserción del donador en el locus *BCR/ABL*, únicamente en la condición CRISPR/Cas9 + donador (Figura 40C). La posterior secuenciación por Sanger de los productos de PCR corroboró la correcta inserción, mediada por HDR, del ADN donador en las células electroporadas con todos los componentes del sistema CRISPR-Trap.

A fin de corroborar la correcta funcionalidad del sistema CRISPR-Trap diseñado, estudiamos los posibles ARNm generados a partir del alelo recombinado. Para ello,

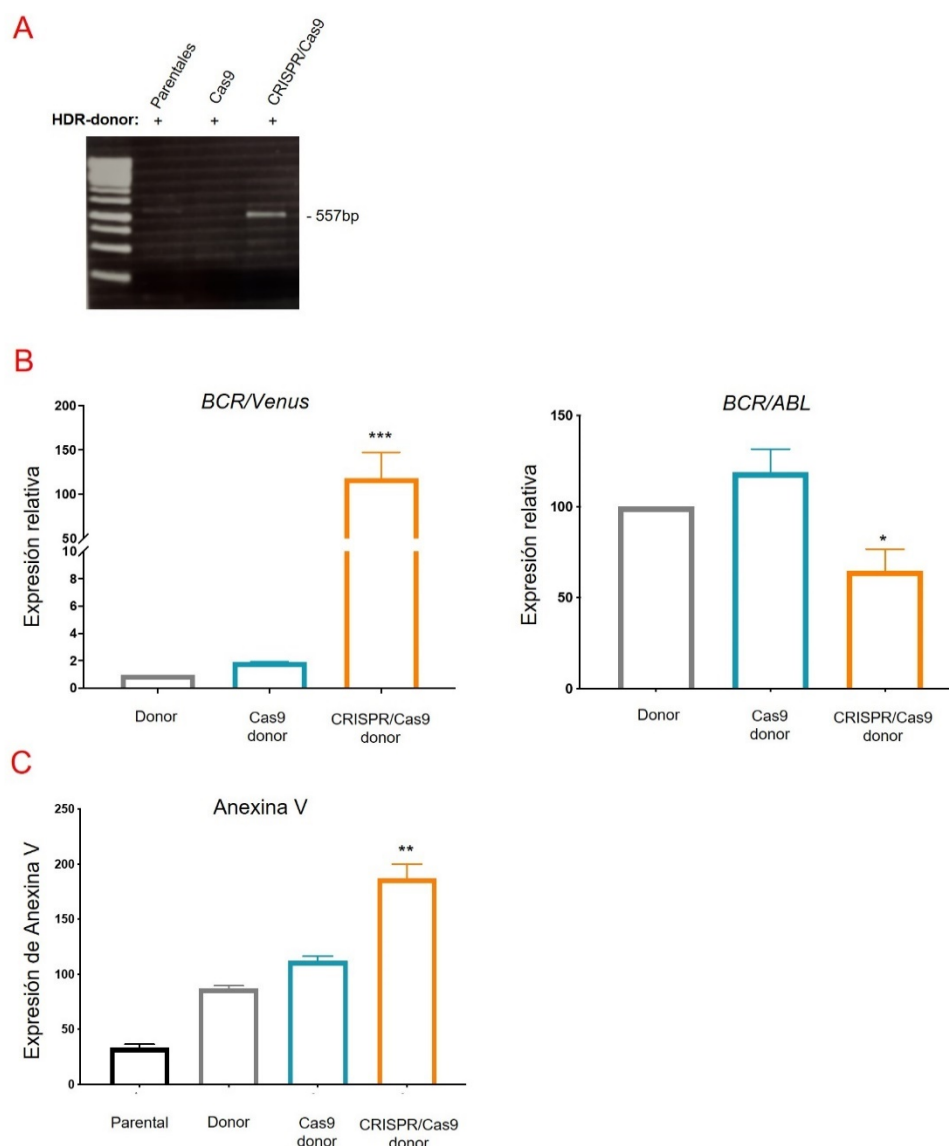


Figura 41. Evaluación del sistema CRISPR-Trap sin promotor en la línea celular K562. (A) RT-PCR sitio-específica del ARNm de fusión *BCR/Venus* en las células K562 parentales y electroporadas: donador, Cas9 + donador y CRISPR/Cas9 + donador. (B) qPCRs de *BCR/Venus* y *BCR/ABL* en los distintos grupos experimentales, (C) Análisis de la expresión de Annexina V por citometría de flujo de las células K562, 48 horas después de la electroporación con el sistema CRISPR-Trap (CRISPR/Cas9 + donador) y controles (parental, donador y Cas9 + donador) (media $\pm$ SD; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

diseñamos una pareja de oligonucleótidos que hibridan fuera y dentro del casete, respectivamente. El resultado de esta RT-PCR sitio-específica (*BCR* qPCR F/*Venus* R, Figura 40A y 41A, Tabla 7) mostró una banda de 557 pb, correspondiente al tamaño del ARNm *BCR/Venus* predicho, resultante de la inserción específica del ADN donador en el locus *BCR/ABL*, únicamente en la condición CRISPR/Cas9 + donor (Figura 41A). Interesantemente, la secuenciación por Sanger del producto de PCR confirmó la existencia de un ARNm *BCR/Venus* correctamente procesado, corroborando la correcta expresión del alelo recombinado.

Una vez demostrada la expresión del casete de interferencia insertado en la secuencia genómica de *BCR/ABL*, se cuantificaron los niveles de expresión del alelo quimérico *BCR/Venus* frente al alelo nativo *BCR/ABL*. Para ello, se utilizó un oligonucleótido directo común, hibridando en la secuencia de *BCR* (*BCR* qPCR F, Tabla 7) y dos oligonucleótidos reversos hibridando en la secuencia diferencial: *ABL* o *Venus* (*ABL* qPCR R o *Venus* R, Figura 40A, Tabla 7), respectivamente. La PCR cuantitativa *BCR/Venus*, confirmó la expresión del alelo híbrido, únicamente en la condición CRISPR/Cas9 + donor, donde alcanzó unos niveles de expresión 118 veces mayores que en los grupos control (donor y Cas9 + donor) (Figura 41B). De forma paralela, los niveles de expresión de *BCR/ABL* se vieron significativamente reducidos en el grupo de células electroporadas con todos los componentes del sistema CRISPR-Trap, con respecto a las condiciones control (Figura 41B).

A fin de evaluar el efecto biológico de la estrategia CRISPR-Trap dirigida hacia *BCR/ABL* se cuantificaron los niveles de apoptosis de las células electroporadas (Figura 41C). 48 horas después de la electroporación, la tinción con Anexina V no mostró diferencias significativas entre las células K562 parentales ($33,3 \pm 5,2$ u.f.) y los grupos control ($87,3 \pm 6,7$ u.f. para la condición donor y $112,4 \pm 13,5$ u.f. para la condición Cas9 + donor). Por el contrario, las células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap completo mostraron niveles significativamente más altos de Anexina-V ($186,8 \pm 22,6$ u.f.), con respecto a todos los grupos control (Figura 41C).

3.2 El sistema CRISPR-Trap dirige eficazmente la integración específica del ADN donador de trampa génica en el locus *BCR/ABL*.

Ante la imposibilidad de conseguir un método de selección eficiente empleando el promotor endógeno de *BCR* para dirigir la expresión del gen reportero, se exploró la posibilidad de introducir un promotor exógeno que dirija la expresión de *Venus* de forma locus-independiente. Para ello, se diseñó el casete SA-CMV-Venus-polyA, conteniendo el promotor CMV (citomegalovirus) de alta expresión en células de mamífero. El ADN donador de doble cadena, que incluye el casete de interferencia diseñado, flaqueado por brazos de homología para *BCR* y *ABL*, se obtuvo por amplificación mediante PCR (Donor F/Donor R, Figura 42, Tabla 3). La línea celular K562 se dividió, de nuevo, en tres grupos experimentales: a) electroporada solo con el ADN donante (donor), b) electroporada con el ADN donante y la Cas9 sin guía CRISPR (Cas9 + donor) y c) electroporada con todos los componentes del sistema CRISPR-Trap (CRISPR/Cas9 + donor). 24 horas después de la electroporación, se observaron células Venus⁺ en los tres grupos experimentales, obteniéndose el mayor porcentaje para la condición CRISPR/Cas9 + donor (32,4%), seguida de la condición Cas9 + donor (23,9%) y, finalmente, la condición donor (17,9%) (Figura 43A). Debido a la obtención de unos porcentajes de fluorescencia similares en todas las condiciones experimentales, y a fin de investigar las posibles diferencias en los niveles de expresión del reportero, se llevó a cabo una PCR cuantitativa de Venus. Como resultado, encontramos que los niveles de ARNm de Venus en el grupo CRISPR/Cas9 + donor eran significativamente mayores que los grupos control, siendo 15 veces mayores que la condición donor y 10 veces mayores que en la condición Cas9 + donor (Figura 43B).

El resultado de las PCRs sitio-inespecíficas, que amplifican una región contenida enteramente en el extremo 5' (In 5' F/Venus R, Figura 42, Tabla 6) o 3' (Venus F/In 3' R, Figura 42, Tabla 6) del ADN donante, mostraron una banda del tamaño esperado en los grupos Cas9 + donor y CRISPR/Cas9 + donor, no siendo así en el grupo donor (Figura 43C). Sin embargo, las PCRs sitio-específicas del extremo 5' (Out 5' F/Venus R, Figura 42, Tabla 6) y 3' (Venus F/Out 3' R, Figura 42, Tabla 6), que solo amplificarían el alelo recombinado, corroboraron la correcta inserción del casete en el locus *BCR/ABL* únicamente en la condición CRISPR/Cas9 + donor, sin detectarse integración sitio-específica en ninguno de los controles (Figura 43C). Finalmente, la secuenciación por

Sanger de los productos de PCR confirmó la correcta unión entre el ADN genómico de *BCR* (PCR 5') o *ABL* (PCR 3') y el casete de interferencia.

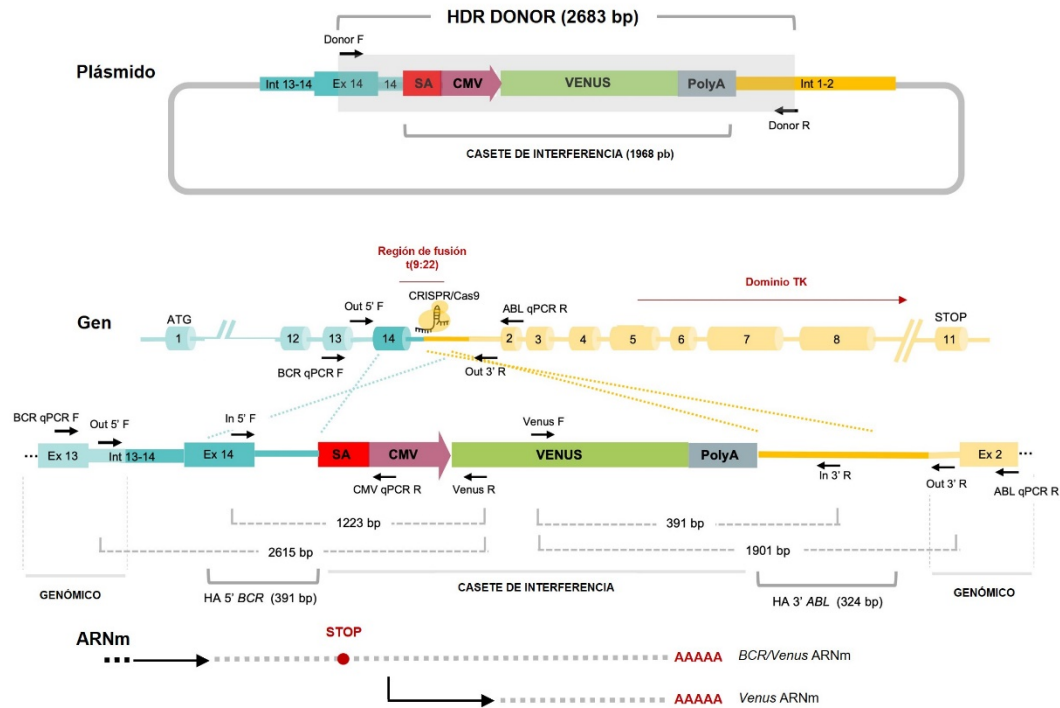


Figura 42. Diseño del sistema CRISPR-Trap dirigido hacia *BCR/ABL*. Representación esquemática del vector de CRISPR-Trap y la región diana del gen de fusión *BCR/ABL*. El plásmido alberga el casete de interferencia flanqueado por brazos de homología, que contiene una secuencia aceptora de empalme (SA), el promotor CMV (CMV) y la secuencia codificante de la proteína fluorescente Venus. Las flechas negras representan los oligonucleótidos utilizados para obtener la molécula donadora de HDR por PCR. Se muestra la secuencia *BCR/ABL* resultante tras la reparación dirigida por homología utilizando el casete de interferencia como ADN donador. La introducción de la secuencia SA-CMV-VENUS en la región intrónica de *BCR/ABL* interrumpe el marco de lectura del oncogén, promoviendo también la expresión del reportero Venus.

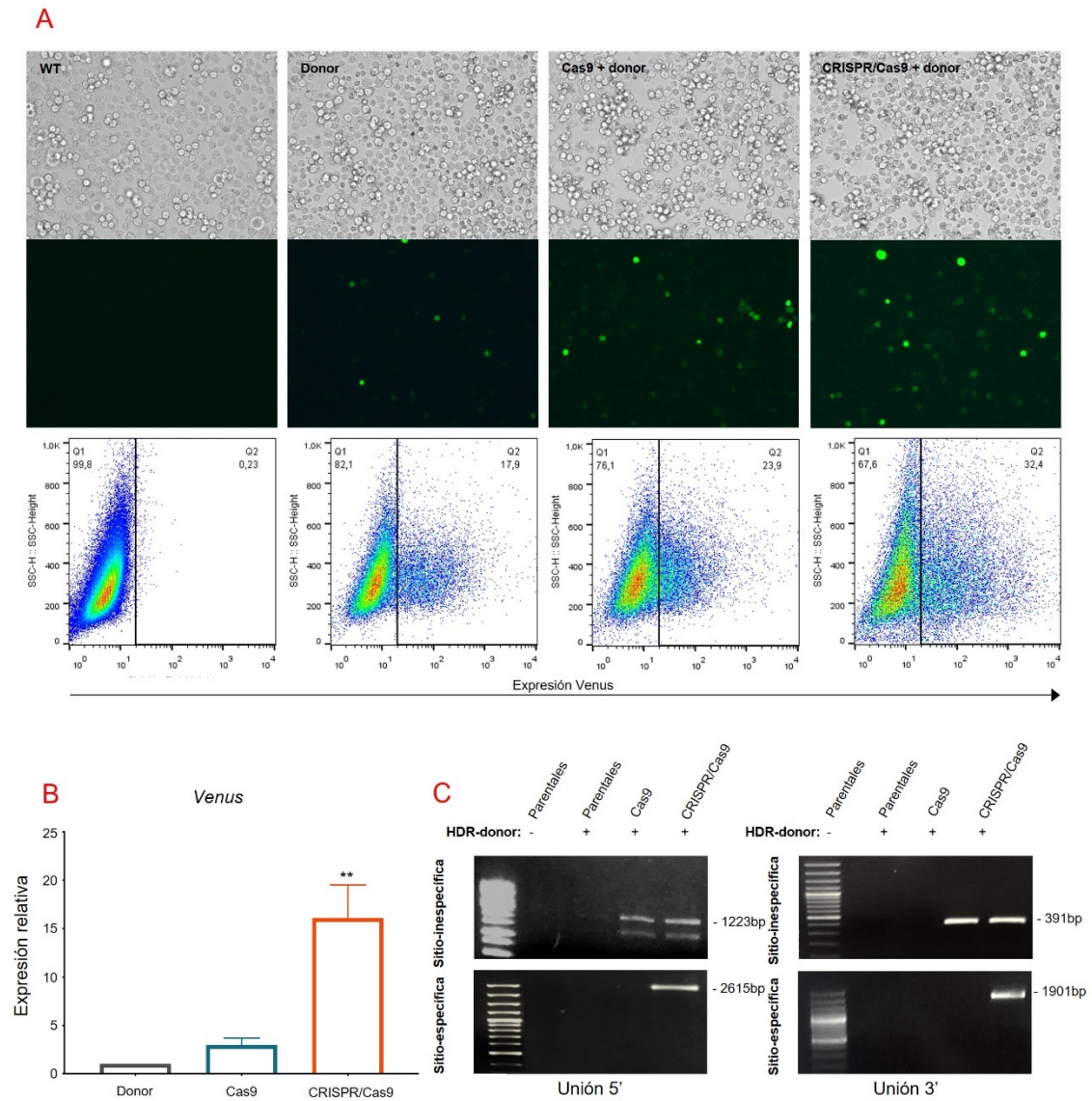


Figura 43. Electroporación del sistema CRISPR-Trap en la línea celular K562. (A) Expresión de Venus en las células K562 electroporadas con: el ADN donador (donor), el donador y la Cas9 (Cas9 + donor) y todos los componentes del sistema CRISPR-Trap (CRISPR/Cas9 + donor). (B) Cuantificación de la expresión de *Venus* por PCR cuantitativa (C) Amplificación sitio-inespecífica (arriba) y sitio-específica (abajo) por PCR de los extremos de unión 5' (izquierda) y 3' (derecha) entre el ADN genómico y el caste de interferencia, en los grupos de células electroporadas (media $\pm$ SEM; ** $p < 0.01$).

3.3 El alelo recombinado *BCR/Venus* se expresa correctamente en detrimento de la expresión de su versión nativa *BCR/ABL*.

Con el objetivo de verificar el correcto funcionamiento del sistema CRISPR-Trap, se estudiaron los posibles transcritos derivados de la expresión del alelo recombinado *BCR/Venus*. La RT-PCR sitio-inespecífica, que amplifica una región enteramente contenida en el ADN donante (In 5' F/Venus R, Figura 42, Tabla 6), mostró una banda de 900 pb, correspondiente al tamaño del ARNm procesado de *BCR/Venus*, en las tres condiciones experimentales (Figura 44A). No obstante, la RT-PCR sitio-específica, que emplea un oligonucleótido localizado en la región genómica de *BCR* y un oligonucleótido contenido en el ADN donador (*BCR* qPCR F/Venus R, Figura 42, Tabla 6 y 7), mostró una banda del tamaño esperado únicamente en la condición CRISPR/Cas9 + donador (Figura 44A). La posterior secuenciación por Sanger de los productos de PCR confirmó la existencia de un ARNm quimérico BCR-CMV-Venus, que contenía un codón de terminación prematuro (CTP) y escapaba a los mecanismos celulares de degradación del ARN (NMD) (Figura 44B). Estos resultados, junto con la presencia de células fluorescentes Venus⁺ en los grupos control, sugieren una expresión inespecífica del casete, cuando el ADN donador es aportado solo o con una Cas9 “no guiada”. Sin embargo, la expresión sitio-específica del casete, proveniente de la integración mediante

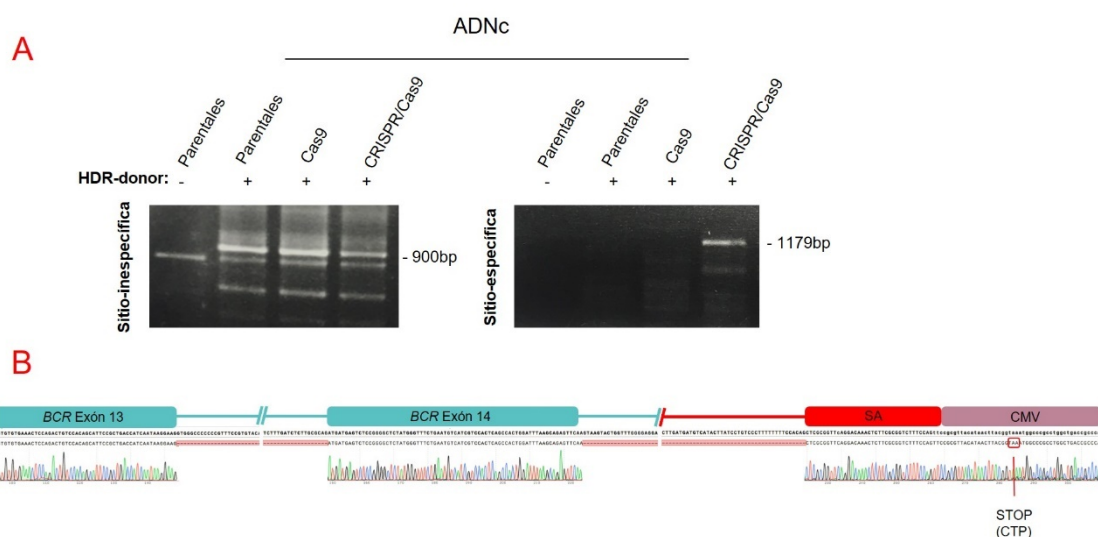


Figura 44. Análisis de la expresión del locus recombinado *BCR/Venus*. (A) RT-PCR sitio-inespecífica (izquierda) y sitio-específica (derecha) del ARNm de fusión *BCR/Venus* en células K562 parentales y electroporadas (donor, Cas9 + donador y CRISPR/Cas9 + donador). (B) Secuenciación mediante Sanger de la RT-PCR sitio-específica que muestra el ARNm procesado del locus *BCR/Venus* de las células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap.

HDR del ADN donador en el locus *BCR/ABL*, solo fue detectada cuando se administraron todos los componentes del sistema CRISPR-Trap.

Una vez demostrada la correcta expresión del casete de interferencia, se procedió a cuantificar los niveles de expresión del alelo quimérico *BCR/Venus* frente al alelo nativo *BCR/ABL* en el conjunto (pool) de células electroporadas. Para ello, se utilizó un oligonucleótido directo común, hibridando en la secuencia de *BCR* (*BCR* qPCR F Figura 42, Tabla 7) y dos oligonucleótidos reversos hibridando en la región diferencial: *ABL* o *CMV*, respectivamente (*ABL* qPCR R o *CMV* qPCR R, Figura 42, Tabla 7). La qPCR de *BCR/Venus* mostró una expresión significativa del alelo recombinado únicamente en el grupo celular CRISPR/Cas9 + donador, donde alcanzó niveles de expresión 800 veces mayores que en los grupos control (donador y Cas9 + donador) (Figura 45A). Contrariamente, la qPCR de *BCR/ABL*, detectó unos niveles de ARNm del oncogén significativamente menores ($55,5 \pm 9,5\%$), únicamente en el grupo de células CRISPR/Cas9 + donador, demostrando el correcto funcionamiento del sistema CRISPR-Trap cuando todos sus componentes son aportados (Figura 45B).

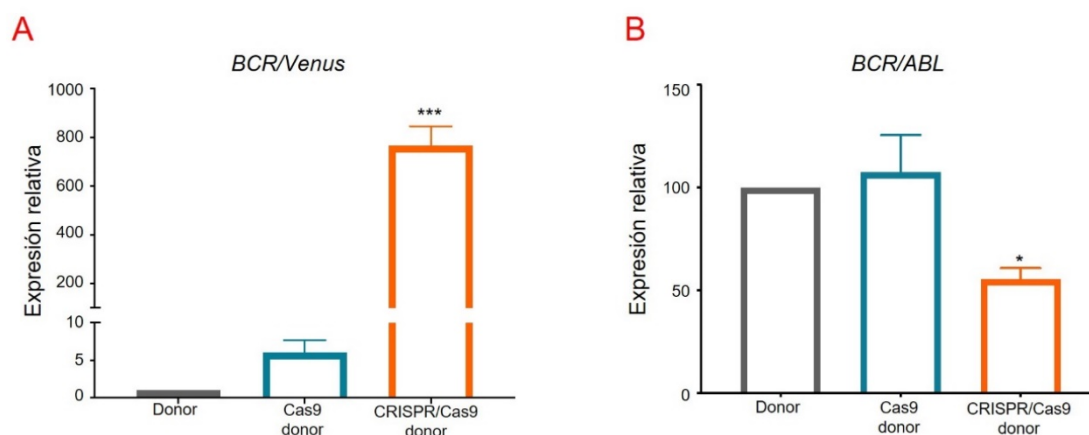


Figura 45. Análisis de la expresión de *BCR/Venus* frente a *BCR/ABL*. qPCRs de *BCR/Venus* (A) y *BCR/ABL* (B) de las células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap y sus respectivos controles (donador y Cas9 + donador).

3.4 El sistema CRISPR-Trap permite la selección de las células en las que se ha eliminado *BCR/ABL*.

A fin de investigar si la expresión del gen reportero *Venus* permite la adecuada selección de las células en las que *BCR/ABL* ha sido eliminado, se compararon, de forma paralela, el conjunto de células electroporadas (del inglés *pool*) de cada condición, con su respectiva fracción celular Venus⁺. La separación de las células Venus⁺ de la condición

CRISPR/Cas9 + donador, dio como resultado un nivel de expresión de *BCR/Venus* casi dos veces mayor ($176,9 \pm 11,1\%$) que el de su respectivo *pool* de células electroporadas, reflejando un enriquecimiento en la fracción celular portadora del alelo *BCR/Venus* tras la selección por el gen reportero (Figura 46A). Sin embargo, en el resto de las condiciones control (Cas9 + donador y donador), no se observaron diferencias significativas en la expresión de *BCR/Venus* entre las células Venus⁺ seleccionadas y sus respectivos *pools* sin seleccionar (Figura 46A).

Por otra parte, la cuantificación por qPCR de los niveles de ARNm de *BCR/ABL* en las fracciones celulares Venus⁺ de ambos grupos control, mostró altos niveles de expresión del oncogén ($94,8 \pm 5,9\%$ de expresión con relación al grupo donador), denotando la expresión inespecífica del casete Venus en estas condiciones (Figura 46B). Sin embargo, las células Venus⁺ seleccionadas a partir de la condición CRISPR/Cas9 + donador, mostraron una significativa reducción de la expresión de *BCR/ABL*, de más de un 80% ($15,9 \pm 3,5\%$) con respecto a los controles (Figura 46B).

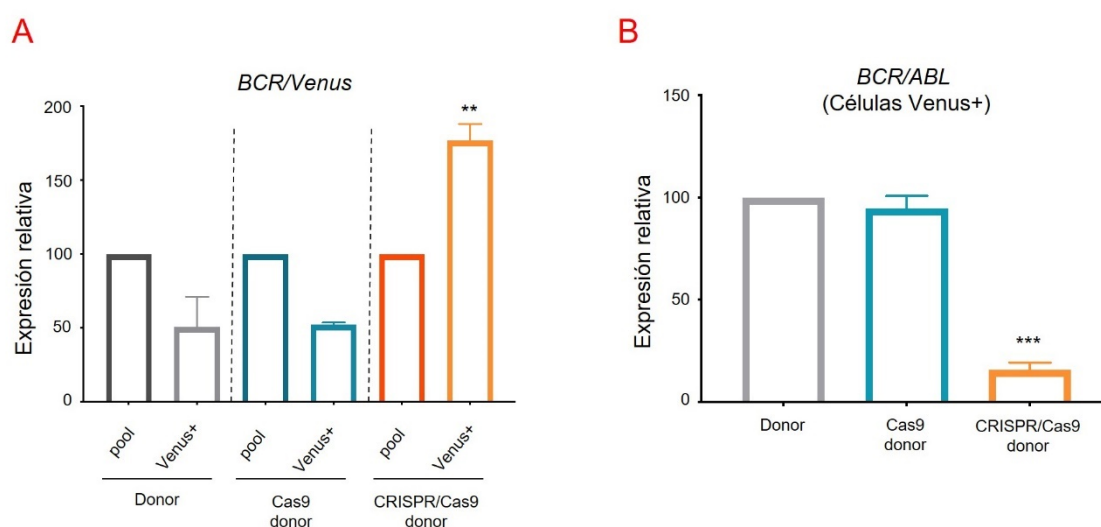


Figura 46. Análisis de expresión de *BCR/Venus* frente a *BCR/ABL* en las células seleccionadas por el sistema CRISPR-Trap. **(A)** qPCR de *BCR/Venus* en el conjunto de células K562 electroporadas (*pool*) vs las células Venus⁺ de cada condición experimental (donador, Cas9 + donador y CRISPR/Cas9 + donador). **(B)** qPCR de *BCR/ABL* en las células Venus⁺ seleccionadas de cada condición experimental.

3.5 El sistema CRISPR-Trap dirigido hacia *BCR/ABL* promueve la apoptosis e inhibe la proliferación en la línea celular de LMC K562.

Con el objetivo de evaluar el efecto biológico de la estrategia CRISPR-Trap dirigida hacia *BCR/ABL*, se analizaron los niveles de apoptosis y la capacidad

proliferativa de cada grupo de células electroporadas (Figura 47). 48 horas después de la electroporación, el marcaje con Anexina V no mostró diferencias significativas entre las células K562 parentales ($7,9 \pm 1,2$ u.f.) y los grupos control ($29,4 \pm 3,5$ u.f. y $57,7 \pm 10,3$ u.f. en donador y Cas9 + donador, respectivamente) (Figura 47A). Por el contrario, las células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap completo mostraron niveles significativamente más altos de Anexina V ($165,4 \pm 21,8$ u.f.) con respecto a todos los grupos control (Figura 47A).

El ensayo de proliferación celular mostró, 48 horas después de la electroporación, un número de células similares entre las condiciones control (15.685 ± 6.862 para la condición donador y 14.904 ± 4.742 para la condición Cas9 + donador) y el grupo de células parentales (19.946 ± 6.035). Sin embargo, las células del grupo CRISPR/Cas9 + donador, presentaban un menor número de células (9.936 ± 3.602 ; (Figura 47B). Tras 72 horas de cultivo, se observó un aumento similar del número de células en todas las condiciones control (parentales: 59.892 ± 15.088 , donador: 45.371 ± 23.313 , Cas9 + donador: 35.689 ± 13.143 ; (Figura 47B). No obstante, las células de la condición CRISPR/Cas9 + donador

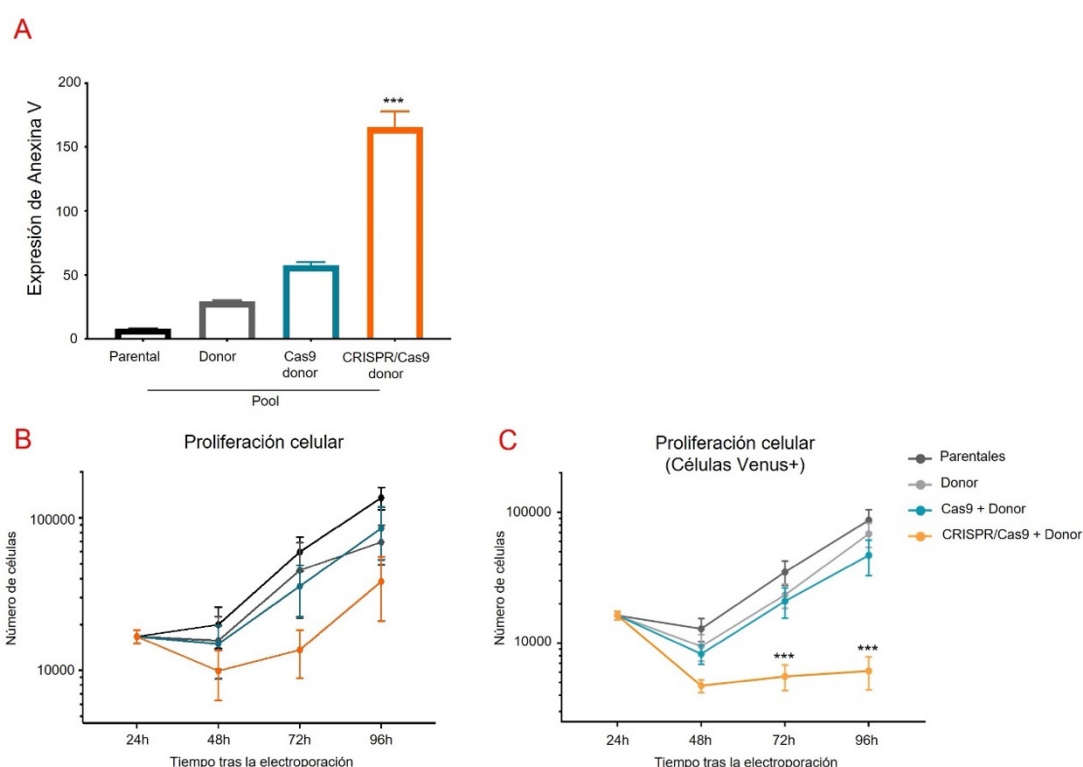


Figura 47. Efecto funcional del sistema CRISPR-Trap en células K562. (A) Análisis de expresión de Anexina V por citometría de flujo de células K562 48 h después de la electroporación con el sistema CRISPR-Trap (CRISPR/Cas9 + donador) y controles (Parental, Parental + donador, Cas9 + donador). (B) Ensayo de proliferación celular de K562 electroporadas con el sistema CRISPR-Trap y los controles durante 96 h en cultivo, y (C) Ensayo de proliferación celular de células K562 Venus⁺ de cada condición, durante 96 horas en cultivo (media $\pm$ SEM; ***, $p < 0,001$).

continuaron reflejando una menor tasa proliferativa, mostrando un menor número de células que el resto de las condiciones (13.622 ± 4.739). Finalmente, tras 96 horas de cultivo, se observó un número de células similar en todas las condiciones (Figura 47B).

A fin de investigar la actividad tumoral de las células seleccionadas por el sistema CRISPR-Trap, se repitió el ensayo de proliferación *in vitro* con las células Venus⁺ obtenidas de cada condición experimental. Nuevamente, las condiciones control donador y Cas9 + donador, mostraron una alta tasa proliferativa, muy similar a la de las células parentales, obteniéndose, tras 96 horas de cultivo, un número de células de: 59.896 ± 15.088 (parentales), 45.371 ± 23.313 (donador) y 35.689 ± 13.143 (Cas9 + donador) (Figura 47C). Sin embargo, la fracción de células Venus⁺ del grupo electroporado con todos los componentes del sistema CRISPR-Trap, exhibió una importante reducción en su tasa proliferativa, con un número de células significativamente menor a las 72 y 96 horas (5.572 ± 2.465 y 6.117 ± 3.448 , respectivamente) (Figura 47C).

3.6 El sistema CRISPR-Trap inhibe la actividad tumoral de *BCR/ABL*, produciendo un beneficio terapéutico en un modelo de xenoinjerto de LMC.

Finalmente, se analizó el efecto terapéutico *in vivo* del sistema CRISPR-Trap en un modelo murino de xenoinjerto de LMC. Se seleccionaron las células fluorescentes Venus⁺ de los grupos de células electroporadas Cas9 + donador y CRISPR/Cas9 + donador, así como el mismo número de células vivas parentales, para inyectarlas por vía subcutánea en ratones NSG, dejando que los tumores se desarrollaran durante 23 días (Figura 48).

El crecimiento de los tumores durante los 23 días posteriores a la inyección reveló una importante actividad oncogénica de las células Venus⁺ del grupo Cas9 + donador, dando lugar a tumores de un volumen final de $1.433,8 \pm 219,6 \text{ mm}^3$, valor muy similar al obtenido en las mediciones de los tumores de la condición control K562 parentales ($1.584,6 \pm 453,8 \text{ mm}^3$) después 23 días (Figura 48A y B). Sorprendentemente, las células Venus⁺ seleccionadas a partir de la condición CRISPR/Cas9 + donador, desarrollaron tumores un 90% más pequeños ($166,8 \pm 71,6 \text{ mm}^3$ a los 23 días tras la inyección, Figura 48A y B) que los obtenidos en los controles, reflejando una efectiva inhibición de la actividad tumoral en las células seleccionadas por el sistema CRISPR-Trap.

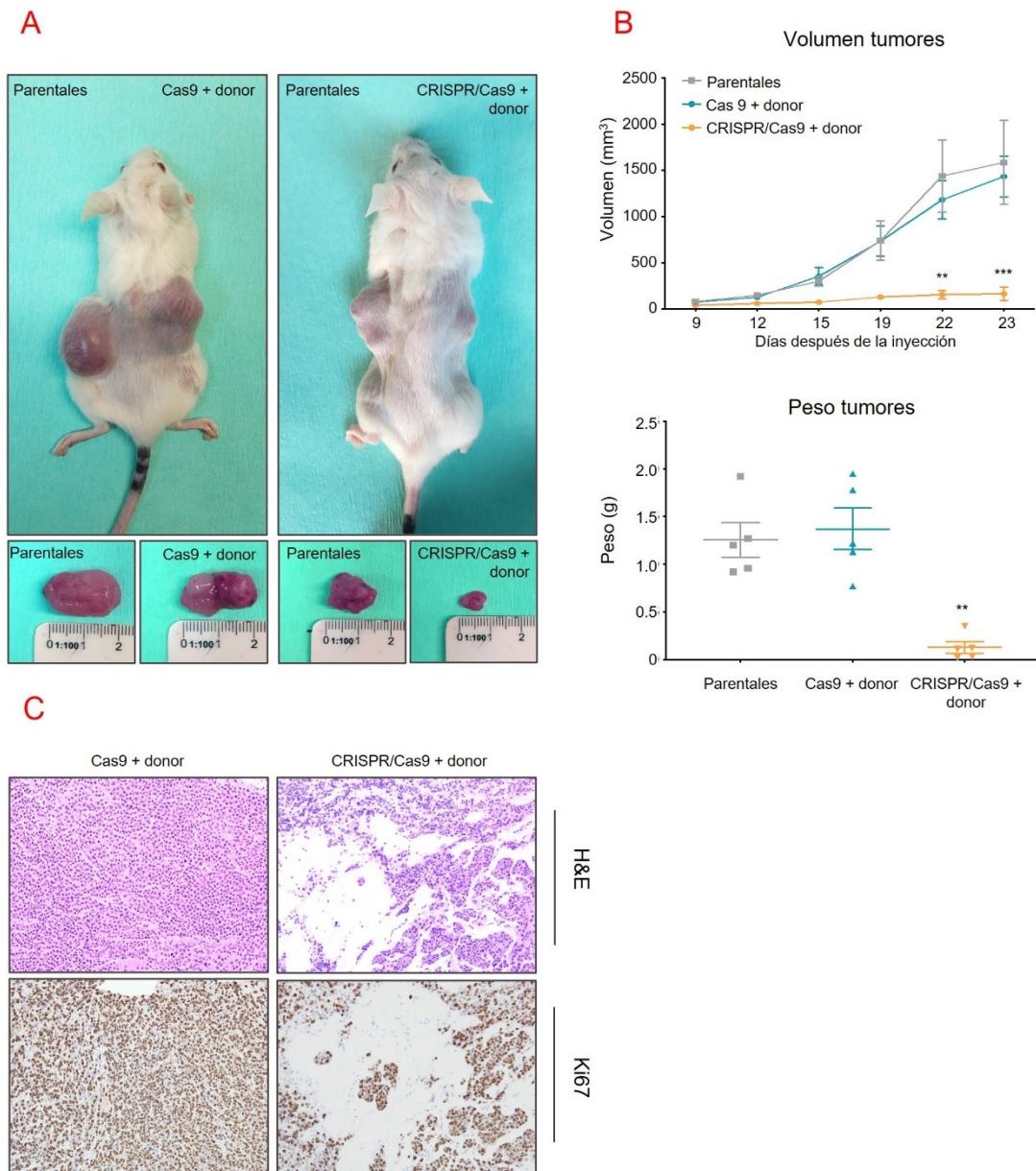


Figura 48. Efecto *in vivo* del sistema CRISPR-Trap dirigido hacia *BCR/ABL*. (A) Imagen externa de los ratones y tumores desarrollados 23 días después de la inyección celular subcutánea. (B) Crecimiento del tumor (mm³) durante los 23 días siguientes a la inyección celular subcutánea. Después de 23 días, se sacrificaron los ratones y se midió su masa tumoral. Los gráficos muestran las medias y el SEM; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (C) Análisis histológico de los tumores. Tinción con hematoxilina/eosina e inmunohistoquímica contra el marcador de proliferación Ki67 del tumor desarrollado tras la inyección de células Cas9 + donante y CRISPR/Cas9 + donante (aumento de 20X).

Consecuentemente, la masa de los tumores, medida a los 23 días, tras el sacrificio de los animales, reveló una masa tumoral significativamente menor en la condición CRISPR/Cas9 + donador que en los respectivos controles ($0,13 \pm 0,06$ g frente a $1,3 \pm 0,2$ g en la condición parental y $1,4 \pm 0,2$ g en la condición Cas9 + donador) (Figura 48A y B).

El análisis histológico mediante la tinción de los tumores con hematoxilina/eosina, reveló un numero significativamente menor de células tumorales viables, en los tumores derivados de las células electroporadas con el sistema CRISPR-Trap completo (Figura 48C). De igual forma, esta reducción de la capacidad oncogénica en las células corregidas por el sistema CRISPR-Trap se correspondió con una fuerte disminución de del número de células Ki-67⁺ dentro del tumor, en comparación con los controles (Figura 48C). Sugiriendo así una alta capacidad antioncogénica del sistema CRISPR-Trap contra *BCR/ABL* en el modelo de LMC.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La leucemia mieloide crónica es una neoplasia mieloproliferativa que representa entre el 15 y el 20% de todos los nuevos diagnósticos de leucemia en adultos [33]. La Sociedad Americana Contra el Cáncer estima que para el año 2022, 8.860 nuevos casos de LMC serán diagnosticados y alrededor de 1.220 personas fallecerán a causa de esta enfermedad [251]. Desde la introducción en la práctica clínica en el año 2000 de los inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs) el panorama terapéutico de la LMC ha cambiado drásticamente, aumentando la tasa de supervivencia a 10 años desde un 20% a la actual de un 80-90%, y equiparando la esperanza de vida de los pacientes a la de personas sanas de su misma edad [85,252]. Sin embargo, aspectos como la toxicidad de estos fármacos o la aparición de resistencias a los mismos, en su mayoría debidas al desarrollo de mutaciones puntuales en el dominio TK del oncogén *BCR/ABL*, ocasiona que hasta un 33% de los pacientes no logre una respuesta óptima a la terapia [88,90]. Las notables mejoras en el diagnóstico y monitorización de la enfermedad, impulsadas principalmente por las técnicas de secuenciación masiva (NGS), han conseguido solventar parte de estos problemas, posibilitando la elección del tratamiento de una forma más dirigida [89]. De esta forma, se identifican mutaciones concretas que predisponen a la resistencia a ciertos tipos de tratamientos de TKIs y la buena respuesta a otros [90]. No obstante, la necesaria cronificación del tratamiento continúa potenciando la aparición de resistencias, y pese a los extraordinarios esfuerzos de la comunidad científica en el desarrollo de nuevos TKIs de segunda y tercera generación [89], la búsqueda de terapias alternativas se vuelve imprescindible.

En este escenario, el trasplante alogénico de médula ósea (Alo-TMO), es la única terapia de rescate actual para la LMC y continúa siendo la terapia estándar en muchas otras enfermedades hematopoyéticas de origen genético [74,75]. Sorprendentemente, el número de pacientes de LMC sometidos a Alo-TMO, que se vio significativamente reducido tras la llegada de los TKIs, ha comenzado a aumentar en los últimos años, a medida que lo ha hecho la prevalencia de la enfermedad [33]. Además del papel fundamental que juega esta terapia en estadios más avanzados de la enfermedad, el Alo-TMO continúa siendo una opción terapéutica muy importante para los pacientes con LMC en fase crónica que no han respondido a dos o más TKIs, número que se estima en un 2% cada año [33]. El Alo-TMO es, de hecho, la única terapia curativa disponible para la

LMC, sin embargo, su uso se ve limitado por la severidad de los procedimientos ablativos previos al trasplante y la escasa disponibilidad de donantes histocompatibles [77]. Así mismo, los importantes efectos secundarios, relacionados principalmente con la enfermedad de injerto contra huésped (del inglés *graft versus host disease* o GVHD), la aparición de infecciones y el fracaso de injerto, siguen acotando el éxito de esta intervención terapéutica [74,76].

Teniendo en cuenta estas limitaciones, y debido a los enormes avances experimentados durante los últimos años en el campo de la terapia génica, la corrección genética en enfermedades hematopoyéticas ha comenzado a representar una valiosa oportunidad terapéutica, alternativa al Alo-TMO [253]. Gracias a sus singulares características de autorrenovación y multipotencia, las células madre hematopoyéticas (CMH) se consideran un objetivo ideal para corregir defectos genéticos característicos de enfermedades hematológicas. Dado que la modificación genética *in vivo* de las CMH es un proceso altamente ineficiente, las terapias génicas hematopoyéticas actuales se basan en la recolección y posterior manipulación *ex vivo* de dichas CMH [254]. A continuación, las células corregidas son refundidas en el paciente, evitando con ello la posibilidad de rechazo del injerto y los graves efectos secundarios debidos al GVHD. Mientras que los primeros ensayos clínicos de terapia génica en CMH se basaron en enfoques no dirigidos, utilizando vectores virales capaces de sobreexpresar proteínas terapéuticas [255,256], las estrategias más actuales han comenzado a utilizar enfoques más precisos, basados en la edición genómica. Así, en 2019 se aprobó el primer ensayo clínico de corrección de CMH *ex vivo*, mediante CRISPR/Cas9, para el tratamiento de las enfermedades monogénicas β -talasemia y la enfermedad de células falciformes. La base del tratamiento, en ambos casos, es la eliminación mediante CRISPR/Cas9 del gen *BCL11A*, un factor de transcripción que reprime la expresión de la hemoglobina fetal, proteína capaz de rescatar el fenotipo de los pacientes [257]. Los estudios retrospectivos realizados hasta la fecha han mostrado resultados prometedores, aumentando cada año el número de pacientes beneficiados con el tratamiento [258]. Reflejo de ello, es el inicio, a finales del 2022, de tres ensayos clínicos más para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes, uno de ellos dirigido a la corrección específica del gen mutado en la enfermedad [259–261].

Dentro del grupo de enfermedades para las que la terapia génica en CMH podría constituir una valiosa estrategia terapéutica, se encuentra la LMC. Como ya se ha mencionado, la LMC representa un paradigma de cáncer de origen monogénico, en el que todos los aspectos patológicos de la enfermedad son atribuibles a la expresión de un único

gen. La eliminación mediante CRISPR/Cas9 del oncogén *BCR/ABL* en las CML de los pacientes de LMC podría constituir una terapia curativa definitiva para la enfermedad, especialmente importante para el grupo de pacientes no respondedores a los tratamientos con TKIs en los que no exista la posibilidad de realizar un trasplante alogénico. Así mismo, una estrategia basada en la corrección de las CML propias del paciente, constituiría la prueba de concepto para evaluar las posibilidades de la terapia génica *ex vivo* en neoplasias hematológicas, en la que han de abordarse nuevos retos. El principal desafío de este tipo de terapias radica en la inherente eficiencia del proceso de edición, que va a repercutir directamente en el número de eventos residuales no editados, responsables de la aparición de recaídas. En este contexto, la búsqueda de sistemas de edición altamente eficientes, junto con la aplicación de estrategias de selección de las CML corregidas previas al trasplante cobran especial importancia. Así pues, garantizar una terapia génica eficiente, además de efectiva, para el tratamiento de neoplasias hematológicas, resulta fundamental para la implementación de este tipo de aproximaciones en la rutina clínica.

1. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 DUAL PROPORCIONA MAYOR EFICIENCIA EN LA GENERACIÓN DE ALELOS NULOS EN EL ONCOGÉN *BCR/ABL*, REPECTO A SISTEMAS DE UNA GUIA ÚNICA.

La generación de rupturas de doble cadena (DSB) en el ADN mediante la tecnología CRISPR/Cas9 es la base para la producción de alelos nulos en ensayos de silenciamiento génico. En la mayoría de los casos, el efecto nulo se consigue a través del mecanismo celular de reparación NHEJ para introducir mutaciones de tipo INDEL en la secuencia codificante de los genes, alterando así el marco de lectura. El empleo de este sistema ofrece una serie de ventajas, como la sencillez de diseño o la alta eficiencia del proceso de reparación, que no se ve restringida a fases concretas del ciclo celular. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de esta estrategia es la gran heterogeneidad y, por tanto, la poca predictibilidad del proceso de edición, que se encuentra supeditado a la variabilidad de los mecanismos de reparación. Concretamente, la aleatoriedad en el tamaño de los INDELS generados por NHEJ provoca que, en un porcentaje de los casos, las mutaciones generadas sean de tipo *in frame* (mutaciones de +3, -3 o múltiplos de 3 pb), por lo que la producción de células KO completas en un solo paso no siempre es posible. Este aspecto, que reduce en gran medida la efectividad del proceso, resulta crítico para las estrategias de terapia génica, especialmente para aquellas

enfocadas al tratamiento de neoplasias, como es el caso de la LMC. En estas aproximaciones, si existe una eficiencia aceptable en el proceso de entrega de los componentes CRISPR, el paso clave para el éxito de la terapia radica en la efectividad de las sgRNAs diseñadas para eliminar el oncogén implicado. Por todo ello, durante los últimos años han surgido numerosos trabajos enfocados en conseguir una edición génica más dirigida, eficiente y reproducible. Así, encontramos estrategias como la eliminación de exones completos [262], la edición mediante *base editors* para introducir codones STOP prematuros en secuencias concretas [263], la aplicación estudios bioinformáticos sobre el contexto de la secuencia de las sgRNAs que tratan de predecir el espectro de ediciones generadas [264], el uso de sgRNAs dirigidas hacia secuencias del *splicing* [265] o la producción de deleciones específicas mediante el empleo de dos sgRNAs [246].

Concretamente, y por los beneficios que ofrecen, como primer objetivo de la presente tesis doctoral se evaluaron las eficiencias de generación de alelos KO de un sistema CRISPR de guía única, dirigida hacia los sitios de procesamiento intrónico y un sistema CRISPR dual, que generará deleciones específicas en la secuencia codificante.

En la primera de las estrategias, el uso de una sgRNA dirigida a las secuencias canónicas del *splicing* podría incrementar la eficiencia de generación de alelos nulos de dos formas independientes: mediante la posibilidad de inducir mutaciones de tipo *frameshift* en la secuencia codificante y/o mediante la alteración de la secuencia canónica del *splicing*. Existen varias evidencias que apoyan la idea de que dirigir el sistema CRISPR/Cas9 hacia los sitios de procesamiento intrónico conduciría a la generación de alelos nulos de forma más efectiva. Está bien documentado que alteraciones en las secuencias canónicas del procesamiento intrónico afectan a los patrones de corte y empalme de los pre-ARNs y generan una gran cantidad de mutaciones de pérdida de función [265,266]. Así mismo, la existencia del mecanismo celular de NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) altamente conservado, que media la degradación de ARNs erróneamente procesados o con intrones retenidos, ayudaría a asegurar la generación de alelos nulos [267].

Por todo ello, en este trabajo, se comparó la eficiencia de generación de alelos KO de sgRNAs dirigidas hacia secuencias internas exónicas y sus equivalentes, dirigidas hacia la secuencia donadora del *splicing* en 5', empleando, de forma preliminar, el gen de la tirosinasa (*Tyr*) como gen reportero. El locus *Tyr*, que codifica para la enzima tirosinasa, encargada de la síntesis de melanina, ha sido ampliamente utilizado como gen reportero en numerosos estudios [248,268] al permitir una rápida monitorización *in vivo*

de la edición génica. El análisis de la edición genómica *in vitro* del gen *Tyr*, empleando líneas celulares murinas y humanas, mostró frecuencias de edición muy similares para ambas guías en ambas especies. Así mismo, se observó que la mayoría de las mutaciones generadas correspondían a pequeños INDELs, reflejando la reparación del DSB mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ). Sin embargo, el análisis *in silico* de las variantes alélicas generadas para cada una de las guías mostró diferentes eficiencias de generación de alelos KO. En el caso de las guías dirigidas hacia secuencias internas exónicas, tan solo un 70% de las variantes alélicas generadas conducirían a fenotipos de pérdida de función, mientras que el porcentaje restante correspondía a mutaciones *in frame*, que preservarían el marco de lectura. Sorprendentemente, en el caso de las guías dirigidas hacia secuencias del *splicing* la totalidad de los alelos editados portaban mutaciones de tipo nulo, al encontrarse alterada la secuencia canónica del *splicing* en 5' en el 100% de las ediciones.

En los ensayos *in vivo*, utilizando embriones de ratón, la secuenciación de la región diana destacó las mismas variantes alélicas en los embriones mantenidos hasta la fase de blastocisto y en las camadas de ratones nacidas. El análisis fenotípico de las camadas reflejó un aumento de la eficiencia de generación de alelos nulos por parte de la guía dirigida contra la secuencia del *splicing*, obteniéndose, tras la edición de una camada con dicha guía, un ratón albino, dos mosaicos y dos con coloración del pelaje. Contrariamente, todos los individuos nacidos de la camada editada con la guía exónica mostraron pelaje negro. A fin de corroborar los hallazgos *in silico*, se secuenciaron las variantes alélicas encontradas en todos los ratones nacidos en ambos grupos. Además de la obtención de un ratón WT, no editado en ninguno de sus alelos, el resto de los ratones con coloración del pelaje nacidos de la camada editada con el sistema dirigido a la secuencia exónica portaban INDELs en uno o más de sus alelos. Interesantemente, se encontraron ratones con el pelaje negro en su totalidad, que portaban mutaciones de tipo *in frame* en ambos alelos, lo que corroboró los datos obtenidos *in silico* y demostró que la introducción de INDELs en la secuencia codificante de un gen no siempre lleva a su silenciamiento. Por el contrario, en la camada derivada de la edición con la guía en contra de la secuencia del *splicing* se detectaron ratones albinos o mosaicos que, pese a portar mutaciones de tipo *in frame*, conducían a alelos KO al tener alterada la secuencia donadora del *splicing* en 5'. Estos resultados demostraron que el empleo de guías dirigidas hacia las secuencias canónicas del *splicing* aumenta la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 para generar alelos nulos.

Una vez corroborados nuestros ensayos preliminares, empleando el gen *Tyr* como reportero, esta estrategia de edición fue trasladada al oncogén *BCR/ABL* responsable de la LMC. La eliminación de la secuencia codificante de *BCR/ABL*, empleando estrategias de edición genómica, ha sido objeto de estudio de diversos trabajos durante los últimos años. En 2017, un trabajo publicado por nuestro grupo demostró por primera vez que el sistema CRISPR/Cas9 elimina eficientemente el oncogén *BCR/ABL*, revirtiendo su actividad tumorigénica [269]. En este trabajo, el empleo de una línea celular murina que expresa el oncogén humano de *BCR/ABL* como modelo de LMC, permitió diseñar una sgRNA dirigida hacia la secuencia de fusión específica de *BCR/ABL*. Sin embargo, en el caso de los pacientes de LMC, existen diferentes transcritos de fusión *BCR/ABL* (p210, p190 o p230) y dentro de ellos, la secuencia intrónica específica resultante de la traslocación t(9:22), es virtualmente única para cada paciente [124]. Como resultado, dirigir el sistema CRISPR/Cas9 hacia la región de fusión del oncogén es una estrategia difícilmente aplicable en la práctica clínica. Por ello y a fin de conseguir una terapia más flexible y clínicamente aplicable, la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en dirigir el sistema de edición hacia secuencias comunes de *BCR* [270] o *ABL* [271,272]. Siguiendo esta última estrategia, en este trabajo se diseñó y comparó la eficiencia de eliminación de *BCR/ABL* por parte de guías dirigidas contra la secuencia exónica y contra la secuencia donadora del *splicing*, dirigidas hacia el dominio TK del gen *ABL*, en una línea celular humana de LMC. Interesantemente, la eliminación de la expresión del oncogén mediante la guía dirigida hacia la secuencia donadora del *splicing* en 5' resultó en un aumento significativo de la apoptosis de la línea celular *BCR/ABL*-dependiente. Todo ello demostró que el empleo de guías dirigidas hacia las secuencias del *splicing* es una valiosa estrategia para incrementar la eficiencia de eliminación de oncogenes, especialmente en aquellos casos en los que la selección celular no sea una opción y los vectores de entrega de sistema de edición solo permitan la utilización de una guía.

Por otra parte, en aquellos casos en los que sí es posible el empleo de más de una sgRNA, una alternativa atractiva para la generación de alelos nulos es la de utilizar un sistema CRISPR dual. Diversos estudios demuestran que el empleo de dos guías CRISPR, situadas lo suficientemente cerca entre sí, conduce preferencialmente a la eliminación de la secuencia comprendida entre los sitios de corte de ambas guías [246,247]. De esta forma, el sistema ofrece una cierta predictibilidad sobre los procesos celulares de reparación del ADN, que van a promover la generación de deleciones específicas en el locus diana, en detrimento de la producción de INDELS aleatorios. Así pues, la

eliminación dirigida de una región genómica concreta ofrece la oportunidad de predecir *in silico* el efecto de la mutación a generar, garantizando la producción de un codón de parada prematuro y, por tanto, la pérdida de función del gen. Por otra parte, el uso de deleciones para eliminar genes permite monitorizar rápidamente el conjunto de células editadas, al poder visualizar el alelo delecionado mediante PCR. A fin de evaluar la eficiencia de generación de alelos nulos mediante esta estrategia, se diseñó un sistema CRISPR dual para inducir una deleción de 101 pb en el dominio TK de *ABL*. La amplificación mediante PCR de la secuencia genómica de interés donde se puede observar la secuencia delecionada corroboró la posibilidad de monitorización y seguimiento de las células editadas. Sorprendentemente, y contrastando con los resultados obtenidos mediante el uso de sgRNAs únicas, el análisis de las secuencias mostró únicamente dos tipos de ediciones generadas por parte del sistema CRISPR dual: una variante portadora de INDELS generados por cada una de las guías y una variante portadora de la deleción específica de 101 pb. Más aun, la cuantificación de la frecuencia de cada una de las variantes reveló una inusual consistencia en las ediciones generadas, donde la obtención de la deleción esperada se daba en más del 90% de las secuencias editadas. Consecuentemente, la cuantificación de los niveles de apoptosis, reflejo de la pérdida de actividad oncogénica de *BCR/ABL*, aumentaron significativamente en el grupo de células editadas por parte del sistema dual, alcanzando niveles incluso mayores que los obtenidos mediante el empleo de guías únicas, dirigidas tanto a la secuencia exónica como a la del *splicing*. Estos resultados demostraron que el uso de un sistema CRISPR dual ofrece, no solo un accesible seguimiento de las células editadas, sino también una eficiente eliminación de la expresión de oncogenes, permitiendo una alta predictibilidad del genotipo resultante.

2. EL SISTEMA CRISPR/CAS9 DUAL ELIMINA LOS EFECTOS ONCOGÉNICOS DE *BCR/ABL* Y REESTABLECE LA HEMATOPOYESIS FISIOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE LMC.

Durante los últimos años, el número de investigaciones centradas en la eliminación del oncogén de fusión *BCR/ABL* mediante el empleo de nucleasas de edición genómica ha crecido enormemente. Así mismo, el desarrollo de modelos murinos que mimetizan la LMC humana y de ratones inmunodeficientes para el injerto de CMH humanas han brindado nuevas oportunidades para evaluar la aplicación terapéutica de

estas estrategias. Estudios previos basados en CRISPR/Cas9, llevados a cabo por nuestro grupo [269], y otros posteriores utilizando nucleasas de dedos de zinc (ZFN) [270] o un sistema CRISPR asociado a nucleasas FokI [273] han demostrado el potencial de una terapia génica anti *BCR/ABL*, capaz de revertir los efectos oncogénicos de la proteína de fusión, de forma similar a lo descrito con el uso de los TKIs. En 2020, el equipo de Shu-Huey Chen empleó por primera vez células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) de pacientes con LMC para evaluar una estrategia anti *ABL*, basada en CRISPR/Cas9 [272]. Los autores realizaron la transducción *ex vivo* de las PBMC utilizando un vector lentiviral conteniendo una guía CRISPR dirigida hacia el exón 2 de *ABL*. Sus resultados reflejaron un aumento significativo de la apoptosis de las células tumorales transducidas, en un modelo sistémico de xenoinjerto de LMC y demostraron por primera vez, que la eliminación del locus *ABL* WT no desencadenaba efectos adversos en la producción del linaje de células T. Recientemente, Rodríguez-Perales S. y colaboradores, han desarrollado un nuevo enfoque, basado en el uso de dos guías para inducir grandes deleciones y eliminar selectivamente oncogenes de fusión [274]. Los investigadores diseñaron una combinación de dos sgRNAs, dirigidas a la región del intrón 8 de *BCR* y el intrón 1 de *ABL*, para inducir una deleción de 133,9 kb únicamente en el locus de fusión *BCR/ABL*, empleando una línea celular humana de LMC. Interesantemente, las células transducidas mediante vectores adenovirales mostraron una reducción tumoral de más del 80%, en un modelo murino de xenoinjerto empleando ratones inmunodeficientes.

No obstante, y pese a los prometedores resultados obtenidos en estos estudios preliminares, empleando líneas celulares, aún existen cuestiones críticas sin resolver sobre la capacidad de injerto, la multipotencia o el hipotético beneficio terapéutico de las células madre leucémicas (CML) editadas mediante CRISPR. En el presente trabajo, demostramos por primera vez la capacidad de un sistema CRISPR dual para eliminar de manera eficiente *BCR/ABL*, no solo en líneas celulares murinas y humanas, sino también en CML primarias (Lin^{-}) de un modelo murino de LMC y CML humanas ($CD34^{+}$) de pacientes de LMC. El sistema CRISPR dual, que emplea dos sgRNAs para inducir una deleción corta, de 101 pb en el dominio TK de *ABL* que, además, conduce a la formación de un codón de parada prematuro, es capaz de producir alelos *BCR/ABL* nulos, evitando la expresión del oncogén a nivel de ARNm y, por tanto, de la oncoproteína. La presencia de este stop prematuro parece ser la causa de la activación de mecanismos de decaimiento del ARN (NMD), mediante los cuales, cuando la célula detecta transcritos sin sentido o con stop prematuros, se activa su degradación impidiendo finalmente su traducción [267].

Además, la generación de esta delección específica permitió el rápido seguimiento de las células editadas y sus descendientes, tanto en líneas celulares, como en células primarias leucémicas. La ausencia de actividad *BCR/ABL* suprimió los efectos oncogénicos sobre la supervivencia y la proliferación en las líneas celulares de LMC editadas. Así mismo, los ensayos *in vitro* empleando células madre leucémicas, reflejaron una significativa reducción de la proliferación tumoral, ligada a un significativo aumento de la apoptosis, y una profunda inhibición de la capacidad clonogénica de las CML editadas. Cabe destacar, que una expresión residual de *BCR/ABL* fue detectada en todos los ensayos con CML, murinas o humanas. Dada la imposibilidad de selección de las células correctamente editadas, y debido a la eficiencia intrínseca de los procesos de entrega y edición, la existencia de eventos residuales sin editar resulta, en la actualidad, inevitable. No obstante, y a pesar de esta limitación, el sistema logró una importante reducción en la expresión del oncogén y un beneficio terapéutico significativo en modelos murinos y xenoinjertos derivados de células de pacientes.

Por otro lado, y a fin de garantizar el éxito terapéutico de una estrategia anti *BCR/ABL*, basada en CMH, para el tratamiento de la LMC, se deben atender cuestiones tales como si las CML editadas son capaces de mantener su potencialidad y dar lugar a una hematopoyesis fisiológica, evitando el sesgo mieloide propio de la patología. Mandal y colaboradores demostraron en el 2014 la eficacia de un sistema CRISPR dual para eliminar genes en células madre y progenitores hematopoyéticos de individuos sanos, preservando la multipotencialidad de las células CD34⁺ editadas [275]. Sin embargo, estas cuestiones aún no han sido abordadas en el caso de células madre leucémicas editadas mediante CRISPR/Cas9. Por ello, y con el fin de resolver estas incógnitas, se llevaron a cabo ensayos de trasplante de médula ósea (TMO), utilizando ratones inmunodeficientes NSG como receptores, para estudiar *in vivo* la multipotencia de las CML murinas y humanas editadas [276]. En el caso de los trasplantes de CML de ratón, se utilizó un modelo murino transgénico de LMC como donante, para evaluar la capacidad de injerto y multipotencia de las CMLm editadas mediante CRISPR/Cas9. A diferencia de los controles, estos trasplantes mostraron poblaciones fisiológicas de células mieloides y linfoides. Es importante destacar que no se detectó un sesgo mieloide en la hematopoyesis generada a partir de las células editadas, al menos 120 días después del TMO, demostrando la capacidad del sistema de edición para suprimir el potencial oncogénico de las células leucémicas *BCR/ABL*⁺. Así mismo, en estos ratones no se observaron síntomas clínicos de la enfermedad, como esplenomegalia o un aumento

patológico de los niveles de granulocitos (células Gr1⁺), característicos del modelo murino de LMC [277] y detectados en los trasplantes control. A fin de estudiar la evolución de los trasplantes con respecto al estadio clínico de la enfermedad, estrechamente relacionado con la carga tumoral, se cuantificaron los niveles de células Gr1⁺ a lo largo de un periodo de 180 días tras el trasplante. En los trasplantes control, de CML sin editar, se detectó un incremento progresivo de la población hematopoyética Gr1⁺, reflejando el desarrollo de LMC en este grupo de ratones. Sin embargo, todos los ratones injertados con células leucémicas editadas mediante el sistema CRISPR dual mostraron niveles menores de células Gr1⁺ que los detectados al inicio del ensayo. Todo ello demostró por primera vez que el sistema de edición CRISPR/Cas9 dual es capaz de restaurar una hematopoyesis fisiológica, produciendo un beneficio terapéutico en un modelo murino de LMC.

Con el objetivo de determinar si estos resultados eran reproducibles en células humanas, se realizaron ensayos similares de TMO, empleando células madre leucémicas humanas obtenidas de pacientes de LMC en fase crónica. En base a lo publicado en estudios previos, el injerto exitoso fue definido por la existencia de al menos un 0,1% de células CD45⁺ humanas en médula ósea [276]. Todos los ratones trasplantados incluidos en el estudio presentaron injertos de entre 0,7% y 9,4%, corroborando el mantenimiento de la capacidad de migración y autorrenovación de las CML editadas y sin editar. De acuerdo con los resultados descritos por Mandal y colaboradores [275], se observó la presencia, 120 días después del TMO, de células CD45⁺ derivadas de las CML editadas trasplantadas. Más aún, la detección de la delección producida en la región genómica de interés de las principales poblaciones hematopoyéticas humanas encontradas en los injertos de los ratones demostró que las células editadas para *BCR/ABL* y trasplantadas contribuyen sólidamente a la hematopoyesis humana generada.

De forma análoga a resultados de trabajos anteriores, los trasplantes controles, empleando células CD34⁺ procedentes de individuos sanos generaron una hematopoyesis fisiológica, caracterizada por una alta proporción de células B, bajos niveles de células T y la ausencia de sesgo mieloide. Interesantemente, los ratones trasplantados con CML editadas mediante el sistema CRISPR dual, mostraron una hematopoyesis muy similar a la obtenida en estos trasplantes fisiológicos, contrastando con los trasplantes con CML sin editar que desarrollaron un trastorno mieloproliferativo, similar al generado en los trasplantes control de células CD34⁺ leucémicas, y definido por una alta proporción de células mieloides CD14⁺ y CD117⁺. Así mismo, la expresión de los marcadores CD117

y CD19 se correlacionó negativamente cuando se analizaron todos los injertos. Se encontraron altos niveles de células CD117⁺ y bajos niveles de células CD19⁺ en todos los ratones trasplantados con CML sin editar, mientras que se observó un resultado inverso en los ratones NSG trasplantados con las células leucémicas editadas. De acuerdo con esto, estudios como el de Eisterer y colaboradores han asociado esta correlación inversa entre ambos marcadores con un fenotipo mieloide y, por tanto, con la progresión de la LMC [278].

Así mismo, a fin de detectar posibles cambios en el patrón de expresión entre las CML editadas y las CML control, debidos a la ausencia de actividad de *BCR/ABL*, se comparó el perfil transcriptómico de ambas poblaciones celulares mediante RNA-seq. Interesantemente, se hallaron numerosos genes diferencialmente expresados entre ambos grupos, muchos de los cuales ya habían sido descritos en estudios transcriptómicos comparativos entre CMH de individuos sanos y CML de pacientes con LMC [279] o incluso entre CML de pacientes, antes y después del tratamiento con TKIs [280]. Así, en los grupos de células corregidas para *BCR/ABL* se detectó una reducción en la expresión de genes típicamente sobreexpresados en las células madre hematopoyéticas de pacientes con LMC. Entre estos genes infraexpresados en las CML editadas, encontramos otros receptores tirosina quinasa como *EPHB6*, cuya expresión también se ve reducida en las CML de pacientes tras el tratamiento con TKIs [281], supresores de la señalización de citoquinas (*SOCS1-3* y *CISH*) [282] y diferentes proteínas de membrana, como el marcador de superficie CD32 (*FCGR2A*), característico de la población celular leucémica [279], o las proteínas TMEM158 y TMEM273, implicadas en la proliferación y progresión tumoral de diferentes tipos de cáncer [283,284]. Por el contrario, entre los genes sobreexpresados en las fracciones celulares editadas, con respecto a las CML sin editar, encontramos diferentes supresores tumorales, tales como *PDCD4* [285], *SCIN* [286], *SERPINI1* [287], *TRANK1* [288] o *TUBB1* [289], cuya expresión se encuentra reducida en LMC y otros tipos de cáncer, asociándose a un aumento en la proliferación y supervivencia celular, una inhibición de la apoptosis y una mayor progresión tumoral.

De esta forma, nuestros resultados demuestran que el sistema CRISPR/Cas9 dual es capaz de abolir el efecto oncogénico de *BCR/ABL*, dando lugar a una diferenciación hematopoyética corregida después del TMO de las células madre leucémicas editadas. Más importante aún, las CML editadas mediante el sistema CRISPR dual son capaces de mantener sus características multipotenciales y restaurar una hematopoyesis fisiológica, evitando el sesgo mieloide. En conjunto, todos estos resultados constituyen la prueba de

concepto de que la eliminación genómica de *BCR/ABL* mediante el sistema CRISPR/Cas9, es opción terapéutica para el tratamiento de la LMC, especialmente para aquellos pacientes en los que la terapia basada en TKIs no es efectiva.

3. LA APROXIMACIÓN CRISPR-TRAP PERMITE LA SELECCIÓN DE LAS CÉLULAS EN LAS QUE LA EXPRESIÓN DE *BCR/ABL* HA SIDO ELIMINADA PARA SU POSTERIOR TRASPLANTE.

El campo de la terapia génica aplicada a los trastornos hematopoyéticos monogénicos ha avanzado significativamente durante las últimas dos décadas, pasando de ser una estrategia prometedora para convertirse en una realidad terapéutica. En este contexto, la terapia génica basada en CMH autólogas se beneficia de toda la experiencia adquirida en el proceso de trasplante de médula ósea alogénico y en la extracción y manipulación de las CMH mediante selección de las células CD34⁺, evitando además todos los riesgos inmunológicos asociados al proceso de Alo-TMO [253]. La terapia génica basada en CMH autólogas ha demostrado su potencial curativo, especialmente en aquellas patologías en las que la corrección génica confiere una ventaja proliferativa a las células editadas y la consecución de ciertos niveles de quimerismo de las células corregidas en el injerto, es suficiente para producir beneficios terapéuticos completos [290]. Sin embargo, existen otros escenarios, como es el caso de la terapia génica para la eliminación de oncogenes, en los que alcanzar ciertos niveles de quimerismo de células corregidas no es suficiente para lograr un tratamiento efectivo y definitivo.

Como ya se ha mencionado, y pese a los prometedores resultados obtenidos en las terapias anti *BCR/ABL* para el tratamiento de la LMC, garantizar la ausencia de células residuales sin editar resulta imperativo para asegurar el éxito de la terapia. Una posible solución a esta problemática es emplear una estrategia que permita la edición y selección *in vitro* de las CMH corregidas. Este enfoque superaría una de las principales limitaciones técnicas, como es la baja eficiencia de edición y ofrecería nuevas posibilidades, como la expansión *in vitro* de la población celular editada antes de su reinfusión al paciente. Así pues, en este trabajo se muestra por primera vez una estrategia, denominada CRISPR-Trap, que combina un sistema de trampa génica con la tecnología CRISPR/Cas9, y permitirá la eliminación genómica de *BCR/ABL* y la expresión simultánea de un marcador celular seleccionable.

La trampa génica o captura de genes es una tecnología de mutagénesis insercional, ampliamente utilizada durante los últimos 20 años, que se basa en el uso de

construcciones de ADN que se integran al azar en el genoma, provocando la interrupción de la expresión de los genes “capturados” y permitiendo su identificación mediante genes reporteros [291]. Clásicamente, las construcciones de trampa génica contienen un gen reportero sin promotor flanqueado en su extremo 5’ por una secuencia aceptora del *splicing* SA (del inglés *splicing acceptor*) que permita que el fragmento sea reconocido como exón, y una señal de poliadenilación (polyA) en el extremo 3’ que asegure el silenciamiento del gen [292]. Adicionalmente, en determinados casos, el sistema puede ser direccionado a una secuencia específica del genoma, mediante la adición de brazos de homología en ambos flancos del casete. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de esta estrategia de trampa génica es que se basa en los mecanismos celulares endógenos de recombinación homóloga (del inglés *homology directed repair* o HDR), muy poco frecuentes y, por tanto, poco eficientes. Sin embargo, el sistema CRISPR-Trap eludiría este obstáculo al emplear el eficiente sistema de edición CRISPR/Cas9 para dirigir la integración, mediada por homología, hacia secuencias genómicas específicas.

La estrategia CRISPR-Trap une la tecnología CRISPR/Cas9, que se dirige a la secuencia específica de fusión *BCR/ABL*, con un ADN donador no viral de trampa génica que se insertará vía HDR. El ADN donador de la trampa génica contiene una secuencia aceptora del *splicing*, que asegura la interrupción del marco de lectura de *BCR/ABL*, seguida de la secuencia del gen reportero *Venus* y, finalmente, una señal de parada de la transcripción (polyA). Los resultados preliminares, utilizando un casete SA-Venus-PolyA, sin promotor, en el que la expresión del reportero *Venus* queda bajo el control del promotor endógeno de *BCR*, mostraron que el sistema era capaz de integrar específicamente el casete, reduciendo la expresión de *BCR/ABL* y evitando sus efectos oncogénicos. Sin embargo, se observó que el nivel de expresión de *BCR/Venus* no era suficiente para producir una fluorescencia detectable y, por tanto, un sistema de selección efectivo. Actualmente, existen diferentes trabajos que han descrito este problema en diferentes genes y han incluido modificaciones en el ADN donador a fin de mejorar la sensibilidad del sistema reportero, tales como potenciadores, sistemas de selección positiva/negativa o repeticiones en tándem del gen reportero [293–295]. Sin embargo, en todos estos casos el aumento de la señal del reportero resultó débil e implican largos procesos de selección/expansión de las células. En la terapia basada en CMH, donde la expansión de las células seleccionadas es limitada y el uso de genes de selección negativa no es adecuado, la búsqueda de un sistema de monitorización robusto se vuelve crítica.

En este sentido, otros estudios han demostrado la necesidad de incluir un promotor exógeno en los ADN donadores de trampa génica para asegurar una alta expresión, locus-independiente, del gen de selección [290]. En consecuencia, se modificó el casete de interferencia inicial para introducir el promotor exógeno de alta expresión CMV dirigiendo la expresión del gen reportero *Venus*. No obstante, la utilización de un donante que contiene un promotor interno implica que las integraciones fuera del sitio diana, detectadas en nuestras condiciones control, condujeron a una expresión observable del gen reportero [296], obteniéndose señales fluorescentes similares en todas las condiciones experimentales. Sorprendentemente, este resultado contrasta con el obtenido en la cuantificación, mediante qPCR, de la expresión del gen *Venus*, donde la sensibilidad de la técnica reveló diferencias significativas en los niveles de expresión del reportero. La expresión del ARNm de *Venus* resultó de hasta 13 veces mayor en la condición tratada con del sistema CRISPR-Trap, sugiriendo un aumento en la eficiencia de integración del casete en el locus diana, mediada por HDR, cuando la herramienta CRISPR/Cas9 dirigía el sistema.

Los análisis llevados a cabo en las células *Venus*⁺ editadas con el sistema CRISPR-Trap, corroboraron la correcta selección de las células en las que *BCR/ABL* había sido eliminado. Así mismo, se confirmó el origen inespecífico, fruto de las integraciones aleatorias o de la expresión del ADN donante libre no integrado, de la fluorescencia *Venus* detectada en las condiciones control. La separación de la fracción celular fluorescente *Venus*⁺ en las condiciones control no resultó en un enriquecimiento de la población celular que portaba el alelo recombinado *BCR/Venus* y, consecuentemente, no se observó una reducción de la expresión del alelo nativo *BCR/ABL*, demostrando la expresión sitio-inespecífica del gen reportero en estas condiciones. Cabe destacar que, con los análisis realizados, no es posible distinguir entre la expresión de *Venus* proveniente del casete integrado al azar y la debida a la expresión del ADN donador no integrado. La línea celular humana de LMC K562 empleada, es dependiente de la expresión de *BCR/ABL* para su supervivencia [297], por lo que no es posible su mantenimiento en cultivo hasta conseguir el agotamiento del ADN donador libre, capaz de emitir fluorescencia observable. Por otra parte, en la condición tratada con el sistema CRISPR-Trap, la selección de las células fluorescentes *Venus*⁺, si condujo a un enriquecimiento de las células editadas para *BCR/ABL*, en las que el casete de interferencia se insertó con éxito en la secuencia específica de fusión del oncogén. Estos resultados son consistentes con los observados en numerosos trabajos previos, en los que

se determinó que la integración sitio-específica mediada por HDR se veía aumentada en un factor de 1.000 cuando se empleaban nucleasas de edición genómica para generar un DSB en la secuencia diana [298]. Como resultado de esta integración sitio-específica, la expresión de *BCR/ABL*, ya reducida en el conjunto de células tratadas disminuyó drásticamente en las células Venus⁺.

Finalmente, el beneficio terapéutico de una estrategia CRISPR-Trap fue evaluado en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la línea celular humana de LMC, el sistema CRISPR-Trap eliminó eficientemente la expresión del oncogén *BCR/ABL*, suprimiendo sus efectos oncogénicos en la supervivencia y proliferación *in vitro*, en el conjunto de células seleccionadas por el sistema. La inyección subcutánea de estas células seleccionadas en ratones inmunodeficientes condujo a una fuerte inhibición del crecimiento tumoral, resultando en una reducción del 90% en la carga tumoral, en comparación con los tumores control. Trabajos previos de nuestro grupo y otros, obtuvieron resultados similares empleando estrategias basadas en la introducción de mutaciones aleatorias en la secuencia codificante del oncogén [269,272]. Sin embargo, en estos trabajos, la posibilidad de inducir mutaciones *in frame*, que preservarían el marco de lectura, junto con la imposibilidad de seleccionar las células corregidas, llevaron a una expresión residual de *BCR/ABL* superior a la deseada. Por el contrario, el sistema CRISPR-Trap mostró, tras la selección de las células editadas, una reducción de más del 80% en los niveles de expresión del oncogén, lo que supone una mejora sustancial en la eficiencia global del proceso en aquellos casos en los que es posible la selección celular previa al trasplante, como es el caso de las terapias basadas en CMH.

En conjunto, estos resultados demuestran que el sistema CRISPR-Trap es capaz de seleccionar adecuadamente las células *BCR/ABL* nulas, limita la existencia de los eventos residuales no editados con potencial oncogénico y otorga un beneficio terapéutico a largo plazo, en un modelo murino de LMC. Aunque serán necesarios más estudios para mejorar la eficiencia de los sistemas de entrega, edición y selección, estos resultados representan un avance en la terapia génica para enfermedades monogénicas hematológicas y ofrecen un nuevo enfoque para la selección de las células correctamente editadas previa al Alo-TMO. Así mismo, el sistema CRISPR-Trap diseñado constituye la prueba de concepto de una estrategia versátil para la monitorización de la eliminación génica, aplicable a cualquier secuencia genómica.

Desde su descripción, el sistema CRISPR/Cas9, ha constituido una herramienta de gran potencial en biología molecular, mediante la generación de modelos *in vitro* e *in vivo* para el estudio de la función génica. En pocos años, las numerosas modificaciones del sistema han abierto todo un abanico de posibles aplicaciones, de entre las cuales, una de las más atractivas es la terapia génica. En este escenario, las neoplasias hematológicas, debido a la naturaleza misma de este tejido, proporcionan un escenario ideal para este tipo de terapia. La posibilidad de extraer las células madre hematológicas leucémicas de un paciente, editarlas *ex vivo* y reinfundirlas tras la ablación de su medula ósea, convierte a la terapia génica mediante CRISPR/Cas9 en una opción terapéutica real. Aunque aún son necesarios nuevos estudios que aumenten la seguridad y la eficiencia del procedimiento, los resultados de esta tesis doctoral demuestran, en su conjunto, la capacidad de este sistema para eliminar la expresión del oncogén *BCR/ABL* humano en células madre hematopoyéticas, manteniendo su multipotencialidad y, por lo tanto, su capacidad para restaurar la hematopoyesis fisiológica tras ser trasplantadas, postulándolo así, como una nueva aproximación terapéutica en pacientes de leucemia mieloide crónica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El sistema CRISPR/Cas9 dirigido hacia las secuencias implicadas en el procesamiento intrónico aumenta la eficiencia de generación de alelos nulos con respecto a las estrategias clásicas, dirigidas hacia secuencias internas exónicas.
2. El diseño CRISPR/Cas9 dual, compuesto por dos guías próximas entre sí, supone una mejora en el proceso de generación de alelos nulos con respecto al sistema clásico de guía única, induciendo de forma preferencial deleciones específicas y ofreciendo un robusto sistema de monitorización de las células editadas.
3. El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén *BCR/ABL* en células madre leucémicas murinas, manteniendo su multipotencia y corrigiendo su actividad mieloproliferativa en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico.
4. El sistema CRISPR/Cas9 dual elimina eficientemente el oncogén *BCR/ABL* en células madre leucémicas humanas, procedentes de pacientes de LMC, anulando su potencial oncogénico *in vitro*.
5. Las células madre leucémicas humanas, corregidas para *BCR/ABL*, mantienen su multipotencia, dando lugar a una hematopoyesis fisiológica, sin síntomas clínicos de la enfermedad, en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico derivado de paciente.
6. La aproximación CRISPR-Trap constituye una estrategia terapéutica potencial que permite la selección *in vitro* de las células en las que la expresión de *BCR/ABL* ha sido eliminada, reduciendo los eventos residuales sin editar, con potencial oncogénico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kondo, M.; Wagers, A.J.; Manz, M.G.; Prohaska, S.S.; Scherer, D.C.; Beilhack, G.F.; Shizuru, J.A.; Weissman, I.L. Biology of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors: Implications for Clinical Application. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 759–806, doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.21.120601.141007.
2. Weissman, I.L. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* **2000**, *100*, 157–168, doi:10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
3. Weissman, I.L.; Shizuru, J.A. The Origins of the Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells, and Their Capability to Induce Donor-Specific Transplantation Tolerance and Treat Autoimmune Diseases. *Blood* **2008**, *112*, 3543–3553, doi:10.1182/BLOOD-2008-08-078220.
4. Lanza, F.; Healy, L.E.; Sutherland, D.R. Structural and Functional Features of the CD34 Antigen: An Update. *Artic. J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2001**.
5. Harrison, D.E.; Zhong, R.K. The Same Exhaustible Multilineage Precursor Produces Both Myeloid and Lymphoid Cells as Early as 3–4 Weeks after Marrow Transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 10134–10138, doi:10.1073/PNAS.89.21.10134.
6. Morrison, S.J.; Weissman, I.L. The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype. *Immunity* **1994**, *1*, 661–673, doi:10.1016/1074-7613(94)90037-X.
7. Morrison, S.J.; Wandycz, A.M.; Hemmati, H.D.; Wright, D.E.; Weissman, I.L. Identification of a Lineage of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Development* **1997**, *124*, 1929–1939, doi:10.1242/DEV.124.10.1929.
8. Adolfsson, J.; Månsson, R.; Buza-Vidas, N.; Hultquist, A.; Liuba, K.; Jensen, C.T.; Bryder, D.; Yang, L.; Borge, O.J.; Thoren, L.A.M.; et al. Identification of Flt3⁺ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential a Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell* **2005**, *121*, 295–306, doi:10.1016/J.CELL.2005.02.013.
9. Benz, C.; Copley, M.R.; Kent, D.G.; Wohrer, S.; Cortes, A.; Aghaeepour, N.; Ma, E.; Mader, H.; Rowe, K.; Day, C.; et al. Hematopoietic Stem Cell Subtypes Expand Differentially during Development and Display Distinct Lymphopoietic Programs. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 273–283, doi:10.1016/J.STEM.2012.02.007.
10. Dykstra, B.; Kent, D.; Bowie, M.; McCaffrey, L.; Hamilton, M.; Lyons, K.; Lee, S.J.; Brinkman, R.; Eaves, C. Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs in Vivo. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 218–229, doi:10.1016/J.STEM.2007.05.015.
11. Ema, H.; Morita, Y.; Suda, T. Heterogeneity and Hierarchy of Hematopoietic Stem Cells. *Exp. Hematol.* **2014**, *42*, 74–82.e2, doi:10.1016/J.EXPHEM.2013.11.004.
12. Sanjuan-Pla, A.; Macaulay, I.C.; Jensen, C.T.; Woll, P.S.; Luis, T.C.; Mead, A.; Moore, S.; Carella, C.; Matsuoka, S.; Jones, T.B.; et al. Platelet-Biased Stem Cells Reside at the Apex of the Haematopoietic Stem-Cell Hierarchy. *Nature* **2013**, *502*, 232–236, doi:10.1038/NATURE12495.
13. Akashi, K.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I.L. A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages. *Nature* **2000**, *404*, 193–197, doi:10.1038/35004599.
14. Suda, T.; Arai, F.; Hirao, A. Hematopoietic Stem Cells and Their Niche. *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 426–433, doi:10.1016/J.IT.2005.06.006.
15. Sipkins, D.A.; Wei, X.; Wu, J.W.; Runnels, J.M.; Côté, D.; Means, T.K.; Luster, A.D.; Scadden, D.T.; Lin, C.P. In Vivo Imaging of Specialized Bone Marrow Endothelial Microdomains for Tumour Engraftment. *Nature* **2005**, *435*, 969–973, doi:10.1038/NATURE03703.
16. Tabe, Y.; Konopleva, M. Role of Microenvironment in Resistance to Therapy in AML. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2015**, *10*, 96–103, doi:10.1007/S11899-015-0253-6.
17. Jin, L.; Hope, K.J.; Zhai, Q.; Smadja-Joffe, F.; Dick, J.E. Targeting of CD44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1167–1174, doi:10.1038/NM1483.
18. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver, Which Death Took Place from Suppuration of the Blood / by John Hughes Bennett. | Wellcome Collection.
19. Virchow: Weisses Blut Und Milztumoren

20. Friedreich, N. Ein Neuer Fall von Leukämie. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.* **1857**, *12*, 37–58, doi:10.1007/BF01938747.
21. Neumann: Ueber Myelogene Leukämie
22. Fraenkel, A. Ueber Acute Leukämie1). *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **2009**, *21*, 639–642, doi:10.1055/S-0029-1199965.
23. Turk: Ein System Der Lymphomatosen
24. NOWELL, P. A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science (80-.)*. **1960**.
25. Baikie, A.G.; Court-Brown, W.M.; Buckton, K.E.; Harnden, D.G.; Jacobs, P.A.; Tough, I.M. A Possible Specific Chromosome Abnormality in Human Chronic Myeloid Leukaemia. *Nature* **1960**, *188*, 1165–1166, doi:10.1038/1881165A0.
26. Tough, I.M.; Baikie, A.G.; Harnden, D.G.; King, M.J.; Court Brown, W.M.; Buckton, K.E.; Jacobs, P.A.; McBride, J.A. Cytogenetic Studies in Chronic Myeloid Leukaemia and Acute Leukaemia Associated with Monogolism. *Lancet (London, England)* **1961**, *1*, 411–417, doi:10.1016/S0140-6736(61)90001-0.
27. Caspersson, T.; Gahrton, G.; Lindsten, J.; Zech, L. Identification of the Philadelphia Chromosome as a Number 22 by Quinacrine Mustard Fluorescence Analysis. *Exp. Cell Res.* **1970**, *63*, 238–240, doi:10.1016/0014-4827(70)90362-9.
28. Rowley, J.D. Letter: A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **1973**, *243*, 290–293, doi:10.1038/243290A0.
29. Bartram, C.R.; De Klein, A.; Hagemeijer, A.; Van Agthoven, T.; Van Kessel, A.G.; Bootsma, D.; Grosveld, G.; Ferguson-smith, M.A.; Davies, T.; Stone, M.; et al. Translocation of C-Ab1 Oncogene Correlates with the Presence of a Philadelphia Chromosome in Chronic Myelocytic Leukaemia. *Nature* **1983**, *306*, 277–280, doi:10.1038/306277A0.
30. Klein, A. De; Kessel, A.G. Van; Grosveld, G.; Bartram, C.R.; Hagemeijer, A.; Bootsma, D.; Spurr, N.K.; Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Stephenson, J.R. A Cellular Oncogene Is Translocated to the Philadelphia Chromosome in Chronic Myelocytic Leukaemia. *Nat.* **1982** *3005894* **1982**, *300*, 765–767, doi:10.1038/300765a0.
31. Groffen, J.; Stephenson, J.R.; Heisterkamp, N.; de Klein, A.; Bartram, C.R.; Grosveld, G. Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, Bcr, on Chromosome 22. *Cell* **1984**, *36*, 93–99, doi:10.1016/0092-8674(84)90077-1.
32. Konopka, J.B.; Watanabe, S.M.; Witte, O.N. An Alteration of the Human C-Abl Protein in K562 Leukemia Cells Unmasks Associated Tyrosine Kinase Activity. *Cell* **1984**, *37*, 1035–1042, doi:10.1016/0092-8674(84)90438-0.
33. Jabbour, E.; Kantarjian, H. Chronic Myeloid Leukemia: 2022 Update on Diagnosis, Therapy and Monitoring. *Am. J. Hematol.* **2022**, doi:10.1002/AJH.26642.
34. Mendizabal, A.M.; Garcia-Gonzalez, P.; Levine, P.H. Regional Variations in Age at Diagnosis and Overall Survival among Patients with Chronic Myeloid Leukemia from Low and Middle Income Countries. *Cancer Epidemiol.* **2013**, *37*, 247–254, doi:10.1016/J.CANEP.2013.01.002.
35. Quintás-Cardama, A.; Cortes, J.E. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, *81*, 973–988, doi:10.4065/81.7.973.
36. Australian Institute of Health and Welfare (AIHW) (2014). Australian Cancer Incidence and Mortality (ACIM) Books: Chronic Myeloid Leukaemia. Canberra: AIHW. [Www.Aihw.Gov.Au/Acim-Books](http://www.aihw.gov.au/acim-books). Accessed 25 February 2014
37. Corso, A.; Lazzarino, M.; Morra, E.; Merante, S.; Astori, C.; Bernasconi, P.; Boni, M.; Bernasconi, C. Chronic Myelogenous Leukemia and Exposure to Ionizing Radiation--a Retrospective Study of 443 Patients. *Ann. Hematol.* **1995**, *70*, 79–82, doi:10.1007/BF01834384.
38. Anastasi, J.; Moinuddin, R.; Daugherty, C. The Juxtaposition of ABL with BCR and Risk for Fusion May Come at the Time of BCR Replication in Late S-Phase [1]. *Blood* **1999**, *94*, 1137–1138, doi:10.1182/blood.v94.3.1137.415a35a_1137_1138.
39. Branford, S.; Hughes, T.P.; Rudzki, Z. Monitoring Chronic Myeloid Leukaemia Therapy by Real-Time Quantitative PCR in Blood Is a Reliable Alternative to Bone Marrow Cytogenetics. *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 587–599, doi:10.1046/J.1365-2141.1999.01749.X.
40. Petzer, A.L.; Eaves, C.J.; Lansdorp, P.M.; Ponchio, L.; Barnett, M.J.; Eaves, A.C. Characterization of Primitive

- Subpopulations of Normal and Leukemic Cells Present in the Blood of Patients with Newly Diagnosed as Well as Established Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **1996**, 88, 2162–2171, doi:10.1182/blood.v88.6.2162.bloodjournal8862162.
41. Kantarjian, H.M.; Keating, M.J.; Talpaz, M.; Walters, R.S.; Smith, T.L.; Cork, A.; McCredie, K.B.; Freireich, E.J. Chronic Myelogenous Leukemia in Blast Crisis. Analysis of 242 Patients. *Am. J. Med.* **1987**, 83, 445–454, doi:10.1016/0002-9343(87)90754-6.
 42. Melo, J. V.; Barnes, D.J. Chronic Myeloid Leukemia: Biology of Advanced Phase. *Myeloproliferative Disord.* **2007**, 37–58, doi:10.1007/978-3-540-34506-0_3.
 43. Ilaria, R.L. Pathobiology of Lymphoid and Myeloid Blast Crisis and Management Issues. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* **2005**, 188–194, doi:10.1182/ASHEDUCATION-2005.1.188.
 44. Rowley, J.D. Special Lecture Molecular Cytogenetics: Rosetta Stone for Understanding Cancer—Twenty-Ninth G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *CANCER Res.* **1990**, 50, 3816–3825.
 45. Heim, S. Chromosomal Abnormalities in Solid Tumours. *Chromosom. Today* **1993**, 163–169, doi:10.1007/978-94-011-1510-0_12.
 46. Yunis, J.J. Recurrent Chromosomal Defects Are Found in Most Patients with Acute Nonlymphocytic Leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1984**, 11, 125–137, doi:10.1016/0165-4608(84)90106-7.
 47. Calkins, G.N. Zur Frage Der Entstehung Maligner Tumoren. By Th. Boveri. Jena, Gustav Fischer. 1914. 64 Pages. *Science* (80-.). **1914**, 40, 857–859, doi:10.1126/SCIENCE.40.1041.857.
 48. Takahashi, N.; Miura, I.; Saitoh, K.; Miura, A.B. Lineage Involvement of Stem Cells Bearing the Philadelphia Chromosome in Chronic Myeloid Leukemia in the Chronic Phase as Shown by a Combination of Fluorescence-Activated Cell Sorting and Fluorescence In Situ Hybridization. *Blood* **1998**, 92, 4758–4763, doi:10.1182/BLOOD.V92.12.4758.
 49. Biernaux, C.; Loos, M.; Sels, A.; Huez, G.; Stryckmans, P. Detection of Major Bcr-Abl Gene Expression at a Very Low Level in Blood Cells of Some Healthy Individuals. *Blood* **1995**, 86, 3118–3122, doi:10.1182/BLOOD.V86.8.3118.3118.
 50. Bose, S.; Deininger, M.; Gora-Tybor, J.; Goldman, J.M.; Melo, J. V. The Presence of Typical and Atypical BCR-ABL Fusion Genes in Leukocytes of Normal Individuals: Biologic Significance and Implications for the Assessment of Minimal Residual Disease. *Blood* **1998**, 92, 3362–3367, doi:10.1182/BLOOD.V92.9.3362.
 51. Laneuville, P.; Heisterkamp, N.; Groffen, J. Expression of the Chronic Myelogenous Leukemia-Associated P210bcr/Abl Oncoprotein in a Murine IL-3 Dependent Myeloid Cell Line. *Oncogene* **1991**, 6, 275–282.
 52. Warfvinge, R.; Geironsen, L.; Sommarin, M.N.E.; Lang, S.; Karlsson, C.; Roschupkina, T.; Stenke, L.; Stentoft, J.; Olsson-Stromberg, U.; Hjorth-Hansen, H.; et al. Single-Cell Molecular Analysis Defines Therapy Response and Immunophenotype of Stem Cell Subpopulations in CML. *Blood* **2017**, 129, 2384–2394, doi:10.1182/BLOOD-2016-07-728873.
 53. Laneuville, P.; Sun, G.; Timm, M.; Vekemans, M. Clonal Evolution in a Myeloid Cell Line Transformed to Interleukin-3 Independent Growth by Retroviral Transduction and Expression of P210bcr/Abl. *Blood* **1992**, 80, 1788–1797, doi:10.1182/BLOOD.V80.7.1788.1788.
 54. Daley, G.Q.; Van Etten, R.A.; Baltimore, D. Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/Abl Gene of the Philadelphia Chromosome. *Science* **1990**, 247, 824–830, doi:10.1126/SCIENCE.2406902.
 55. Mantioli, G.T. BCR-ABL Insufficiency for the Transformation of Human Stem Cells into CML. *Med. Hypotheses* **2002**, 59, 588–589, doi:10.1016/S0306-9877(02)00220-7.
 56. Herrmann, H.; Cerny-Reiterer, S.; Gleixner, K. V.; Blatt, K.; Herndlhofer, S.; Rabitsch, W.; Jäger, E.; Mitterbauer-Hohendanner, G.; Streubel, B.; Selzer, E.; et al. CD34+/CD38– Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia Express Siglec-3 (CD33) and Are Responsive to the CD33-Targeting Drug Gemtuzumab/Ozogamicin. *Haematologica* **2012**, 97, 219, doi:10.3324/HAEMATOL.2010.035006.
 57. Landberg, N.; von Palffy, S.; Askmyr, M.; Lilljebjörn, H.; Sandén, C.; Rissler, M.; Mustjoki, S.; Hjorth-Hansen, H.; Richter, J.; Ågerstam, H.; et al. CD36 Defines Primitive Chronic Myeloid Leukemia

- Cells Less Responsive to Imatinib but Vulnerable to Antibody-Based Therapeutic Targeting. *Haematologica* **2018**, *103*, 447–455, doi:10.3324/HAEMATOL.2017.169946.
58. Loscocco, F.; Visani, G.; Galimberti, S.; Curti, A.; Isidori, A. BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 939, doi:10.3389/FONC.2019.00939/BIBTEX .
 59. Jin, L.; Tabe, Y.; Konoplev, S.; Xu, Y.; Leysath, C.E.; Lu, H.; Kimura, S.; Ohsaka, A.; Rios, M.B.; Calvert, L.; et al. CXCR4 Up-Regulation by Imatinib Induces Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Cell Migration to Bone Marrow Stroma and Promotes Survival of Quiescent CML Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 48–58, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0042.
 60. Jeanpierre, S.; Arizkane, K.; Thongjuea, S.; Grockowiak, E.; Geistlich, K.; Barral, L.; Voeltzel, T.; Guillemain, A.; Gonin-Giraud, S.; Gandrillon, O.; et al. The Quiescent Fraction of Chronic Myeloid Leukemic Stem Cells Depends on BMPR1B, Stat3 and BMP4-Niche Signals to Persist in Patients in Remission. *Haematologica* **2021**, *106*, 111, doi:10.3324/HAEMATOL.2019.232793.
 61. Forkner CE (1938) Leukemia and Allied Disorders.
 62. Forkner, C.E.; Scott, T.F.M. Arsenic as a Therapeutic Agent in Chronic Myelogenous Leukemia: Preliminary Report. *J. Am. Med. Assoc.* **1931**, *97*, 3–5, doi:10.1001/jama.1931.02730010007002 .
 63. Lissauer: Zwei Fälle von Leucaemie
 64. Lancet, A.D.-T.; 1882, undefined NOTES ON A CASE OF LEUCOCYTHÆMIA.
 65. Pusey, W.A. REPORT OF CASES TREATED WITH ROENTGEN RAYS. *J. Am. Med. Assoc.* **1902**, *XXXVIII*, 911–919, doi:10.1001/JAMA.1902.624801500010 01.
 66. J., N.S.-N.M.; 1903, undefined Therapeutic Value of the Roentgen-Rays in the Treatment of Pseudoleucaemia. *ci.nii.ac.jp*.
 67. Galton, D.A.G. Myleran in Chronic Myeloid Leukaemia; Results of Treatment. *Lancet (London, England)* **1953**, *264*, 208–213, doi:10.1016/S0140-6736(53)90885-X.
 68. Allan, N.C.; Shepherd, P.C.A.; Richards, S.M. UK Medical Research Council Randomised, Multicentre Trial of Interferon-Alpha N1 for Chronic Myeloid Leukaemia: Improved Survival Irrespective of Cytogenetic Response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leuka. *Lancet (London, England)* **1995**, *345*, 1392–1397, doi:10.1016/S0140-6736(95)92596-1.
 69. Kennedy, B.J. Hydroxyurea in Chronic Myelogenous Leukemia. *Ann. Intern. Med.* **1969**, *70*, 1084, doi:10.7326/0003-4819-70-5-1084 3.
 70. Rushing, D.; Goldman, A.; Gibbs, G.; Howe, R.; Kennedy, B.J. Hydroxyurea versus Busulfan in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. *Am. J. Clin. Oncol.* **1982**, *5*, 307–313, doi:10.1097/00000421-198206000-00013.
 71. Talpaz, M.; Kantarjian, H.M.; McCredie, K.; Trujillo, J.M.; Keating, M.J.; Gutterman, J.U. Hematologic Remission and Cytogenetic Improvement Induced by Recombinant Human Interferon Alpha A in Chronic Myelogenous Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *314*, 1065–1069, doi:10.1056/NEJM198604243141701.
 72. Hehlmann, R.; Heimpel, H.; Hasford, J.; Kolb, H.J.; Pralle, H.; Hossfeld, D.K.; Queißer, W.; Löffler, H.; Hochhaus, A.; Heinze, B.; et al. Randomized Comparison of Interferon- α With Busulfan and Hydroxyurea in Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **1994**, *84*, 4064–4077, doi:10.1182/BLOOD.V84.12.4064.BLO ODJOURNAL84124064.
 73. Fefer, A.; Cheever, M.A.; Thomas, E.D.; Boyd, C.; Ramberg, R.; Glucksberg, H.; Buckner, C.D.; Storb, R. Disappearance of Ph1-Positive Cells in Four Patients with Chronic Granulocytic Leukemia after Chemotherapy, Irradiation and Marrow Transplantation from an Identical Twin. *N. Engl. J. Med.* **1979**, *300*, 333–337, doi:10.1056/NEJM197902153000702.
 74. Lübking, A.; Dreimane, A.; Sandin, F.; Isaksson, C.; Märkevärn, B.; Brune, M.; Ljungman, P.; Lenhoff, S.; Stenke, L.; Höglund, M.; et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia in the TKI Era: Population-Based Data from the Swedish CML Registry. *Bone Marrow Transplant.* **2019**, *54*, 1764–1774, doi:10.1038/S41409-019-0513-5.

75. Ljungman, P.; Urbano-Ispizua, A.; Cavazzana-Calvo, M.; Demirer, T.; Dini, G.; Einsele, H.; Gratwohl, A.; Madrigal, A.; Niederwieser, D.; Passweg, J.; et al. Allogeneic and Autologous Transplantation for Haematological Diseases, Solid Tumours and Immune Disorders: Definitions and Current Practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* **2006**, *37*, 439–449, doi:10.1038/SJ.BMT.1705265.
76. Gale, R.P.; Diger Hehlmann, R.; Zhang, M.-J.; Hasford, J.; Goldman, J.M.; Heimpel, H.; Hochhaus, A.; Klein, J.P.; Kolb, H.-J.; Mcglave, P.B.; et al. *Survival With Bone Marrow Transplantation Versus Hydroxyurea or Interferon for Chronic Myelogenous Leukemia*;
77. Van Rhee, F.; Szydlo, R.M.; Hermans, J.; Devergie, A.; Frassoni, F.; Arcese, W.; De Witte, T.; Kolb, H.J.; Niederwieser, D.; Jacobsen, N.; et al. Long-Term Results after Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase: A Report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **1997**, *20*, 553–560, doi:10.1038/sj.bmt.1700933.
78. Jean Dausset, D. Clin d'A Il a La Vie La Grande Aventure Du HLA. **1998**.
79. Goldman, J.M.; McCarthy, D.M.; Hows, J.M.; Catovsky, D.; Goolden, A.W.G.; Baughan, A.S.J.; Worsley, A.M.; Gordon-Smith, E.C.; Batchelor, J.R.; Galton, D.A.G. Marrow Transplantation for Patients in the Chronic Phase of Chronic Granulocytic Leukaemia. *Lancet (London, England)* **1982**, *2*, 623–625, doi:10.1016/S0140-6736(82)92736-2.
80. Bhatia, R.; Munthe, H.A.; Verfaillie, C.M. Tyrphostin AG957, a Tyrosine Kinase Inhibitor with Anti-BCR/ABL Tyrosine Kinase Activity Restores Beta1 Integrin-Mediated Adhesion and Inhibitory Signaling in Chronic Myelogenous Leukemia Hematopoietic Progenitors. *Leukemia* **1998**, *12*, 1708–1717, doi:10.1038/SJ.LEU.2401193.
81. Druker, B.J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G.M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N.B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 561–566, doi:10.1038/NM0596-561.
82. Deininger, M.W.N.; Goldman, J.M.; Lydon, N.; Melo, J. V. The Tyrosine Kinase Inhibitor CGP57148B Selectively Inhibits the Growth of BCR-ABL–Positive Cells. *Blood* **1997**, *90*, 3691–3698, doi:10.1182/BLOOD.V90.9.3691.
83. Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H.; research, T.M.-C.; 1996, undefined Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase in Vitro and in Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative. *AACR*.
84. Bower, H.; Björkholm, M.; Dickman, P.W.; Höglund, M.; Lambert, P.C.; Andersson, T.M.L. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2851–2857, doi:10.1200/JCO.2015.66.2866.
85. Deininger, M.; O'Brien, S.G.; Guilhot, F.; Goldman, J.M.; Hochhaus, A.; Hughes, T.P.; Radich, J.P.; Hatfield, A.K.; Mone, M.; Filian, J.; et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood* **2009**, *114*, 1126–1126, doi:10.1182/BLOOD.V114.22.1126.1126.
86. Graham, S.M.; Jørgensen, H.G.; Allan, E.; Pearson, C.; Alcorn, M.J.; Richmond, L.; Holyoake, T.L. Primitive, Quiescent, Philadelphia-Positive Stem Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia Are Insensitive to STI571 in Vitro. *Blood* **2002**, *99*, 319–325, doi:10.1182/BLOOD.V99.1.319.
87. Bocchia, M.; Sicuranza, A.; Abruzzese, E.; Iurlo, A.; Sirianni, S.; Gozzini, A.; Galimberti, S.; Aprile, L.; Martino, B.; Pregno, P.; et al. Residual Peripheral Blood CD26+ Leukemic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia Patients during TKI Therapy and during Treatment-Free Remission. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, doi:10.3389/FONC.2018.00194/FULL.
88. Milojkovic, D.; Apperley, J.F. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7519–7527, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1068.
89. Jabbour, E.; Kantarjian, H.; Cortes, J. Use of Second- and Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: An Evolving Treatment Paradigm. *Clin.*

- Lymphoma. Myeloma Leuk.* **2015**, *15*, 323–334, doi:10.1016/J.CLML.2015.03.006.
90. Bhamidipati, P.K.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Cornelison, A.M.; Jabbour, E. Management of Imatinib-Resistant Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2013**, *4*, 103–117, doi:10.1177/2040620712468289.
 91. Rosenberg, N.E.; Clark, D.R.; Witte, O.N. Abelson Murine Leukemia Virus Mutants Deficient in Kinase Activity and Lymphoid Cell Transformation. *J. Virol.* **1980**, *36*, 766–774, doi:10.1128/JVI.36.3.766-774.1980.
 92. Laneuville, P. Abl Tyrosine Protein Kinase. *Semin. Immunol.* **1995**, *7*, 255–266, doi:10.1006/SMIM.1995.0030.
 93. Pendergast, A.M. Nuclear Tyrosine Kinases: From Abl to WEE1. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 174–181, doi:10.1016/S0955-0674(96)80063-9.
 94. Clarkson, B.; Strife, A.; Wisniewski, D.; Lambek, C.L.; Liu, C. Chronic Myelogenous Leukemia as a Paradigm of Early Cancer and Possible Curative Strategies. *Leuk. 2003 177* **2003**, *17*, 1211–1262, doi:10.1038/sj.leu.2402912.
 95. Skorski, T.; Nieborowska-Skorska, M.; Wlodarski, P.; Wasik, M.; Trotta, R.; Kanakaraj, P.; Salomoni, P.; Antonyak, M.; Martinez, R.; Majewski, M.; et al. The SH3 Domain Contributes to BCR/ABL-Dependent Leukemogenesis In Vivo: Role in Adhesion, Invasion, and Homing. *Blood* **1998**, *91*, 406–418, doi:10.1182/BLOOD.V91.2.406.
 96. Van Etten, R.A.; Jackson, P.; Baltimore, D. The Mouse Type IV C-Abl Gene Product Is a Nuclear Protein, and Activation of Transforming Ability Is Associated with Cytoplasmic Localization. *Cell* **1989**, *58*, 669–678, doi:10.1016/0092-8674(89)90102-5.
 97. Kipreos, E.T.; Wang, J.Y.J. Cell Cycle-Regulated Binding of c-Abl Tyrosine Kinase to DNA. *Science* **1992**, *256*, 382–385, doi:10.1126/SCIENCE.256.5055.382.
 98. Mcwhirter, J.R.; Wang, J.Y.J. An Actin-Binding Function Contributes to Transformation by the Bcr-Abl Oncoprotein of Philadelphia Chromosome-Positive Human Leukemias. *EMBO J.* **1993**, *12*, 1533, doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05797.x.
 99. Daley, G.Q.; Ben-Neriah, Y. Implicating the Bcr/Abl Gene in the Pathogenesis of Philadelphia Chromosome-Positive Human Leukemia. *Adv. Cancer Res.* **1991**, *57*, 151–184, doi:10.1016/S0065-230X(08)60998-7.
 100. Kipreos, E.T.; Wang, J.Y.J. Differential Phosphorylation of C-Abl in Cell Cycle Determined by Cdc2 Kinase and Phosphatase Activity. *Science* **1990**, *248*, 217–220, doi:10.1126/SCIENCE.2183353.
 101. Yuan, Z.M.; Shioya, H.; Ishiko, T.; Sun, X.; Gu, J.; Huang, Y.; Lu, H.; Kharbada, S.; Weichselbaum, R.; Kufe, D. P73 Is Regulated by Tyrosine Kinase C-Abl in the Apoptotic Response to DNA Damage. *Nature* **1999**, *399*, 814–817, doi:10.1038/21704.
 102. Lewis, J.M.; Schwartz, M.A. Integrins Regulate the Association and Phosphorylation of Paxillin by C-Abl. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14225–14230, doi:10.1074/JBC.273.23.14225.
 103. Tybulewicz, V.L.J.; Crawford, C.E.; Jackson, P.K.; Bronson, R.T.; Mulligan, R.C. Neonatal Lethality and Lymphopenia in Mice with a Homozygous Disruption of the C-Abl Proto-Oncogene. *Cell* **1991**, *65*, 1153–1163, doi:10.1016/0092-8674(91)90011-M.
 104. Reuther, G.W.; Fu, H.; Cripe, L.D.; Collier, R.J.; Pendergast, A.M. Association of the Protein Kinases C-Bcr and Bcr-Abl with Proteins of the 14-3-3 Family. *Science* **1994**, *266*, 129–133, doi:10.1126/SCIENCE.7939633.
 105. McWhirter, J.R.; Galasso, D.L.; Wang, J.Y. A Coiled-Coil Oligomerization Domain of Bcr Is Essential for the Transforming Function of Bcr-Abl Oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 7587–7595, doi:10.1128/MCB.13.12.7587-7595.1993.
 106. Denhardt, D.T. Signal-Transducing Protein Phosphorylation Cascades Mediated by Ras/Rho Proteins in the Mammalian Cell: The Potential for Multiplex Signalling. *Biochem. J.* **1996**, *318* (Pt 3, 729–747, doi:10.1042/BJ3180729.
 107. Montaner, S.; Perona, R.; Saniger, L.; Lacal, J.C. Multiple Signalling Pathways Lead to the Activation of the Nuclear Factor KappaB by the Rho Family of GTPases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12779–12785, doi:10.1074/JBC.273.21.12779.
 108. Diekmann, D.; Brill, S.; Garrett, M.D.; Totty, N.; Hsuan, J.; Monfries, C.; Hall, C.; Lim, L.; Hall, A. Bcr Encodes a

- GTPase-Activating Protein for P21rac. *Nature* **1991**, 351, 400–402, doi:10.1038/351400A0.
109. Wu, Y.; Liu, J.; Arlinghaus, R.B. Requirement of Two Specific Tyrosine Residues for the Catalytic Activity of Bcr Serine/Threonine Kinase. *Oncogene* **1998**, 16, 141–146, doi:10.1038/SJ.ONC.1201524.
 110. Ma, G.; Lu, D.; Wu, Y.; Liu, J.; Arlinghaus, R.B. Bcr Phosphorylated on Tyrosine 177 Binds Grb2. *Oncogene* **1997**, 14, 2367–2372, doi:10.1038/SJ.ONC.1201053.
 111. Liu, J.; Wu, Y.; Ma, G.Z.; Lu, D.; Haataja, L.; Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Arlinghaus, R.B. Inhibition of Bcr Serine Kinase by Tyrosine Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 998–1005, doi:10.1128/MCB.16.3.998.
 112. Campbell, M.L.; Arlinghaus, R.B. Current Status of the BCR Gene and Its Involvement with Human Leukemia. *Adv. Cancer Res.* **1991**, 57, 227–256, doi:10.1016/S0065-230X(08)61000-3.
 113. Voncken, J.W.; Schaick, H. van; Kaartinen, V.; Deemer, K.; Coates, T.; Landing, B.; Pattengale, P.; Dorseuil, O.; Bokoch, G.M.; Groffen, J.; et al. Increased Neutrophil Respiratory Burst in Bcr-Null Mutants. *Cell* **1995**, 80, 719–728, doi:10.1016/0092-8674(95)90350-X.
 114. Li, S.; Ilaria, R.L.; Million, R.P.; Daley, G.Q.; Van Etten, R.A. The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia-like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity. *J. Exp. Med.* **1999**, 189, 1399–1412, doi:10.1084/JEM.189.9.1399.
 115. Melo, J. V. The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. *Blood* **1996**, 88, 2375–2384, doi:10.1182/BLOOD.V88.7.2375.BLOODJOURNAL8872375.
 116. Lifshitz, B.; Fainstein, E.; Marcelle, C.; Shtivelman, E.; Amson, R.; Gale, R.P.; Canaani, E. Bcr Genes and Transcripts. *Oncogene* **1988**, 2, 113–117.
 117. Franz, W.M.; Berger, P.; Wang, J.Y.J. Deletion of an N-Terminal Regulatory Domain of the c-Abl Tyrosine Kinase Activates Its Oncogenic Potential. *EMBO J.* **1989**, 8, 137, doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb03358.x.
 118. Shtivelman, E.; Lifshitz, B.; Gale, R.P.; Canaani, E. Fused Transcript of Abl and Bcr Genes in Chronic Myelogenous Leukaemia. *Nature* **1985**, 315, 550–554, doi:10.1038/315550A0.
 119. Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Stephenson, J.R.; Spurr, N.K.; Goodfellow, P.N.; Solomon, E.; Carritt, B.; Bodmer, W.F. Chromosomal Localization of Human Cellular Homologues of Two Viral Oncogenes. *Nat.* 1982 2995885 **1982**, 299, 747–749, doi:10.1038/299747a0.
 120. Heim, S.; Mitelman, F. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. **2015**, 645.
 121. Liu, L.G.; Tanaka, H.; Ito, K.; Kyo, T.; Ito, T.; Kimura, A. Chronic Myelogenous Leukemia with E13a3 (B2a3) Type of BCR-ABL Transcript Having a DNA Breakpoint between ABL Exons A2 and A3. *Am. J. Hematol.* **2003**, 74, 268–272, doi:10.1002/AJH.10429.
 122. Chen, S.J.; Chen, Z.; Grausz, J.D.; Hillion, J.; D'Auriol, L.; Flandrin, G.; Larsen, C.J.; Berger, R. Molecular Cloning of a 5' Segment of the Genomic Phl Gene Defines a New Breakpoint Cluster Region (Bcr2) in Philadelphia-Positive Acute Leukemias. *Leukemia* **1988**, 2, 634–641.
 123. Denny, C.T.; Shah, N.P.; Ogden, S.; Willman, C.; McConnell, T.; Crist, W.; Carroll, A.; Witte, O.N. Localization of Preferential Sites of Rearrangement within the BCR Gene in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, 86, 4254–4258, doi:10.1073/PNAS.86.11.4254.
 124. Erikson, J.; Griffin, C.A.; Ar-Rushdi, A.; Valtieri, M.; Hoxie, J.; Finan, J.; Emanuel, B.S.; Rovera, G.; Nowell, P.C.; Croce, C.M. Heterogeneity of Chromosome 22 Breakpoint in Philadelphia-Positive (Ph+) Acute Lymphocytic Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 1807–1811, doi:10.1073/PNAS.83.6.1807.
 125. Lugo, T.G.; Pendergast, A.M.; Muller, A.J.; Witte, O.N. Tyrosine Kinase Activity and Transformation Potency of Bcr-Abl Oncogene Products. *Science* **1990**, 247, 1079–1082, doi:10.1126/SCIENCE.2408149.
 126. Daley, G.Q.; McLaughlin, J.; Witte, O.N.; Baltimore, D. The CML-Specific P210 Bcr/Abl Protein, Unlike v-Abl, Does Not Transform NIH/3T3 Fibroblasts. *Science* **1987**, 237, 532–535, doi:10.1126/SCIENCE.2440107.
 127. Dreazen, O.; Rassool, F.; Sparkes, R.S.;

- Klisak, I.; Goldman, J.M.; Gale, R.P. Do Oncogenes Determine Clinical Features in Chronic Myeloid Leukaemia? *Lancet (London, England)* **1987**, *1*, 1402–1405, doi:10.1016/S0140-6736(87)90594-0.
128. Pane, F.; Frigeri, F.; Sindona, M.; Luciano, L.; Ferrara, F.; Cimino, R.; Meloni, G.; Saglio, G.; Salvatore, F.; Rotoli, B. Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A Distinct Disease With a Specific Molecular Marker (BCR/ABL With C3/A2 Junction). *Blood* **1996**, *88*, 2410–2414, doi:10.1182/BLOOD.V88.7.2410.BLOODJOURNAL8872410.
 129. Wilson, G.; Frost, L.; Goodeve, A.; Vandenberghe, E.; Peake, I.; Reilly, J. BCR-ABL Transcript With an E19a2 (C3a2) Junction in Classical Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **1997**, *89*, 3064, doi:10.1182/BLOOD.V89.8.3064.
 130. Golub, T.R.; Goga, A.; Barker, G.F.; Afar, D.E.; McLaughlin, J.; Bohlander, S.K.; Rowley, J.D.; Witte, O.N.; Gilliland, D.G. Oligomerization of the ABL Tyrosine Kinase by the Ets Protein TEL in Human Leukemia. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4107–4116, doi:10.1128/MCB.16.8.4107.
 131. Papadopoulos, P.; Ridge, S.A.; Boucher2, C.A.; Stocking, C.; Wiedemann3, L.M. The Novel Activation of ABL by Fusion to an Ete-Related Gene, TEL1.
 132. Gordon, M.Y.; Dowding, C.R.; Riley, G.P.; Goldman, J.M.; Greaves, M.F. Altered Adhesive Interactions with Marrow Stroma of Haematopoietic Progenitor Cells in Chronic Myeloid Leukaemia. *Nature* **1987**, *328*, 342–344, doi:10.1038/328342A0.
 133. Puil, L.; Liu, J.; Gish, G.; Mbamalu, G.; Bowtell, D.; Pelicci, P.G.; Arlinghaus, R.; Pawson, T. Bcr-Abl Oncoproteins Bind Directly to Activators of the Ras Signalling Pathway. *EMBO J.* **1994**, *13*, 764, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06319.x.
 134. Bedi, A.; Zehnbaue, B.A.; Barber, J.P.; Sharkis, S.J.; Jones, R.J. Inhibition of Apoptosis by BCR-ABL in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **1994**, *83*, 2038–2044, doi:10.1182/BLOOD.V83.8.2038.2038.
 135. Verfaillie, C.M.; Hurley, R.; Lundell, B.I.; Zhao, C.; Bhatia, R. Integrin-Mediated Regulation of Hematopoiesis: Do BCR/ABL-Induced Defects in Integrin Function Underlie the Abnormal Circulation and Proliferation of CML Progenitors? *Acta Haematol.* **1997**, *97*, 40–52, doi:10.1159/000203658.
 136. Bhatia, R.; Wayner, E.A.; McGlave, P.B.; Verfaillie, C.M. Interferon-Alpha Restores Normal Adhesion of Chronic Myelogenous Leukemia Hematopoietic Progenitors to Bone Marrow Stroma by Correcting Impaired Beta 1 Integrin Receptor Function. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 384–391, doi:10.1172/JCI117333.
 137. Bruns, I.; Czibere, A.; Fischer, J.C.; Roels, F.; Cadeddu, R.P.; Buest, S.; Bruennert, D.; Huenerlituerkoglu, A.N.; Stoecklein, N.H.; Singh, R.; et al. The Hematopoietic Stem Cell in Chronic Phase CML Is Characterized by a Transcriptional Profile Resembling Normal Myeloid Progenitor Cells and Reflecting Loss of Quiescence. *Leukemia* **2009**, *23*, 892–899, doi:10.1038/LEU.2008.392.
 138. Chang, Y.C.; Tien, S.C.; Tien, H.F.; Zhang, H.; Bokoch, G.M.; Chang, Z.F. P210(Bcr-Abl) Desensitizes Cdc42 GTPase Signaling for SDF-1alpha-Directed Migration in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Oncogene* **2009**, *28*, 4105–4115, doi:10.1038/ONC.2009.260.
 139. Oda, T.; Heaney, C.; Hagopian, J.R.; Okuda, K.; Griffin, J.D.; Druker, B.J. Crkl Is the Major Tyrosine-Phosphorylated Protein in Neutrophils from Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22925–22928, doi:10.1016/S0021-9258(17)31596-X.
 140. Uemura, N.; Griffin, J.D. The Adapter Protein Crkl Links Cbl to C3G after Integrin Ligation and Enhances Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37525–37532, doi:10.1074/JBC.274.53.37525.
 141. Jain, S.K.; Langdon, W.Y.; Varticovski, L. Tyrosine Phosphorylation of P120(Cbl) in BCR/Abl Transformed Hematopoietic Cells Mediates Enhanced Association with Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Oncogene* **1997**, *14*, 2217–2228, doi:10.1038/sj.onc.1201049.
 142. Pendergast, A.M.; Quilliam, L.A.; Cripe, L.D.; Bassing, C.H.; Dai, Z.; Li, N.; Batzer, A.; Rabun, K.M.; Der, C.J.; Schlessinger, J.; et al. BCR-ABL-Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein. *Cell* **1993**, *75*, 175–185, doi:10.1016/S0092-8674(05)80094-7.
 143. Bonati, A.; Carlo-Stella, C.; Lunghi, P.; Albertini, R.; Pinelli, S.; Migliaccio, E.; Sammarelli, G.; Savoldo, B.; Tabilio, A.; Dall'Aglia, P.P.; et al. Selective

- Expression and Constitutive Phosphorylation of SHC Proteins [Corrected] in the CD34+ Fraction of Chronic Myelogenous Leukemias. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 728–732.
144. Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H.F.; Marshall, C.J. Ras Recruits Raf-1 to the Plasma Membrane for Activation by Tyrosine Phosphorylation. *EMBO J.* **1995**, *14*, 3136, doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07316.x.
 145. Skorski, T.; Bellacosa, A.; Nieborowska-Skorska, M.; Majewski, M.; Martinez, R.; Choi, J.K.; Trotta, R.; Wlodarski, P.; Perrotti, D.; Chan, T.O.; et al. Transformation of Hematopoietic Cells by BCR/ABL Requires Activation of a PI-3k/Akt-Dependent Pathway. *EMBO J.* **1997**, *16*, 6151–6161, doi:10.1093/EMBOJ/16.20.6151.
 146. Franke, T.F.; Kaplan, D.R.; Cantley, L.C. PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell* **1997**, *88*, 435–437, doi:10.1016/S0092-8674(00)81883-8.
 147. Ilaria, R.L.; Van Etten, R.A. P210 and P190(BCR/ABL) Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31704–31710, doi:10.1074/JBC.271.49.31704.
 148. Sawyers, C.L.; Callahan, W.; Witte, O.N. Dominant Negative MYC Blocks Transformation by ABL Oncogenes. *Cell* **1992**, *70*, 901–910, doi:10.1016/0092-8674(92)90241-4.
 149. Zou, X.; Rudchenko, S.; Wong, K.K.; Calame, K. Induction of C-Myc Transcription by the v-Abl Tyrosine Kinase Requires Ras, Raf1, and Cyclin-Dependent Kinases. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 654–662, doi:10.1101/GAD.11.5.654.
 150. Cortez, D.; Kadlec, L.; Pendergast, A.M. Structural and Signaling Requirements for BCR-ABL-Mediated Transformation and Inhibition of Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 5531–5541, doi:10.1128/MCB.15.10.5531.
 151. Amarante-Mendes, G.P.; Kim, C.N.; Liu, L.; Huang, Y.; Perkins, C.L.; Green, D.R.; Bhalla, K. Bcr-Abl Exerts Its Antiapoptotic Effect Against Diverse Apoptotic Stimuli Through Blockage of Mitochondrial Release of Cytochrome C and Activation of Caspase-3. *Blood* **1998**, *91*, 1700–1705, doi:10.1182/BLOOD.V91.5.1700.
 152. Dubrez, L.; Eymin, B.; Sordet, O.; Droin, N.; Turhan, A.G.; Solary, E. BCR-ABL Delays Apoptosis Upstream of Procaspase-3 Activation. *Blood* **1998**, *91*, 2415–2422, doi:10.1182/BLOOD.V91.7.2415.
 153. Sánchez-García, I.; Martín-Zanca, D. Regulation of Bcl-2 Gene Expression by BCR-ABL Is Mediated by Ras. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 225–228, doi:10.1006/JMBI.1996.0779.
 154. Wang, H.G.; Rapp, U.R.; Reed, J.C. Bcl-2 Targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. *Cell* **1996**, *87*, 629–638, doi:10.1016/S0092-8674(00)81383-5.
 155. Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J.; Korsmeyer, S.J. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-X(L). *Cell* **1996**, *87*, 619–628, doi:10.1016/S0092-8674(00)81382-3.
 156. Gabriele, L.; Phung, J.; Fukumoto, J.; Segal, D.; Wang, I.M.; Giannakakou, P.; Giese, N.A.; Ozato, K.; Morse, H.C. Regulation of Apoptosis in Myeloid Cells by Interferon Consensus Sequence-Binding Protein. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 411–421, doi:10.1084/JEM.190.3.411.
 157. Holtschke, T.; Löhler, J.; Kanno, Y.; Fehr, T.; Giese, N.; Rosenbauer, F.; Lou, J.; Knobloch, K.P.; Gabriele, L.; Waring, J.F.; et al. Immunodeficiency and Chronic Myelogenous Leukemia-like Syndrome in Mice with a Targeted Mutation of the ICSBP Gene. *Cell* **1996**, *87*, 307–317, doi:10.1016/S0092-8674(00)81348-3.
 158. Rothstein, R.J. One-Step Gene Disruption in Yeast. *Methods Enzymol.* **1983**, *101*, 202–211, doi:10.1016/0076-6879(83)01015-0.
 159. Smithies, O.; Gregg, R.G.; Boggs, S.S.; Koralewski, M.A.; Kucherlapati, R.S. Insertion of DNA Sequences into the Human Chromosomal Beta-Globin Locus by Homologous Recombination. *Nature* **1985**, *317*, 230–234, doi:10.1038/317230A0.
 160. Thomas, K.R.; Folger, K.R.; Capecchi, M.R. High Frequency Targeting of Genes to Specific Sites in the Mammalian Genome. *Cell* **1986**, *44*, 419–428, doi:10.1016/0092-8674(86)90463-0.
 161. Mansour, S.L.; Thomas, K.R.; Capecchi, M.R. Disruption of the Proto-Oncogene Int-2 in Mouse Embryo-Derived Stem Cells: A General Strategy for Targeting Mutations to Non-Selectable Genes. *Nature* **1988**, *336*, 348–352, doi:10.1038/336348A0.
 162. Sander, J.D.; Joung, J.K. CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes. *Nat. Biotechnol.*

- 2014, 32, 347–350, doi:10.1038/NBT.2842.
163. Chiruvella, K.K.; Liang, Z.; Wilson, T.E. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012757, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A012757.
164. Karanam, K.; Kafri, R.; Loewer, A.; Lahav, G. Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 320–329, doi:10.1016/J.MOLCEL.2012.05.052.
165. Heyer, W.D.; Ehmsen, K.T.; Liu, J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 113–139, doi:10.1146/ANNUREV-GENET-051710-150955.
166. Carroll, D. Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 409–439, doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060713-035418.
167. Urnov, F.D.; Rebar, E.J.; Holmes, M.C.; Zhang, H.S.; Gregory, P.D. Genome Editing with Engineered Zinc Finger Nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 636–646, doi:10.1038/nrg2842.
168. Kim, H.; Kim, J.S. A Guide to Genome Engineering with Programmable Nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 321–334, doi:10.1038/nrg3686.
169. Perez, E.E.; Wang, J.; Miller, J.C.; Jouvenot, Y.; Kim, K.A.; Liu, O.; Wang, N.; Lee, G.; Bartsevich, V. V.; Lee, Y.L.; et al. Establishment of HIV-1 Resistance in CD4⁺ T Cells by Genome Editing Using Zinc-Finger Nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 808–816, doi:10.1038/NBT1410.
170. Li, H.; Haurigot, V.; Doyon, Y.; Li, T.; Wong, S.Y.; Bhagwat, A.S.; Malani, N.; Anguela, X.M.; Sharma, R.; Ivanciu, L.; et al. In Vivo Genome Editing Restores Haemostasis in a Mouse Model of Haemophilia. *Nature* **2011**, *475*, 217–221, doi:10.1038/NATURE10177.
171. Joung, J.K.; Sander, J.D. TALENs: A Widely Applicable Technology for Targeted Genome Editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 49–55, doi:10.1038/NRM3486.
172. Deng, D.; Yan, C.; Pan, X.; Mahfouz, M.; Wang, J.; Zhu, J.K.; Shi, Y.; Yan, N. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* **2012**, *335*, 720–723, doi:10.1126/SCIENCE.1215670.
173. Li, T.; Liu, B.; Spalding, M.H.; Weeks, D.P.; Yang, B. High-Efficiency TALEN-Based Gene Editing Produces Disease-Resistant Rice. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 390–392, doi:10.1038/NBT.2199.
174. Osborn, M.J.; Starker, C.G.; McElroy, A.N.; Webber, B.R.; Riddle, M.J.; Xia, L.; Defeo, A.P.; Gabriel, R.; Schmidt, M.; Von Kalle, C.; et al. TALEN-Based Gene Correction for Epidermolysis Bullosa. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1151–1159, doi:10.1038/MT.2013.56.
175. Anguela, X.M.; Sharma, R.; Doyon, Y.; Miller, J.C.; Li, H.; Haurigot, V.; Rohde, M.E.; Wong, S.Y.; Davidson, R.J.; Zhou, S.; et al. Robust ZFN-Mediated Genome Editing in Adult Hemophilic Mice. *Blood* **2013**, *122*, 3283–3287, doi:10.1182/BLOOD-2013-04-497354.
176. Wefers, B.; Ortiz, O.; Wurst, W.; Kühn, R. Generation of Targeted Mouse Mutants by Embryo Microinjection of TALENs. *Methods* **2014**, *69*, 94–101, doi:10.1016/J.YMETH.2014.01.002.
177. Gupta, R.M.; Musunuru, K. Expanding the Genetic Editing Tool Kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 4154–4161, doi:10.1172/JCI72992.
178. Makarova, K.S.; Wolf, Y.I.; Alkhnbashi, O.S.; Costa, F.; Shah, S.A.; Saunders, S.J.; Barrangou, R.; Brouns, S.J.J.; Charpentier, E.; Haft, D.H.; et al. An Updated Evolutionary Classification of CRISPR–Cas Systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 722–736, doi:10.1038/nrmicro3569.
179. Mojica, F.J.M.; Juez, G.; Rodriguez-Valera, F. Transcription at Different Salinities of *Haloferax Mediterranei* Sequences Adjacent to Partially Modified PstI Sites. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 613–621, doi:10.1111/J.1365-2958.1993.TB01721.X.
180. Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakamura, A. Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5429–5433, doi:10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987.
181. Jansen, R.; Van Embden, J.D.A.; Gaastra, W.; Schouls, L.M. Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1565–1575, doi:10.1046/J.1365-2958.2002.02839.X.
182. Bolotin, A.; Quinquis, B.; Sorokin, A.; Dusko Ehrlich, S. Clustered Regularly

- Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin. *Microbiology* **2005**, *151*, 2551–2561, doi:10.1099/MIC.0.28048-0/CITE/REFWORKS.
183. Pourcel, C.; Salvignol, G.; Vergnaud, G. CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies. *Microbiology* **2005**, *151*, 653–663, doi:10.1099/MIC.0.27437-0/CITE/REFWORKS.
 184. Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes. *Science* **2007**, *315*, 1709–1712, doi:10.1126/SCIENCE.1138140.
 185. Makarova, K.S.; Grishin, N. V.; Shabalina, S.A.; Wolf, Y.I.; Koonin, E. V. A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action. *Biol. Direct* **2006**, *1*, doi:10.1186/1745-6150-1-7.
 186. Marraffini, L.A.; Sontheimer, E.J. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science (80-.)*. **2008**, *322*, 1843–1845, doi:10.1126/SCIENCE.1165771/SUPPL_FILE/MARRAFFINI-SOM.PDF.
 187. Sorek, R.; Kunin, V.; Hugenholtz, P. CRISPR — a Widespread System That Provides Acquired Resistance against Phages in Bacteria and Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 181–186, doi:10.1038/nrmicro1793.
 188. Garneau, J.E.; Dupuis, M.È.; Villion, M.; Romero, D.A.; Barrangou, R.; Boyaval, P.; Fremaux, C.; Horvath, P.; Magadán, A.H.; Moineau, S. The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA. *Nat.* **2010**, *468*, 67–71, doi:10.1038/nature09523.
 189. Deltcheva, E.; Chylinski, K.; Sharma, C.M.; Gonzales, K.; Chao, Y.; Pirzada, Z.A.; Eckert, M.R.; Vogel, J.; Charpentier, E. CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III. *Nature* **2011**, *471*, 602–607, doi:10.1038/NATURE09886.
 190. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821, doi:10.1126/SCIENCE.1225829.
 191. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-.)*. **2013**, *339*, 819–823, doi:10.1126/SCIENCE.1231143/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF.
 192. Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K.M.; Aach, J.; Guell, M.; DiCarlo, J.E.; Norville, J.E.; Church, G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science (80-.)*. **2013**, *339*, 823–826, doi:10.1126/SCIENCE.1232033/SUPPL_FILE/MALI.SM.PDF.
 193. Onishi, I.; Yamamoto, K.; Kinowaki, Y.; Kitagawa, M.; Kurata, M. To Discover the Efficient and Novel Drug Targets in Human Cancers Using CRISPR/Cas Screening and Databases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS222212322.
 194. Sato, M. Phenotypic Screening Using Large-Scale Genomic Libraries to Identify Drug Targets for the Treatment of Cancer. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3617–3627, doi:10.3892/OL.2020.11512.
 195. Dickinson, D.J.; Goldstein, B. CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis Elegans* Genome Engineering. *Genetics* **2016**, *202*, 885–901, doi:10.1534/genetics.115.182162.
 196. García-Tuñón, I.; Vuelta, E.; Lozano, L.; Herrero, M.; Méndez, L.; Palomero-Hernandez, J.; Pérez-Caro, M.; Pérez-García, J.; González-Sarmiento, R.; Sánchez-Martín, M. Establishment of a Conditional Nomo1 Mouse Model by CRISPR/Cas9 Technology. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 1381–1391, doi:10.1007/S11033-019-05214-7.
 197. Ren, X.; Holsteens, K.; Li, H.; Sun, J.; Zhang, Y.; Liu, L.P.; Liu, Q.; Ni, J.Q. Genome Editing in *Drosophila Melanogaster*: From Basic Genome Engineering to the Multipurpose CRISPR-Cas9 System. *Sci. China. Life Sci.* **2017**, *60*, 476–489, doi:10.1007/S11427-017-9029-9.
 198. Tessadori, F.; Roessler, H.I.; Savelberg, S.M.C.; Chocron, S.; Kamel, S.M.; Duran, K.J.; Van Haelst, M.M.; Van Haften, G.; Bakkers, J. Effective CRISPR/Cas9-Based Nucleotide Editing in Zebrafish to Model Human Genetic

- Cardiovascular Disorders. *DMM Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*, doi:10.1242/dmm.035469.
199. Wu, S.S.; Li, Q.C.; Yin, C.Q.; Xue, W.; Song, C.Q. Advances in CRISPR/Cas-Based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics* **2020**, *10*, 4374–4382, doi:10.7150/THNO.43360.
 200. Martinez-Lage, M.; Torres-Ruiz, R.; Puig-Serra, P.; Moreno-Gaona, P.; Martin, M.C.; Moya, F.J.; Quintana-Bustamante, O.; Garcia-Silva, S.; Carcaboso, A.M.; Petazzi, P.; et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Targeting of Fusion Oncogenes for Selective Elimination of Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–14, doi:10.1038/s41467-020-18875-x.
 201. Ran, F.A.; Cong, L.; Yan, W.X.; Scott, D.A.; Gootenberg, J.S.; Kriz, A.J.; Zetsche, B.; Shalem, O.; Wu, X.; Makarova, K.S.; et al. In Vivo Genome Editing Using Staphylococcus Aureus Cas9. *Nature* **2015**, *520*, 186–191, doi:10.1038/NATURE14299.
 202. Zetsche, B.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Slaymaker, I.M.; Makarova, K.S.; Essletzbichler, P.; Volz, S.E.; Joung, J.; Van Der Oost, J.; Regev, A.; et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **2015**, *163*, 759–771, doi:10.1016/J.CELL.2015.09.038.
 203. Zetsche, B.; Heidenreich, M.; Mohanraju, P.; Fedorova, I.; Kneppers, J.; Degennaro, E.M.; Winblad, N.; Choudhury, S.R.; Abudayyeh, O.O.; Gootenberg, J.S.; et al. Multiplex Gene Editing by CRISPR-Cpf1 Using a Single CrRNA Array. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 31–34, doi:10.1038/NBT.3737.
 204. Dai, X.; Park, J.J.; Du, Y.; Kim, H.R.; Wang, G.; Errami, Y.; Chen, S. One-Step Generation of Modular CAR-T Cells with AAV-Cpf1. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 247–254, doi:10.1038/s41592-019-0329-7.
 205. Cox, D.B.T.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Franklin, B.; Kellner, M.J.; Joung, J.; Zhang, F. RNA Editing with CRISPR-Cas13. *Science* (80-.). **2017**, *358*, 1019–1027, doi:10.1126/SCIENCE.AAQ0180/SUPP L FILE/AAQ0180-COX-SM.PDF.
 206. Abudayyeh, O.O.; Gootenberg, J.S.; Essletzbichler, P.; Han, S.; Joung, J.; Belanto, J.J.; Verdine, V.; Cox, D.B.T.; Kellner, M.J.; Regev, A.; et al. RNA Targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* **2017**, *550*, 280–284, doi:10.1038/NATURE24049.
 207. Kushawah, G.; Hernandez-Huertas, L.; Abugattas-Nuñez del Prado, J.; Martinez-Morales, J.R.; DeVore, M.L.; Hassan, H.; Moreno-Sanchez, I.; Tomas-Gallardo, L.; Diaz-Moscoso, A.; Monges, D.E.; et al. CRISPR-Cas13d Induces Efficient mRNA Knockdown in Animal Embryos. *Dev. Cell* **2020**, *54*, 805–817.e7, doi:10.1016/J.DEVCEL.2020.07.013.
 208. Zhang, X.H.; Tee, L.Y.; Wang, X.G.; Huang, Q.S.; Yang, S.H. Off-Target Effects in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Engineering. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4*, e264, doi:10.1038/MTNA.2015.37.
 209. Hsu, P.D.; Scott, D.A.; Weinstein, J.A.; Ran, F.A.; Konermann, S.; Agarwala, V.; Li, Y.; Fine, E.J.; Wu, X.; Shalem, O.; et al. DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 827–832, doi:10.1038/nbt.2647.
 210. Tröder, S.E.; Zevnik, B. History of Genome Editing: From Meganucleases to CRISPR Cologne Excellence Cluster for Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases.
 211. Slaymaker, I.M.; Gao, L.; Zetsche, B.; Scott, D.A.; Yan, W.X.; Zhang, F. Rationally Engineered Cas9 Nucleases with Improved Specificity. *Science* **2016**, *351*, 84–88, doi:10.1126/SCIENCE.AAD5227.
 212. Schmid-Burgk, J.L.; Gao, L.; Li, D.; Gardner, Z.; Strecker, J.; Lash, B.; Zhang, F. Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 794–800.e8, doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.02.023.
 213. Komor, A.C.; Kim, Y.B.; Packer, M.S.; Zuris, J.A.; Liu, D.R. Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-Stranded DNA Cleavage. *Nature* **2016**, *533*, 420–424, doi:10.1038/NATURE17946.
 214. Ui, A.; Chiba, N.; Yasui, A. Relationship among DNA Double-Strand Break (DSB), DSB Repair, and Transcription Prevents Genome Instability and Cancer. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 1443–1451, doi:10.1111/CAS.14404.
 215. Kim, K.; Ryu, S.M.; Kim, S.T.; Baek, G.; Kim, D.; Lim, K.; Chung, E.; Kim, S.; Kim, J.S. Highly Efficient RNA-Guided Base Editing in Mouse Embryos. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 435–437, doi:10.1038/NBT.3816.
 216. Ma, Y.; Yu, L.; Zhang, X.; Xin, C.; Huang, S.; Bai, L.; Chen, W.; Gao, R.; Li,

- J.; Pan, S.; et al. Highly Efficient and Precise Base Editing by Engineered DCas9-Guide TRNA Adenosine Deaminase in Rats. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 39, doi:10.1038/S41421-018-0047-9.
217. Liu, Z.; Chen, M.; Chen, S.; Deng, J.; Song, Y.; Lai, L.; Li, Z. Highly Efficient RNA-Guided Base Editing in Rabbit. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41467-018-05232-2.
 218. Ochoa-Sanchez, A.; Perez-Sanchez, G.; Marianna Torres-Ledesma, A.; Pablo Valdez, J.R.; Rinaldi, G.; Moguel, B.B.; Molina-Aguilar, C. Prime Editing, a Novel Genome-Editing Tool That May Surpass Conventional CRISPR-Cas9., doi:10.1089/regen.2021.0016.
 219. Liu, Y.; Li, X.; He, S.; Huang, S.; Li, C.; Chen, Y.; Liu, Z.; Huang, X.; Wang, X. Efficient Generation of Mouse Models with the Prime Editing System. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 27, doi:10.1038/s41421-020-0165-z.
 220. Rosenberg, S.A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R.A.; Moen, R.; Karson, E.M.; Lotze, M.T.; Yang, J.C.; Topalian, S.L.; et al. Gene Transfer into Humans--Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 570–578, doi:10.1056/NEJM199008303230904.
 221. Prakash, V.; Moore, M.; Yáñez-Muñoz, R.J. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 465–474, doi:10.1038/MT.2016.5.
 222. Blaese, R.M.; Culver, K.W.; Miller, A.D.; Carter, C.S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results after 4 Years. *Science* **1995**, *270*, 475–480, doi:10.1126/SCIENCE.270.5235.475.
 223. Sibbald, B. Death but One Unintended Consequence of Gene-Therapy Trial. *C. Can. Med. Assoc. J.* **2001**, *164*, 1612.
 224. Raper, S.E.; Chirmule, N.; Lee, F.S.; Wivel, N.A.; Bagg, A.; Gao, G.P.; Wilson, J.M.; Batshaw, M.L. Fatal Systemic Inflammatory Response Syndrome in a Ornithine Transcarbamylase Deficient Patient Following Adenoviral Gene Transfer. *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *80*, 148–158, doi:10.1016/J.YMGME.2003.08.016.
 225. Naso, M.F.; Tomkowicz, B.; Perry, W.L.; Strohl, W.R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **2017**, *31*, 317–334, doi:10.1007/S40259-017-0234-5.
 226. Xu, X.; Wan, T.; Xin, H.; Li, D.; Pan, H.; Wu, J.; Ping, Y. Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Genome Editing. *J. Gene Med.* **2019**, *21*, doi:10.1002/JGM.3107.
 227. Kim, S.; Kim, D.; Cho, S.W.; Kim, J.; Kim, J.S. Highly Efficient RNA-Guided Genome Editing in Human Cells via Delivery of Purified Cas9 Ribonucleoproteins. *Genome Res.* **2014**, *24*, 1012–1019, doi:10.1101/GR.171322.113.
 228. Wilbie, D.; Walther, J.; Mastrobattista, E. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1555–1564, doi:10.1021/ACS.ACCOUNTS.9B00106.
 229. Hui, S.W. Overview of Drug Delivery and Alternative Methods to Electroporation. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *423*, 91–107, doi:10.1007/978-1-59745-194-9_6.
 230. BRILLIANCE: A Phase 1/2 Single Ascending Dose Study of EDIT-101, an in Vivo CRISPR Gene Editing Therapy in CEP290-Related Retinal Degeneration Forward Looking Statements. **2021**.
 231. Zhang, Z.; Hou, W.; Chen, S. Updates on CRISPR-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Virol. Sin.* **2022**, *37*, 1–10, doi:10.1016/J.VIRS.2022.01.017.
 232. News: CRISPR Trial Update: NTLA-2002 For Hereditary Angioedema - CRISPR Medicine.
 233. Gillmore, J.D.; Gane, E.; Taubel, J.; Kao, J.; Fontana, M.; Maitland, M.L.; Seitzer, J.; O'Connell, D.; Walsh, K.R.; Wood, K.; et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 493–502, doi:10.1056/NEJMOA2107454/SUPPL_FILE/NEJMOA2107454_DATA-SHARING.PDF.
 234. Morisaka, H.; Yoshimi, K.; Okuzaki, Y.; Gee, P.; Kunihiro, Y.; Sonpho, E.; Xu, H.; Sasakawa, N.; Naito, Y.; Nakada, S.; et al. CRISPR-Cas3 Induces Broad and Unidirectional Genome Editing in Human Cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41467-019-13226-x.
 235. Clinical Trial: Urinary Tract Infections, UTI, (NCT04191148) - CRISPR Medicine.
 236. News: First CRISPR Therapy for Type 1 Diabetes Set to Enter Clinical Trial - CRISPR Medicine.
 237. Yáñez San Segundo, L. CAR-T Cell

- Therapy. *Med. Clin. (Barc)*. **2021**, *156*, 123–125, doi:10.1016/J.MEDCLI.2020.05.007.
238. Batlevi, C.L.; Palomba, M.L.; Park, J.; Mead, E.; Santomasso, B.; Riviere, I.; Wang, X.; Senechal, B.; Furman, R.; Yang, J.; et al. PHASE I CLINICAL TRIAL OF CD19-TARGETED 19-28Z/4-1BBL “ARMORED” CAR T CELLS IN PATIENTS WITH RELAPSED OR REFRACTORY NHL AND CLL INCLUDING RICHTER TRANSFORMATION. *Hematol. Oncol.* **2019**, *37*, 166–167, doi:10.1002/HON.124_2629.
 239. Vertex and CRISPR Therapeutics to Present New Clinical Data... | CRISPR.
 240. Palacios, R.; Steinmetz, M. Il-3-Dependent Mouse Clones That Express B-220 Surface Antigen, Contain Ig Genes in Germ-Line Configuration, and Generate B Lymphocytes in Vivo. *Cell* **1985**, *41*, 727–734, doi:10.1016/S0092-8674(85)80053-2.
 241. Daley, G.Q.; Baltimore, D. Transformation of an Interleukin 3-Dependent Hematopoietic Cell Line by the Chronic Myelogenous Leukemia-Specific P210bcr/Abl Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 9312–9316, doi:10.1073/PNAS.85.23.9312.
 242. Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D.A.; Zhang, F. Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2281–2308, doi:10.1038/NPROT.2013.143.
 243. Chaiyachati, B.H.; Kaundal, R.; Zhao, J.; Wu, J.; Flavell, R.; Chi, T. LoxP-FRT Trap (LOFT): A Simple and Flexible System for Conventional and Reversible Gene Targeting. *BMC Biol.* **2012**, *10*, doi:10.1186/1741-7007-10-96.
 244. Honda, H.; Oda, H.; Suzuki, T.; Takahashi, T.; Witte, O.N.; Ozawa, K.; Ishikawa, T.; Yazaki, Y.; Hirai, H. Development of Acute Lymphoblastic Leukemia and Myeloproliferative Disorder in Transgenic Mice Expressing P210bcr/Abl: A Novel Transgenic Model for Human Ph1-Positive Leukemias. *Blood* **1998**, *91*, 2067–2075, doi:10.1182/BLOOD.V91.6.2067.
 245. Ordóñez, J.L.; Amaral, A.T.; Carcaboso, A.M.; Herrero-Martín, D.; Del Carmen García-Macías, M.; Sevillano, V.; Alonso, D.; Pascual-Pasto, G.; San-Segundo, L.; Vila-Ubach, M.; et al. The PARP Inhibitor Olaparib Enhances the Sensitivity of Ewing Sarcoma to Trabectedin. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18875, doi:10.18632/ONCOTARGET.4303.
 246. Canver, M.C.; Bauer, D.E.; Dass, A.; Yien, Y.Y.; Chung, J.; Masuda, T.; Maeda, T.; Paw, B.H.; Orkin, S.H. Characterization of Genomic Deletion Efficiency Mediated by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 Nuclease System in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21312–21324, doi:10.1074/JBC.M114.564625.
 247. Chen, X.; Xu, F.; Zhu, C.; Ji, J.; Zhou, X.; Feng, X.; Guang, S. Dual SgRNA-Directed Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis Elegans*. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, doi:10.1038/SREP07581.
 248. Silvers, W. The Coat Colors of Mice: A Model for Mammalian Gene Action and Interaction. **1979**, 379.
 249. Mout, R.; Ray, M.; Yesilbag Tonga, G.; Lee, Y.W.; Tay, T.; Sasaki, K.; Rotello, V.M. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2452–2458, doi:10.1021/ACSNANO.6B07600.
 250. Zuris, J.A.; Thompson, D.B.; Shu, Y.; Guilinger, J.P.; Bessen, J.L.; Hu, J.H.; Maeder, M.L.; Joung, J.K.; Chen, Z.Y.; Liu, D.R. Cationic Lipid-Mediated Delivery of Proteins Enables Efficient Protein-Based Genome Editing in Vitro and in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 73–80, doi:10.1038/NBT.3081.
 251. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33, doi:10.3322/CAAC.21708.
 252. Bower, H.; Björkholm, M.; Dickman, P.W.; Höglund, M.; Lambert, P.C.; Andersson, T.M.L. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2851–2857, doi:10.1200/JCO.2015.66.2866.
 253. Bueren, J.A.; Quintana-Bustamante, O.; Almaraz, E.; Navarro, S.; Río, P.; Segovia, J.C.; Guenechea, G. Advances in the Gene Therapy of Monogenic Blood Cell Diseases. *Clin. Genet.* **2020**, *97*, 89–102, doi:10.1111/CGE.13593.
 254. Zhang, H.; McCarty, N. CRISPR-Cas9 Technology and Its Application in Haematological Disorders. *Br. J. Haematol.* **2016**, *175*, 208, doi:10.1111/BJH.14297.
 255. Aiuti, A.; Cattaneo, F.; Galimberti, S.; Benninghoff, U.; Cassani, B.; Callegaro,

- L.; Scaramuzza, S.; Andolfi, G.; Mirolo, M.; Brigida, I.; et al. Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 447–458, doi:10.1056/NEJMOA0805817.
256. Hacein-Bey-Abina, S.; Le Deist, F.; Carlier, F.; Bouneaud, C.; Hue, C.; De Villartay, J.-P.; Thrasher, A.J.; Wulffraat, N.; Sorensen, R.; Dupuis-Girod, S.; et al. Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by Ex Vivo Gene Therapy. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1185–1193, doi:10.1056/NEJMOA012616.
257. Frangoul, H.; Altshuler, D.; Cappellini, M.D.; Chen, Y.-S.; Domm, J.; Eustace, B.K.; Foell, J.; de la Fuente, J.; Grupp, S.; Handgretinger, R.; et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 252–260, doi:10.1056/NEJMOA2031054/SUPPL_FILE/NEJMOA2031054_DATA-SHARING.PDF.
258. Frangoul, H.; Bobruff, Y.; Cappellini, M.D.; Corbacioglu, S.; Fernandez, C.M.; de la Fuente, J.; Grupp, S.A.; Handgretinger, R.; Ho, T.W.; Imren, S.; et al. Safety and Efficacy of CTX001 in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia and Sickle Cell Disease: Early Results from the Climb THAL-111 and Climb SCD-121 Studies of Autologous CRISPR-CAS9-Modified CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* **2020**, *136*, 3–4, doi:10.1182/BLOOD-2020-139575.
259. Beam Therapeutics Reports Progress Across Ex Vivo and In Vivo Pipeline of Base Editing.
260. Kanter, J.; DiPersio, J.F.; Leavey, P.; Shyr, D.C.; Thompson, A.A.; Porteus, M.H.; Intondi, A.; Lahiri, P.; Dever, D.P.; Petrusich, A.; et al. Cedar Trial in Progress: A First in Human, Phase 1/2 Study of the Correction of a Single Nucleotide Mutation in Autologous HSCs (GPH101) to Convert HbS to HbA for Treating Severe SCD. *Blood* **2021**, *138*, 1864, doi:10.1182/BLOOD-2021-152892.
261. Clinical Trial: CRISPR Therapy for Sickle Cell Disease - Innovative Genomics Institute (IGI) Available online: <https://innovativegenomics.org/news/crispr-therapy-for-sickle-cell-disease-clinical-trial/> (accessed on 5 July 2022).
262. Gapinske, M.; Luu, A.; Winter, J.; Woods, W.S.; Kostan, K.A.; Shiva, N.; Song, J.S.; Perez-Pinera, P. CRISPR-SKIP: Programmable Gene Splicing with Single Base Editors. *Genome Biol.* **2018**, *19*, doi:10.1186/S13059-018-1482-5.
263. Kuscu, C.; Parlak, M.; Tufan, T.; Yang, J.; Szlachta, K.; Wei, X.; Mammadov, R.; Adli, M. CRISPR-STOP: Gene Silencing through Base-Editing-Induced Nonsense Mutations. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 710–712, doi:10.1038/NMETH.4327.
264. Shen, M.W.; Arbab, M.; Hsu, J.Y.; Worstell, D.; Culbertson, S.J.; Krabbe, O.; Cassa, C.A.; Liu, D.R.; Gifford, D.K.; Sherwood, R.I. Predictable and Precise Template-Free CRISPR Editing of Pathogenic Variants. *Nature* **2018**, *563*, 646, doi:10.1038/S41586-018-0686-X.
265. Krawczak, M.; Reiss, J.; Cooper, D.N. The Mutational Spectrum of Single Base-Pair Substitutions in mRNA Splice Junctions of Human Genes: Causes and Consequences. *Hum. Genet.* *90*, 41–54.
266. Krawczak, M.; Thomas, N.S.T.; Hundrieser, B.; Mort, M.; Wittig, M.; Hampe, J.; Cooper, D.N. Single Base-Pair Substitutions in Exon-Intron Junctions of Human Genes: Nature, Distribution, and Consequences for mRNA Splicing. *Hum. Mutat.* **2007**, *28*, 150–158, doi:10.1002/humu.20400.
267. Kervestin, S.; Jacobson, A. NMD: A Multifaceted Response to Premature Translational Termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 700–712, doi:10.1038/nrm3454.
268. Zheng, H.; Zhou, L.; Shi, Y.; Tian, J.; Wang, F. Tyrosinase-Based Reporter Gene for Photoacoustic Imaging of MicroRNA-9 Regulated by DNA Methylation in Living Subjects. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2018**, *11*, 34–40, doi:10.1016/J.OMTN.2018.01.008.
269. García-Tuñón, I.; Hernández-Sánchez, M.; Ordoñez, J.L.; Alonso-Pérez, V.; Álamo-Quijada, M.; Benito, R.; Guerrero, C.; Hernández-Rivas, J.M.; Sánchez-Martín, M. The CRISPR/Cas9 System Efficiently Reverts the Tumorigenic Ability of BCR/ABL in Vitro and in a Xenograft Model of Chronic Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2017**, *8*, 26027–26040, doi:10.18632/oncotarget.15215.
270. Huang, N.; Huang, Z.; Gao, M.; Luo, Z.; Zhou, F.; Liu, L.; Xiao, Q.; Wang, X.; Feng, W. Induction of Apoptosis in Imatinib Sensitive and Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells by Efficient Disruption of Bcr-Abl Oncogene with Zinc Finger Nucleases. *J. Exp. Clin.*

- Cancer Res.* **2018**, *37*, doi:10.1186/S13046-018-0732-4.
271. Luo, Z.; Gao, M.; Huang, N.; Wang, X.; Yang, Z.; Yang, H.; Huang, Z.; Feng, W. Efficient Disruption of Bcr-Abl Gene by CRISPR RNA-Guided FokI Nucleases Depresses the Oncogenesis of Chronic Myeloid Leukemia Cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 224, doi:10.1186/s13046-019-1229-5.
 272. Chen, S.H.; Hsieh, Y.Y.; Tzeng, H.E.; Lin, C.Y.; Hsu, K.W.; Chiang, Y.S.; Lin, S.M.; Su, M.J.; Hsieh, W.S.; Lee, C.H. ABL Genomic Editing Sufficiently Abolishes Oncogenesis of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2020**, *Vol. 12*, Page 1399 **2020**, *12*, 1399, doi:10.3390/CANCERS12061399.
 273. Luo, Z.; Gao, M.; Huang, N.; Wang, X.; Yang, Z.; Yang, H.; Huang, Z.; Feng, W. Efficient Disruption of Bcr-Abl Gene by CRISPR RNA-Guided FokI Nucleases Depresses the Oncogenesis of Chronic Myeloid Leukemia Cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 1–13, doi:10.1186/S13046-019-1229-5/FIGURES/6.
 274. Martinez-Lage, M.; Torres-Ruiz, R.; Puig-Serra, P.; Moreno-Gaona, P.; Martin, M.C.; Moya, F.J.; Quintana-Bustamante, O.; Garcia-Silva, S.; Carcaboso, A.M.; Petazzi, P.; et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Targeting of Fusion Oncogenes for Selective Elimination of Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-18875-x.
 275. Mandal, P.K.; Ferreira, L.M.R.; Collins, R.; Meissner, T.B.; Boutwell, C.L.; Friesen, M.; Vrbanc, V.; Garrison, B.S.; Stortchevoi, A.; Bryder, D.; et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells Using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* **2014**, *15*, 643–652, doi:10.1016/J.STEM.2014.10.004.
 276. Ito, M.; Hiramatsu, H.; Kobayashi, K.; Suzue, K.; Kawahata, M.; Hioki, K.; Ueyama, Y.; Koyanagi, Y.; Sugamura, K.; Tsuji, K.; et al. NOD/SCID/γnull Mouse: An Excellent Recipient Mouse Model for Engraftment of Human Cells. *Blood* **2002**, *100*, 3175–3182, doi:10.1182/BLOOD-2001-12-0207.
 277. Pear, W.S.; Miller, J.P.; Xu, L.; Pui, J.C.; Soffer, B.; Quackenbush, R.C.; Pendergast, A.M.; Bronson, R.; Aster, J.C.; Scott, M.L.; et al. Efficient and Rapid Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-Like Myeloproliferative Disease in Mice Receiving P210 Bcr/Abl-Transduced Bone Marrow. *Blood* **1998**, *92*, 3780–3792, doi:10.1182/BLOOD.V92.10.3780.
 278. Eisterer, W.; Jiang, X.; Christ, O.; Glimm, H.; Lee, K.H.; Pang, E.; Lambie, K.; Shaw, G.; Holyoake, T.L.; Petzer, A.L.; et al. Different Subsets of Primary Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells Engraft Immunodeficient Mice and Produce a Model of the Human Disease. *Leukemia* **2005**, *19*, 435–441, doi:10.1038/SJ.LEU.2403649.
 279. Landberg, N.; von Palffy, S.; Askmyr, M.; Lilljebjörn, H.; Sandén, C.; Rissler, M.; Mustjoki, S.; Hjorth-Hansen, H.; Richter, J.; Ågerstam, H.; et al. CD36 Defines Primitive Chronic Myeloid Leukemia Cells Less Responsive to Imatinib but Vulnerable to Antibody-Based Therapeutic Targeting. *Haematologica* **2018**, *103*, 447–455, doi:10.3324/HAEMATOL.2017.169946.
 280. Zhang, W.; Yang, B.; Weng, L.; Li, J.; Bai, J.; Wang, T.; Wang, J.; Ye, J.; Jing, H.; Jiao, Y.; et al. Single Cell Sequencing Reveals Cell Populations That Predict Primary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 25337, doi:10.18632/AGING.104136.
 281. Buckens, O.J.; El Hassouni, B.; Giovannetti, E.; Peters, G.J. The Role of Eph Receptors in Cancer and How to Target Them: Novel Approaches in Cancer Treatment. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1762566> **2020**, *29*, 567–582, doi:10.1080/13543784.2020.1762566.
 282. Schultheis, B.; Carapeti-Marootian, M.; Hochhaus, A.; Weißer, A.; Goldman, J.M.; Melo, J. V. Overexpression of SOCS-2 in Advanced Stages of Chronic Myeloid Leukemia: Possible Inadequacy of a Negative Feedback Mechanism. *Blood* **2002**, *99*, 1766–1775, doi:10.1182/BLOOD.V99.5.1766.
 283. Handschuh, L.; Lonetti, A. Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/7239206.
 284. Fu, Y.; Yao, N.; Ding, D.; Zhang, X.; Liu, H.; Ma, L.; Shi, W.; Zhu, C.; Tang, L. TMEM158 Promotes Pancreatic Cancer Aggressiveness by Activation of TGFβ1 and PI3K/AKT Signaling Pathway. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 2761–2775, doi:10.1002/JCP.29181.

285. Pin, G.; Huanting, L.; Chengzhan, Z.; Xinjuan, K.; Yugong, F.; Wei, L.; Shifang, L.; Zhaojian, L.; Kun, H.; Weicheng, Y.; et al. Down-Regulation of PDCD4 Promotes Proliferation, Angiogenesis and Tumorigenesis in Glioma Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1284, doi:10.3389/FCELL.2020.593685/BIBTEX.
286. Zhang, Z.H.; Lian, X.Y.; Li, X.X.; He, P.F.; Lin, J.; Qian, J. [Clinical Study of SCIN Expression and Dromoter Methylation in Patients with Chronic Myeloid Leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* **2019**, *27*, 646–651, doi:10.19746/J.CNKI.ISSN.1009-2137.2019.03.003.
287. Lueck, S.C.; Russ, A.C.; Botzenhardt, U.; Schlenk, R.F.; Zobel, K.; Deshayes, K.; Vucic, D.; Döhner, H.; Döhner, K.; Fulda, S.; et al. Smac Mimetic Induces Cell Death in a Large Proportion of Primary Acute Myeloid Leukemia Samples, Which Correlates with Defined Molecular Markers. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49539, doi:10.18632/ONCOTARGET.10390.
288. Mukhopadhyay, A.; Ni, J.; Zhai, Y.; Yu, G.L.; Aggarwal, B.B. Identification and Characterization of a Novel Cytokine, THANK, a TNF Homologue That Activates Apoptosis, Nuclear Factor-KB, and c-Jun NH2- Terminal Kinase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15978–15981, doi:10.1074/jbc.274.23.15978.
289. Samet, I.; Han, J.; Jlaiel, L.; Sayadi, S.; Isoda, H. Olive (Olea Europaea) Leaf Extract Induces Apoptosis and Monocyte/Macrophage Differentiation in Human Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells: Insight into the Underlying Mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/927619.
290. Diez, B.; Genovese, P.; Roman-Rodriguez, F.J.; Alvarez, L.; Schioli, G.; Ugalde, L.; Rodriguez-Perales, S.; Sevilla, J.; Heredia, C.D. de; Holmes, M.C.; et al. Therapeutic Gene Editing in CD34+ Hematopoietic Progenitors from Fanconi Anemia Patients. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1574, doi:10.15252/EMMM.201707540.
291. Stanford, W.L.; Cohn, J.B.; Cordes, S.P. Gene-Trap Mutagenesis: Past, Present and Beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 756–768, doi:10.1038/35093548.
292. Friedel, R.H.; Soriano, P. Gene Trap Mutagenesis in the Mouse. *Methods Enzymol.* **2010**, *477*, 243, doi:10.1016/S0076-6879(10)77013-0.
293. Tanaka, T.S.; Davey, R.E.; Lan, Q.; Zandstra, P.W.; Stanford, W.L. Development of a Gene-Trap Vector with a Highly Sensitive Fluorescent Protein Reporter System for Expression Profiling. *Genesis* **2008**, *46*, 347–356, doi:10.1002/DVG.20404.
294. Ishikawa, K.; Kobayashi, Y.; Wakabayashi, Y.; Watanabe, S.; Semba, K. A Highly Sensitive Trap Vector System for Isolating Reporter Cells and Identification of Responsive Genes. *Biol. methods Protoc.* **2018**, *3*, doi:10.1093/BIOMETHODS/BPY003.
295. Lu, H.; Liu, J.; Feng, T.; Guo, Z.; Yin, Y.; Gao, F.; Cao, G.; Du, X.; Wu, S. A HIT-Trapping Strategy for Rapid Generation of Reversible and Conditional Alleles Using a Universal Donor. *Genome Res.* **2021**, *31*, 900–909, doi:10.1101/GR.271312.120/-/DC1.
296. Roth, T.L.; Puig-Saus, C.; Yu, R.; Shifrut, E.; Carnevale, J.; Li, P.J.; Hiatt, J.; Saco, J.; Krystofinski, P.; Li, H.; et al. Reprogramming Human T Cell Function and Specificity with Non-Viral Genome Targeting. *Nature* **2018**, *559*, 405, doi:10.1038/S41586-018-0326-5.
297. McGahon, A.J.; Brown, D.G.; Martin, S.J.; Amarante-Mendes, G.P.; Cotter, T.G.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Downregulation of Bcr-Abl in K562 Cells Restores Susceptibility to Apoptosis: Characterization of the Apoptotic Death. *Cell Death Differ.* **1997**, *4*, 95–104, doi:10.1038/sj.cdd.4400213.
298. Porteus, M.H.; Baltimore, D. Chimeric Nucleases Stimulate Gene Targeting in Human Cells. *Science* **2003**, *300*, 763, doi:10.1126/SCIENCE.1078395.

ANEXO I:

Contribuciones Científicas en el periodo de la Tesis Doctoral

ANEXO I: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS EN EL PERIODO DE LA TESIS DOCTORAL.

A continuación, se recogen los trabajos de investigación publicados en los que ha participado Elena Vuelta Ramos durante el periodo de investigación de la presente Tesis Doctoral:

1.- Vuelta E, Ordoñez JL, Sanz DJ, Ballesteros S, Hernández-Rivas JM, Méndez-Sánchez L, Sánchez-Martín M, García-Tuñón I. ***CRISPR/Cas9-Directed Gene Trap Constitutes a Selection System for Corrected BCR/ABLLeukemic Cells in CML***. Int J Mol Sci. 2022 Jun 7;23(12):6386. doi: 10.3390/ijms23126386. PMID: 35742831; PMCID: PMC9224210. Anexo II.

2.- Marín-Quílez A, Vuelta E, Díaz-Ajenjo L, Fernández-Infante C, García-Tuñón I, Benito R, Palma-Barqueros V, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR, Rivera J, Bastida JM. ***A novel nonsense variant in TPM4 caused dominant macrothrombocytopenia, mild bleeding tendency and disrupted cytoskeleton remodeling***. J Thromb Haemost. 2022 May;20(5):1248-1255. doi: 10.1111/jth.15672. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35170221.

3.- Vuelta E, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Méndez L, Hernández-Carabias P, Saldaña R, Sevilla J, Sebastián E, Muntión S, Sánchez-Guijo F, Hernández-Rivas JM, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M. ***CRISPR-Cas9 Technology as a Tool to Target Gene Drivers in Cancer: Proof of Concept and New Opportunities to Treat Chronic Myeloid Leukemia***. CRISPR J. 2021 Aug;4(4):519-535. doi: 10.1089/crispr.2021.0009. PMID: 34406033. Anexo II.

4.- Algarín EM, Quwaider D, Campos-Laborie FJ, Díaz-Tejedor A, Mogollón P, Vuelta E, Martín-Sánchez M, San-Segundo L, González-Méndez L, Gutiérrez NC, García-Sanz R, Paíno T, De Las Rivas J, Ocio EM, Garayoa M. ***Stroma-Mediated Resistance to S63845 and Venetoclax through MCL-1 and BCL-2 Expression Changes Induced by miR-193b-3p and miR-21-5p Dysregulation in Multiple Myeloma. Cells***.

2021 Mar 4;10(3):559. doi: 10.3390/cells10030559. PMID: 33806619; PMCID: PMC8001939.

5.- Marín-Quílez A, García-Tuñón I, Fernández-Infante C, Hernández-Cano L, Palma-Barqueros V, Vuelta E, Sánchez-Martín M, González-Porras JR, Guerrero C, Benito R, Rivera J, Hernández-Rivas JM, Bastida JM. ***Characterization of the Platelet Phenotype Caused by a Germline RUNX1 Variant in a CRISPR/Cas9-Generated Murine Model.*** Thromb Haemost. 2021 Sep;121(9):1193-1205. doi: 10.1055/s-0041-1723987. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33626581.

6.- Vuelta E, García-Tuñón I, Hernández-Carabias P, Méndez L, Sánchez-Martín M. ***Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy.*** Biology (Basel). 2021 Feb 4;10(2):118. doi: 10.3390/biology10020118. PMID: 33557401; PMCID: PMC7915349. Anexo II.

7.- García-Tuñón I, Vuelta E, Lozano L, Herrero M, Méndez L, Palomero-Hernandez J, Pérez-Caro M, Pérez-García J, González-Sarmiento R, Sánchez-Martín M. ***Establishment of a conditional Nomo1 mouse model by CRISPR/Cas9 technology.*** Mol Biol Rep. 2020 Feb;47(2):1381-1391. doi: 10.1007/s11033-019-05214-7. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31833031.

8.- García-Tuñón I, Alonso-Pérez V, Vuelta E, Pérez-Ramos S, Herrero M, Méndez L, Hernández-Sánchez JM, Martín-Izquierdo M, Saldaña R, Sevilla J, Sánchez-Guijo F, Hernández-Rivas JM, Sánchez-Martín M. ***Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency.*** PLoS One. 2019 May 9;14(5):e0216674. doi: 10.1371/journal.pone.0216674. PMID: 31071190; PMCID: PMC6508695. Anexo II.

ANEXO II:
Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral

ANEXO II: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.

A continuación, se adjuntan las publicaciones científicas que han derivado del trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral:

RESEARCH ARTICLE

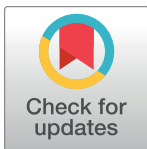
Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency

Ignacio García-Tuñón^{1,2}, Verónica Alonso-Pérez^{1,2}, Elena Vuelta³, Sandra Pérez-Ramos³, María Herrero³, Lucía Méndez³, Jesús María Hernández-Sánchez^{1,2}, Marta Martín-Izquierdo^{1,2}, Raquel Saldaña⁴, Julián Sevilla⁵, Fermín Sánchez-Guijo^{1,2,6}, Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,6}, Manuel Sánchez-Martín^{2,3,7*}

1 Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain, **2** IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Salamanca, Spain, **3** Servicio de Transgénesis, Nucleus, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Servicio de Hematología, Hospital de Especialidades de Jerez, Zacatecas, Spain, **5** Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain, **6** Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, **7** Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* adolsan@usal.es



OPEN ACCESS

Citation: García-Tuñón I, Alonso-Pérez V, Vuelta E, Pérez-Ramos S, Herrero M, Méndez L, et al. (2019) Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency. PLoS ONE 14 (5): e0216674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674>

Editor: Stefan Maas, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: February 7, 2019

Accepted: April 26, 2019

Published: May 9, 2019

Copyright: © 2019 García-Tuñón et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was mainly supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa" [grant PI17/01895 to IGT and MSM.]; Junta de Castilla y León, Fondos FEDER [SA085U16 to JMHR]; Novartis grant; and by the

Abstract

CRISPR/Cas9 allows the generation of knockout cell lines and null zygotes by inducing site-specific double-stranded breaks. In most cases the DSB is repaired by non-homologous end joining, resulting in small nucleotide insertions or deletions that can be used to construct knockout alleles. However, these mutations do not produce the desired null result in all cases, but instead generate a similar, functionally active protein. This effect could limit the therapeutic efficiency of gene therapy strategies based on abrogating oncogene expression, and therefore needs to be considered carefully. If there is an acceptable degree of efficiency of CRISPR/Cas9 delivery to cells, the key step for success lies in the effectiveness of a specific sgRNA at knocking out the oncogene, when only one sgRNA can be used. This study shows that the null effect could be increased with an sgRNA targeting the splice donor site (SDS) of the chosen exon. Following this strategy, the generation of null alleles would be facilitated in two independent ways: the probability of producing a frameshift mutation and the probability of interrupting the canonical mechanism of pre-mRNA splicing. In these contexts, we propose to improve the loss-of-function yield driving the CRISPR system at the SDS of critical exons.

Introduction

With the recent diversification of genome editing tools, including those involving clustered, regularly interspaced short palindromic repeats and their nuclease-associated protein Cas9 (CRISPR/Cas9), the landscape of suppression techniques has dramatically changed. Although CRISPR/Cas9 is similar in action and efficacy to protein-based targeted nucleases, such as zinc finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs)[1], the ease with which these reagents can be designed and tested through the construction of single-

Fundación “Jabones para Daniel”. JM Hernández-Sánchez was supported by a research grant from Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

guide RNAs (sgRNAs) has made gene editing available to a wider variety of users and for a broader range of applications. Unlike ribozymes, antisense oligodeoxynucleotides (AS-ODNs) and short interfering RNAs (siRNAs), CRISPR/Cas9 works at the DNA level, where it has the advantage of providing permanent and full gene knockout, while other methods only silence genes transiently[2,3]. CRISPR/Cas9 cuts DNA in a sequence-specific manner with the possibility of interrupting coding sequences, thereby making it possible to turn off cancer drivers in a way that was not previously feasible in humans[4,5]. This notable application of permanent gene disruption is based on the cellular mechanisms involved in double-stranded break (DSB) repair. Nonhomologous DNA end-joining (NHEJ) is the predominant DSB repair pathway throughout the cell cycle. Following the creation of a DSB within the coding sequence of a gene, the predominant and error-prone NHEJ pathway often results in small nucleotide insertions or deletions (indels)[6]. Its great efficiency at inducing DSB has led to CRISPR/Cas9 technology gaining a reputation as the gold standard for creating null alleles *in vivo* and *in vitro*. These null alleles can arise from NHEJ indels that trigger premature stop codons (frame-shift mutation) and/or non-sense-mediated decay in the target gene, resulting in loss of function. Currently, CRISPR/Cas9 is extensively used to engineer gene knockouts in most biological systems, but due to the variable size of the NHEJ-induced indel, it is not always possible to generate a full KO in one step. When the delivery of Cas9 elements is effective, full KO generation requires off-frame mutations in both alleles, which is a matter of probability since the random nature of DNA repair gives rise to considerable heterogeneity within the cell. It entails dealing with a significant frequency of mutated cells in which the outcome of mutation could preserve the reading frame (i.e., +3 or -3 mutations)[7]. A possible solution is to use two or more RNA guides to knock out the gene at several key sites in an attempt to guarantee the null result. However, a high proportion of off-targets would increase with each new sgRNA added. Conversely, more sgRNAs at the same time trigger more DSBs, which induces a stronger p53-mediated DNA damage response[8] and more complex rearrangements[9]. Either way, these undesirable effects may be irrelevant in assays in which the knockout cell can be sequenced, selected and expanded, or the null allele of the animal model can be segregated. Nevertheless, there are other situations, either *in vivo* or *in vitro*, in which cell selection and clone expansion are not available, and achieving high levels of knockout or gene inactivation efficiency is crucial[10,11]. Thus, it is important to study the key exons carefully and, more importantly, the target areas inside them, before making a selection[12]. Hematological cancer therapies based on specific oncogenic silencing within primitive pluripotent stem cells may be the best example of these situations. In this pathological cell context, the highly efficient interruption of the oncogenic open reading frame (ORF) might be an effective therapeutic option. It would even be more important for those tumors directed by a single oncogenic event, as is the case for several leukemias or sarcomas, which are directed by specific fusion oncoproteins [13,14]. A recent study of the *BCR/ABL* oncogene showed this gene fusion to be an ideal target for CRISPR/Cas9-mediated gene therapy. A CRISPR-Cas9 application truncated the specific *BCR-ABL* fusion (p210) abrogating its oncogenic potential, but to achieve *in vivo* effectiveness in a xenograft model, the authors had to select and expand the correctly edited cellular clone because some of the clones contained in-frame or non-synonymous mutations[5,15]. Therefore, in these situations, it is essential to have not only highly efficient Cas9-sgRNA cell delivery, but also a high capacity for generating null mutations. This is especially critical for cancer oncogene suppression therapies based on disrupting driver oncogenes. If the efficiency of CRISPR/Cas9 reagent delivery to the cancer cell is acceptable, the key step to success lies in the effectiveness with which a specific sgRNA can knock out the oncogene. In this way, for most knockout studies in which the edited cells or mice can be selected, the sgRNA targets different positions within the chosen exon, avoiding exon boundaries. In most of these cases, the

sgRNA design follows only off-target criteria, but for cases in which cellular selection is not an option and only one sgRNA can be used, the null effect could be strengthened with an sgRNA that targets splice site consensus sequences or close to them. Following this strategy, the generation of null alleles would be enhanced in two ways: by producing a frameshift mutation and by breaking the canonical mechanism of pre-mRNA splicing. In this sense, it has long been known that mutations in splice-site consensus sequences can affect pre-mRNA splicing patterns and can lead to the generation of null or deficient alleles[16]. In fact, pioneering genetic studies indicated that many of the thalassemia mutations in the β -globin gene affect splice sites and give rise to aberrant splicing patterns[17,18]. Recent studies have demonstrated that a splicing mutation in the STAR gene is a loss-of-function mutation that produces an aberrant protein[19]. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), a conserved biological mechanism that degrades transcripts containing premature translation termination codons, could help secure the null effect when a DSB is induced at splice sites. In addition to transcripts derived from nonsense alleles, the substrates of the NMD pathway include pre-mRNAs that enter the cytoplasm with their introns intact[20]. Several mutations of splice donor sites that cause loss of gene function have recently been identified. A novel mutation at a splice donor site that was predicted to lead to skipping of exon 10 of the PLA2G6 gene was found in a homozygous state in infantile neuroaxonal dystrophy patients. This variant has been correlated with loss of function, providing further evidence of its pathogenicity[21]. Mutations in the ectodysplasin A1 gene (EDA-A1) at the splice donor site have been described in patients with hypohydrotic ectodermal dysplasia. This novel functional skipping-splicing EDA mutation was the cause of the pathological phenotype[22]. Studies in a family with premature ovarian failure identified a variant that alters a splice donor site. This variant resulted in a predicted loss of function of the MCM9 gene, which is involved in homologous recombination and repair of double-stranded DNA breaks[23].

Taking into account all these findings, we decided to explore the effectiveness of driving one single sgRNA targeting the splice-donor exon site (SDE-sgRNA) to increase the null allele yield. To compare the knockout efficiency of SDE-sgRNAs and sgRNAs targeting positions within the exon (IE-sgRNA) we induced DSB with both guides in critical exons in three genes (*TYR*, *ATM* and *ABL*), two systems (*in vivo* and *in vitro*), and two species (human and mouse). Finally, we sequenced all mutant alleles generated and analyzed the consequences *in silico* and *in vivo*.

Results

The sgRNA guides targeting splice-donor sites of key exons increase the generation *in vitro* and *in vivo* of null alleles in mouse and human cells

In vitro. Two groups of sgRNAs were created to study the efficiency of SDE-sgRNAs and IE-sgRNAs at generating null alleles in mouse and human cells (Fig 1). All guides were designed to target the Tyrosinase, and *ATM* genes in both species in key exons.

Three individual electroporation assays were performed with each sgRNA in Baf/3 mouse cells and K562 human cells. Mouse *Tyr* exon 1, mouse *ATM* exon 10, human *Tyr* exon1 and human *ATM* exon10 sgRNAs (SDE-sgRNA and IE-sgRNA for each one) were cloned in a CRISPR-Cas9-GFP mammalian expression vector. An empty CRISPR-Cas9-GFP vector was used as a control. GFP expression was detectable 24 hours post-electroporation in all cases, indicating the effective delivery of the CRISPR/Cas9 system and its expression in Baf/3 or K562 cells (Fig 2A). GFP+ cells were sorted and subjected to Sanger sequencing, which revealed no variations in the target sequence of control cells. Sanger sequencing identified indel mutations at the predicted cleavage point in CRISPR/Cas9 assays, while no sequence

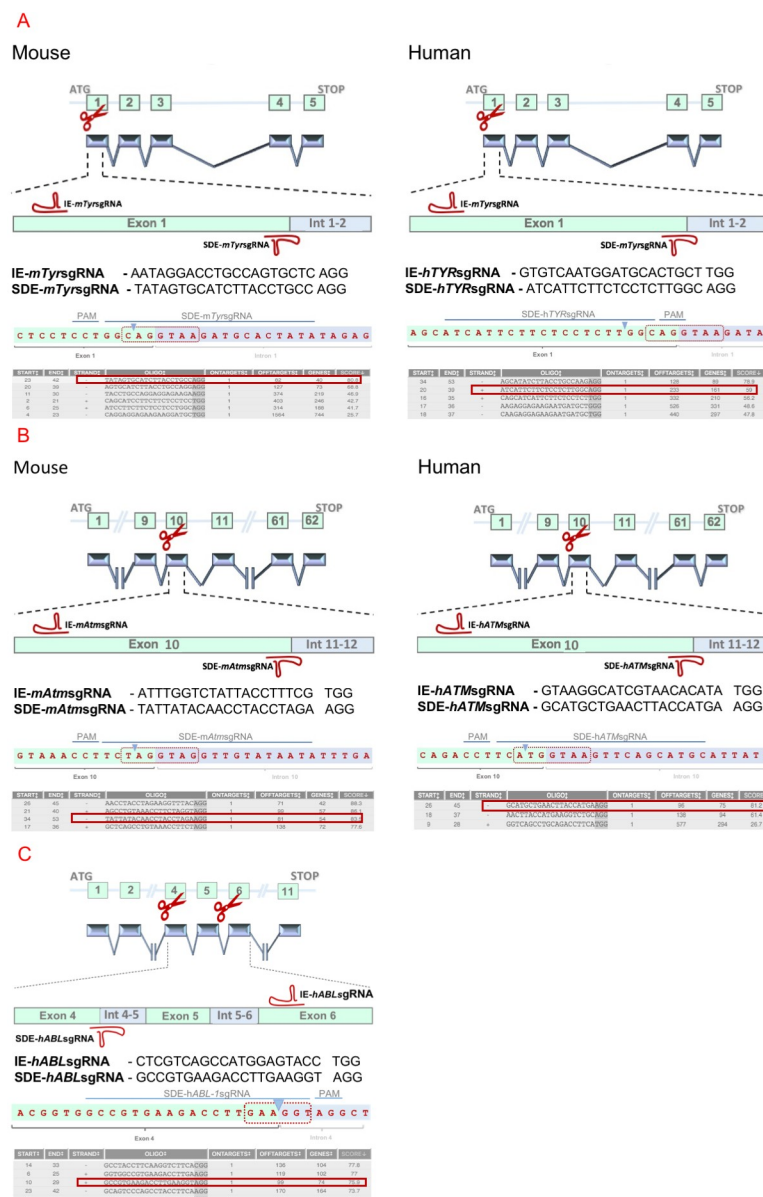


Fig 1. Experimental design of genome edition of *TYR*, *ATM* and *ABL-1* loci by CRISPR/Cas9 system. (A) Schematic representation of the mouse and human *Tyr* loci and the CRISPR/Cas9 experimental design of the two RNA guides are represented in the exon 1 sequence. SDE-sgRNAs match the splice site between exon 1 and intron 1–2. IE-sgRNAs target a central position at the coding sequence of exon 1. (B) Schematic representation of the mouse and human *ATM* loci and the CRISPR/Cas9 experimental design the two RNA guides are represented in the exon 10 sequence. SDE-sgRNAs match the splice site between exon 10 and intron 10–11, and IE-sgRNAs target a coding sequence of exon 10. (C) Schematic representation of the human *ABL-1* locus and the CRISPR/Cas9 experimental design the two RNA guides. SDE-sgRNAs match the splice site between exon 4 and intron 4–5, and IE-sgRNAs target a coding sequence of exon 6. Sequences of each SDE-sgRNA are represented (blue line) and its expected cleavage point (blue arrowhead) at the splice donor sequence (red dotted box). Also, several candidates to SDE-sgRNAs are listed with its respective scores (red box correspond to selected sgRNAs).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g001>

variations were observed in control cells (Fig 2B). Tracking of indels by decomposition (TIDE) analysis showed similar overall DSB-induced efficiency between SDE-sgRNA and IE-sgRNA in the Baf/3 or K562 cell lines. In knockout assays with both sgRNAs, the TIDE algorithm of Baf/3 and K562 mutant cells predicted small deletions (1–7 bp) in most cases (Fig 3).

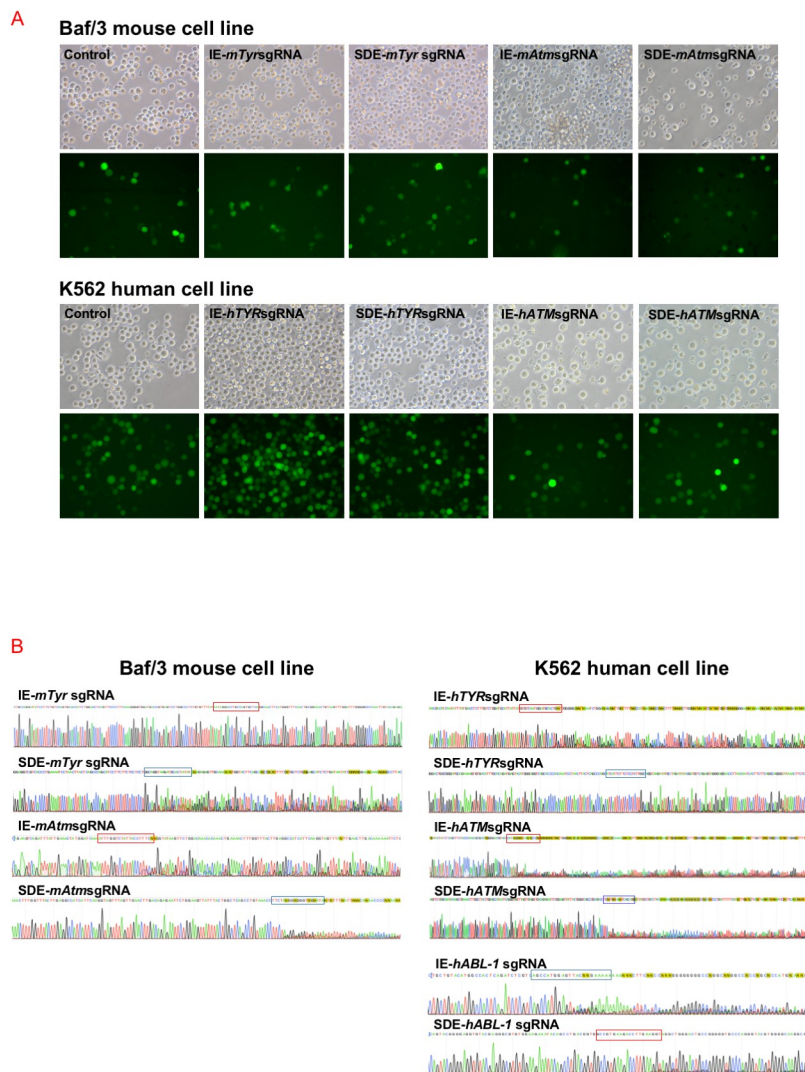


Fig 2. *In vitro* CRISPR/Cas9-mediated edition of *Tyr* and *Atm* loci in the Baf/3 mouse cell line, and *TYR*, *ATM* and *ABL-1* in the K562 human cell line. (A) Fluorescent microscopy of cells electroporated with empty px480 vector (controls) and carrying each RNA guides. (B) Sequences of CRISPR/Cas9 edited cells through IE-sgRNA (red box) and SDE-sgRNA (blue box). Edited cells showed a mixture of sequences around the expected cleavage point for each sgRNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g002>

To eliminate interference in Cas9 delivery efficiency among assays, we decided to analyze only the mutant alleles generated by every guide and their consequences for the obviation of wildtype or well-repaired alleles. In order to gain detailed information about all mutant alleles for each sgRNA we analyzed the genome of properly electroporated Baf/3 or k562 cells by next-generation sequencing (NGS) (S1–S4 Tables). Unlike with the Sanger analysis, NGS revealed a high number of mutated alleles in both groups. Several of detected alleles shown in-frame indels that deleted 1–6 amino acids, thereby preserving the reading frame of the protein (S1–S4 Tables). However, *in silico* analysis of the allelic modifications generated by SDE-sgRNA predict the generation of a null allele in all cases, by frameshift mutations or by loss of canonical splicing sequences, or both simultaneously (Fig 4).

In order to evaluate the functionality of the mutant alleles generated by the CRISPR/Cas9 system in the human *ATM* gene, protein levels in K562-edited cells were analyzed by western

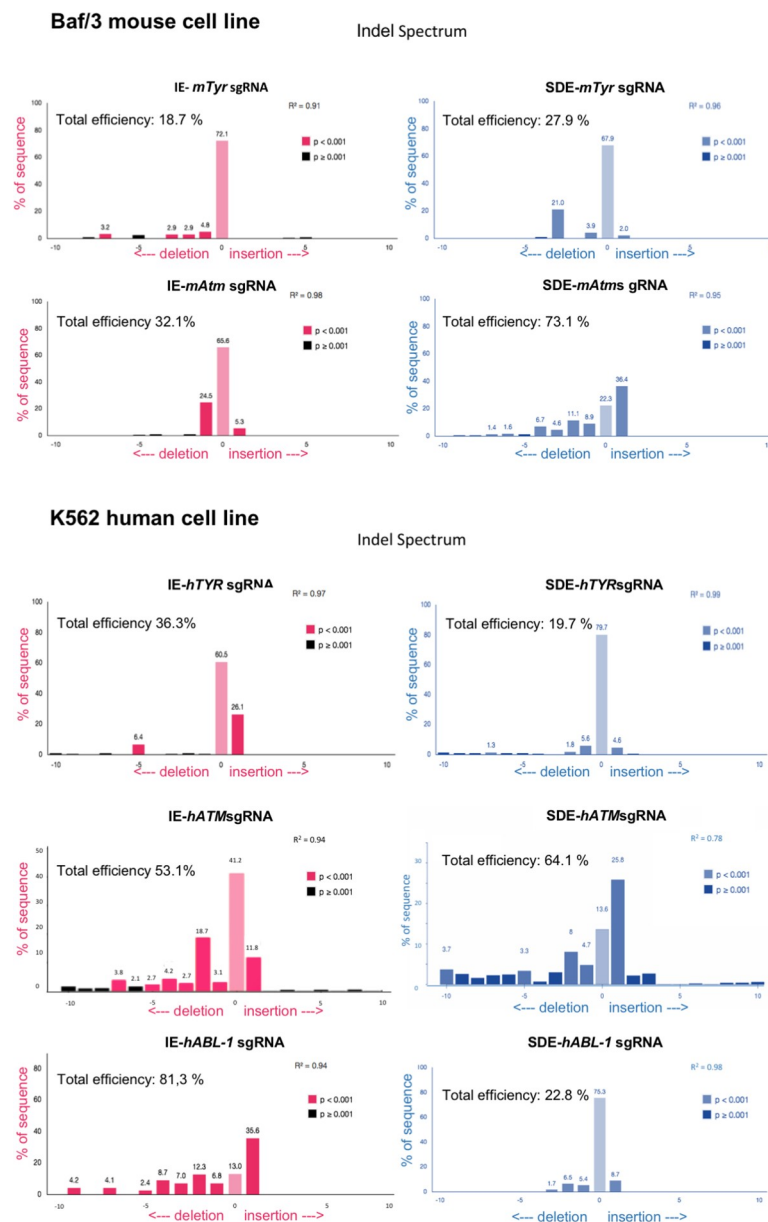


Fig 3. TIDE decomposition analysis of edited sequences generated in human and mouse cell lines. TIDE decomposition algorithm prediction of the overall edition efficacy and most common allele variations generated for IE-sgRNAs (red panels) and for SDE-sg-RNAs (blue panels).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g003>

blot (WB). While IE-*hATM*sgRNA-transfected cells showed slightly weaker *ATM* expression compared with K562 parental cells, low levels of *ATM* protein were detected in SDE-*hATM*sgRNA-transfected cells (Fig 5A). Single-cell-derived cell lines from both IE-*hATM*sgRNA (6 clones) and SDE-*hATM*sgRNA-SD (6 clones) K562 cells were established and analyzed by NGS (S5 Table). *ATM* protein levels of each single-cell-derived clone were analyzed by WB. Most mutated cell clones (4/6) edited with IE-*hATM*sgRNA showed *ATM* expression (Fig 5B). NGS analysis of all single-cell clones edited with IE-*hATM*sgRNA had at least one functional allele, either a wildtype (wt) or with in-frame mutations (S5 Table). However, several mutated cell clones (5/6) edited with SDE-*hATM*sgRNA had no levels of *ATM*

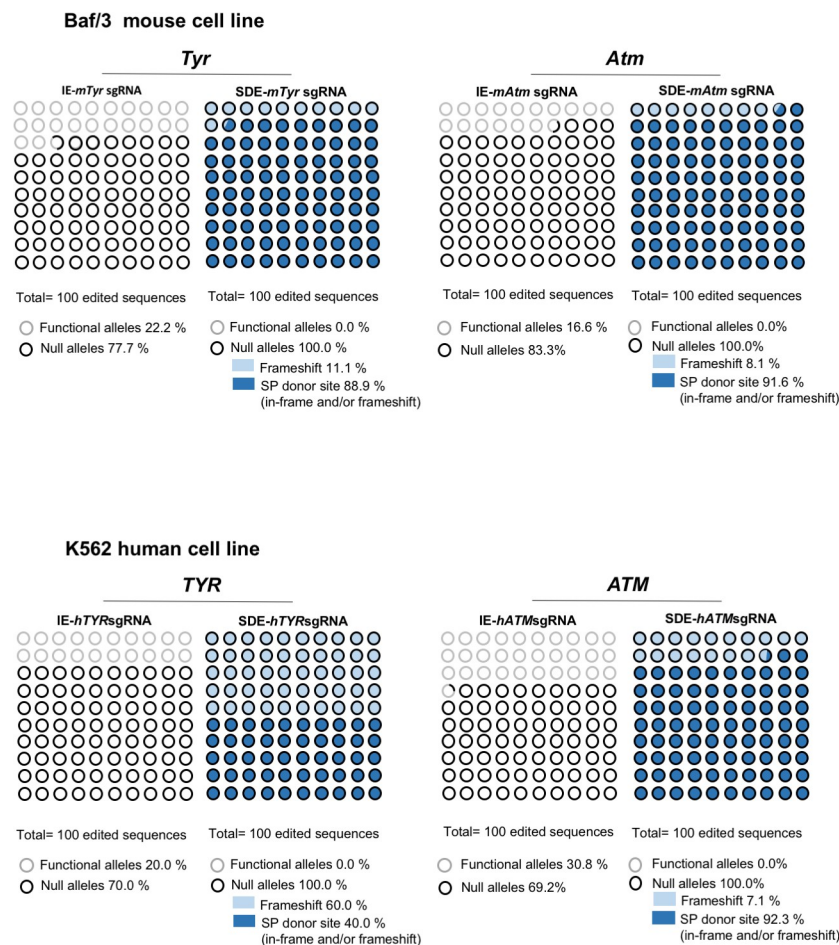


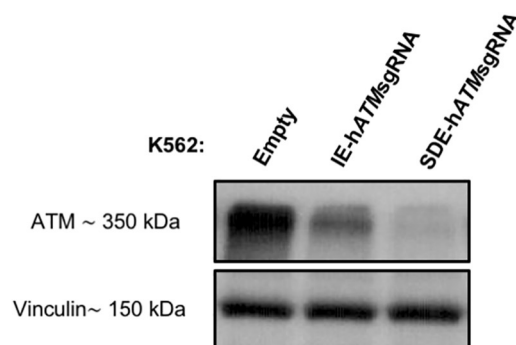
Fig 4. Next Generation Sequencing (NGS) analysis of *TYR* and *ATM* genes in mouse and human edited cells. Graphic representation of the mutations found in edited cells by IE-sgRNA and SDE-sgRNA, and their predicted effect. Black and gray circles represent null alleles and functional alleles respectively, while the background indicates the type of mutation (dark blue: splice donor site in-frame and/or frameshift; light blue: frameshift).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g004>

protein that could be detected by WB (Fig 5B). Analyzing them showed splicing mutations together with in-frame or frameshift mutations in both *ATM* alleles (S5 Table).

In vivo. One-cell stage embryos from two strains of mice, inbred C57Bl6/J and F2 hybrids of B6/CBA, were microinjected with Cas9 mRNA and *Tyr* sgRNAs. No nucleotide polymorphisms between C57Bl6/J and CBA strains at *Tyr* exon1/intron1 were found. The microinjected embryos were divided in two groups, one of which was grown to blast stage and harvested to obtain the genomic DNA, which was analyzed to detect indels at the sgRNA cut-sites. Embryos of the other group were grown to the two-cell stage and implanted in pseudo-pregnant females to visualize the *in vivo* CRISPR effect on mouse coat color. The microinjected zygotes grown to blast stage were harvested to obtain their genomic DNA, which was then analyzed by NGS, revealing a greater abundance of null alleles in the SDE-*mTyr*sgRNA than in the IE-*mTyr*sgRNA embryo group (100% vs. 67.57%) (S6 Table). Briefly, NGS detected seven mutated alleles at the expected cut-site of IE-*mTyr*sgRNA. *In silico* analysis identified three mutated alleles with in-frame mutations that gave rise to a putative functional protein. NGS in the group of embryos microinjected with SDE-*mTyr*sgRNA identified eight mutated alleles, of which three were in-frame mutations and five were null mutations. However, in this embryo

A



B

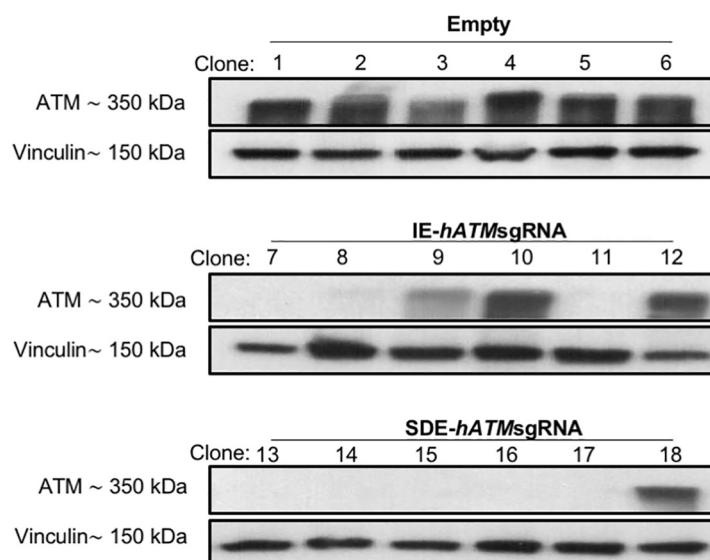


Fig 5. Analysis of *ATM* gene expression by Western blot in K562 edited cells. (A) Western blot analysis of *ATM* protein expression in K562-edited cells. A single band of 350 kDa corresponding to *ATM* was observed in K562 cells electroporated with empty px458. A lower level of *ATM* expression was observed in IE-*hATM*sgRNA-edited cells, and an even lower level was noted in SDE-*hATM*sgRNA-edited cells. Vinculin expression of the cells was used as the loading control. (B) Western blot analysis of *ATM* expression in single-edited-cell clones. All clones derived from cells electroporated with empty vector, used as a control, showed a single band corresponding to *ATM*. Three of six IE-*hATM*sgRNA edited clones showed no expression of *ATM* and one of six had a lower level of *ATM* expression compared with controls. Only one of six SDE-*hATM*sgRNA-edited clones expressed *ATM*, while *ATM* expression could not be detected in the other five clones.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g005>

group, all alleles (100%) detected were predicted to be null alleles given the splicing site mutations (Fig 6 and S6 Table).

To confirm the *in-silico* predictions, one-cell stage embryos from two strains of mice were microinjected with Cas9 mRNA and both *Tyr* sgRNAs separately. Embryos microinjected with SDE-*mTyr*sgRNA or IE-*mTyr*sgRNA were implanted in two cell-stage in pseudopregnant

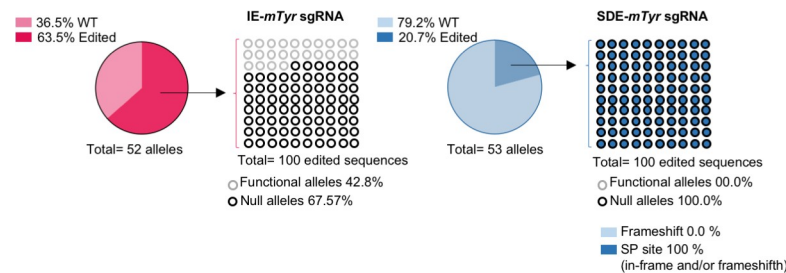


Fig 6. Next Generation Sequencing (NGS) analysis of CRISPR/Cas9 edited mouse embryos at *Tyr* locus. Graphic NGS analysis of CRISPR/Cas9-mediated edition of *Tyr* locus in mouse blastocysts. Genotyping of embryos microinjected with sgRNAs targeting *Tyr* gene, by NGS, revealed that only 67.57% of edited sequences from embryos microinjected with IE-*mTyr*sgRNA correspond to null alleles, while 100% SDE-*mTyr*sgRNA-modified alleles gave rise to null alleles. Black and gray circles correspond to null and functional alleles, respectively, while the background indicates the type of mutation (dark blue: splice donor site in-frame and/or frameshift; light blue: frameshift).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g006>

females. Full albinos, mosaics, and colored-coat pups were detected in all offspring of each group of microinjected embryos in both strains (Fig 7). 60 mice per group were analyzed by Sanger sequencing and a large number of mutant mice with one or two mutant alleles were detected. To address which sgRNA yielded a higher proportion of null alleles, we excluded all mice with unmuted alleles. All mice with at least one mutant allele (mosaic mice) were analyzed *in silico*. We detected a higher number of albino or mosaic mice in the SDE-*mTyr*sgRNA mouse group compared with the IE-*mTyr*sgRNA group (S7 Table).

Sanger sequencing and TIDE analysis of the SDE-*mTyr*sgRNA mouse group with any grade of albinism identified at least two alleles with frameshift mutations and/or splice mutations. As a representative example we show an offspring where we detected mosaic pups with three alleles: a wildtype allele, a frameshift null allele and a splicing-site-mutated allele arising from a point mutation (+1 bp insertion) at the intronic splice-site. We also detected coat-colored pups in IE-*mTyr*sgRNA targeted pups exclusively with two mutated alleles: a frameshift allele and a mutated allele arising from a nonsynonymous mutation (Fig 7 and S7 Table).

The sgRNA guide targeting the exon splice-donor site of *BCR/ABL* oncogene increases the efficiency for abrogating cell survival / proliferation oncogene-dependent

To test the efficiency of SDE-sgRNA and IE-sgRNA guides at switching off oncogenes we performed similar assays to generate *ABL* null alleles in the leukemic K562 cell line and to abrogate the oncogene activity of *BCR/ABL* oncogene fusion (Fig 1C).

Similarly to *TYR* and *ATM* genes, three individual electroporation assays of K562 cells were performed with each sgRNA directed towards the *ABL* exon 1 (SDE-*hABL-1*sgRNA and IE-*hABL-1*sgRNA) cloned in a CRISPR-Cas9-GFP mammalian expression vector. Sanger sequencing showed genome edition at expected cleavage point for each sgRNA guide and Tide analysis predicted a variety of small indels for each guide (Figs 2 and 3). NGS analysis showed the most frequent allele variations generated in K562 by electroporation with SDE- and IE-*hABL-1* sgRNAs (S8 Table). 40% (4/10) of the allelic variations generated by IE-*hABL-1* sgRNA gave rise to in-frame mutations. By contrast, SDE-*hABL-1* sgRNA gave rise to 100% (9/9) of knockout sequences, four of which (44.4%) were in-frame mutations, but with an altered canonical splicing sequence (S8 Table).

To test the ability of SDE sgRNAs to increase the efficiency at knocking out fusion oncogenes, we compared the proficiency at abrogating the cell survival and proliferation produced

SDE-mTyr sgRNA



SDE-mTyrsgRNA	Sequence (Splice site; Exon; Intron)	Mutation	Result	Protein translation
WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG			
Mosaic # 1	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del CAGGTA	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	In frame -3 bp / Sp donor site -6 bp	No
Black # 2	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del G	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	Sp donor site -2bp	No
Mosaic # 3	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del GGTA	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	Frameshift -1 bp / Sp donor site -5 bp	No
Mosaic # 4	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del CAGGTAAG	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	In frame -3 bp / Sp donor site -7 bp	No
Albino # 5	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del GG / Ins CAT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	Sp donor site	No
Albino # 5	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del A	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	Frameshift -1 bp / Sp donor site -1bp	No
Albino # 5	WT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG		Yes
	Del CCTGGCAGGTA / Ins ATAT	AGCCGAGCATCCTCTTCTCTCTGCGAGCTAGGATGCACATATAGAG	In frame / Sp donor site	No

Fig 7. In vivo Analysis of Tyr-null alleles generation by CRISPR/Cas9-induced mutations. A representative off-spring obtained from SDE-mTyrsgRNA. Most pups of SDE-mTyrsgRNA -edited embryos (4 of 5) showed a mutant phenotype (1 albino and 3 mosaic). The genetic characterization of the different alleles of the off-spring is showed below.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g007>

by the *BCR-ABL* oncoprotein through the induction of indels with SDE-sgRNA and IE-sgRNA CRISPR-Cas9 guides. In three independent assays, we electroporated the K562 *BCR/ABL* cell line with SDE-*hABL-1* and IE-*hABL-1*sgRNA. After 48 hours, we analyzed the effects on apoptosis and cell cycle (Fig 8). SDE-*hABL-1*sgRNA-targeted cells showed a higher level of apoptosis (86.8%) than noted in IE-*hABL-1*sgRNA cells (60.1%), while 32.4% of control cells were apoptotic (Fig 8A). K562 cells electroporated with SDE sgRNA yielded 10% more subG0 DNA content (45.3%) than IE-edited cells (34.5%) (Fig 8B). The quantification of annexin expression in K562-edited cells with SDE- and IE-*hABL-1* sgRNAs showed a higher level of expression in SDE-*hABL-1*sgRNA-edited cells (568.2 mfi) compared with IE-*hABL-1*sgRNA-edited cells (475.5 mfi) and K562 control cells (411.5 mfi) (Fig 8C).

Off-targets analysis showed no differences between sgRNAs designed against splice-donor site and internal-exon region

To determinate if the predicted off-targets were affected in a major manner by the SDE sgRNAs we studied the top 5 predicted off-targets of each independent sgRNA (Fig 9). We tested the ability of each sgRNA to induce genome edition in off-target sequences by the observation the heteroduplex formed in the edited sequences. The IE-sgRNAs produced genome edition in 5 of 25 analyzed off-target sequences, and the same proportion of edited off-target was found in SDE-sgRNAs, producing 4 altered sequences of 25 (Fig 9). Statistical analysis showed no significant differences between both sgRNAs groups (p value = 0.751).

Discussion

DSB induced by CRISPR/Cas9 technology is the gold standard for creating null alleles in any biological system. In most cases, DSBs are typically repaired by NHEJ, resulting in indel

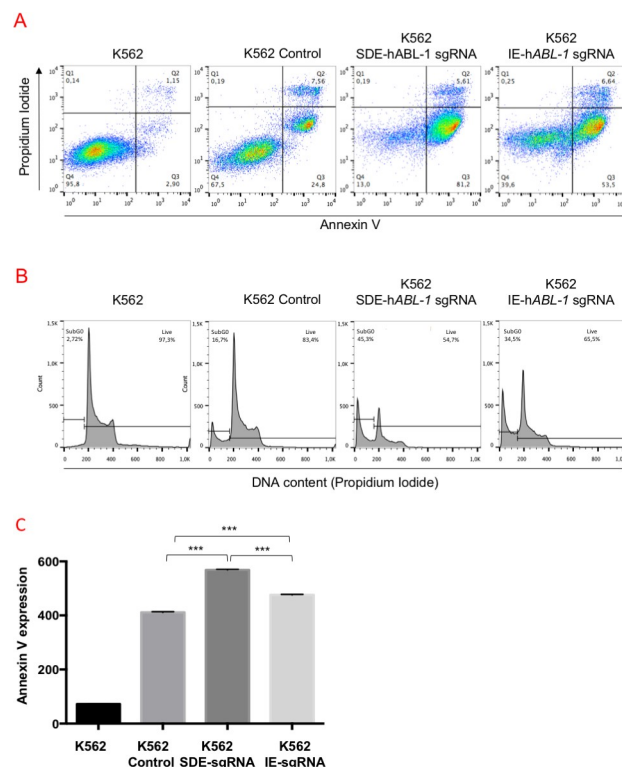
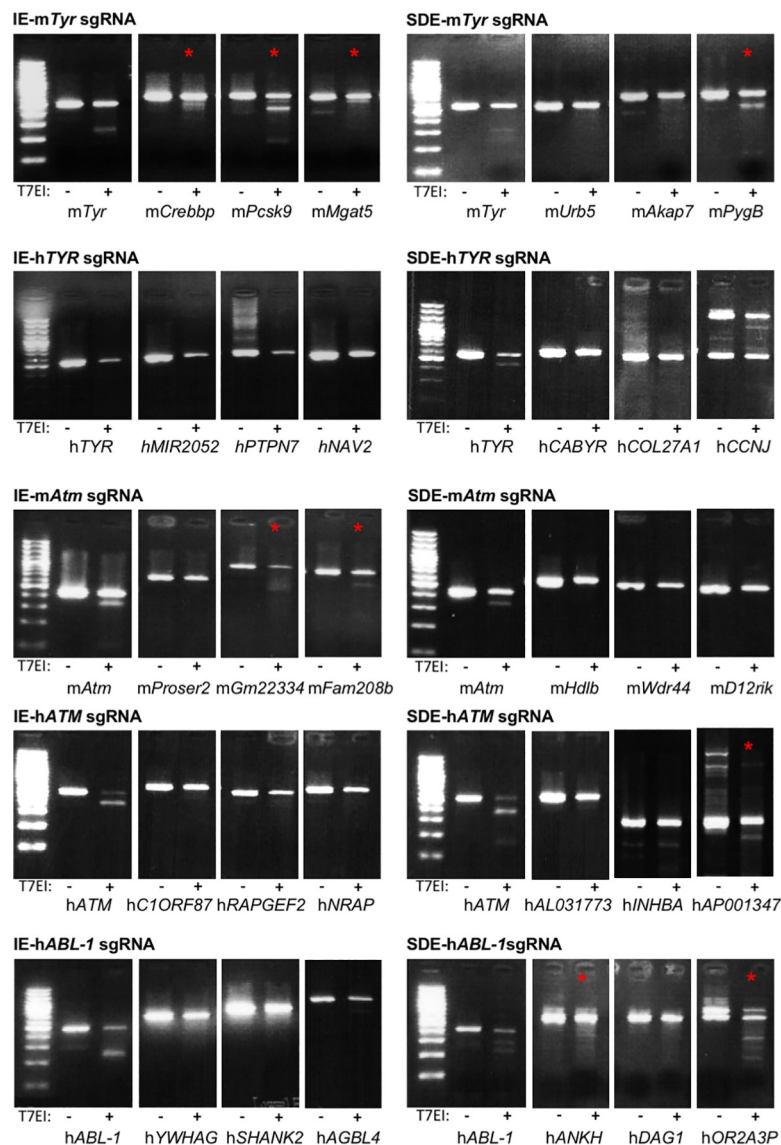


Fig 8. Functional analysis of *BCR-ABL-1* in CRISPR/Cas9 edited K562 cells. (A) Flow cytometry analysis of annexin V expression and cell cycle of K562-edited cells. SDE-hABL-1sgRNA trigger a higher number of apoptotic cells than IE-hABL-1sgRNA and control cells after electroporation with the empty vector. (B) The DNA content of the cells edited with SDE sgRNA gave 10% higher levels than IE-edited cells (45.3% vs. 34.5%). (C) The quantification of annexin V expression in K562-edited cells with SDE and IE hABL-1 sgRNAs showed a higher level of expression in SDE-hABL-1sgRNA edited cells (568,2 mfi) than in IE-hABL-1sgRNA-edited cells (475.5 mfi). Graph shows results from three independent experiments. ***, $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g008>

mutations. These mutations can generate knockout alleles when CRISPR/Cas9 is directed at coding sequences, but due to the variable size of NHEJ-induced indels, generating a full KO in one step cannot always be achieved at high frequency. This could be especially critical for gene therapy approaches. If there is an acceptable degree of efficiency of delivery of CRISPR/Cas9 reagents to the target cell, the key step for success lies in the effectiveness of a specific sgRNA at knocking out the oncogene. In this context, the null effect could be increased by sgRNAs targeting the exon SD boundaries. Following this strategy, the generation of null alleles could be increased in two independent ways: by the probabilities of producing a frameshift mutation and/or breaking the canonical pre-mRNA splicing. In the present work we have demonstrated that knockout efficiency can be increased using sgRNAs targeting the exon splice donor area. The study considered the predicted informatic score (most guides with a score of > 75) and the cut-site of the sgRNAs. It is important to note that for SDE-sgRNAs we chose PAMs to trigger DSBs inside the coding sequence that were located no further than five nucleotides from the end of the exon.

We noted that most of the mutant alleles produced in our assays in the Baf3 and k562 cell lines correspond to small indels, indicating that the DSB is repaired by blunt-end ligation independently of sequence homology, the classic nonhomologous end joining (C-NHEJ) mechanism[7]. NGS corroborated the Sanger sequences detected and exposed new mutant alleles that are likely to be little-represented in the edited cell line. As expected, NGS and Sanger



Off-target	IE-sgRNA	SDE-sgRNA
No edited	20	21
Edited	5	4

Chi-square test $P=0.751$ n.s.

Fig 9. Off-targets analysis of sgRNAs. Surveyor analysis of the top 5 predicted off-targets for each sgRNA used. Panel shows amplified sequence of target and 3 representative off-targets, non-treated and treated with T7 endonuclease I. Digestion reveals genome edition (red asterisk) when the off-target sequence carries some mutations. Table shows overall results from all off-targets analyzed. No differences were observed in number of edited off-targets by IE-sgRNAs compared with SDE-sgRNAs (Chi-square test $P = 0.751$ n.s.).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216674.g009>

sequencing highlighted the same alleles in *in vivo* assays of mouse zygotes, grown to blast or of mice born from them. *In silico* analysis of these mutant alleles revealed a full efficiency of the null effect in SDE-sgRNA compared with IE-sgRNA. When an IE-sgRNA was used, mutant alleles with mutations preserving the reading frame were detected. To corroborate the *in silico*

findings we Sanger-sequenced all mice born in both groups. Excluding unmutated mice, we detected color mice born from microinjected zygotes with IE-sgRNA with indels in one or more alleles. It is of particular note that we observed color mice with both alleles mutated, one of them with a frameshift mutation and the other with a mutation, indicating that some induced indels are not able to generate a frameshift mutation. By contrast, when we used a *Tyr* SDE-sgRNA, we detected albino or mosaic mice featuring one allele with a frameshift mutation and another with a mutation but a destroyed splice-donor site. This result demonstrates the higher null efficiency when an SDE-sgRNA is used. To determine whether this effect can be reproduced in another locus we employed the same assay but targeting the *ATM* and *ABL* loci. A similar result was obtained in both loci in human and mouse cell lines. Western blot analysis in cell clones from both groups corroborated the NGS and the results of their *in silico* analysis. More importantly, this approach can be efficiently used to abrogate oncogene expression. When a cancer cell is the target, a delivery strategy that can result in the expression of Cas9 and an oncogene-specific sgRNA in all infected cells is desirable. This is especially critical for *in vitro* gene therapy where the expansion processes of a selected edited cell are not available. Similarly, it is crucial for *in vivo* approaches in cancer therapies based on disrupting a driver oncogene. If the efficiency of delivery of CRISPR/Cas9 reagents to the cancer cell is acceptable, the key step for success lies in the effectiveness of a specific sgRNA at knocking out the oncogene. In most of these cases, the designs are based solely on off-target criteria. However, for those cases in which cellular selection is not an option and only one sgRNA can be used, the null effect could be increased with an sgRNA targeting the exon boundary. Various strategies at different molecular levels[24] have been employed to treat malignant diseases in recent decades, such as specific drug inhibitors acting at the protein level, gene suppression therapies at the mRNA level, and genome-editing nucleases at the DNA level. CRISPR/Cas9 works has the advantage of providing permanent and full gene knockout, and following this strategy, we abrogated p210 (BCR/ABLp210) oncoprotein expression in the K562 cell line. Using this approach, pools of K562 edited cells electroporated with SDE-sgRNAs or IE-sgRNA were studied. The loss of p210 expression in K562 cells with SDE-sgRNA resulted in a significant increase in apoptosis levels. Thus, this strategy could be adopted for gene therapy in cases for which cell selection is not an option and the delivery Cas9 vector only allows the accommodation of one sgRNA.

Conclusions

Genome-editing nucleases, like the popular CRISPR/Cas9, enable knockout cell lines and null zygotes to be generated by inducing site-specific DSBs within a genome. In most cases, when a DNA template is not present, the DSB is repaired by non-homologous end joining, resulting in small nucleotide insertions or deletions that can be used to construct knockout alleles. However, for several reasons, these mutations do not produce the desired null result in all cases, giving rise to a similar but functionally active protein. This undesirable effect could limit the efficiency of gene therapy strategies based on abrogating oncogene expression by CRISPR/Cas9 and should therefore be borne in mind. The use of an sgRNA-targeting splice donor site could improve the null result for *in vivo* gene therapies. This strategy could be adopted to abrogate *in vivo* the oncogenic activity involved in tumor maintenance.

Material & methods

Ethics statement

This study followed Spanish and European Union guidelines for animal experimentation (RD 1201/05, RD 53/2013 and 86/609/CEE respectively). The study was approved by Bioethics Committee of the University of Salamanca and Junta de Castilla y León, Spain (ref.000359).

Cell lines and culture conditions

Baf/3 is a murine interleukin 3-dependent murine pro-B cell [25]. Baf/3 was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of penicillin/streptomycin (Life Technologies) and 10% of WEHI-3-conditioned medium, as a source of IL-3.

The human CML-derived cell lines K562 were purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). K562 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). All cell lines were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The presence of mycoplasma was tested frequently in all cell lines with a MycoAlert kit (Lonza), using only mycoplasma-free cells in all the experiments carried out.

CRISPR/Cas9 system design and sgRNA cloning

pX458 (Addgene plasmid # 48138) [26], which contains the coding sequence of Cas9 nuclease and GFP, and a cloning site for sgRNA sequence, was digested with BpiI (NEB). To clone the sgRNAs into the pX458 vector, two complementary oligos were designed for each sgRNA that included two 4-bp overhang sequences (S9 Table). The sgRNA sequences were designed with the web tool of the Spanish National Biotechnology Centre (CNB)-CSIC (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>).

Two sgRNAs were designed for the mouse *Tyr* locus. One of them, IE-*mTyr*sgRNA, targets the exonic sequence in *Tyr* exon1, and the other, SDE-*mTyr*sgRNA, targets the exon1-intron1-2 junction. Two sgRNAs were designed to target homologous sequences in the human *TYR* locus: IE-*hTYR*sgRNA and SDE-*hTYR*sgRNA (Fig 1A).

In the same way, two sgRNAs against the mouse *Atm* locus (IE-*mAtm*sgRNA and SDE-*mAtm*sgRNA) and two sgRNAs against the human *ATM* locus (IE-*hATM*sgRNA and SDE-*hATM*sgRNA) were designed, one of each pair in the coding sequence of exon 10 (IE) and the other against the *ATM* exon10-intron10-11 splice donor exon (SDE) (Fig 1B).

Finally, two sgRNA against human *ABL-1* locus were designed: IE-*hABL-1*sgRNA, which targets the exon 6 coding sequence, and SDE-*hABL-1*sgRNA, which targets the exon 4 splice donor sequence (Fig 1C).

The two complementary oligos used to conform each sgRNA (S9 Table) were denatured at 95°C for 5 min, ramp-cooled to 25°C over 45 min to allow annealing, and finally ligated with the linearized pX458. 2 µl of the ligation reaction were used to transform competent cells, and single colonies were expanded using a QIAprep spin Maxiprep Kit (Qiagen) before plasmid extraction. The correct insertion of the sgRNA sequences was confirmed by Sanger sequencing.

In vitro cell electroporation

Mouse Baf/3 and human K562 cells were electroporated with pX458 containing sgRNAs against the *Tyr* and *ATM* loci, respectively, using Amaxa Nucleofector II (Lonza). 2 x 10⁶ Baf/3 mouse cells were electroporated with 15 µg of plasmid in 100 µl of electroporation buffer (5 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 120 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH7.2; 25 mM sodium succinate; 25 mM manitol) [27] using program X001, while 1 x 10⁶ k562 cells were electroporated with 10 µg of plasmid using program T016. 24 hours after electroporation, GFP-positive cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using FACS-Aria (BD Bioscience). 72 hours post-electroporation, the genome editing of the cells was analyzed.

Sequencing of sgRNA targets sites

Genomic DNA from cells was extracted using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. To amplify the different target regions of human and mouse *TYR* and *ATM* genes, and human *ABL-1*, PCR was performed with the oligos described in [S10 Table](#). Genomic DNA from single blastocyst-staged embryo was extracted in 10 μ l of lysis buffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL pH 8.5, 0.1% Triton x-100, and 4 mg/ml of proteinase K) at 55°C overnight, then heated at 95°C for 10 min. 2 μ l of this DNA solution was used as a template for two rounds of PCR (30 cycles + 20 cycles) to amplify the target sequences using a specific primer for each region ([S11 Table](#)).

PCR products were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and sequenced by the Sanger method using forward and reverse PCR primers.

The editing efficiency of the sgRNAs and the mutations potentially induced were assessed using Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) software (<https://tide-calculator.nki.nl>; Netherlands Cancer Institute), which only required two Sanger sequencing runs from wild-type cells and mutated cells.

To specifically identify the different generated mutations, Next Generation Sequencing (NGS) technology was employed with the same Sanger primers with the corresponding adapters added, to read each edited sequence individually.

The purified amplicons were mixed in equimolar ratios according to the number of molecules and diluted to a final concentration of 0.2 ng/ μ l. The indexed paired-end library was prepared with a Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina) and sequenced using an Illumina platform (NextSeq or MiSeq, 300 cycles). A median per base coverage of 27,538 reads (range 2096–88,976) was achieved. To call the sequence variants, an in-house bioinformatics pipeline was established. Sequencing reads were aligned to the mouse reference sequence genome (mm9) using bwa-0.7.12 software, and variant calling was performed with VarScan. v2.4. To visualize read alignment and confirm the variant calls, Integrative Genomics Viewer version 2.3.26 (IGV, Broad Institute, MA) was used.

Flow cytometry analysis and cell sorting of single-edited cell-derived clone

72 hours after sgRNA electroporation of K562 and Baf/3 cells, GFP-positive cells were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using FACS Aria (BD Biosciences), establishing the edited K562 and Baf/3 cell pool lines. For K562, single cells were seeded in 96-well plates by FACS, establishing six random single-cell-derived clones for both *ATM* sgRNAs, and used to analyze ATM protein expression. Six clones derived from cells electroporated with empty vector were used as controls.

Western blotting

ATM protein expression was assessed by SDS-PAGE and western blot using a rabbit anti-ATM antibody (1:1000; 2873S; Cell Signaling). Horseradish peroxidase-conjugated α -rabbit antibody (1:5000; 7074S; Cell Signaling) was used as a secondary antibody. Antibodies were detected using ECL Western Blotting Detection Reagents (RPN2209, GE Healthcare). The expression of vinculin (rabbit anti-vinculin; 1:1000; 4650S; Cell Signaling) was used as a loading control.

In vitro transcription of CRISPR/Cas9 system components, animals and embryo microinjection

All sgRNA sequences were PCR-amplified from px458-based vector with primers carrying the T7 RNA polymerase promoter at the 5' ends ([S11 Table](#)), and after column purification

(Roche) the resulting PCR was used as a template for T7 RNA polymerase transcription *in vitro* (MEGAscript T7 Transcription Kit, Thermo Fisher).

The Cas9 nuclease ORF, including NLS, was also PCR-amplified with primers carrying the T7 RNA polymerase promoter at the 5' ends (S11 Table). The PCR product was purified and used as a template for *in vitro* transcription, 5' capping (mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit, Thermo Fisher), and 3' poly(A) tailing (Poly(A) Tailing Kit, Thermo Fisher). Transcription products were purified with RNeasy Mini Kit (Qiagen) and eluted in nuclease-free EmbryoMax microinjection buffer (Millipore).

One-cell-staged embryos from superovulated C57BL/6J or B6/CBA hybrid females were harvested and microinjected with 20 ng/μl of sgRNA and 20 ng/μl of Cas9 mRNA into the cytoplasm and pronucleus. Embryo donor mice were euthanized by cervical dislocation and were given humanitarian care in accordance with bioethical committee of University of Salamanca (ref. 000359) and Spanish and European Union guidelines for animal experimentation.

Apoptosis and cell cycle analysis

Apoptosis was measured by flow cytometry with an annexin V-Dy634 apoptosis detection kit (ANXVVKDY, Immunostep) following the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^5 cells were collected and washed twice in PBS, and labeled with annexin V-DY-634 and non-vital dye propidium iodide (PI), allowing the discrimination of living-intact cells (annexin-negative, PI-negative), early apoptotic cells (annexin-positive, PI-negative) and late apoptotic or necrotic cells (annexin-positive, PI-positive). In parallel, cell distribution in the cell cycle phase was also analyzed by measuring DNA content (PI labeling after cell permeabilization). Plots show results of a representative experiment from three independent replicates.

Off-targets analysis

Predicted top 5 off-targets were analyzed by the T7 endonuclease I (T7EI) mismatch cleavage assay following manufacturer's indications (Integrated DNA Technologies) [28]. Target DNA sequences were amplified by PCR using specific oligonucleotides (S12 Table). To form the heteroduplex complexes, PCR products were denatured 95°C for 10 minutes, followed by temperature ramp (95–85°C, -2°C/sec and 85–25°C, 0.3°C/sec). The heteroduplex products were incubated with T7EI 1 hour at 37°C and visualized in 2% agarose gel.

Statistical analysis

Statistical analysis of annexin V expression was performed using GraphPad Prism version 6.00 for Mac OS X, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Experimental results were expressed as median ± standard error (SEM). Nonparametric variables were analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. Values with $p < 0.001$ (indicated by three asterisks) were considered to be statistically significant. Chi-square test was performed to analyze the difference obtained in off-target analysis.

Supporting information

S1 Table. *In vitro* genome editing of the mouse *Tyr* locus using sgRNA against exon coding sequence (IE) and the coding splice-donor exon (SDE) sequence. NGS analysis of allelic variants induced in Baf/3 mouse cells. (DOCX)

S2 Table. *In vitro* genomic edition of human *TYR* locus using sgRNA against exon coding sequence (IE) and coding SDE sequence. NGS analysis of allelic variants induced in K562

human cells.
(DOCX)

S3 Table. *In vitro* genome editing of the human *ATM* locus using sgRNA against the exon coding sequence (IE) and the coding SDE sequence. NGS analysis of allelic variants induced in K562 human cells.
(DOCX)

S4 Table. *In vitro* genome editing of the mouse *Atm* locus using sgRNA against the exon coding sequence (IE) and the coding SDE sequence. NGS analysis of allelic variants induced in Baf/3 mouse cells.
(DOCX)

S5 Table. NGS analysis of *ATM* allelic variants induced in human K562 single-edited cell-derived clones.
(DOCX)

S6 Table. *In vivo* genome editing of *Tyr* locus in mouse embryos using sgRNA against the coding sequence (IE) and the SDE sequence. NGS analysis of allelic variants induced in microinjected mouse blastocysts.
(DOCX)

S7 Table. *In vivo* genome editing of *Tyr* locus in mice using sgRNA against the coding sequence (IE) and the coding SDE sequence. Observed phenotype and Sanger analysis of allelic variants induced in mice born after CRISPR/Cas9 system microinjection.
(DOCX)

S8 Table. *In vitro* genome editing of the human *ABL-1* locus using sgRNA against the exon coding sequence (IE) and the coding SDE sequence. NGS analysis of allelic variants induced in K562 cells.
(DOCX)

S9 Table. Oligos designed for each sgRNA.
(DOCX)

S10 Table. Oligos used for target genome sequence amplification.
(DOCX)

S11 Table. Oligos used for *in vitro* transcription of sgRNA and Cas9 mRNA.
(DOCX)

S12 Table. Oligos used for off-target genome sequence amplification.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors wish to express their sincere thanks to Dionisio Martín Zanca, Alberto Pendás (Spanish Research Council, CSIC), for their technical assistance and contribution to our CRISPR/Cas9 studies; Servicio de Citometría, Servicio de Experimentación Animal (University of Salamanca) and Servicio de Secuenciación (IBMCC) for their technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Ignacio García-Tuñón, Manuel Sánchez-Martín.

Formal analysis: Jesús María Hernández-Sánchez, Marta Martín-Izquierdo.

Funding acquisition: Jesús María Hernández-Rivas.

Investigation: Ignacio García-Tuñón, Verónica Alonso-Pérez, Elena Vuelta, Sandra Pérez-Ramos.

Methodology: Ignacio García-Tuñón, Verónica Alonso-Pérez, Elena Vuelta, Sandra Pérez-Ramos, María Herrero, Lucía Méndez, Jesús María Hernández-Sánchez, Marta Martín-Izquierdo.

Resources: Raquel Saldaña, Julián Sevilla, Fermín Sánchez-Guijo.

Supervision: Manuel Sánchez-Martín.

Visualization: Manuel Sánchez-Martín.

Writing – original draft: Ignacio García-Tuñón, Manuel Sánchez-Martín.

Writing – review & editing: Ignacio García-Tuñón, Manuel Sánchez-Martín.

References

1. Gaj T, Gersbach CA, Barbas 3rd CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013/05/15. 2013; 31: 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004> PMID: 23664777
2. Grimm D, Kay MA. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2007/11/21. 2007; 473–481. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.473> PMID: 18024667
3. Bobbin ML, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016/01/08. 2016; 56: 103–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103633> PMID: 26738473
4. Porteus M. Genome Editing: A New Approach to Human Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015/11/14. 2016; 56: 163–190. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124454> PMID: 26566154
5. Garcia-Tunon I, Hernandez-Sanchez M, Ordonez JL, Alonso-Perez V, Alamo-Quijada M, Benito R, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017; <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15215> PMID: 28212528
6. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-). 2012; 337: 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829> PMID: 22745249
7. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 2015/10/07. 2016; 26: 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009> PMID: 26437586
8. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med.* 2018/06/13. 2018; 24: 927–930. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z> PMID: 29892067
9. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol.* 2018/07/17. 2018; 36: 765–771. <https://doi.org/10.1038/nbt.4192> PMID: 30010673
10. Kotterman MA, Schaffer D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2014; 15: 445–451. <https://doi.org/10.1038/nrg3742> PMID: 24840552
11. Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun.* 2017; 8: 14500. <https://doi.org/10.1038/ncomms14500> PMID: 28220790
12. Graham DB, Root DE. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biol.* 2015; 16: 260. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0823-x> PMID: 26612492
13. Sanchez-Garcia I. Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annu Rev Genet.* 1997/01/01. 1997; 31: 429–453. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.429> PMID: 9442903

14. Perez-Mancera PA, Sanchez-Garcia I. Understanding mesenchymal cancer: the liposarcoma-associated FUS-DDIT3 fusion gene as a model. *Semin Cancer Biol.* 2005/04/14. 2005; 15: 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.01.006> PMID: 15826835
15. Wassef M, Luscan A, Battistella A, Le Corre S, Li H, Wallace MR, et al. Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods.* 2017; 121–122: 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.05.003> PMID: 28499832
16. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.* 1992/09/01. 1992; 90: 41–54. PMID: 1427786
17. Treisman R, Proudfoot NJ, Shander M, Maniatis T. A single-base change at a splice site in a beta 0-thalassaemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell.* 1982/07/01. 1982; 29: 903–911. PMID: 7151176
18. Treisman R, Orkin SH, Maniatis T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned beta-thalassaemia genes. *Nature.* 1983; 302: 591–596. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6188062> PMID: 6188062
19. Camats N, Pandey A V, Fernandez-Cancio M, Fernandez JM, Ortega AM, Udhane S, et al. STAR splicing mutations cause the severe phenotype of lipoid congenital adrenal hyperplasia: insights from a novel splice mutation and review of reported cases. *Clin Endocrinol.* 2014; 80: 191–199. <https://doi.org/10.1111/cen.12293> PMID: 23859637
20. Matsuda D, Sato H, Maquat LE. Chapter 9. Studying nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Methods Enzym.* 2009/02/14. 2008; 449: 177–201. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(08\)02409-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(08)02409-9)
21. Elsayed LEO, Mohammed IN, Hamed AAA, Elseed MA, Salih MAM, Yahia A, et al. Case report of a novel homozygous splice site mutation in PLA2G6 gene causing infantile neuroaxonal dystrophy in a Sudanese family. *BMC Med Genet.* 2018/05/10. 2018; 19: 72. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0592-y> PMID: 29739362
22. Liu G, Wang X, Qin M, Sun L, Zhu J. A Novel Splicing Mutation of Ectodysplasin A Gene Responsible for Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *Oral Dis.* 2018/04/21. 2018; <https://doi.org/10.1111/odi.12874> PMID: 29676859
23. Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet.* 2014/12/07. 2014; 95: 754–762. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002> PMID: 25480036
24. García-Tuñón I, Vuelta E, Pérez-Ramos S, Hernández-Rivas JM, Méndez L, Herrero M, et al. CRISPR-ERA for Switching Off (Onco) Genes. In: Singh Aditi, editor. *Modulating Gene Expression—Abridging the RNAi and CRISPR-Cas9 Technologies.* IntechOpen; 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80245>
25. Palacios R, Steinmetz M. II-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell.* 1985/07/01. 1985; 41: 727–734. PMID: 3924409
26. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013/10/26. 2013; 8: 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143> PMID: 24157548
27. Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Limia CG, Redondo P, et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016; 4: 99. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00099> PMID: 28168187
28. Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda).* 2015; 5: 407–15. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015834> PMID: 25566793

Review

Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy

Elena Vuelta ¹ , Ignacio García-Tuñón ² , Patricia Hernández-Carabias ¹, Lucía Méndez ¹ and Manuel Sánchez-Martín ^{1,2,*} 

¹ Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; elena.vuelta.r@gmail.com (E.V.); patri_galle@usal.es (P.H.-C.); mendez_lucia@usal.es (L.M.)

² Institute de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain; ignacio.tunon@usal.es

* Correspondence: adolsan@usal.es

Simple Summary: In the last two decades, the therapeutic landscape of several tumors have changed profoundly with the introduction of drugs against proteins encoded by oncogenes. Oncogenes play an essential role in human cancer and when their encoded proteins are inhibited by specific drugs, the tumoral process can be reverted or stopped. An example of this is the case of the chronic myeloid leukemia, in which all the pathological features can be attributed by a single oncogene. Most patients with this disease now have a normal life expectancy thanks to a rationality designed inhibitor. However, the drug only blocks the protein, the oncogene continues unaffected and treatment discontinuation is only an option for a small subset of patients. With the advent of genome-editing nucleases and, especially, the CRISPR/Cas9 system, the possibilities to destroy oncogenes now is feasible. A novel therapeutic tool has been developed with unimaginable limits in cancer treatment. Recent studies support that CRISPR/Cas9 system could be a definitive therapeutic option in chronic myeloid leukemia. This work reviews the biology of chronic myeloid leukemia, the emergence of the CRISPR system, and its ability as a specific tool for this disease.



Citation: Vuelta, E.; García-Tuñón, I.; Hernández-Carabias, P.; Méndez, L.; Sánchez-Martín, M. Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy. *Biology* **2021**, *10*, 118. <https://doi.org/10.3390/biology10020118>

Academic Editor: Magali Cucchiaroni

Received: 11 January 2021

Accepted: 2 February 2021

Published: 4 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The constitutively active tyrosine-kinase *BCR/ABL1* oncogene plays a key role in human chronic myeloid leukemia development and disease maintenance, and determines most of the features of this leukemia. For this reason, tyrosine-kinase inhibitors are the first-line treatment, offering most patients a life expectancy like that of an equivalent healthy person. However, since the oncogene stays intact, lifelong oral medication is essential, even though this triggers adverse effects in many patients. Furthermore, leukemic stem cells remain quiescent and resistance is observed in approximately 25% of patients. Thus, new therapeutic alternatives are still needed. In this scenario, the interruption/deletion of the oncogenic sequence might be an effective therapeutic option. The emergence of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) technology can offer a definitive treatment based on its capacity to induce a specific DNA double strand break. Besides, it has the advantage of providing complete and permanent oncogene knockout, while tyrosine kinase inhibitors (TKIs) only ensure that *BCR-ABL1* oncoprotein is inactivated during treatment. CRISPR/Cas9 cuts DNA in a sequence-specific manner making it possible to turn oncogenes off in a way that was not previously feasible in humans. This review describes chronic myeloid leukemia (CML) disease and the main advances in the genome-editing field by which it may be treated in the future.

Keywords: CML; CRISPR/Cas9; *BCR/ABL1*; genome editing

1. Clinical Features of Chronic Myeloid Leukemia

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease with an incidence of 1–2 cases per 100,000 each year, accounting for 15% of all new cases of leukemia [1]. The frequency is higher among adults, in whom the mean age of incidence is about 55 years,

and indeed, rarely arises during childhood. It may affect both sexes, but is slightly more common in males, with a ratio of 2.2 men to 1.4 women per 100,000 affected [1,2]. The most common clinical symptoms of CML include fatigue, anemia, splenomegaly, abdominal pain, and recurrent infections. However, a large proportion of asymptomatic patients are diagnosed after an unrelated medical examination [1]. Three clinical phases of its pathological evolution are recognized. At first, CML disease is characterized by a myeloid hyperplasia in an indolent chronic phase (CP). At this point, leukemic stem cells (LSCs) respond to growth factors, but myeloproliferative differentiation pathways acquire an advantage because they are the main cause of the massive myeloid expansion characteristic of CML [3]. In this initial phase, myeloid progenitors and mature cells accumulate in the blood and extramedullary tissues. Without effective therapy, CML progresses through a period of increasing instability known as the acceleration phase (AP), ending in an acute leukemic-like disease known as the blast crisis phase (BP). The definitions of AP and BP are largely dependent on the proportion of blasts in the blood and bone marrow. AP and BP are characterized by a maturation arrest in the myeloid or lymphoid lineage, and newly accumulated genetic and epigenetic aberrations occur in LSCs [4]. The final BP stage can result in a lymphoblastic (25%), myeloblastic (50%), or biphenotypic/undifferentiated acute leukemic phenotype (25%), which indicates a stem origin for CML disease [5], as shown in Figure 1. Finally, bone marrow failure due to a lack of cell differentiation, and a massive infiltration by immature blasts, causes patient mortality from infection, thrombosis, or anemia [6].

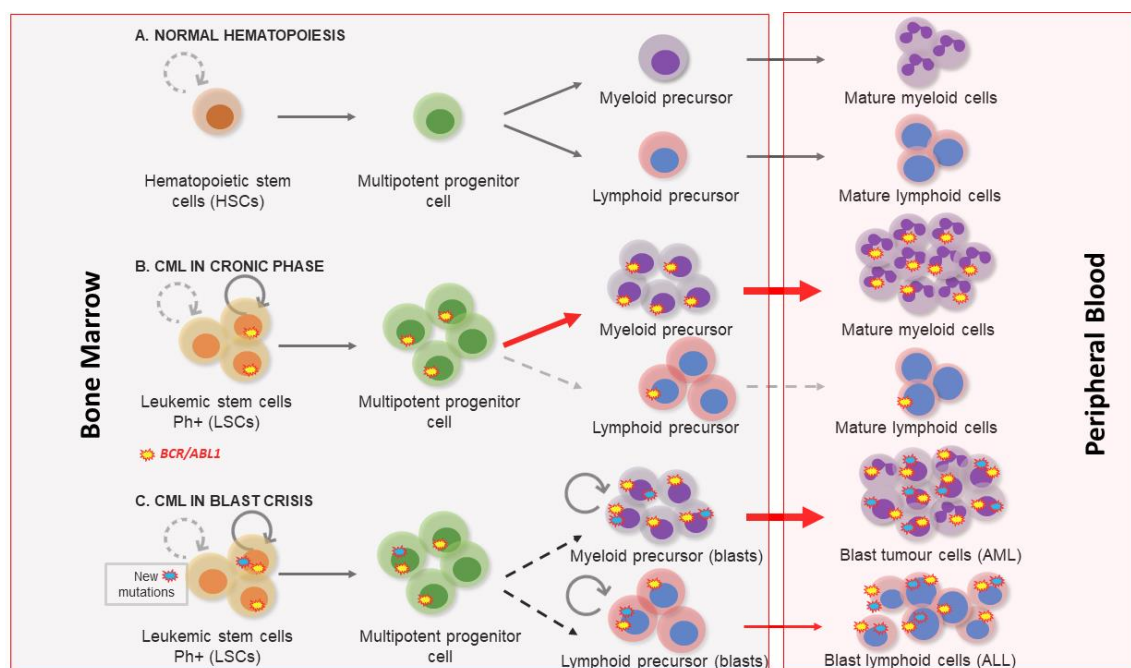


Figure 1. Chronic myeloid leukemia clinical phases. (A) Normal hematopoiesis characterized by the existence of hematopoietic stem cells with a controlled self-renewal and multipotency ability, resulting in balanced hematopoiesis between myeloid and lymphoid lineages. (B) In the chronic phase the myeloproliferative differentiation pathway acquires an advantage, and a massive myeloid expansion is produced. (C) Blast crisis is characterized by a maturation arrest in the myeloid or lymphoid lineage. Newly accumulated genetic and epigenetic aberrations appear in leukemic stem cells (LSCs) and blast cells go out from bone marrow to peripheral blood.

Diagnosis is based on detecting the hallmark of CML, the presence of the chromosome 22 abnormality known as Philadelphia (Ph), named after the US city in which it was first observed. It is the result of the reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22-t(9;22) [7]. Conventional cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH), and reverse

transcription PCR (RT-PCR) are the techniques commonly used to confirm a diagnosis of CML and to evaluate the response to therapy.

Before successful treatments became available, the median survival of CML patients after diagnosis was approximately 3–5 years [8,9]. The therapeutic landscape of CML changed profoundly with the introduction of tyrosine kinase inhibitor (TKI) drugs [8,10,11], and most patients with CP-CML now have a normal life expectancy. However, treatment discontinuation is only an option for a small subset of patients [12].

2. Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia

Nowell and Hungerf, in 1960, first described the Ph chromosome, a small chromosome present in the bone marrow cells of CML patients [7]. It was the first time that a chromosomal abnormality had been linked to a particular neoplasia [13]. Subsequent investigations confirmed that the generation of the Ph chromosome was due to the t(9;22) (q34;q11) translocation. The next breakthrough in our understanding of CML occurred in the 1980s, when it was demonstrated that this rearrangement gave rise to a fusion gene [14]. In this translocation, the analogue of the *v-ABL* protooncogene from chromosome 9 is moved to the breakpoint cluster region of the *BCR* gene on ch22. The location of the breakpoints between the two loci is variable [15]. Commonly, the breakpoint at the *ABL* locus occurs in a DNA region spanning more than 200 kb housing exon 2. At the *BCR* locus, the breakpoints occur in the major breakpoint cluster region (M-*bcr*), which spans a 3 kb region that includes exons 13 and 14 of *BCR*. All the rearrangements involving both breakpoint regions give rise to a 210 kDa protein, the most common chimeric transcript in CML [16]. However, in a minority of CML cases, the *BCR* breakpoint is located near exon 2, termed the minor breakpoint cluster region (m-*bcr*). In these cases, the resulting mRNA gives rise to a 190 kDa protein [15]. Finally, another infrequent breakpoint cluster region (μ -*bcr*) exists, downstream of *BCR* exon 19, which generates a 230 kDa protein when it is translocated to the *ABL1* locus [17], as shown in Figure 2.

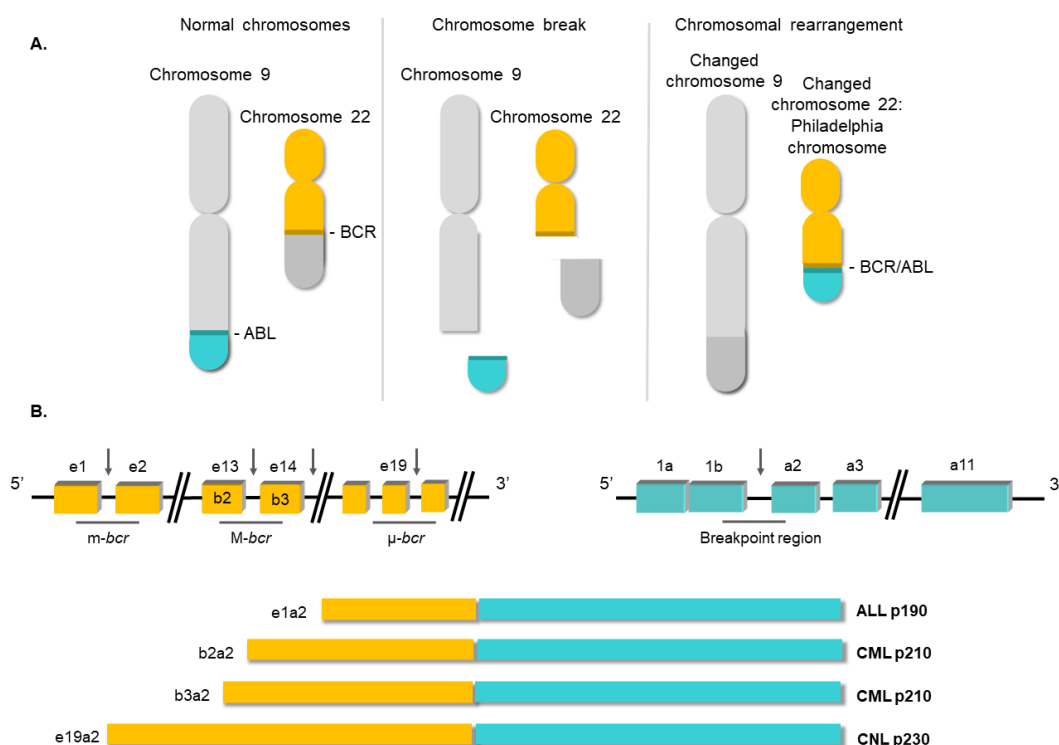


Figure 2. Structure of the *BCR/ABL1* oncogene. (A) Schematic representation of the t(9;22) (q34;q11) translocation triggering the Philadelphia chromosome. (B) Breakpoint locations between *BCR* and *ABL1* genes. Different fusion protein combinations yield different outcomes.

Since the *BCR/ABL1* fusion was described, the efforts of the scientific community have focused on elucidating its molecular roles in CML pathology. Several studies have shown the aberrant and constitutive tyrosine kinase activity of the *BCR/ABL1* oncoprotein, highlighting this activity as being responsible for the transformation of the hematopoietic stem cell [18–21]. The fusion of the two genes constitutively activates the tyrosine kinase domain of *ABL1*, which contains three SRC homology domains (SH1–SH3). The SH1 domain enables the tyrosine kinase function, whereas the SH2 and SH3 domains mediate interactions with other proteins [22]. The SH3 domain is critical to the regulation of *ABL1* kinase activity, thereby presenting a target for clinical therapy. It is known that the fusion between the 5' end of *BCR* and the SH3 domain of *ABL1* abrogates the physiological suppression of the kinase [23]. Meanwhile, *BCR* has an important coiled-coil (CC) domain that will allow *BCR/ABL1* dimerization and subsequent trans-autophosphorylation, thus increasing the molecular signal [24], as shown in Figure 3. The phosphorylation of the Y-177 tyrosine residue domain SH2 of *ABL* allows the high-affinity binding of the growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) as well as the scaffolding protein Gab2, activating the Ras pathway [25]. This aberrant kinase signaling activates many target proteins, such as the PI3K, AKT, JNK, and SRC family kinases, as well as transcription factors such as STATs, nuclear factor- κ B, and MYC [26–28].

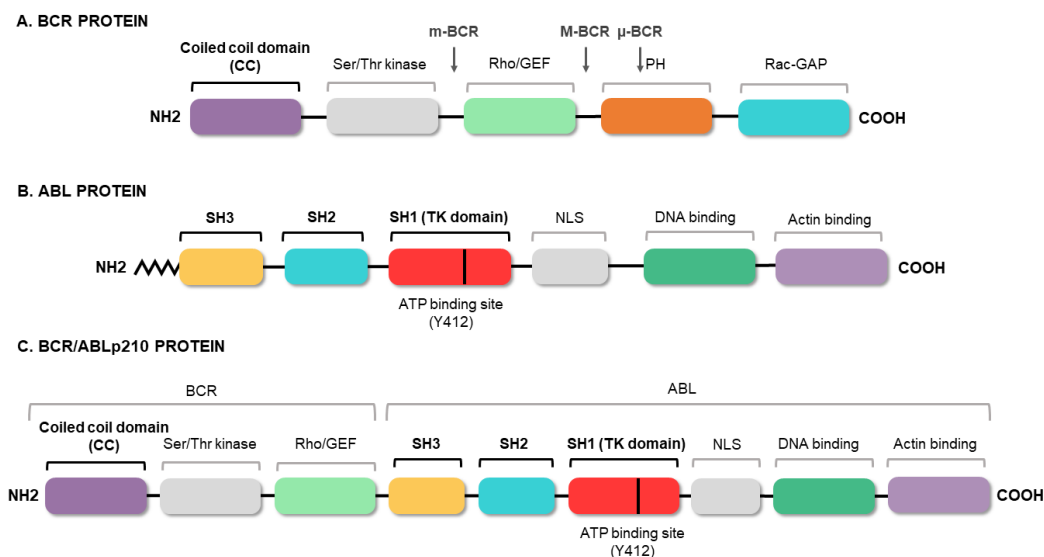


Figure 3. *BCR/ABL* protein domains. Protein regions located in the *BCR* (A) and *ABL* (B) proteins, and those maintained in the fusion (C). The figure highlights the coiled-coil (CC) domain of *BCR*, which allows the dimerization of the oncoprotein, and the three SRC domains of *ABL1*, including the tyrosine kinase domain (SH1) and the regulatory domains (SH2 and SH3).

The constitutively active signaling causes cell reprogramming and expansion of the LSC clone. As a result, *BCR/ABL1*-positive hematopoietic stem cells exhibit uncontrolled proliferation [29], lack of response to apoptotic signals [30], alterations in cell adhesion [31], impaired differentiation [32], and independence of growth factors [33]. As a consequence, a myeloid differentiation bias is commonly observed in the chronic phase of CML.

3. Conventional Therapies for Chronic Myeloid Leukemia

The history of CML treatment can be considered one of the great milestones of modern cancer medicine. From its discovery until the 1980s, the standard treatment for CML consisted of conventional chemotherapy. Arsenic was the first treatment to be administered in the 19th century, but was superseded by alkylating drugs such as busulfan and hydroxyurea in the 1960s [34,35]. Unfortunately, they did not delay the onset of disease progression and facilitated only a modest improvement in survival. The introduction of interferon- α in the 1970s induced complete cytogenetic remission in 10–15% of patients, and increased median survival to 6 years [36]. However, interferon- α treatment has serious

side-effects, and treatment had to be discontinued in most patients, causing them to relapse. In this context, allogeneic stem cell transplantation (SCT) was the only therapeutic option that could provide increased long-term survival, and so it became the first-line treatment in the 1990s for patients in the chronic phase [37–39]. Even today, this therapeutic option is the only one with the potential to definitively cure CML patients in this phase. The SCT procedure involves bone marrow ablation (by chemotherapy or radiotherapy) followed by the infusion of normal allogeneic stem cells. However, it is only available to a small number of patients who have an HLA-matched donor, and is associated with a significant transplant-related mortality rate [39]. Nowadays, SCT is used solely as a last-resort salvage option.

As mentioned above, CML is a type of cancer in which all the pathological features can be attributed to a single genetic event, in this case the *BCR/ABL1* fusion. Knowing that the tyrosine kinase activity of *BCR/ABL1* is essential for the malignant transformation of cells, the search for compounds that inhibit this activity became imperative. During the 1990s, various tyrosine kinase inhibitors (TKIs) were tested to evaluate their therapeutic potential in CML [40,41]. The mechanism of action of these compounds is based on competition with adenosine triphosphate (ATP) or the protein substrate of the kinase, whereby *BCR/ABL1* activity is inhibited at the protein level. Finally, in the 2000s, the Novartis compound STI571 (later known as imatinib mesylate), which showed surprising results by selectively inhibiting *BCR/ABL1* at micromolar concentrations, was approved as therapy for CML [42,43]. The arrival of TKIs marked a watershed in the treatment of CML and they remain the frontline therapy for CML. Thanks to TKIs, CP-CML patients, who, before 2001, had a survival rate of 20% at 8 years, now have a rate of 87%, and a life expectancy like those of healthy people of the same age [10,11,17]. Despite the success achieved with TKI-based treatments, there are still obstacles to overcome. The main concern is that TKI drugs do not tackle the etiological cause of CML and the oncogenic event remains uncorrected/unedited. The existence of residual *BCR/ABL*-positive cells, which remain “oncogenic-quiescent”, has been demonstrated, indicating that TKIs do not completely eliminate the LSCs [12]. TKIs efficiently silence the oncogenic activity of *BCR/ABL* while the drug is present, but the remaining LSCs can lead to relapse after TKI therapy ceases, as shown in Figure 4.

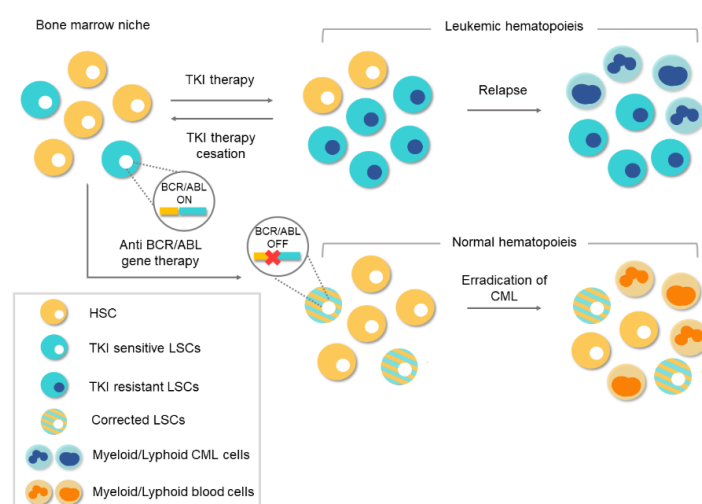


Figure 4. Conventional therapies vs. gene therapy for chronic myeloid leukemia (CML). Tyrosine-kinase inhibitor (TKI)-based conventional therapies are effective at silencing *BCR/ABL1* in leukemic stem cells (LSCs). Treatment cessation can lead to relapse because of the existence of residual *BCR/ABL1*-positive cells. The appearance of TKI-resistant LSCs during treatment can lead to a relapse of the disease. However, anti-*BCR/ABL1* gene therapy would eliminate the oncogene at the genome level. Corrected LSCs would be able to repopulate the bone marrow niche and thereby enable normal hematopoiesis.

In this scenario, lifelong oral medication is necessary, and treatment discontinuation is only an option in those patients who were able to achieve and maintain strong molecular responses. Lifelong administration facilitates adverse effects in many patients and a significant percentage of them eventually become resistant to TKI treatment [44]. The identification of various forms of resistance has led to the development of second- and third-generation TKIs that are effective against kinase-specific mutations in these patients [45]. Taking this therapeutic scenario into account, it is still necessary to seek new and definitive alternative therapies. Currently, any coding sequence can be abolished by CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 nucleases [46–48] or zinc finger nuclease [49], which means there is an opportunity of a definitive cure available to TKI-resistant CML patients. Thus, CRISPR/Cas9 system could be a definitive therapeutic option.

4. Genome-Editing Nucleases for Gene Therapy

Advances in molecular biology and genetics in recent years have broadened our knowledge of genetically based diseases, and very many genes involved in their development have been identified. These same advances have made it possible to develop the genome-editing technology with which these candidate genes can be genetically manipulated. With the advent of engineered chimeric proteins with nuclease activity, such as zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs), genome manipulation has become more feasible than ever [50,51]. These new approaches overcome the difficulties associated with previous genome-editing techniques based on homologous recombination (HR), such as low efficiency, and laborious and time-consuming assays [52]. The mechanism of action of genome-editing nucleases is based on the generation of double-strand breaks (DSBs) in the DNA that stimulate the endogenous cellular DNA repair mechanisms: non-homologous end-joining (NHEJ) and homology-directed repair (HDR). NHEJ results in the introduction of random insertion or deletion (indel) mutations that, in a coding sequence, most frequently lead to frameshift mutations that generate null alleles. The HDR pathway exploits the phenomenon of homologous recombination specifically to introduce an exogenous donor DNA template in the DSB site, allowing mutated sequences to be replaced or edited [53], as shown in Figure 5.

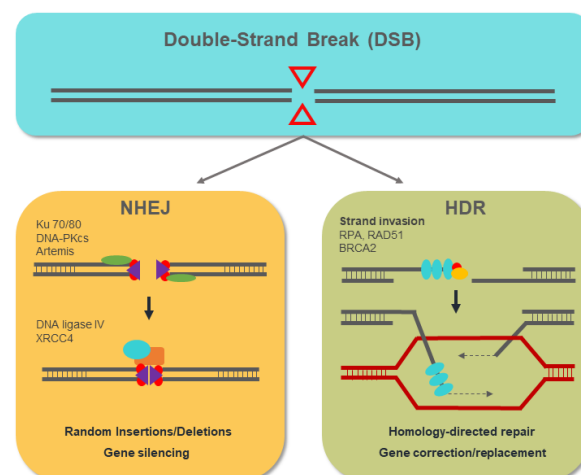


Figure 5. The non-homologous end-joining (NHEJ) mechanism involves the action of the proteins ku70/80, DNA-PKcs, and Artemis, with the ability to bind to the free DNA ends that are generated. The resected DNA ends are joined by the action of ligase IV with the insertion of a variable number of nucleotides (indels) that, in most cases, lead to the generation of null alleles. The homology-directed repair (HDR) pathway begins with the resection of the released DNA ends. The RPA, Rad51, and BRCA2 proteins act by binding and protecting the ssDNA that is generated. Through homologous recombination, the HDR pathway allows the introduction of DNA templates from exogenous donors at the double-strand break (DSB) site, replacing the target genomic sequence.

ZFN and TALEN have been widely used for decades, but the proteinaceous nature of their structure leads to serious technical drawbacks, such as the complexity of design and high costs [54]. Fortunately, the recent development of the CRISPR/Cas9 system in the genome-editing field has revolutionized this methodology. The simplicity of this system offers a powerful, effective, low-cost, and universal tool heralding a new era for gene therapy.

5. Overview of the CRISPR/Cas9 System

Most of archaea and almost 50% of bacteria have an adaptive immune system to defend them against phage infection. This system is defined by a genomic locus with a series of short palindromic repeats separated by unique “spacers”, preceded by an AT-rich “leader” sequence and forming a cluster [55]. Francisco Mojica was the first researcher in 1993 to describe this matrix of tandem-repeated sequences working on the archaea *Haloferax mediterranei* [56]. Previously, a similar structure was described in *Escherichia coli* and he also spotted a connection with eubacteria [57]. Mojica coined the acronym of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) in accordance with Ruud Jansen, who first used the term in print in 2002 [58]. Three years later, it was reported that these unknown spacer sequences had a high percentage of similarity with sequences found in various types of bacteriophages and plasmids and it may represent an immunological memory [59–61].

In 2007, Barrangou et al. demonstrated that the CRISPR system was a rudimentary prokaryotic immune system that protects prokaryotes against foreign DNA infections [62]. They also studied the role of the CRISPR-associated proteins (Cas) Cas7 and Cas9, suggesting that Cas7 was involved in generating new spacers and repeats and Cas9 in breaking the DNA [63]. Later it was showed that the different spacers are interspersed with tandem sequences and they are expressed as small guide CRISPR RNAs (crRNAs). These crRNAs were responsible for CRISPR-based resistance and they can be transferred from a resistant to a naïve strain, inducing resistance in the second. crRNAs drive the Cas9 protein to cleave the invader genome, and this find opened the door to direct the destruction of a DNA sequence like a restriction enzyme but in a specifically addressable manner [64–67]. Importantly, the only requirement for Cas9 nuclease activity was the existence of a small PAM motif (protospacer adjacent motif) at the 3' end of the target sequence [68–70]. A single precise blunt-end cleavage event three nucleotides upstream of the PAM sequence was the consequence of the Cas9 nuclease activity.

The transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) completed the puzzle to clarify the nature of Cas9 activity [71]. The tracrRNA is a scaffold that partially hybridizes with the crRNA and the Cas9 endonuclease, allowing all the components to be assembled [48], as shown in Figure 6.

To further simplify the system, Charpentier and Doudna showed that the two RNAs could function in vitro when fused into a single-guide RNA (sgRNA). Like Siksnys [72], they showed that Cas9 could cut purified DNA in vitro and it could be programmed with custom-designed sgRNAs [48].

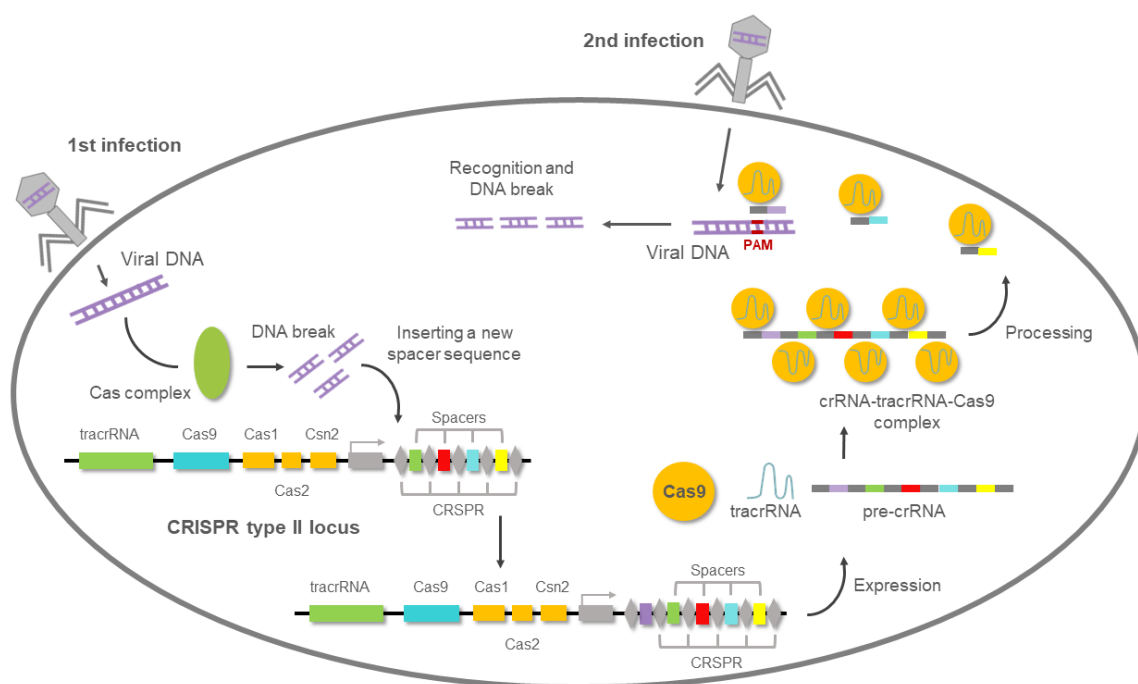


Figure 6. CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-mediated adaptive immunity system presents in prokaryotes. After the first viral infection, the Cas complex excises the viral DNA, then introduces it into the bacterial genome. When the second viral infection occurs, a complementary RNA (crRNA) to that of the viral genome is used to guide the Cas9 nuclease to degrade the viral DNA.

These discoveries and the demonstration of their *in vitro* activity opened the door to using this system as a genome-editing nuclease [73]. However, the question that remained to be addressed was whether the CRISPR system would also work in mammalian cells. By mid-2012, Feng Zhang designed a robust three-component system consisting of Cas9 (orthologs from *Streptococcus thermophilus* or *S. pyogenes*), tracrRNA, and a CRISPR array for targeting 16 sites in the human and mouse genomes. Zhang answered the question and he showed that it was possible to mutate one or several genes at the same time, inducing indels by NHEJ. Besides, the CRISPR system could insert new sequences at the target site via HR when a repair template was added [74,75]. Its simplicity, effectiveness, and universality mean that the CRISPR/Cas9 system has rapidly become the preferred tool for RNA-guided genome editing. In fact, it has been widely applied for gene modification in several model systems [76–80]. In 2006, the emergence of the “base editing” era, a new approach that enables the direct, irreversible conversion of one target DNA base into another in a programmable manner, without requiring DSBs or donor templates, was developed from David Liu’s lab. An engineered fusion of CRISPR/Cas9 with the cytidine deaminase enzyme has the ability to mediate the direct conversion of cytidine to uridine, thereby effecting a C → T (or G → A) substitution [81]. The door to correct a variety of point mutations relevant to human disease began to open. However, it was reported that these DNA base editors can cause substantial off-target editing in both genomic DNA and RNA, and thus further studies will be performed to improve the selectivity of DNA base editors [82].

Despite system deficiencies that still need to be improved, it is likely that the CRISPR/Cas9 systems will be incorporated into the therapeutic strategy for the treatment of monogenically inherited disorders and malignancies whose pathological features can be attributed to a single genetic event, such as gene fusion [83,84].

6. New CRISPR-Cas Systems and Approaches

However, Zhang’s scientific contributions did not stop there and continued (and continue today) to revolutionize the field of gene editing. In 2015, Zhang’s team reported a

novel and more accurate CRISPR system from *Acidaminococcus* and *Lachnospiraceae*, with efficient genome-editing activity in human cells, the Cas12a (Cpf1) [85]. The Cpf1 coding sequence is smaller than Cas9, it requires only one RNA (tracrRNA-independent), and generates sticky-end DSBs that are less prone to non-homologous end joining (NHEJ), being ideal for precise gene editing. Given these advantages, the Cpf1 system is more feasible to in vivo deliver and it could become a better gene-editing tool than Cas9 [86,87]. A peculiar property of Cas12a was that it completely degraded single strand DNA molecules after its activation. By combining Cas12a ssDNase activation with isothermal amplification, Doudna's team created a method named DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter), which achieves attomolar sensitivity for DNA detection, showing its ability to detect human papilloma virus in patient samples in a rapid and specific manner [88].

In 2017, Zhang and colleagues again astonished the scientific community, reporting a novel CRISPR system to target and edit RNA, the class 2 type VI CRISPR-Cas effector Cas13a [89,90]. The nuclease activity of this protein allows gene knockdown without genomic alteration. However, Cas13a cleaves all the RNAs around after it becomes enzymatically active following the first single strand RNA break. Far from being a disadvantage, this promiscuous feature was used for DNA or RNA detection in diagnostics [91]. Specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) was the first platform based on CRISPR-Cas13 systems for rapid and specific detection of viruses or mutations in patient liquid biopsy samples [92].

7. CRISPR Gene Therapy in CML

In the last five years, the number of scientific papers reporting work on CRISPR/Cas9 in the context of leukemia research has increased enormously [84,93–96]. Many of them concern in vitro studies to clarify the role of a variety of genes in leukemia development [97]. These studies identify key genes that will subsequently be edited in leukemic cells using CRISPR/Cas9 technology.

In 2015, Valletta et al. demonstrated for the first time that the CRISPR/Cas9 system could correct acquired mutations in a human myeloid leukemia cell line [98]. CRISPR-Cas9 was then successfully used in animal models of genetic diseases. Finally, the first clinical trials involving CRISPR-Cas9 in humans were initiated in 2016 [99].

Focusing on hematopoietic stem cells (HSCs), the first clinical trial to treat thalassemia (NCT03655678) using CRISPR-Cas9-modified HSCs was approved in 2018 [100]. In this sense, CML could also be one of the best candidates with which to evaluate the therapeutic potential of the CRISPR/Cas9 system. CML is an HSC malignancy directed by a single oncogene. The singularities of HSCs, which sustain the long-term generation of all hematopoietic lineages, make CML an ideal candidate for gene therapy. The special characteristics of self-renewing and multipotent HSCs imply that gene editing or ablation by CRISPR will be inherited by all daughter cells, restoring a new hematopoiesis. Furthermore, the peculiarities of the hematopoietic compartment, which make possible the collection and subsequent reinfusion of HSCs, enable the development of ex vivo therapies, and thereby the evaluation and selection of the edited HSCs, improving the safety and efficiency of the process.

Imatinib therapy is based on the knowledge that the *BCR/ABL1* fusion is the underlying cause of CML pathogenesis. For this reason, it is reasonable to surmise that the CRISPR/Cas9-induced gene interruption of *BCR/ABL1* might offer a definitive cure. Several studies have been recently performed to study the ability to disrupt the *BCR/ABL1* oncogene, showing the CRISPR-Cas9 system as a therapy tool ready to reach clinical trials in the near future, as shown in Table 1.

The development of immunodeficient mice for human HSC engrafting [101] and of mouse models that mimic human CML [102] has provided new opportunities to evaluate these CRISPR/Cas9 therapeutic applications. Recently, several in vitro and in vivo studies have explored the ability of CRISPR/Cas9 to destroy the *BCR/ABL1* gene fusion. In 2017, García-Tuñón and coworkers demonstrated for the first time that the CRISPR/Cas9 system

effectively abrogates the *BCR/ABL1* oncogene, reversing its tumorigenic activity [96]. They showed in a CML xenograft animal model how edited CRISPR cells lost their ability to proliferate and survive, and that no tumors developed when the edited cell was selected. Their results constituted the proof-of-principle that *BCR/ABL1* abrogation by the CRISPR system results in the loss of tumorigenicity.

Table 1. Therapeutic strategies to disrupt the *BCR/ABL1* oncogene in CML by genome-editing nucleases.

Target	Cell Type	Genome Editing System	Outcomes	Reference
Fusion sequence	Boff p210 (mouse)	CRISPR/Cas9	Subcutaneous injection of edited single cell derived clones was unable to generate tumors in a CML xenograft model.	[96]
<i>BCR</i> exon 1	K562 (human) and patient derived CD34+ cells	ZFNs	Intravenous tail vein injection into NOD/SCID mice of the edited K562 showed a lower tumorigenic capacity in vivo. Lower proliferative capacity in vitro was observed in edited primary cells.	[95]
<i>ABL1</i> exon 2	K562 (human) and patient derived CD34+ cells	CRISPR RNA-guided FokI nucleases (RFNs)	Similar results to those of their previous work. High efficiency and greater security by reducing the frequency of off-targets, compared with CRISPR/Cas9 system.	[94]
<i>ABL1</i> exon 2	K562 (human) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of CML patients	CRISPR/Cas9	Virus-mediated <i>ABL1</i> -targeting to edit luciferase-labeled K562 into a systemic leukemia xenograft model. Bioluminescence imaging showed a significant reduction of leukemic cells in vivo.	[103]
Fusion sequence	K562 (human) and patient derived CD34+ cells	CRISPR/Cas9	Specific targeting of the <i>BCR/ABL1</i> fusion sequence with a pair of guides directed towards intronic sequences of each of the genes involved in the fusion that will cause a deletion in those cells that carry the translocation.	[84]
<i>ABL1</i> exon 6	Boffp210 (mouse), K562 (human), Lin- CML mouse model and patient-derived CD34+	CRISPR/Cas9	Edited HSCs from CML mouse model restored normal hematopoiesis in NOD/SCID bone marrow niche. Edited patient-derived CD34+ are capable of regenerating normal hematopoiesis in the bone marrow niche of NOD/SCID mice.	[104]

In 2018, Wenli Feng's group demonstrated that other genome-editing nucleases, like ZFN nucleases, achieved the abrogation of the *BCR/ABL1* oncogene [95]. Using a pair of ZFNs targeting the exon 1 of *BCR*, a premature stop codon was created triggering a truncated oncoprotein. The apoptotic rate was higher, and the proliferative capacity was lower in the ZFN-edited cells. The same group published a subsequent study in which they overcame the technical limitations linked to the use of the ZFNs [94]. The authors adopted a new strategy based on CRISPR RNA-guided FokI nucleases (RFNs) to target exon 2 of *ABL1*. According to them, the combination of the universality of the CRISPR site design and the specificity of the FokI cleavage would provide an efficient and secure editing tool that would avoid the limitations of previous systems, such as the labor-intensive design of ZFNs and off-targets of CRISPR/Cas9. RFN-editing proved to be effective,

achieving a reduction in the expression of *BCR/ABL1* and its downstream targets, in the imatinib-sensitive and imatinib-resistant forms of K562. Edited cells showed a loss of their malignant potential, reflected in a depressed proliferative and colony-forming capacity in vitro. Furthermore, when these edited cells were transplanted by intravenous injection into the tail vein of immunodeficient NOD/SCID animals, they showed an impaired in vivo leukemogenic capacity.

Recently, new work focusing on the disruption of *BCR/ABL1* by genome-editing nucleases as a therapeutic strategy in CML has revealed the therapeutic potential of the CRISPR system. In 2020, Chia-Hwa Lee et al., using a CRISPR/Cas9 lentiviral vector to disrupt *ABL1* in the human CML K562 cell line, demonstrated a reduced proliferation rate as a consequence of *BCR/ABL1* disruption [103]. Ex vivo transduction of peripheral blood mononuclear cells from CML patients was performed to evaluate the therapeutic potential of this viral system in the clinical milieu. They observed a high rate of apoptosis in the transduced cells and demonstrated that the disruption of the *ABL1* non-rearranged allele did not trigger important consequences. The T-cell lineage was not affected by CRISPR activity at this *ABL1* non-translocated locus.

A new approach based on the use of two guides to induce a large deletion and selectively eliminate fusion oncogenes has been developed by Rodriguez-Perales and coworkers [84]. Combinations of two sgRNAs targeting *BCR* intron 8 and *ABL* intron 1 regions were designed to induce a 133.9 kb deletion on *BCR/ABL1* oncogene. This new strategy induced a frameshift alteration of the entire *ABL1* DNA-binding domain. For any given sgRNA combination, electroporated K562 cells showed a significant decrease (~85%) in clonogenic capacity in vitro and an increase in apoptosis. Importantly, they used cord blood-derived human hematopoietic progenitor hCD34+ cells to study whether a side effect was produced because of the CRISPR-Cas9 activity. In vitro analysis of targeted CD34+ cells revealed no difference in proliferation in long-term culture, suggesting no production of collateral cancer-driven genomic alterations. Besides, K562 transduced cells with an adenoviral vector carrying all the CRISPR reagents were subcutaneously injected into immunodeficient mice resulting in an 88% decrease in tumor size compared with control tumors.

Finally, Vuelta et al. recently reported their design of a new CRISPR/Cas9 short-deletion system that efficiently interrupts the *BCR/ABL1* oncogene in murine and human cell lines and, for the first time, in primary leukemic stem cells Sca1+ from a CML mouse model and CD34+ from human CML patients [104]. They demonstrated that CRISPR/Cas9-edited LSCs had impaired tumorigenic activity and fully restored capacity for multipotency. Further, they showed that the infusion of CRISPR/Cas9-edited LSCs confer a significant therapeutic benefit on orthotopic patient-derived xenografts (PDXs) and on CML mouse models. They revealed that CRISPR/Cas9 technology can easily be used to destroy driver oncogenes like *BCR/ABL1*, providing proof-of-principle for gene therapy through genome-editing nucleases.

8. Future Directions

With the advent of genome-editing nucleases and, especially, the CRISPR/Cas9 system, the possibilities of modifying the genome of species have reached hitherto unimaginable limits. In this context, gene therapy is one of the fields that has experienced a great impulse. The possibility of definitively curing genetic diseases, by direct correction of the underlying cause of the pathology, has ceased to be a future possibility and become a current reality. However, certain limitations still hinder the use of gene therapy as part of routine medical practice. Like other gene therapy approaches, the greatest limitation of in vivo CRISPR therapy is the difficulty of finding an optimal and safe delivery method. On the other hand, the preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans [105] could be considered and new Cas proteins should be employed. The issue about CRISPR off-targets also needs to be resolved [106]. The CRISPR-Cas9 system induces DSBs at target sites in genomic DNA, but can also generate undesirable cleavages outside of on-target sites. Cleavage

at off-target sites can trigger mutations which may result in the disruption of normal genes. Efforts to discover new Cas variants with high fidelity and a protospacer adjacent motif less restrictive than NGG sequence will offer soon a solution [107,108]. Finally, despite the development of new and increasingly efficient methods, 100% editing efficiency is unattainable. However, guaranteeing the absence of unedited cells is imperative in hematopoietic malignancies that are clinically treated, such as the disruption of *BCR/ABL1* in CML. A possible solution would involve the selection of the correctly edited cells, which would entail the design of genome-editing approaches that simultaneously allow the genetic correction and expression of a selectable cell marker.

In summary, the enormous therapeutic potential of the CRISPR/Cas tools have been widely corroborated in numerous research papers and in clinical trials. There are technical limitations associated with this technology, but the number of possible alternatives to overcome them has increased at the same rate. We are certain that CRISPR/Cas gene therapy will become a routine clinical practice in the near future.

Author Contributions: Conceptualization, E.V. and M.S.-M.; writing—original draft preparation, E.V. and M.S.-M.; writing—review and editing, M.S.-M.; funding acquisition, I.G.-T. and M.S.-M.; resources, E.V., I.G.-T., P.H.-C., and L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), grant number PI17/01895 (ISCIII-FEDER), and by the Fundación Memoria de D. Samuel Solorzano Barroso (FS/29-2020) from the University of Salamanca. E.V. is supported by a predoctoral grant from the University of Salamanca-Banco Santander. P.H.C. and L.M. are supported by Nucleus (platform for research supporting) from the University of Salamanca.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the Bomberos Ayudan charity (<https://bomberosayudan.org>) for supporting our CML research (Jabones solidarios para Daniel).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Quintás-Cardama, A.; Cortes, J. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. In *Mayo Clinic Proceedings*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; Volume 81, pp. 973–988. [CrossRef]
2. Mendizabal, A.M.; Garcia-Gonzalez, P.; Levine, P.H. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. *Cancer Epidemiol.* **2013**, *37*, 247–254. [CrossRef] [PubMed]
3. Petzer, A.; Eaves, C.; Lansdorp, P.; Ponchio, L.; Barnett, M.; Eaves, A. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood* **1996**, *88*, 2162–2171. [CrossRef] [PubMed]
4. Melo, J.V.; Barnes, D.J. Chronic Myeloid Leukemia: Biology of Advanced Phase. In *Myeloproliferative Disorders*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 37–58. [CrossRef]
5. Kantarjian, H.M.; Keating, M.J.; Talpaz, M.; Walters, R.S.; Smith, T.L.; Cork, A.; McCredie, K.B.; Freireich, E.J. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Am. J. Med.* **1987**, *83*, 445–454. [CrossRef]
6. Ilaria, R.L. Pathobiology of Lymphoid and Myeloid Blast Crisis and Management Issues. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2005**, *2005*, 188–194. [CrossRef] [PubMed]
7. Nowell, P. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **1960**, *132*, 1497–1499.
8. Kantarjian, H.; O'Brien, S.; Jabbour, E.; Garcia-Manero, G.; Quintas-Cardama, A.; Shan, J.; Rios, M.B.; Ravandi, F.; Faderl, S.; Kadia, T.; et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: A single-institution historical experience. *Blood* **2012**, *119*, 1981–1987. [CrossRef]
9. Chereda, B.; Melo, J.V. Natural course and biology of CML. *Ann. Hematol.* **2015**, *94* (Suppl. 2), S107–S121. [CrossRef]
10. Bower, H.; Björkholm, M.; Dickman, P.W.; Höglund, M.; Lambert, P.C.; Andersson, T.M.-L. Life Expectancy of Patients with Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2851–2857. [CrossRef]

11. Deininger, M.; O'Brien, S.G.; Guilhot, F.; Goldman, D.J.M.; Hochhaus, A.; Hughes, T.P.; Radich, J.P.; Hatfield, A.K.; Mone, M.; Filian, J.; et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood* **2009**, *114*, 1126. [\[CrossRef\]](#)
12. Graham, S.M.; Jørgensen, H.G.; Allan, E.; Pearson, C.; Alcorn, M.J.; Richmond, L.; Holyoake, T.L. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **2002**, *99*, 319–325. [\[CrossRef\]](#)
13. Rowley, J.D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nat. Cell Biol.* **1973**, *243*, 290–293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Ben-Neriah, Y.; Daley, G.Q.; Mes-Masson, A.M.; Witte, O.N.; Baltimore, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the *bcr/abl* hybrid gene. *Science* **1986**, *233*, 212–214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Score, J.; Calasanz, M.J.; Ottman, O.; Pane, F.; Yeh, R.F.; A Sobrinho-Simões, M.; Kreil, S.; Ward, D.; Hidalgo-Curtis, C.; Melo, J.V.; et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia* **2010**, *24*, 1742–1750. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Groffen, J.; Stephenson, J.R.; Heisterkamp, N.; De Klein, A.; Bartram, C.R.; Grosveld, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr*, on chromosome 22. *Cell* **1984**, *36*, 93–99. [\[CrossRef\]](#)
17. Verstovsek, S.; Lin, H.; Kantarjian, H.; Saglio, G.; De Micheli, D.; Pane, F.; Garcia-Manero, G.; Intrieri, M.; Rotoli, B.; Salvatore, F.; et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: Low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable p230 BCR/ABL protein may predict an indolent course. *Cancer* **2002**, *94*, 2416–2425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Lugo, T.G.; Pendergast, A.M.; Muller, A.J.; Witte, O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. *Science* **1990**, *247*, 1079–1082. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Kabarowski, J.H.; Witte, O.N. Consequences of BCR–ABL Expression within the Hematopoietic Stem Cell in Chronic Myeloid Leukemia. *Stem Cells* **2000**, *18*, 399–408. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhou, H.; Xu, R. Leukemia stem cells: The root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell* **2015**, *6*, 403–412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Janossy, G.; Roberts, M.; Greaves, M. Target Cell in Chronic Myeloid Leukemia and Its Relationship to Acute Lymphoid Leukemia. *Lancet* **1976**, *308*, 1058–1061. [\[CrossRef\]](#)
22. Cohen, G.B.; Ren, R.; Baltimore, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **1995**, *80*, 237–248. [\[CrossRef\]](#)
23. Mayer, B.J.; Baltimore, D. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the *Abl* tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 2883–2894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. McWhirter, J.R.; Galasso, D.L.; Wang, J.Y. A coiled-coil oligomerization domain of *Bcr* is essential for the transforming function of *Bcr-Abl* oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 7587–7595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ma, G.; Lu, D.; Wu, Y.; Liu, J.; Arlinghaus, R.B. *Bcr* phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* **1997**, *14*, 2367–2372. [\[CrossRef\]](#)
26. Steelman, L.S.; A Franklin, R.; Abrams, S.L.; Chappell, W.; Kempf, C.R.; Bäsecke, J.; Stivala, F.; Donia, M.; Fagone, P.; Nicoletti, F.; et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* **2011**, *25*, 1080–1094. [\[CrossRef\]](#)
27. Walker, S.R.; Frank, D.A. STAT Signaling in the Pathogenesis and Treatment of Cancer. In *Signaling Pathways in Cancer Pathogenesis and Therapy*; Springer: New York, NY, USA, 2012; pp. 95–108. [\[CrossRef\]](#)
28. Martelli, A.M.; Evangelisti, C.; Chappell, W.; Abrams, S.L.; Bäsecke, J.; Stivala, F.; Donia, M.; Fagone, P.; Nicoletti, F.; Libra, M.; et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: Roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* **2011**, *25*, 1064–1079. [\[CrossRef\]](#)
29. Puil, L.; Liu, J.; Gish, G.; Mbamalu, G.; Bowtell, D.; Pelicci, P.; Arlinghaus, R.; Pawson, T. *Bcr-Abl* oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* **1994**, *13*, 764–773. [\[CrossRef\]](#)
30. Bedi, A.; Zehnauer, B.; Barber, J.; Sharkis, S.; Jones, R. Inhibition of apoptosis by BCR–ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* **1994**, *83*, 2038–2044. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Gordon, M.Y.; Dowding, C.R.; Riley, G.; Goldman, J.M.; Greaves, M.F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nat. Cell Biol.* **1987**, *328*, 342–344. [\[CrossRef\]](#)
32. Clarkson, B.H.; Strife, A.; Wisniewski, D.; Lambek, C.; Liu, C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* **2003**, *17*, 1211–1262. [\[CrossRef\]](#)
33. Pendergast, A.M.; Quilliam, L.A.; Cripe, L.D.; Bassing, C.H.; Dai, Z.; Li, N.; Batzer, A.; Rabun, K.M.; Der, C.J.; Schlessinger, J.; et al. BCR–ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **1993**, *75*, 175–185. [\[CrossRef\]](#)
34. Minot, G.R.; Buckman, T.E.; Isaacs, R. Chronic myelogenous leukemia: Age incidence, duration, and benefit derived from irradiation. *J. Am. Med. Assoc.* **1924**, *82*, 1489–1494. [\[CrossRef\]](#)
35. Rushing, D.; Goldman, A.; Gibbs, G.; Howe, R.; Kennedy, B.J. Hydroxyurea versus busulfan in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **1982**, *5*, 307–314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tura, S.; Baccarani, M. α -interferon in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Blood* **1995**, *85*, 2999–3000. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Lübking, A.; Dreimane, A.; Sandin, F.; Isaksson, C.; Märkevärn, B.; Brune, M.; Ljungman, P.; Lenhoff, S.; Stenke, L.; Höglund, M.; et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in the TKI era: Population-based data from the Swedish CML registry. *Bone Marrow Transplant.* **2019**, *54*, 1764–1774. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. Gale, R.P.; Hehlmann, R.; Zhang, M.J.; Hasford, J.; Goldman, J.M.; Heimpel, H.; Hochhaus, A.; Klein, J.P.; Kolb, H.J.; McGlave, P.B.; et al. Survival with Bone Marrow Transplantation Versus Hydroxyurea or Interferon for Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **1998**, *91*, 1810–1819.
39. Van Rhee, F.; Szydlo, R.; Hermans, J.; Devergie, A.; Frassoni, F.; Arcese, W.; De Witte, T.; Kolb, H.; Niederwiser, D.; Jacobsen, N.; et al. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: A report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **1997**, *20*, 553–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H.; Meyer, T.; Müller, M.; Druker, B.J.; Lydon, N.B. Inhibition of the *Abl* protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 100–104.
41. Bhatia, R.; A Munthe, H.; Verfaillie, C. Tyrophostin AG957, a tyrosine kinase inhibitor with anti-BCR/*ABL* tyrosine kinase activity restores $\beta 1$ integrin-mediated adhesion and inhibitory signaling in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Leukemia* **1998**, *12*, 1708–1717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 493–502. [[CrossRef](#)]
43. Druker, B.J.; Talpaz, M.; Resta, D.J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J.M.; Lydon, N.B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; et al. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the *BCR-ABL* Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1031–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Milojkovic, D.; Apperley, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7519–7527. [[CrossRef](#)]
45. Jabbour, E.; Kantarjian, H.; Cortes, J. Use of Second- and Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: An Evolving Treatment Paradigm. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2015**, *15*, 323–334. [[CrossRef](#)]
46. Mojica, F.J.M.; Montoliu, L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 811–820. [[CrossRef](#)]
47. Wassef, M.; Luscan, A.; Battistella, A.; Le Corre, S.; Li, H.; Wallace, M.; Vidaud, M.; Margueron, R. Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods* **2017**, *121–122*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **2011**, *188*, 773–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bibikova, M.; Golic, M.; Golic, K.G.; Carroll, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **2002**, *161*, 1169–1175. [[PubMed](#)]
51. Moscou, M.J.; Bogdanove, A.J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* **2009**, *326*, 1501. [[CrossRef](#)]
52. Capecchi, M.R. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **1989**, *244*, 1288–1292. [[CrossRef](#)]
53. Rudin, N.; Sugarman, E.; Haber, J.E. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1989**, *122*, 519–534. [[CrossRef](#)]
54. Gupta, R.M.; Musunuru, K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 4154–4161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Makarova, K.S.; Wolf, Y.I.; Alkhnbashi, O.S.; Costa, F.; Shah, S.A.; Saunders, S.J.; Barrangou, R.; Brouns, S.J.; Charpentier, E.; Haft, D.H.; et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *13*, 722–736. [[CrossRef](#)]
56. Mojica, F.J.; Juez, G.; Rodriguez-Valera, F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 613–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5429–5433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Jansen, R.; Van Embden, J.D.A.; Gaastra, W.; Schouls, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1565–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Mojica, F.J.M.; Diez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Soria, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* **2005**, *60*, 174–182. [[CrossRef](#)]
60. Pourcel, C.; Salvignol, G.; Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **2005**, *151*, 653–663. [[CrossRef](#)]
61. Bolotin, A.; Quinquis, B.; Sorokin, A.; Dusko Ehrlich, S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **2005**, *151*, 2551–2561. [[CrossRef](#)]
62. Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **2007**, *315*, 1709–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Makarova, K.S.; Grishin, N.V.; A Shabalina, S.; I Wolf, Y.; Koonin, E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **2006**, *1*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Brouns, S.J.J.; Jore, M.M.; Lundgren, M.; Westra, E.R.; Slijkhuis, R.J.H.; Snijders, A.P.L.; Dickman, M.J.; Makarova, K.S.; Koonin, E.V.; Van Der Oost, J. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* **2008**, *321*, 960–964. [[CrossRef](#)]

65. Marraffini, L.A.; Sontheimer, E.J. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* **2008**, *322*, 1843–1845. [\[CrossRef\]](#)
66. Sorek, R.; Kunin, V.; Hugenholtz, P. CRISPR—A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 181–186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Sapranaukas, R.; Gasiunas, G.; Fremaux, C.; Barrangou, R.; Horvath, P.; Siksnys, V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 9275–9282. [\[CrossRef\]](#)
68. Garneau, J.E.; Dupuis, M.-È.; Villion, M.; Romero, D.A.; Barrangou, R.; Boyaval, P.; Fremaux, C.; Horvath, P.; Magadán, A.H.; Moineau, S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **2010**, *468*, 67–71. [\[CrossRef\]](#)
69. Horvath, P.; Romero, D.A.; Couité-Monvoisin, A.-C.; Richards, M.; Deveau, H.; Moineau, S.; Boyaval, P.; Fremaux, C.; Barrangou, R. Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1401–1412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Deveau, H.; Barrangou, R.; Garneau, J.E.; Labonté, J.; Fremaux, C.; Boyaval, P.; Romero, D.A.; Horvath, P.; Moineau, S. Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1390–1400. [\[CrossRef\]](#)
71. Deltcheva, E.; Chylinski, K.; Sharma, C.M.; Gonzales, K.; Chao, Y.; Pirzada, Z.A.; Eckert, M.R.; Vogel, J.; Charpentier, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **2011**, *471*, 602–607. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Gasiunas, G.; Barrangou, R.; Horvath, P.; Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2579–E2586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Wright, A.V.; Nuñez, J.K.; Doudna, J.A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell* **2016**, *164*, 29–44. [\[CrossRef\]](#)
74. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **2013**, *339*, 819–823. [\[CrossRef\]](#)
75. Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K.M.; Aach, J.; Guell, M.; Dicarlo, J.E.; Norville, J.E.; Church, G.M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* **2013**, *339*, 823–826. [\[CrossRef\]](#)
76. Dickinson, D.J.; Goldstein, B. CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics* **2016**, *202*, 885–901. [\[CrossRef\]](#)
77. Gratz, S.J.; Rubinstein, C.D.; Harrison, M.M.; Wildonger, J.; O’Connor-Giles, K.M. CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Drosophila*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2015**, *111*. [\[CrossRef\]](#)
78. Jiang, W.Z.; Yang, B.; Weeks, D.P. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in *Arabidopsis thaliana* and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99225. [\[CrossRef\]](#)
79. Ma, Y.; Zhang, X.; Shen, B.; Lu, Y.; Chen, W.; Ma, J.; Bai, L.; Huang, X.; Zhang, L. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* **2014**, *24*, 122–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Wang, H.; Yang, H.; Shivalila, C.S.; Dawlaty, M.M.; Cheng, A.W.; Zhang, F.; Jaenisch, R. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* **2013**, *153*, 910–918. [\[CrossRef\]](#)
81. Komor, A.C.; Kim, Y.B.; Packer, M.S.; Zuris, J.A.; Liu, D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **2016**, *533*, 420–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Park, S.; Beal, P.A. Off-Target Editing by CRISPR-Guided DNA Base Editors. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3727–3734. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Wu, S.-S.; Li, Q.-C.; Yin, C.-Q.; Xue, W.; Song, C.-Q. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics* **2020**, *10*, 4374–4382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Martinez-Lage, M.; Torres-Ruiz, R.; Puig-Serra, P.; Moreno-Gaona, P.; Martin, M.C.; Moya, F.J.; Quintana-Bustamante, O.; Garcia-Silva, S.; Carcaboso, Á.M.; Petazzi, P.; et al. In vivo CRISPR/Cas9 targeting of fusion oncogenes for selective elimination of cancer cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
85. Zetsche, B.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Slaymaker, I.M.; Makarova, K.S.; Essletzbichler, P.; Volz, S.E.; Joung, J.; Van Der Oost, J.; Regev, A.; et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **2015**, *163*, 759–771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Zetsche, B.; Heidenreich, M.; Mohanraju, P.; Fedorova, I.; Kneppers, J.; DeGennaro, E.M.; Winblad, N.; Choudhury, S.R.; O Abudayyeh, E.M.D.O.; Gootenberg, J.S.; et al. Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 31–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Dai, X.; Park, J.J.; Du, Y.; Kim, H.R.; Wang, G.; Errami, Y.; Chen, S. One-step generation of modular CAR-T cells with AAV–Cpf1. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 247–254. [\[CrossRef\]](#)
88. Chen, J.S.; Ma, E.; Harrington, L.B.; Da Costa, M.; Tian, X.; Palefsky, J.M.; Doudna, J.A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* **2018**, *360*, 436–439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Cox, D.B.T.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Franklin, B.; Kellner, M.J.; Joung, J.; Zhang, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **2017**, *358*, 1019–1027. [\[CrossRef\]](#)
90. Abudayyeh, O.O.; Gootenberg, J.S.; Essletzbichler, P.; Han, S.; Joung, J.; Belanto, J.J.; Verdine, V.; Cox, D.B.T.; Kellner, M.J.; Regev, A.; et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature* **2017**, *550*, 280–284. [\[CrossRef\]](#)
91. Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Lee, J.W.; Essletzbichler, P.; Dy, A.J.; Joung, J.; Verdine, V.; Donghia, N.; Daringer, N.M.; Freije, C.A.; et al. Nucleic acid detection with CRISPR–Cas13a/C2c2. *Science* **2017**, *356*, 438–442. [\[CrossRef\]](#)

92. Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Kellner, M.J.; Joung, J.; Collins, J.J.; Zhang, F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* **2018**, *360*, 439–444. [\[CrossRef\]](#)
93. García-Tunón, I.; Alonso-Pérez, V.; Vuelta, E.; Pérez-Ramos, S.; Herrero, M.; Méndez, L.; Sánchez, J.; Martín-Izquierdo, M.; Saldaña, R.; Sevilla, J.; et al. Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216674. [\[CrossRef\]](#)
94. Luo, Z.; Gao, M.; Huang, N.; Wang, X.; Yang, Z.; Yang, H.; Huang, Z.; Feng, W. Efficient disruption of *bcr-abl* gene by CRISPR RNA-guided FokI nucleases depresses the oncogenesis of chronic myeloid leukemia cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 224. [\[CrossRef\]](#)
95. Huang, N.; Huang, Z.; Gao, M.; Luo, Z.; Zhou, F.; Liu, L.; Xiao, Q.; Wang, X.; Feng, W. Induction of apoptosis in imatinib sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells by efficient disruption of *bcr-abl* oncogene with zinc finger nucleases. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. García-Tunón, I.; Hernández-Sánchez, M.; Ordoñez, J.L.; Alonso-Pérez, V.; Álamo-Quijada, M.; Benito, R.; Guerrero, C.; Hernández-Rivas, J.M.; Sanchez-Martin, M.A. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of *BCR/ABL* in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* **2017**, *8*, 26027–26040. [\[CrossRef\]](#)
97. Vukovic, M.; Guitart, A.V.; Sepulveda, C.; Villacreses, A.; O'Duibhir, E.; Panagopoulou, T.I.; Ivens, A.; Menendez-Gonzalez, J.; Iglesias, J.M.; Allen, L.; et al. Hif-1 α and Hif-2 α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 2223–2234. [\[CrossRef\]](#)
98. Valletta, S.; Dolatshad, H.; Bartenstein, M.; Yip, B.H.; Bello, E.; Gordon, S.; Yu, Y.; Shaw, J.; Roy, S.; Scifo, L.; et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* **2015**, *6*, 44061–44071. [\[CrossRef\]](#)
99. Cyranoski, D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *539*, 479. [\[CrossRef\]](#)
100. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects with Transfusion-Dependent β -Thalassemia—Full Text View. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03655678?view=results> (accessed on 15 January 2021).
101. Aryee, K.-E.; Shultz, L.D.; Brehm, M.A. Immunodeficient Mouse Model for Human Hematopoietic Stem Cell Engraftment and Immune System Development. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1185*, 267–278. [\[CrossRef\]](#)
102. Peng, C.; Li, S. Chronic Myeloid Leukemia (CML) Mouse Model in Translational Research. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1438*, 225–243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Chen, S.-H.; Hsieh, Y.-Y.; Tzeng, H.-E.; Lin, C.-Y.; Hsu, K.-W.; Chiang, Y.-S.; Lin, S.-M.; Su, M.-J.; Hsieh, W.-S.; Lee, C.-H. *ABL* Genomic Editing Sufficiently Abolishes Oncogenesis of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2020**, *12*, 1399. [\[CrossRef\]](#)
104. Vuelta, E.; Luis Ordoñez, J.; Alonso-Pérez, V.; Méndez, L.; Hernández-Carabias, P.; Saldaña, R.; Sevilla, J.; Sebastian, E.; Muntión, S.; Sánchez-Guijo, F.; et al. CRISPR/Cas9 technology abolishes the *BCR/ABL1* oncogene effect in chronic myeloid leukemia and restores normal hematopoiesis. *bioRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
105. Charlesworth, C.T.; Deshpande, P.S.; Dever, D.P.; Camarena, J.; Lemgart, V.T.; Cromer, M.K.; Vakulskas, C.A.; Collingwood, M.A.; Zhang, L.; Bode, N.M.; et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 249–254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Sternberg, S.H.; Lafrance, B.; Kaplan, M.; Doudna, J.A. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. *Nature* **2015**, *527*, 110–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Li, J.-J.; Hong, S.; Chen, W.; Zuo, E.; Yang, H. Advances in detecting and reducing off-target effects generated by CRISPR-mediated genome editing. *J. Genet. Genom.* **2019**, *46*, 513–521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Hu, J.H.; Miller, S.M.; Geurts, M.H.; Tang, W.; Chen, L.; Sun, N.; Zeina, C.M.; Gao, X.; Rees, H.A.; Lin, Z.; et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **2018**, *556*, 57–63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

RESEARCH ARTICLE

CRISPR-Cas9 Technology as a Tool to Target Gene Drivers in Cancer: Proof of Concept and New Opportunities to Treat Chronic Myeloid Leukemia

Elena Vuelta,^{1–3} José Luis Ordoñez,^{1,4} Verónica Alonso-Pérez,^{1,4} Lucía Méndez,³ Patricia Hernández-Carabias,³ Raquel Saldaña,⁵ Julián Sevilla,⁶ Elena Sebastián,⁶ Sandra Muntión,^{1,2,6–8} Fermín Sánchez-Guijo,^{1,2,6–8} Jesús María Hernández-Rivas,^{2,4,8} Ignacio García-Tuñón,^{1,4,*†} and Manuel Sánchez-Martín^{2,3,4,*†}

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic malignancy produced by a unique oncogenic event involving the constitutively active tyrosine-kinase (TK) *BCR/ABL1*. TK inhibitors (TKI) changed its prognosis and natural history. Unfortunately, *ABL1* remains unaffected by TKIs. Leukemic stem cells (LSCs) remain, and resistant mutations arise during treatment. To address this problem, we have designed a therapeutic CRISPR-Cas9 deletion system targeting *BCR/ABL1*. The system was efficiently electroporated to cell lines, LSCs from a CML murine model, and LSCs from CML patients at diagnosis, generating a specific *ABL1* null mutation at high efficiency and allowing the edited leukemic cells to be detected and tracked. The CRISPR-Cas9 deletion system triggered cell proliferation arrest and apoptosis in murine and human CML cell lines. Patient and murine-derived xenografts with CRISPR-edited LSCs in NOD SCID gamma niches revealed that normal multipotency and repopulation ability of CRISPR edited LSCs were fully restored. Normal hematopoiesis was restored, avoiding myeloid bias. To the best of our knowledge, we show for the first time how a CRISPR-Cas9 deletion system efficiently interrupts *BCR/ABL1* oncogene in primary LSCs to bestow a therapeutic benefit. This study is a proof of concept for genome editing in all those diseases, like CML, sustained by a single oncogenic event, opening up new therapeutic opportunities.

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell (HSC) disorder in which BCR-ABL1 oncoprotein has a constitutively active tyrosine kinase (TK) initiating and maintaining the disease during the chronic phase (CP).^{1–7} Aberrant kinase signaling activates downstream targets^{8–17} and reprograms the cell to cause uncontrolled proliferation and results in a myeloproliferative disorder. Without an effective treatment, the CP evolves to an aggressive phase called the blast crisis, resembling acute leukemia and leading to patient mortality

from infection, thrombosis, or anemia.^{18,19} CML is a TK-dependent disease that from a clinical point of view is not as problematic as it was 20 years ago thanks to TK inhibitors (TKI). First-line treatment with TKI drugs in CP-CML patients has led to their life expectancy becoming the same as that of the healthy population.^{19–22} However, despite the effectiveness of TKI drugs, leukemic stem cells (LSCs) remain “oncogenic quiescent,” and treatment should be continued indefinitely, with resistances observed in approximately 25% of patients.^{23,24} Therefore, it is still necessary to seek new therapeutic

¹Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Instituto Biología Molecular y Celular del Cáncer (USAL/CSIC), Salamanca, Spain; ²Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ³Servicio de Transgénesis, NUCLEUS, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁵Servicio de Hematología, Hospital de Jerez, Cádiz, Spain; ⁶Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; ⁷RETIC TerCel y CIBERONC, ISCIII, Madrid, Spain; and ⁸Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain.

[†]These authors contributed equally to this work and share the senior authorship.

*Address correspondence to: Ignacio García-Tuñón, PhD, Centro de investigación del Cáncer, Salamanca, 37007-Spain, Email: ignacio.tunon@usal.es; or Manuel Sánchez-Martín, PhD, Dpto. de Medicina. Universidad de Salamanca, Salamanca, 3707-Spain, Email: adolsan@usal.es

alternatives, and the CRISPR-Cas9 system^{25–27} could be a definitive therapeutic option. Preliminary CRISPR assays to disrupt *BCR/ABL1* have been mainly reported in CML cell lines with good results.^{28–33} However, in primary CML cells, unresolved critical questions about the engraft capacity, multipotency, or putative therapeutic benefit of CRISPR-edited LSCs are pending.

The present work demonstrates that CRISPR-Cas9 technology efficiently avoids the oncogenic effect not only in CML cell lines but also in primary LSCs from CML patients and murine models. To the best of our knowledge, we show that CRISPR-edited LSCs *in vivo* colonize and repopulate the murine bone, restoring the normal hematopoiesis and bestowing a clinical benefit. Our study provides proof of principle for genome editing in CML patients.

Methods

BCR/ABL1 in silico analysis and CRISPR-Cas9 deletion system design and reagents

In most CML patients, the point of fusion in *BCR* is located on the major region (M-bcr) downstream of exons 13 or 14, whereas the break point of the *ABL* gene is generally located upstream of the second exon (a2).^{34,35} This translocation produces a 210 kDa chimeric protein containing BCR as an N-terminal fusion partner joined to most of ABL1 protein (Supplementary Fig. S1).^{36,37} In order to destroy the *BCR-ABL* TK domain and thereby prevent Tk activity, we designed two single guide RNAs (sgRNAs; *ABL* TK1-sgRNA and *ABL* TK2-sgRNA; Supplementary Table S1 and Fig. 1) to generate a small deletion (101 bp) targeting the *ABL* exon 6 (Supplementary Fig. S1). TK-sgRNA sequences were designed with the BreakingCas web tool.

In K562 *in vitro* experiments, we used an irrelevant sgRNA (mock) as a control (Integrated DNA Technology; CRISPR-Cas9 negative control crRNA for humans, mice, and rats).

HSC transplantation

After 24 h in cytokine-enriched culture, 1.8×10^6 Lin[−] cells from Tgp210⁺ C57BL/6 mice or human CD34⁺ cells from the CML bone marrow (BM) sample were divided to undergo only Cas9 (control) or full CRISPR system (Cas9 and *ABL*-TK sgRNAs) electroporation.

As a control for murine–murine BM transplantation (BMT), we used Tgp210⁺ mice (CML disease) and C57BL/6J wild-type (normal hematopoiesis). For human–murine BMT, we used 9×10^5 hCD34⁺ leukemic stem cells from CML patients (control disease) and 9×10^5 healthy hCD34⁺ cells (normal hematopoiesis).

Electroporated and non-electroporated HSCs from all groups were injected intravenously through the lateral tail vein in 4- to 5-week-old sublethally irradiated NOD SCID gamma (NSG) mice (Charles River Laboratories; 2 Gy, 4 h before injection). Mice were irradiated at the Radioactive Isotopes and Radioprotection Service, NUCLEUS, University of Salamanca. Mice were sacrificed by anesthetic overdose 4 or 6 months after injection.

Murine model, cell lines, cell samples, isolation, electroporation, and culture conditions

We used a CML murine model expressing the human *BCR/ABL1* cDNA under tec promoter.³⁸

The murine CML Boff-p210 cell line, derived from the hematopoietic cell line Baf/3,³⁹ was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). The interleukin (IL)-3-dependent Baf/3 cells were grown in the same medium supplemented with 20% WEHI-3-conditioned medium as a source of IL-3.

The human CML-derived cell line K562 was purchased from the DMSZ collection (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). K562 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). All cell lines were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Murine hematopoietic cells were isolated from murine BM samples by flushing their femurs with a syringe containing 2 mL phosphate-buffered saline (PBS) 10% FBS. After red blood lysis treatment, AutoMACs sorter with a Direct Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotech) was used to separate Lin[−] stem cells, which were then maintained in culture for 24 h in Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% FBS, mIL-3 (10 µg/mL), mIL-6 (10 µg/mL), thrombopoietin (mTPO; 10 µg/mL), and stem cell growth factor (mSCF; 10 µg/mL; Preprotech EC Ltd.). Mice were housed in a temperature-controlled specific pathogen-free (SPF) facility using individually ventilated cages, standard diet, and a 12 h light/dark cycle according to EU laws at the Servicio de Experimentación Animal, University of Salamanca.

The study with animals followed Spanish and European Union guidelines for animal experimentation (RD 1201/05, RD 53/2013, and 86/609/CEE) and was approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca and Conserjería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León (registration number 359).

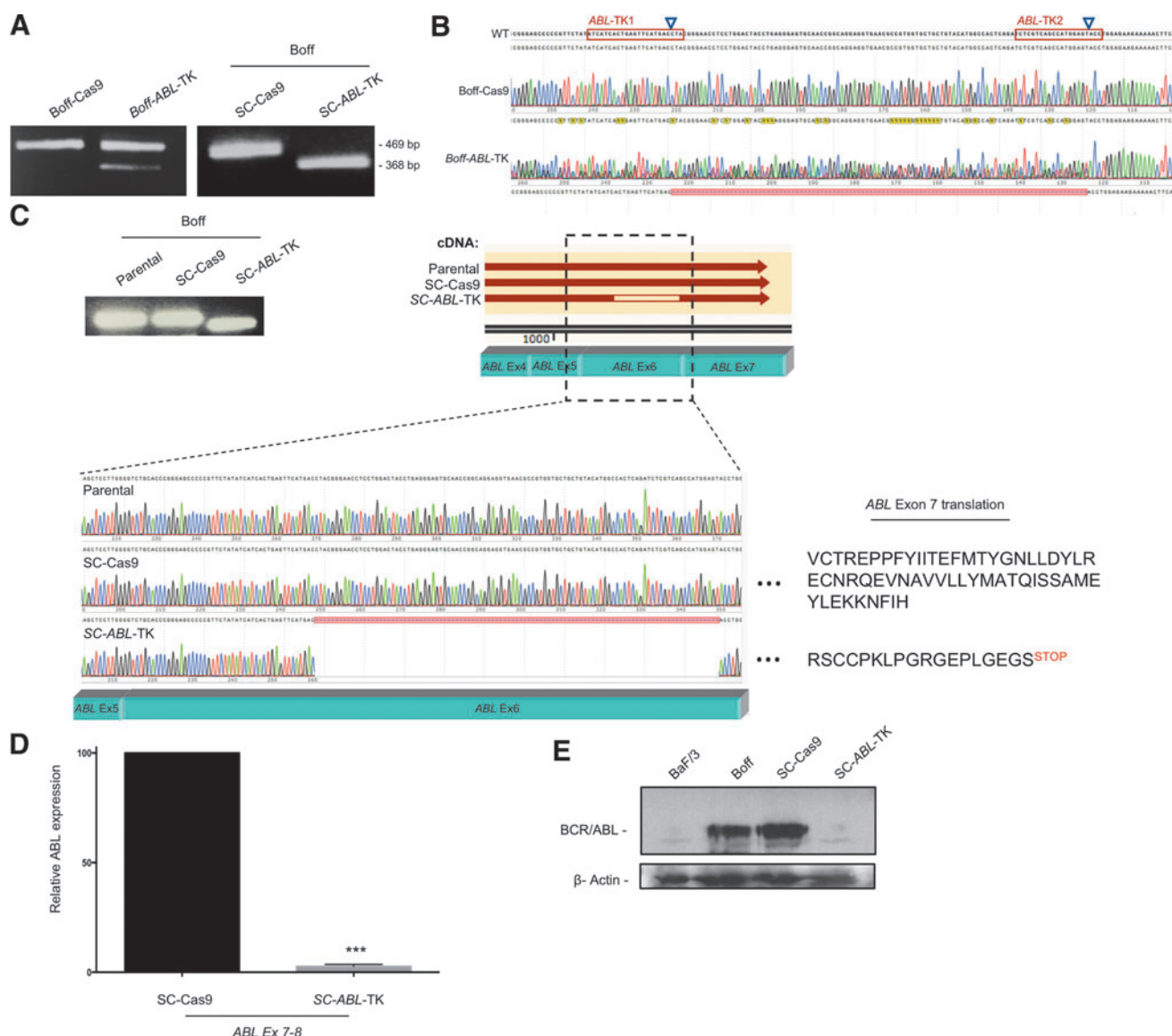


FIG. 1. Functional analysis of the CRISPR-Cas9 deletion system in the Boff-p210 cell line. **(A)** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of ABL exon 6 in Boff-p210 cells electroporated with solely Cas9 (Boff-Cas9), with Cas9 and both sgRNAs (Boff-ABL-TK), and in single-cell clones derived (SC-Cas9 and SC-ABL-TK). **(B)** Sanger sequencing of the amplified region of ABL exon 6. **(C)** Reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) of ABL exon 6 showing a smaller mRNA transcript in SC-ABL-TK than in control cells (parental and SC-Cas9). The 101 bp deletion was confirmed by Sanger sequencing in SC-ABL-TKs. *In silico* analysis shows this deletion generates a premature stop codon in ABL exon 7. **(D)** Quantitative PCR of ABL expression in Boff-p210 single-edited cell-derived clones (SC) at the exon 7-8 level ($M \pm SEM$; *** $p < 0.001$). **(E)** Western blot of BCR-ABL in Baf/3, Boff, and SC cells. Color images are available online.

Human CD34⁺ BM cells were isolated from seven patients at diagnosis. All patients were *BCR/ABL1* with major BCR break points triggering p210 oncoproteins. BM samples were treated with an erythrocyte lysis buffer followed by separation with AutoMACs sorter and CD34 Microbead Kit human (Miltenyi Biotech) and grown in

IMDM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific), hIL-3 (10 μ g/mL), hIL-6 (10 μ g/mL), hTPO (10 μ g/mL), hSCF (10 μ g/mL), and Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (10 μ g/mL; Preprotech EC Ltd.). CD34⁺ cells were maintained in culture for 24 h before electroporation.

The study with human samples and human data followed the Spanish Biomedical Research Law 14/2007, RD 1716/2011, RD 1720/2007, and European Regulation 2016/679 (General Data Protection Regulation). The study was approved by the Ethics Committee for research in human drugs (CEIC) of IBSAL, Salamanca, Spain (reference PI5505/2017).

CRISPR-Cas9 ribonucleocomplex assembly and electroporation

The guide RNAs targeting *ABL* TK domains were composed by annealing equimolar concentrations of crRNA (specific target sequence; Integrated DNA Technology) and tracrRNA to a final duplex concentration of 44 μ M by heating at 95°C for 5 min and ramping down the temperature to 25°C. Duplex (22 pmol) was incubated with 18 pmol of Cas9 enzyme (Integrated DNA Technology) to a final volume of 1 μ L for electroporation. We added 2 μ L of 10.8 μ M of Electroporation Enhancer (Integrated DNA Technology) and 9 μ L of cell suspension of 3×10^7 cells/mL.

Cells were electroporated using a Neon Transfection System 10 μ L Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The electroporation parameters for each cell type are described in the Table 1.

Genotyping

Genomic DNA from cells was extracted using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. We amplified the *ABL* target regions using polymerase chain reaction (PCR; oligos described in Supplementary Table S1). PCR products were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and sequenced by the Sanger method using forward and reverse PCR primers.

Reverse transcription PCR and quantitative PCR

To test *BCR/ABL* mRNA expression, 150 ng of total mRNA from cells was extracted with a RNeasy mini kit (Qiagen) and *in vitro*-retrotranscribed (SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix Kit, Thermo Fisher Scientific). cDNA was used as a template to PCR amplify and to Sanger sequence the *BCR/ABL* exon 6 (Supplementary Table S1).

BCR/ABL and *GAPDH* expression was quantified by quantitative PCR (Applied Biosystems) using specific *BCR* and *ABL* and *GAPDH* oligos (Supplementary Table S1).

Western blot and immunofluorescence

BCR-ABL protein expression was assessed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting using a murine anti-ABL antibody (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology). Horseradish peroxidase-conjugated α -mouse antibody (1:10,000; NA931V, GE Healthcare) was used as a secondary antibody. Antibodies were detected by ECLTM Western Blotting Detection Reagents (RPN2209; GE Healthcare). β -Actin expression was determined as a control (mouse anti- β -actin 1:20,000; Sigma-Aldrich).

For immunofluorescence analysis, cells were fixed and permeabilized onto poly-L-lysine-coated slides, as previously described.⁴⁰ After blockade, slides were incubated with anti-ABL (Santa Cruz Biotechnology) antibodies at 1:1,000 dilution for 2 h. Cy5[®] Goat Anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch) was used as a secondary antibody (1:1,000; 1 h). Nuclei were stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), diluted in PBS, and incubated for 3 min at room temperature. Cells were washed twice in PBS, and slides were mounted with Vectashield reagent (Vector Laboratories). Images were acquired with the Leica TCS SP5DMI-6000B confocal microscope.

Apoptosis and cell-cycle analysis

Apoptosis was evaluated by flow cytometry with annexin V-Dy634 (apoptosis-detection kit ANXVVKDY; Immunostep). Briefly, 5×10^5 cells were collected, washed twice in PBS, and labeled with annexin V-DY-634 and non-vital dye propidium iodide (PI) to enable the discrimination of living cells (annexin-negative, PI-negative), early apoptotic cells (annexin-positive, PI-negative), and late apoptotic or necrotic cells (annexin-positive, PI-positive). In parallel, cell distribution in the cell cycle phase was also analyzed by measuring DNA content (PI labeling after cell permeabilization). Data were analyzed using FlowJo vX.0.7 (TreeStar).

Flow cytometry analysis and cell sorting

Boff-p210 cells were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using FACS Aria (BD Biosciences) 48 h after electroporation with the CRISPR-Cas9 reagents (crRNAs and ATTO-labeled tracrRNA; Integrated DNA Technology). Single cells were seeded on a 96-well plate, establishing the SC-*ABL*-TK and SC-Cas9 clones. Peripheral blood from NSG mice was obtained by

Table 1. Cell Electroporation Parameters

Cells	Pulse voltage (V)	Pulse width (ms)	Pulse number
Boff-p210	1,700	2	1
K562	1,450	10	3
mLin ⁻	1,700	2	1
hCD34 ⁺	1,600	10	3

submandibular puncture. BM cells were isolated from NSG mice by flushing the tibia and femurs. Red blood cells were lysed, and white cells were washed twice in PBS. Fluorophore-conjugated antibodies for murine and human FACS analysis were: anti-mCD45 (PerCP-Cy5), anti-mB220 (PE), anti-mIgM (APC), anti-mCD4 (FITC), anti-mCD8 (APC), and anti-mCD45 (PerCP-Cy5), all from Biolegend; anti-mGr1 (APC-Cy7), anti-mMac (FITC), anti-sca1 (PE) and anti-mCD117 (PE-Cy7), anti-hCD45 (FITC), anti-hCD34 (APC), anti-hCD14 (APC-H7), anti-hCD117, and anti-hCD15 (FITC), all from BD Biosciences; and anti-hCD19 (PE-Cy7; Immunostep). Data were analyzed using FlowJo vX.0.7 (TreeStar).

Off-targets analysis

The top three predicted coding off-target sequences for each sgRNA used (Supplementary Fig. S5) were analyzed with the T7 endonuclease I (T7EI) mismatch cleavage assay⁴¹ following the manufacturer's indications (Integrated DNA Technologies). Target DNA sequences were amplified by PCR using specific oligonucleotides (Supplementary Table S5) in human and murine LSCs. To form the heteroduplex complexes, PCR products were denatured at 95°C for 10 min and then ramping down the temperature (95–85°C, –2°C/s, and 85–25°C, 0.3°C/s). The heteroduplex products were incubated with T7EI for 1 h at 37°C and visualized in 2% agarose gel.

RNA-seq assay and bioinformatic analysis

In order to validate that Cas9 or Cas9 + irrelevant sgRNAs do not have important transcriptional effects, a RNA-seq and a bioinformatic analysis was performed with three independent biological replicates by group, in the following groups: (1) K562 Cas9 (K562 cells + Cas 9 alone), (2) K562 Mock (K562 cells + Cas9 and irrelevant sgRNA), and (3) K562 ABL-TKs (K562 cells + Cas9 and ABL-TK sgRNAs).

Samples were quantified with the Salmon algorithm⁴² setting with the following parameters: paired-end, default parameters. Differential expression (DE) analysis was performed with DESeq2.⁴³ Functional enrichment analysis was performed with the goseq R package.⁴⁴ It was executed with the following parameters: test=Wald; fit.Type=parametric. The protocol was executed using the RNA-seq analysis platform.⁴⁵ The results are shown in Supplementary Figures S6 and S7 and Supplementary Tables S6 and S7. RNA-seq was performed at the Sequencing Service of NUCLEUS, University of Salamanca, and bioinformatic analysis was performed at the Bioinformatics Service of NUCLEUS, University of Salamanca.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v6 (GraphPad Software). Group differences between levels of annexin V labeling and BCR/ABL1 expression were tested with one- and two-way analysis of variance (ANOVA), respectively, and Tukey's multiple comparisons test. Differences in percentages of hematological populations were estimated by two-way ANOVA. Statistical significance was concluded for values of $p < 0.05$ and $p < 0.001$.

Results

The CRISPR-Cas9 deletion system efficiently disrupts the *BCR/ABL1* oncogene, preventing its expression

The murine CML cell line Boff-p210 was electroporated with Cas9 RNP joined to two specific sgRNAs targeting the *ABL* TK domain at exon 6 (Boff-*ABL*-TK) or without sgRNAs as a control (Boff-Cas9). A 473 bp band corresponding to *BCR/ABL1* genomic exon 6 was amplified by PCR in Boff-*ABL*-TK and Boff-Cas9 cells. As expected, an extra band of 368 bp was detected only in Boff-*ABL*-TK cells, suggesting the presence of a deletion generated by both RNA guides (Fig. 1A). Sanger sequencing revealed a mixture of sequences between the expected cleavage points of both guides (Fig. 1B) and confirmed the specific deletion. To analyze the deletion effect, we isolated a single-cell-derived clone (SC) carrying the specific CRISPR deletion affecting the *ABL1* TK domain (SC-*ABL*-TK). PCR of *ABL* exon 6 showed a single band of 368 bp in SC-*ABL*-TK cells, in contrast with a 469 bp band observed in SC-Cas9 cells (Fig. 1A). The specific 101 bp deletion was confirmed by Sanger sequencing in Boff-*ABL*-TK and SC-*ABL*-TK (Fig. 1B). To determine the effect of the CRISPR deletion at mRNA and protein levels, *ABL* expression was quantified by reverse transcription (RT)-PCR and Western blot. As expected, SC-*ABL*-TK cells showed a shorter human *ABL* mRNA than full-length sequences (Fig. 1C). Sanger sequencing of RT-PCR products confirmed a mRNA carrying a 101 bp deletion in SC-*ABL*-TK cells, giving rise to a frameshift mutation due to a premature STOP codon at the contiguous *ABL* exon 7 (Fig. 1C). To determine whether the frameshift mutation triggers mRNA decay, quantitative PCR was performed using oligos downstream from the deletion (junction of exons 7 and 8; Supplementary Table S1). SC-*ABL*-TK cells showed a statistically significant lower level of expression (2.6%, $p < 0.001$; Fig. 1D). Western blot analysis showed that Boff-Cas9 and SC-Cas9 cells normally expressed a 250 kDa BCR/ABL1 protein, while SC-*ABL*-TK-edited cells exhibited no expression of BCR/ABL1 similar to parental BaF/3 cells (Fig. 1E).

To establish whether these results are also reproducible in human cells, the patient-derived cell line K562 was electroporated with Cas9 RNP joined to two TK sgRNAs targeting *BCR/ABL1* exon 6. A 473 bp band corresponding to *BCR/ABL1* exon 6 was amplified by PCR in K562-Cas9 cells (control) and K562-*ABL*-TK cells. As expected, an extra band of 372 bp was detected in K562-*ABL*-TK cells, and Sanger sequencing confirmed the specific deletion (Fig. 2A). *BCR/ABL1* oncogene expression was determined by quantitative PCR, which revealed significantly ($p < 0.001$) lower *BCR/ABL1* mRNA levels in K562-*ABL*-TK cells than control parental and Cas9 cell lines (Fig. 2B). Western blot analysis of ABL and BCR-ABL in K562-*ABL*-TK cells detected a lower level of expression of both proteins (Fig. 2C).

The ABL immunofluorescence assay confirmed a huge decrease of BCR/ABL1-positive cells in the K562-*ABL*-TK pool (Fig. 2C).

The CRISPR-Cas9 deletion system abolishes the *BCR/ABL1* oncogenic effect in CML cell lines

To determine the biological significance of disrupting the sequence of *BCR/ABL1* with the CRISPR system at the *ABL1* TK domain, we analyzed the apoptosis levels and DNA content of CRISPR-edited and control cells. Unlike BaF/3, Boff-p210 cells are IL-3 independent for growth and survival due to the oncogene signaling. Thus, we studied the effect of abrogating *BCR/ABL1* by CRISPR in Boff-p210 cells in the absence of IL-3 (Supplementary Fig. S2). Forty-eight hours after electroporation and IL-3

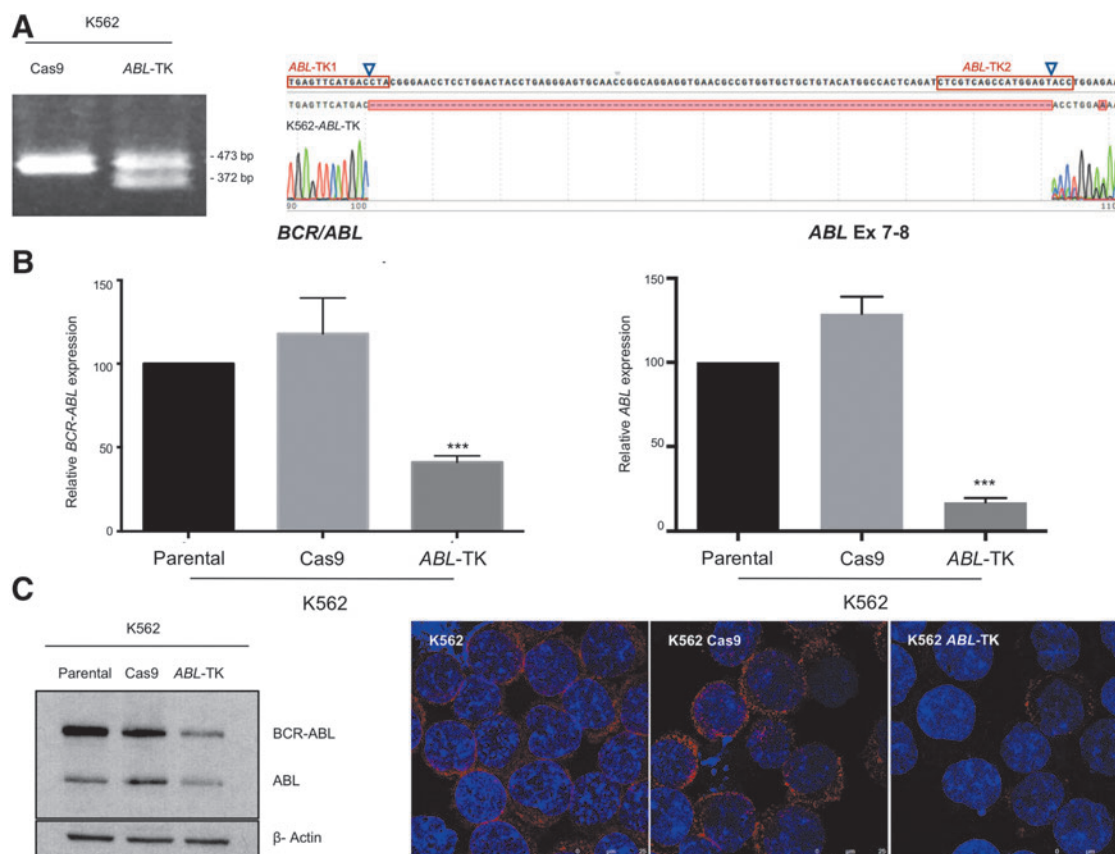


FIG. 2. Functional analysis of the CRISPR-Cas9 deletion system in the K562 human cell line. **(A)** PCR amplification of ABL exon 6 in K562 cells electroporated with Cas9 nuclease (K562-Cas9) and with Cas9 joined to both sgRNAs (K562-*ABL*-TKs). Sanger sequencing of the amplified region revealed a 101 bp deletion between the expected cleavage points. **(B)** Quantitative PCR of *BCR/ABL* (left) and *ABL* (right) mRNA in K562 (parental), K562-Cas9, and K562-*ABL*-TK ($M \pm SEM$; *** $p < 0.001$). **(C)** Western blot of ABL protein in parental, K562-Cas9, and K562-*ABL*-TK (left). These results were corroborated by immunocytochemistry (right). Color images are available online.

withdrawal, we observed a basal level of mortality of 15.1% (annexin-V-positive cells) in SC-Cas9, similar to that observed in the presence of IL-3 (13.3%), while this level reached 99.1% on average in the SC-*ABL*-TK cells (Supplementary Fig. S2A). Accordingly, we also observed a 94.5% of cells in SubG0 phase in SC-*ABL*-TK with respect to unedited SC-Cas9 cells (2.1%) (Supplementary Fig. S2B).

Similarly, we analyzed the apoptosis levels and DNA content in human edited/unedited K562 cells (Supplementary Fig. S3). We also detected a significant ($p < 0.001$) increase in annexin-V-positive cells (63.2%) in K562-*ABL*-TK-edited cells, while unedited K562 (parental), K562-Cas9, and K562 mock cells showed lower levels (8.4%, 14.5%, and 12.05%, respectively; Supplementary Fig. S3A and B). DNA content analysis of

K562-Cas9-TKs cells showed 24.6% of SubG0 cells, while K562 and K562-Cas9 cells showed 1.76% and 4.87% of SubG0 cells, respectively (Supplementary Fig. S3C).

We quantified the editing efficiency of the sgRNAs using Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) software (Netherlands Cancer Institute), which only required two Sanger sequencing runs from wild-type cells and mutated cells (Supplementary Fig. S4A and B). The indel induction efficiency of the system was similar in murine and human LSCs (49.9% and 46.7%, respectively). The induced deletion efficiency was 60.5% in hLSCs (Supplementary Fig. S4C) and was determined by DNA quantitative PCR using oligos located on the deleted sequence (*ABL* Ex6 qPCR F/*ABL* ex7 qPCR R; Supplementary Table S1).

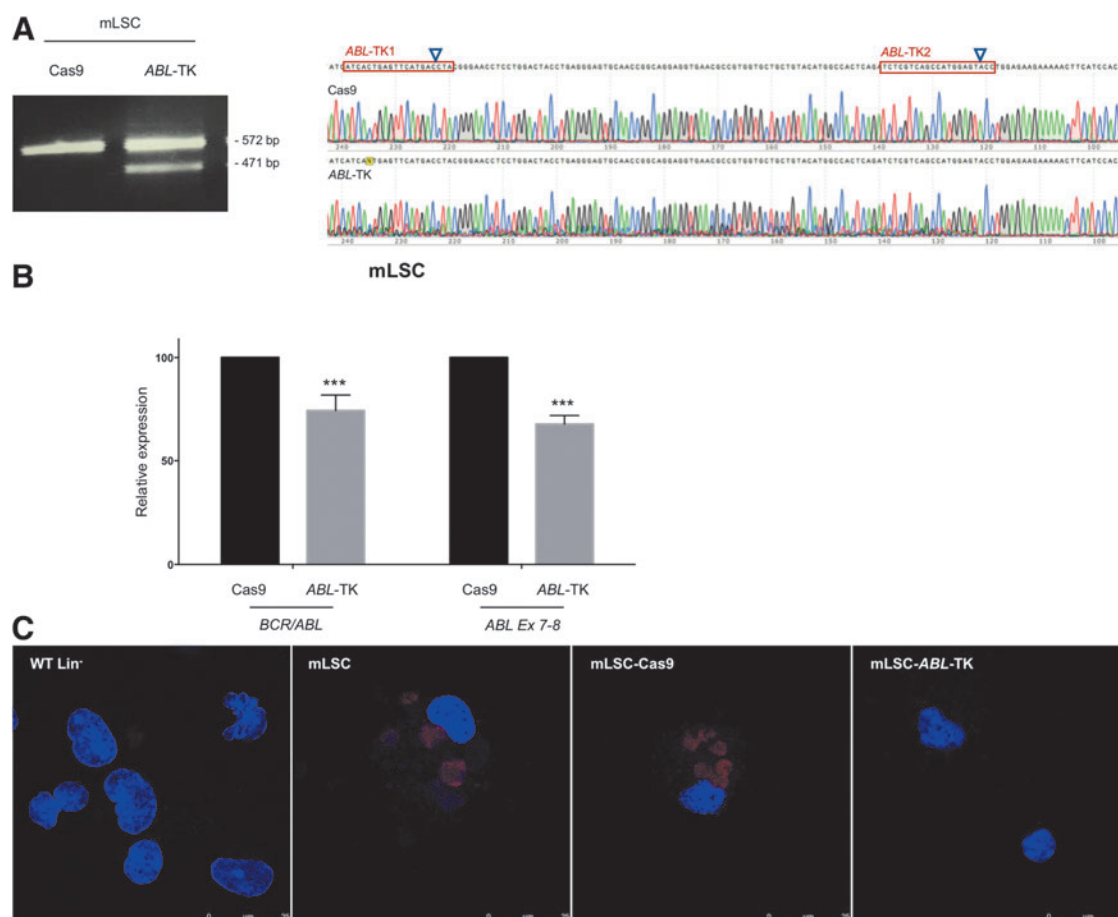


FIG. 3. CRISPR-Cas9 deletion system in murine leukemic stem cells (mLSCs). mLSCs were isolated from TgP210+ murine bone marrow (BM) and electroporated with Cas9 and with Cas9 joined to both sgRNAs (*ABL*-TK). **(A)** PCR amplification of the genomic *ABL* exon 6 sequence and Sanger sequencing. **(B)** Quantitative PCR of *BCR/ABL* mRNA (fusion point) and *ABL* mRNA (exons 7–8) in mLSC-Cas9 (control) and mLSC-*ABL*-TK (edited) cells ($M \pm SEM$; *** $p < 0.001$). **(C)** Anti-human *ABL* immunostaining of mLSC cells. Color images are available online.

The CRISPR-Cas9 deletion system restores the multipotent capacity and impairs the myeloid bias in primary murine CML leukemic stem cells

To address whether a primary CML stem cell, with a CRISPR-induced deletion at exon 6, reacquires its physiological multipotency, we used a CML transgenic mouse expressing *BCR/ABL1* human oncogene.³⁸ Lin[−] mLSCs were isolated from CML transgenic mice with symptomatic chronic disease (>60% Gr1⁺ cells in peripheral blood). An *ABL1* exon 6-specific deletion was induced by electroporation of Cas9 RNP joined to *ABL*-TK sgRNAs. PCR amplification of *ABL1* exon 6 in mLSCs-*ABL*-TK cells showed the specific 368 bp band due to CRISPR activity. PCR cloning and Sanger sequencing demonstrated the specific 101 bp deletion between Cas9 cleavage points (Fig. 3A).

Expression of *BCR/ABL1* mRNA from mLSCs-*ABL*-TK cells was quantified by quantitative PCR. While mLSCs-Cas9 control cells showed high *BCR/ABL1* mRNA levels, we found significantly ($p < 0.001$) lower levels in mLSCs-Cas9 cells (Fig. 3B). Accordingly, lower levels of ABL protein were also detected by immunofluorescence in mLSCs-*ABL*-TK cells (Fig. 3C).

To test the multipotency of these mLSCs-*ABL*-TK cells, we engrafted them and their counterpart mLSCs-Cas9 cells into two NSG mice (NSG-Cas9 and NSG-*ABL*-TK; Fig. 4A). Several hematopoietic cell lineages from the peripheral blood of transplanted NSGs were analyzed 120 days post transplant (Fig. 4B). Significantly, we detected and isolated specific hematopoietic cell populations such as myeloid cells (Gr1⁺), B-lymphocytes (B220⁺), and T-lymphocytes (CD4⁺ or CD8⁺) arising from both NSG-*ABL*-TK and NSG-Cas9 BMs. In contrast, FACS analysis only detected normal white cell percentages in peripheral blood from NSG-*ABL*-TK, while the NSG-Cas9 counterpart exhibited a Gr1⁺ bias to the detriment of the lymphoid lineage (Fig. 4B). As expected, PCR amplification of *ABL* exon 6 in all sorted populations from NSG-*ABL*-TK showed the presence of the *ABL1* CRISPR-induced deletion (Fig. 4C). Unlike NSG-Cas9, normal percentages of Gr1⁺ cells were

detected in NSG-*ABL*-TK, at least by 60 days post BMT. The *BCR/ABL1* quantitative PCR assay in sorted CD45⁺ cells from NSG-*ABL*-TKs at 120 days post BMT showed lower expression ($69.1 \pm 1.9\%$) than its NSG-Cas9 counterpart (Fig. 4D).

mLSCs modified by CRISPR at the ABL1 locus restore normal hematopoiesis

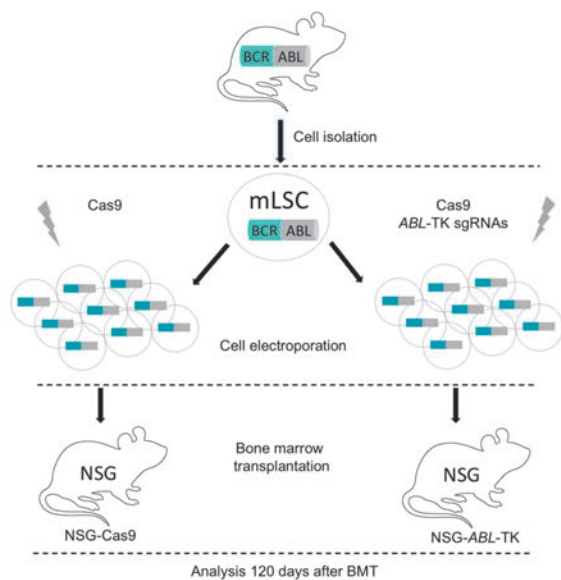
To determine whether the CRISPR-Cas9 deletion system is potentially useful as a CML therapy, independent BMT assays of CRISPR-edited and non-edited mLSCs were performed in NSGs following this scheme (Fig. 5A): (1) six NSG mice engrafted with CRISPR-edited mLSCs from CML donors (NSG-*ABL*-TK), (2) six NSG with non-edited mLSCs from CML donors (NSG-Cas9), (3) five CML transgenic mice used as parental disease controls (CML-Tg), and (4) five wild-type mice as normal controls (WT). All mLSCs were isolated from BMs of at least one-year-old CML transgenic mice with clinical disease (>60% Gr1⁺ cells in peripheral blood; Supplementary Table S2). CRISPR-Cas9-induced deletion at the *ABL1* TK domain in Lin[−] mLSCs was produced and confirmed by PCR and Sanger sequencing. Peripheral blood FACS analysis was performed 60 days after BMT to study the hematological cell populations. The endpoint was determined at 120 days (Supplementary Table S3).

CML symptoms, like splenomegaly, were observed in four NSG-Cas9 and in all CML transgenic mice. However, all the spleens of NSG-*ABL*-TK were normal size like those of WT mice (Fig. 5B).

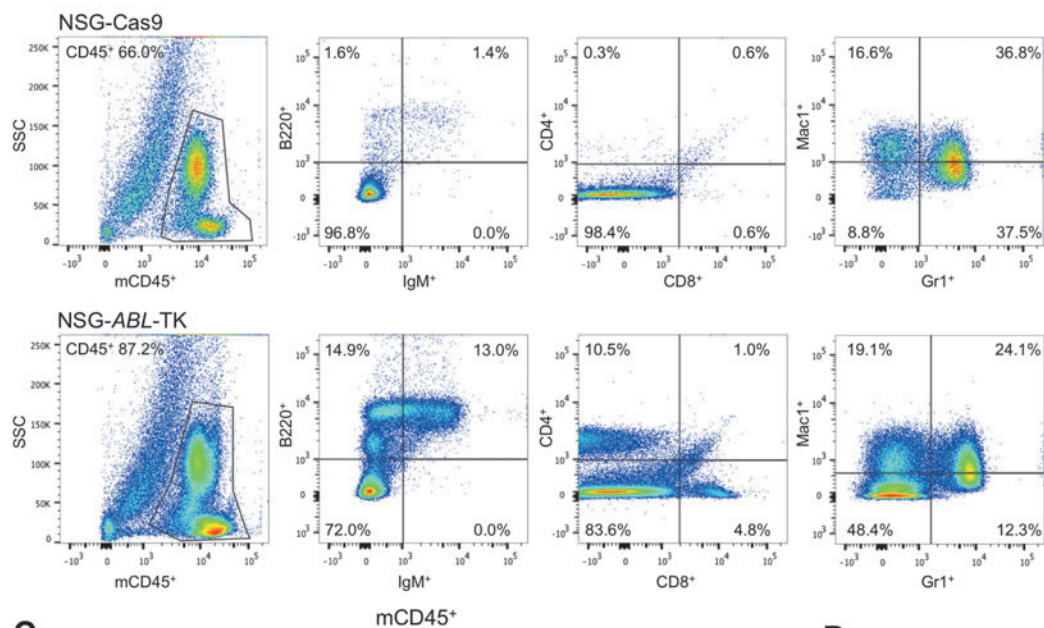
The percentage of Gr1⁺ cells increased in all NSG-Cas9 mice, reaching $59.2 \pm 9.9\%$ in peripheral blood by the endpoint. In contrast, a significantly lower percentage of Gr1⁺ cells was detected in NSG-*ABL*-TKs ($29.2 \pm 6.6\%$; $p < 0.001$), similar to WT mice ($17.9 \pm 3.4\%$; Fig. 5C and D). A significantly higher percentage of Mac1⁺ cells ($55.2 \pm 8.2\%$) was observed in NSG-Cas9 than in NSG-*ABL*-TK ($31.7 \pm 5.7\%$; $p < 0.05$) and WT mice ($19.6 \pm 1.5\%$; $p < 0.05$). As expected, low levels of lymphoid populations were noticed in all NSG-Cas9 and CML-Tg mice (Fig. 5C and D).

FIG. 4. Engraftment and multipotency capacity of CRISPR-Cas9-edited mLSCs. **(A)** Schematic representation of the experimental procedure and study groups. **(B)** Four months after BM transplantation (BMT), murine CD45⁺ cell populations from peripheral blood were analyzed and isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Lymphoid (B220⁺, CD4⁺, and CD8⁺) and myeloid (Gr1⁺ and Mac1⁺) populations were identified in the blood samples. **(C)** DNA samples from mCD45⁺ cells from mLSC-Cas9 and mLSC-*ABL*-TK mice were PCR amplified, revealing the presence of a CRISPR-Cas9-induced deletion in *ABL* exon 6 of the GR1⁺, B220⁺, CD4⁺, CD8⁺, and SCA⁺ cells. **(D)** Quantification of *BCR/ABL* expression in recovered mCD45 cells 4 months after transplantation ($M \pm SEM$; *** $p < 0.001$). Color images are available online.

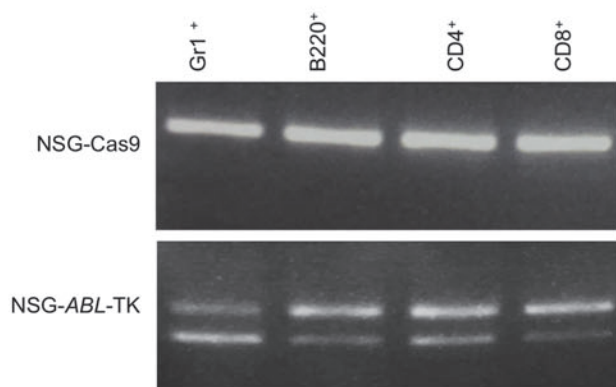
A



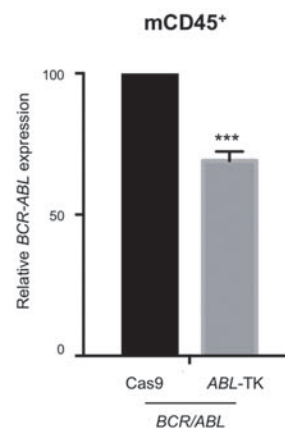
B



C



D



To study the correlation between percentage Gr1⁺ cell population and clinical disease stage, avoiding interindividual differences among donors, three independent BMT assays were performed with three independent mLSC donor mice (Supplementary Table S2 and Fig. 5E). The different clinical disease stages were defined as “initial phase” (donor #1, Gr1⁺ ≤40%), “chronic phase” (donor #2, Gr1⁺ ≥40% and ≤60%), and “advanced phase” (donor #3, Gr1⁺ ≥60%). LSCs from each CML mouse were split in two samples and electroporated with or without all CRISPR reagents (NSG-*ABL*-TK and NSG-Cas9). Both samples were engrafted into NSG recipients and maintained for 6 months (Fig. 5E). At the initial point of BMT assay, CML donor mice showed 35.4% (donor #1), 52.3% (donor #2), and 63.9% (donor #3) Gr1⁺ cells. Two months after BMT, all NSG-*ABL*-TKs mice displayed normal levels of Gr1⁺ cells (donor #1, 23%; donor #2, 8%; donor #3, 35%) and were similar 24 weeks after BMT. In contrast, all NSG-Cas9 showed increasing Gr1⁺ populations at 2 months and reached pathological levels by the endpoint (donor #1, 52%; donor #2, 62%; donor #3, 72%; Fig. 5E).

The CRISPR-Cas9 deletion system impairs myeloid bias and restores physiological multipotency in CD34⁺ LSCs from CML patients

To corroborate the applicability of CRISPR technology as a potential therapeutic tool in human CML, LSCs CD34⁺ were isolated from the BM of CP-CML patients at diagnosis. CD34⁺ hLSCs were electroporated with or without all CRISPR reagents to induce the specific deletion at *BCR/ABL1* exon 6 (hLSCs-*ABL*-TK and hLSCs-Cas9). Specific deletion was detected and confirmed by PCR and sequencing in hLSC-*ABL*-TKs (Fig. 6A). Quantitative PCR of *BCR/ABL1* mRNA from hLSCs-*ABL*-TKs showed significantly lower expression ($p < 0.001$) than controls (Fig. 6B). These results were confirmed by Western blot (Fig. 6C).

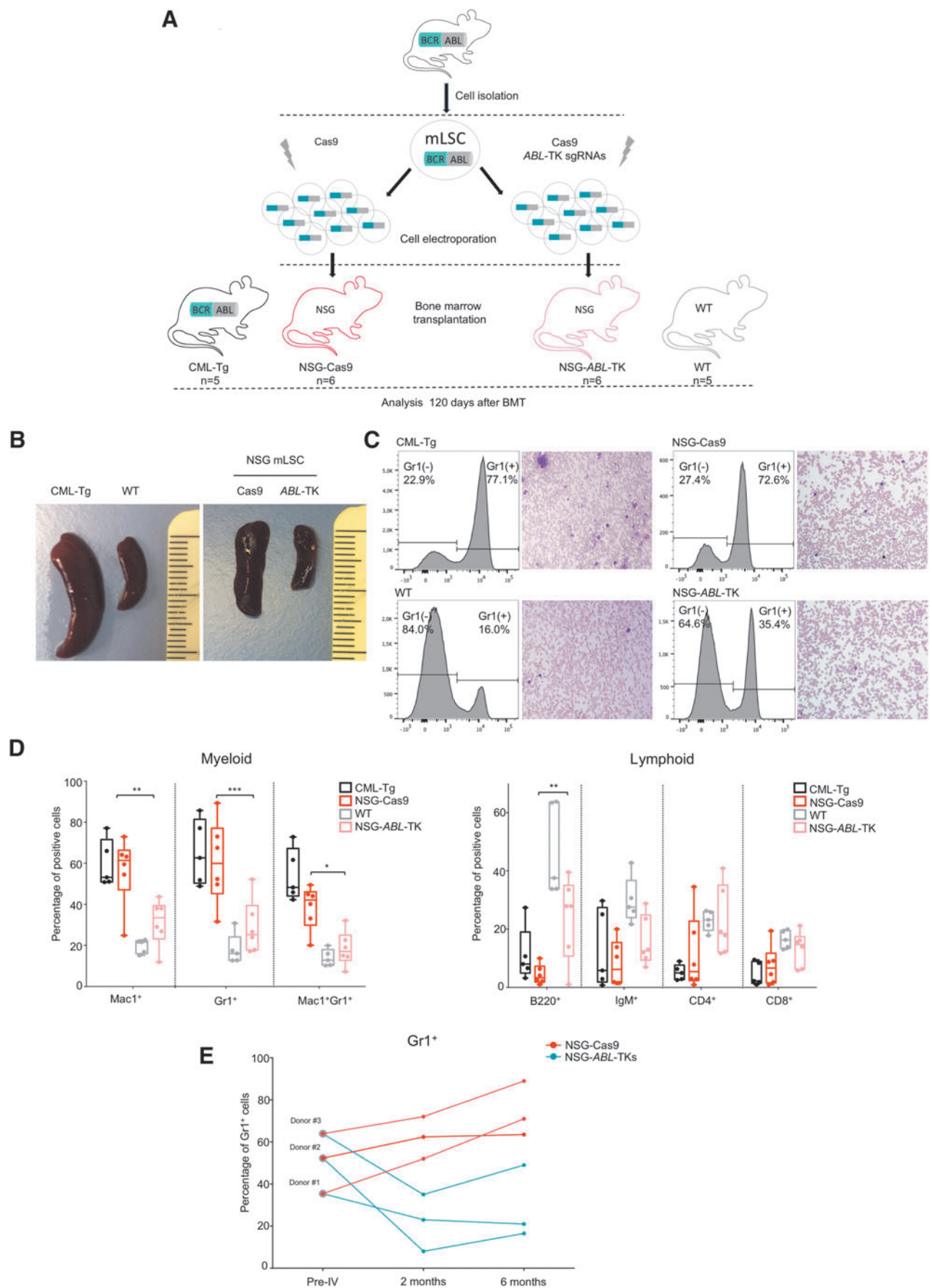
To explore the ability of the CRISPR-Cas9 system to abolish the tumorigenic capacity of hLSCs, we studied the proliferation and survival of hLSC-*ABL*-TK cells (Fig. 6D). hLSC-*ABL*-TK displayed a lower proliferation rate than hLSC-Cas9 cells did. Accordingly, hLSC-*ABL*-TK also showed a higher percentage of cell death than hLSC-Cas9 cells did (Fig. 6D).

CD34⁺ LSCs from 10 CML-CP patients at diagnosis were included to establish orthotopic PDX assays in NSG mice as follows: seven CML CD34⁺ samples were split in two, seven were electroporated with all reagents (hLSC-*ABL*-TKs), seven were electroporated solely with Cas9 (hLSCs-Cas9), and three CML CD34⁺ un-electroporated samples were used as disease controls. In addition, three CD34⁺ BM samples from healthy donors were used as normal controls (NSG-healthy-hCD34⁺). A total of 20 NSG of the same age were used as receptors of these cells (Fig. 7A). In all NSG-hLSC-*ABL*-TK, the percentages of myeloid cells (hCD14⁺ and hCD117⁺) and lymphoid B cells (hCD19⁺) were normal. A representative FACS analysis of BM 180 days after BMT is shown in Figure 7B. *BCR/ABL1* expression analysis in hCD45⁺-sorted BM cells isolated from NSG-*ABL*-TKs presented significantly lower levels than NSG-hLSC-Cas9 ($30.3 \pm 12.5\%$ and $33.2 \pm 17.7\%$, respectively; $p < 0.01$; Fig. 7C).

FACS analysis of NSG BM samples 180 days after transplantation revealed normal levels of hCD14⁺ ($5.4 \pm 2.6\%$), hCD117⁺ ($15.5 \pm 8.7\%$), and hCD19⁺ ($84.9 \pm 3.9\%$) in all NSG-hLSC-*ABL*-TK (Fig. 7D and Supplementary Table S4). In contrast, high levels of CD14⁺ ($65.1 \pm 12.7\%$) and CD117⁺ ($86.5 \pm 5.1\%$) and reduced levels of hCD19⁺ ($15.1 \pm 3.7\%$) were detected in all NSG-hLSC-Cas9 BM samples ($p < 0.001$; Fig. 7D).

Significantly, a linear regression analysis of hCD117⁺ and hCD19⁺ cell populations in the NSG mice engraftments showed an inverse correlation ($r^2 = 0.9212$)

FIG. 5. Therapeutic evaluation of the CRISPR-Cas9 deletion system in a murine model of chronic myeloid leukemia (CML). **(A)** Schematic representation of the experimental procedure and study groups. **(B)** Macroscopic aspect and spleen sizes of CML transgenic mice, wild-type mice, and NOD SCID gamma (NSG) recipient mice (NSG-Cas9 and NSG-*ABL*-TK). **(C)** FACS quantification of Gr1⁺ cells and representative micrograph of hematoxylin-stained peripheral blood. **(D)** FACS analysis of myeloid and lymphoid hematological populations generated in the peripheral blood of NSG recipient mice after BMT: NSG-*ABL*-TK (pink box), NSG-Cas9 (red box). CML transgenic mice (black box) and wild-type mice (gray box) were used as controls for CML disease and normal cell distribution (median ± SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). **(E)** Percentage and evolution of Gr1⁺ cell population analyzed in peripheral blood of NSG recipients with mLSC engraftments from CML transgenic mice at different stages of disease. mLSCs were divided into two equal-sized groups and were electroporated with Cas9 (NSG-Cas9, red line) and with Cas9 joined to both sgRNAs (NSG-*ABL*-TK, blue line) before BMT. Color images are available online.



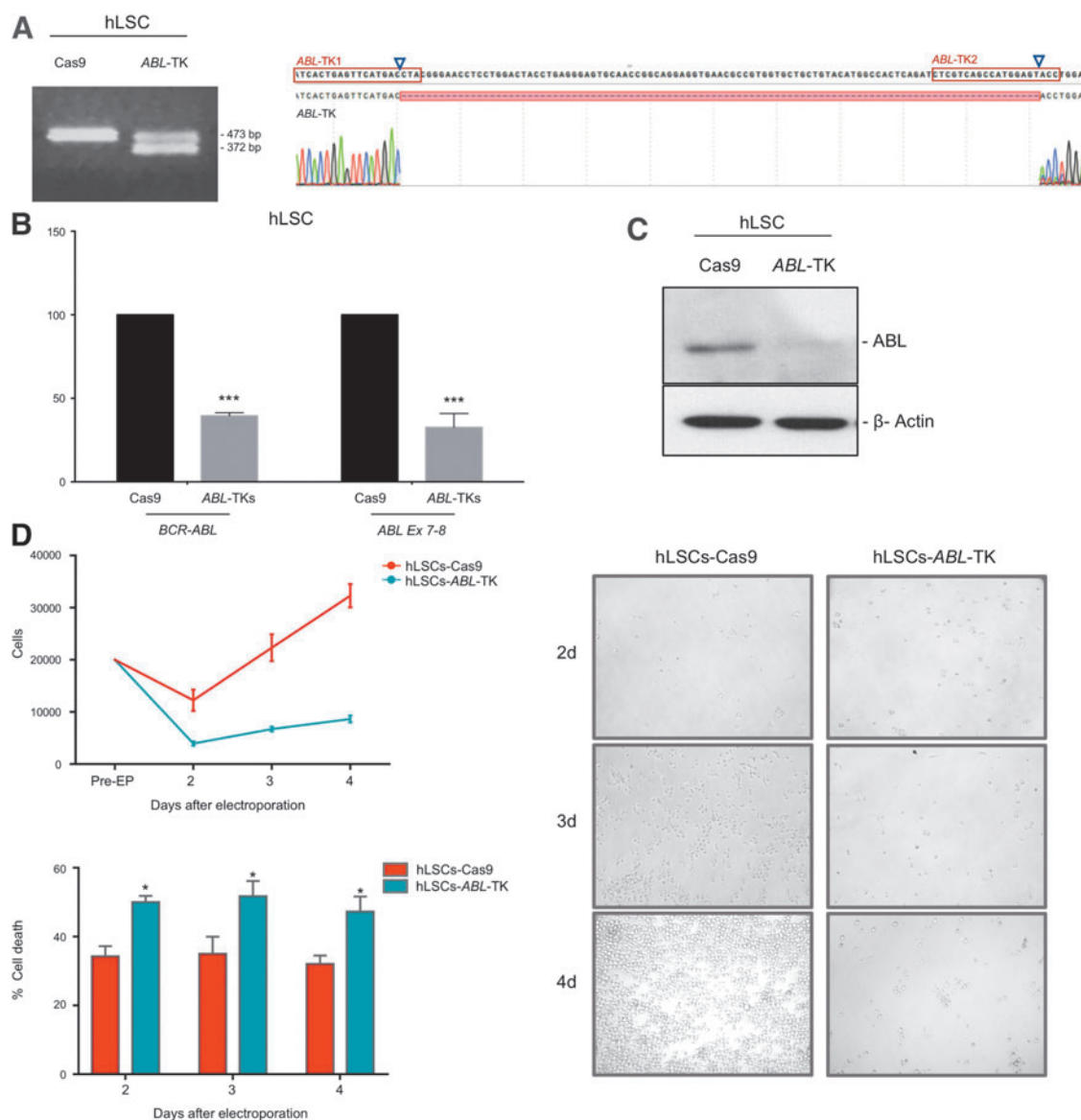


FIG. 6. Effects of CRISPR-Cas9 deletion system in human LSCs. Human CD34⁺ LSCs were isolated from BM biopsies of CML patients and electroporated with/without all the CRISPR-Cas9 reagents. **(A)** PCR amplification of ABL exon 6 in hLSC from patients electroporated with Cas9 nuclease (hLSC-Cas9) and Cas9 joined to both sgRNAs (hLSC-ABL-TK). Sanger sequencing of ABL exon 6 of both cell populations. **(B)** Quantitative PCR of *BCR/ABL* (fusion *BCR/ABL* exons, left) and *ABL* (exons 7–8, right; $M \pm SEM$; *** $p < 0.001$). **(C)** Western blot anti-ABL in hLSC cells. Cells electroporated with Cas9, used as control, showed a single band corresponding to ABL (~135 kDa). However, hLSC electroporated with ABL-TKs showed a lower expression level of ABL protein. **(D)** *In vitro* cell proliferation and apoptosis analysis of hLSC after CRISPR-Cas9 editing. LSC proliferation and apoptosis levels were measured 24, 48, and 96 h after electroporation with Cas9 (red) and Cas9 joined to ABL-TK sgRNAs (blue; $M \pm SEM$; * $p < 0.05$). hLSC-ABL-TK showed a lower proliferation ability and a higher apoptosis rate than non-edited cells (hLSC-Cas9). Color images are available online.

among NSG-hLSC-*ABL*-TK and NSG-healthy-hCD34⁺ with respect to NSG-hLSC-Cas9 and NSG-hLSC CD34⁺ donors (Fig. 7E).

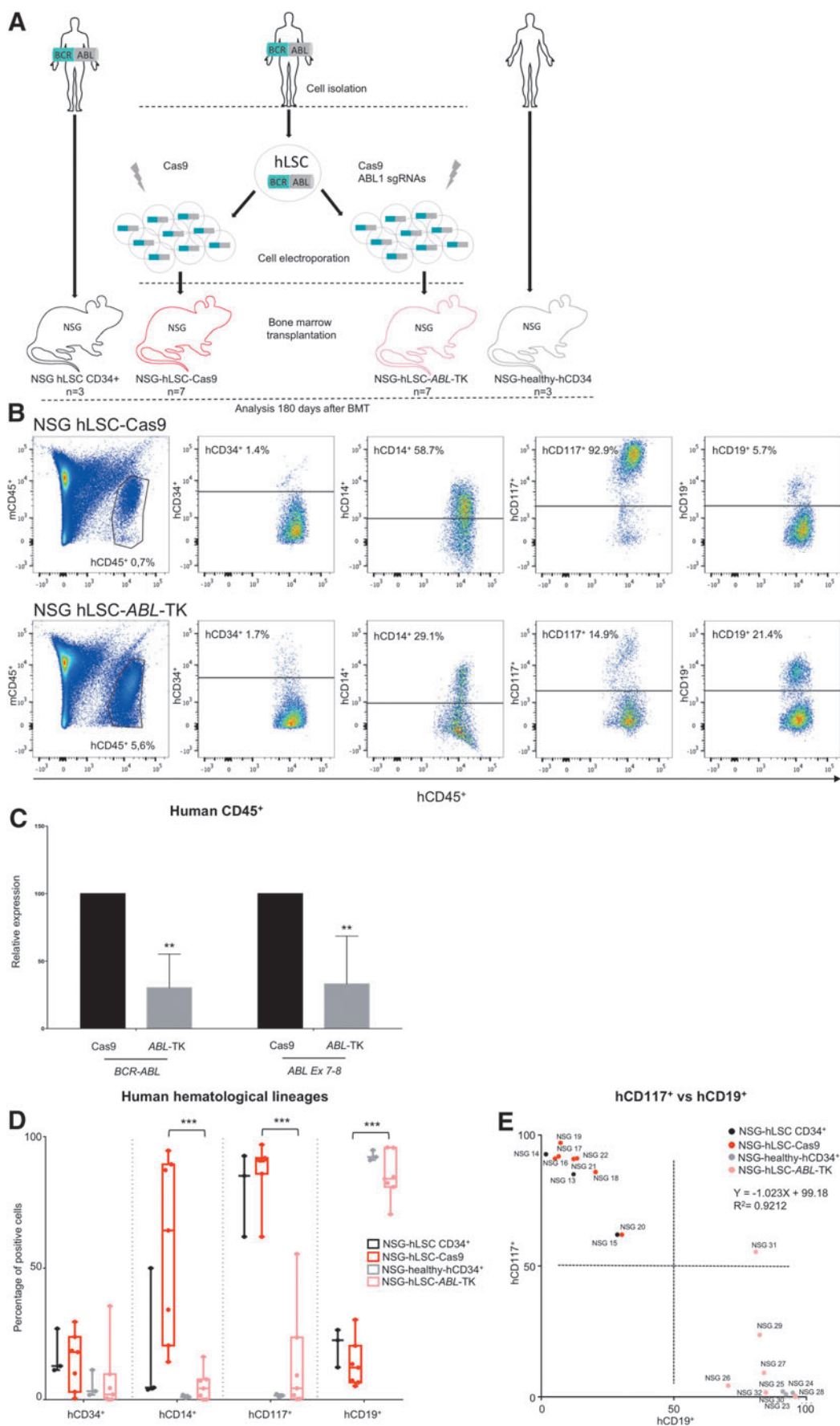
Discussion

Since the year 2000, the therapeutic landscape for CML has been changed profoundly by TKI drugs,⁴⁶ and most patients with CP-CML have a normal life expectancy. However, treatment cessation is only an option in a small subset of patients.⁴⁷ Unfortunately, TKI drugs do not tackle the etiological cause. The oncogenic event remains uncorrected, and a significant percentage of patients eventually become resistant to TKI treatment.⁴⁸

Currently, any coding sequence can be abolished by CRISPR-Cas9 nucleases^{28,29} or zinc finger nuclease,³² offering a definitive opportunity for TKI-resistant CML patients. Our previous studies and, later, those of others^{30,31,33} have demonstrated the effectiveness of the CRISPR system for knocking out *ABL1*, avoiding its oncogenic potential similar to that described with TKI imatinib and also affecting the *c-ABL1* normal allele.⁴⁹ Unlike imatinib treatment, in which toxicity is mild to moderate due to its activity on other cell compartments or on other TK enzymes,⁵⁰ this CRISPR deletion approach affects only those hematopoietic cells that express *c-ABL1* in a natural manner. Thus, the therapeutic activity and also the toxicity are restricted to the hematopoietic system, and probably only defects in the maturation of B cells in the BM could be expected.^{51,52} Other studies in cell lines induced indel mutations at *ABL1* coding sequence for abolishing its expression in

a permanent manner. CRISPR-Cas9 lentivirus for transducing peripheral blood mononuclear cells from a CML patient demonstrated a significant increase in the number of cells undergoing apoptosis.³³ However, critical questions about using CRISPR as a new potential tool for CML treatment remain, such as whether CRISPR-edited LSCs can engraft and dominate BM hematopoiesis or if the edited LSC recovers its physiological multipotential commitment and thereby avoids the myeloid bias. Here, we have developed a new strategy to generate CRISPR-induced deletions at the *ABL1* locus. A CRISPR large deletion system for abolishing the *BCR-ABL1* oncogene was previously reported by others using two sgRNAs targeting the intronic sequences, one in each of the genes involved in the chromosome translocation.^{53,54} Unlike these studies, our design generates a short deletion with a higher efficiency and probability than large deletions due to the short distance between the CRISPR-Cas9 cleavage points. Besides, deletions have potential advantages compared to indels, given the efficiency of biallelic modification, ease of rapid identification by PCR, and predictability of loss of function,⁵⁵ and have been tested in healthy CD34⁺ HSCs, preserving the multilineage potential of the CD34⁺ cell.⁵⁶ We have designed two sgRNAs for inducing a short deletion at the *ABL1* TK domain, guaranteeing the production of a truncated protein with no TK activity and for tracking the edited cell and its daughters. This system interrupted the *BCR/ABL1* oncogene, preventing entirely any oncogenic effect on survival and proliferation in selected CRISPR-edited cells from CML cell lines. In LSCs, a remaining expression of *BCR/ABL1* is observed due to the overall efficiency

FIG. 7. Multipotency capacity and therapeutic evaluation of CRISPR-edited hLSCs in an orthotopic model. Human CD34⁺ LSCs were isolated from BM biopsies of CML patients, electroporated with/without all CRISPR-Cas9 reagents and transplanted into irradiated NSG mice. **(A)** Schematic representation of study groups and experimental procedure. **(B)** FACS analysis of human hematological cell populations in BM 24 weeks after BMT. NSG with hLSC engraftments from patients electroporated with Cas9 nuclease are called NSG-hLSC-Cas9. NSG with hLSC engraftments from patients electroporated with Cas9 joined to both sgRNAs are named NSG-hLSC-*ABL*-TK. **(C)** Quantitative PCR of *BCR/ABL* (fusion *BCR/ABL* exons, left) and *ABL* (exons 7–8, right) in hCD45 cells from NSG BM 24 weeks after BMT. **(D)** FACS analysis of human hematological hCD45⁺ cell population 24 weeks after BMT in NSG mice. NSG with hLSC engraftments electroporated with Cas 9 are called NSG-hLSC-Cas9 (red boxes), and those with Cas9 joined to sgRNAs are called hLSC-*ABL*-TK (pink boxes). NSG with healthy hCD34⁺ engraftments (NSG-healthy-hCD34⁺, gray boxes) were used as normal controls. NSG with untreated hCD34⁺ cells from CML patients (NSG-hLSC-CD34⁺; black boxes) were used as a control disease (****p* < 0.001). **(E)** Linear regression analysis of hCD117⁺ and hCD19⁺ cell populations in NSG mice engraftments. NSG with hLSC engraftments electroporated with Cas 9 are represented with pink dots, and those with Cas9 joined to sgRNAs are represented with red dots. NSG with healthy hCD34⁺ engraftments (NSG-healthy-hCD34⁺) are represented with gray boxes. NSG with untreated hCD34⁺ cells from CML patients (NSG-hLSC-CD34⁺) are represented with black boxes. Color images are available online.



ratio intrinsic to the delivery and genome edition processes.^{28,29,31–33} Despite this, a significantly therapeutic benefit in murine models and PDX was confirmed in primary LSCs for the first time to our knowledge.

Several BMT assays in NSG mice were used as the best tool for studying the multipotency of human and murine HSCs *in vivo*.⁵⁷ With a CML murine model as a donor of mLSCs, we confirmed the engraftment and multipotency capacity of the CRISPR-edited mLSCs, avoiding the myeloid bias, at least 120 days after BMT. No clinical symptoms of splenomegaly and increased granulocyte lineage, usually reported in CML murine models,^{58–60} were detected.

To study of the correlation between tumor burden and therapeutic effect, we detected increased percentages of Gr1⁺ tumoral cells in all NSG-Cas9 controls, while NSG-*ABL*-TK showed lower levels of Gr1⁺ cells than those detected at the start. We noticed that the CRISPR deletion system restored normal hematopoiesis, bestowing a therapeutic benefit in the CML murine model. Despite the great result obtained, this work is a proof of concept, and a definitive cure could only be achieved when CRISPR edited cells were selected. Gene-trapping approaches combined with CRISPR technology would be an ideal solution to select them. Taking this into account, the CRISPR deletion system achieved a disease-free survival of >4 months in mice and restored normal hematopoiesis. Similar BMT assays were performed with CML human samples collected from untreated CP-CML patients. Successful engraftment was defined as the presence of at least 0.1% hCD45⁺ cells in the BM.⁶¹ Like others, we noted the presence of hCD45⁺ cells 120 days after BMT.⁵⁶ We found engraftments between 0.7% and 9.4%, showing that migration and self-renewal capacity of the edited and non-edited cells were not affected. We demonstrated that CRISPR-edited cells robustly contributed to human hematopoietic cell chimerism, generating normal hematopoiesis characterized by a high proportion of B cells, very low levels of T cells, and the absence of myeloid bias similar to that described in human HSC engraftments from healthy controls.⁶² In contrast, all NSG-hLSC-Cas9 developed a myeloproliferative disorder with a high proportion of CD14⁺ and CD117⁺ cells and inverse correlation between CD117⁺ and CD19⁺ expression associated with a myeloid phenotype and/or progression of CML.⁶³

Conclusions

Our results constitute the first step toward providing proof of principle for genome editing of the main genetic event in CML patients. The CRISPR-Cas9 deletion system efficiently interrupts the *ABL1* genome sequence,

avoiding the oncogenic effects in murine/human cell lines and LSCs. CRISPR-edited cells maintain their multipotency and repopulation capacity, restoring normal hematopoiesis and bestowing a therapeutic benefit.

As a proof of concept of its potential, these data provide the basis for a very useful alternative for interfering other cancer gene drivers and treating malignant human diseases.

Acknowledgments

We thank the following services at NUCLEUS, University of Salamanca: the Radioactive Isotopes and Radioprotection Service for mouse irradiation; the Cell Separation, Experimental Animal and Transgenic facilities for carrying out the FACS and animal assays; and the Sequencing and Bioinformatic Services for running the RNA-seq assays and the bioinformatic analysis. We thank also the Bomberos Ayudan charity for supporting our CML research (Jabones solidarios para Daniel).

Author Disclosure Statement

The authors declare that they have no competing interests.

Funding Information

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) PI17/01895 (ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa”), the Research Support Platform of the University of Salamanca (NUCLEUS), Novartis Farmacéutica S.A., the predoctoral grant program from University of Salamanca-Banco Santander, and the Bomberos Ayudan Association of Madrid.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
 Supplementary Figure S2
 Supplementary Figure S3
 Supplementary Figure S4
 Supplementary Figure S5
 Supplementary Figure S6
 Supplementary Figure S7
 Supplementary Table S1
 Supplementary Table S2
 Supplementary Table S3
 Supplementary Table S4
 Supplementary Table S5
 Supplementary Table S6
 Supplementary Table S7

References

1. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, et al. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the *bcr/abl* hybrid gene. *Science* 1986;233:212–214. DOI: 10.1126/science.3460176.
2. Janosy G, Roberts M, Greaves MF. Target cell in chronic myeloid leukaemia and its relationship to acute lymphoid leukaemia. *Lancet* 1976;2:1058–1061. DOI: 10.1016/s0140-6736(76)90970-3.
3. Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell* 2015;6:403–412. DOI: 10.1007/s13238-015-0143-7.
4. Tauchi T, Boswell HS, Leibowitz D, et al. Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *J Exp Med* 1994;179:167–175. DOI: 10.1084/jem.179.1.167.

5. Kabarowski JH, Witte ON. Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia. *Stem Cells* 2000;18:399–408. DOI: 10.1002/stem.180399.
6. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 1984;37:1035–1042. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90438-0.
7. Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, et al. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:1810–1814. DOI: 10.1073/pnas.82.6.1810.
8. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:7587–7595. DOI: 10.1128/mcb.13.12.7587.
9. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, et al. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 1991;11:1785–1792. DOI: 10.1128/mcb.11.4.1785.
10. Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, et al. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol* 1993;13:1728–1736. DOI: 10.1128/mcb.13.3.1728.
11. Ma G, Lu D, Wu Y, et al. Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* 1997;14:2367–2372. DOI: 10.1038/sj.onc.1201053.
12. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, et al. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 1994;266:129–133. DOI: 10.1126/science.7939633.
13. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, et al. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 1993;363:45–51. DOI: 10.1038/363045a0.
14. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, et al. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1996;13:247–254.
15. Ilaria RLJ, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704–31710. DOI: 10.1074/jbc.271.49.31704.
16. Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 1996;183:811–820. DOI: 10.1084/jem.183.3.811.
17. Frank DA, Varticovski L. BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia* 1996;10:1724–1730.
18. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 2004;22:247–306. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104753.
19. Chereda B, Melo J V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015;94 Suppl 2:S107–21. DOI: 10.1007/s00277-015-2325-z.
20. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, et al. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *J Clin Oncol* 2016;34:2851–2857. DOI: 10.1200/JCO.2015.66.2866.
21. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 2012;119:1981–1987. DOI: 10.1182/blood-2011-08-358135.
22. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343–3356. DOI: 10.1182/blood.V96.10.3343.
23. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of resistance to imatinib and second-generation tyrosine inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:7519–7527. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1068.
24. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro*. *Blood* 2002;99:319–325. DOI: 10.1182/blood.v99.1.319.
25. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
26. Mojica FJM, Montoliu L. On the origin of CRISPR-Cas technology: from prokaryotes to mammals. *Trends Microbiol* 2016;24:811–820. DOI: 10.1016/j.tim.2016.06.005.
27. Wassef M, Luscan A, Battistella A, et al. Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods* 2017;121–122:45–54. DOI: 10.1016/j.jmeth.2017.05.003.
28. Garcia-Tuñón I, Hernandez-Sanchez M, Ordóñez JL, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL *in vitro* and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 2017;8. DOI: 10.18632/oncotarget.15215.
29. Garcia-Tuñón I, Alonso-Perez V, Vuelta E, et al. Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency. *PLoS One* 2019;14:e0216674. DOI: 10.1371/journal.pone.0216674.
30. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079–1082. DOI: 10.1126/science.2408149.
31. Luo Z, Gao M, Huang N, et al. Efficient disruption of bcr-abl gene by CRISPR RNA-guided FokI nucleases depresses the oncogenesis of chronic myeloid leukemia cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:224. DOI: 10.1186/s13046-019-1229-5.
32. Huang N, Huang Z, Gao M, et al. Induction of apoptosis in imatinib sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells by efficient disruption of bcr-abl oncogene with zinc finger nucleases. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37:62. DOI: 10.1186/s13046-018-0732-4.
33. Chen S-H, Hsieh Y-Y, Tzeng H-E, et al. ABL genomic editing sufficiently abolishes oncogenesis of human chronic myeloid leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancers (Basel)* 2020;12:1399. DOI: 10.3390/cancers12061399.
34. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93–99. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90077-1.
35. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, et al. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 1985;315:758–761. DOI: 10.1038/315758a0.
36. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, et al. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315:550–554. DOI: 10.1038/315550a0.
37. Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, et al. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 1985;313:1429–1433. DOI: 10.1056/NEJM198512053132301.
38. Honda H, Oda H, Suzuki T, et al. Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. *Blood* 1998;91:2067–2075. DOI: 10.1182/blood.V91.6.2067.
39. Palacios R, Steinmetz M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes *in vivo*. *Cell* 1985;41:727–734. DOI: 10.1016/s0092-8674(85)80053-2.
40. Herrero AB, San Miguel J, Gutierrez NC. Deregulation of DNA double-strand break repair in multiple myeloma: implications for genome stability. *PLoS One* 2015;10:e0121581. DOI: 10.1371/journal.pone.0121581.
41. Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)* 2015;5:407–15. DOI: 10.1534/g3.114.015834.
42. Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017;14:417–419. DOI: 10.1038/nmeth.4197.
43. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
44. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 2010;11:R14. DOI: 10.1186/gb-2010-11-2-r14.
45. Prieto C, Barrios D. RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics* 2020;36:1955–1956. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz854.
46. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies. *Cancer Cell* 2020;37:530–542. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.006.

47. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2015;385:1447–1459. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62120-0.
48. Ankathil R, Azlan H, Dzarr AA, et al. Pharmacogenetics and the treatment of chronic myeloid leukemia: how relevant clinically? An update. *Pharmacogenomics* 2018;19:393–475. DOI: 10.2217/pgs-2017-0193.
49. Jacquet A, Herrant M, Legros L, et al. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J* 2003;17:2160–2162. DOI: 10.1096/fj.03-0322.
50. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002;62:4236–4243.
51. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, et al. Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 1991;65:1165–1175. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90012-n.
52. Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, et al. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 1991;65:1153–1163. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90011-m.
53. Martinez-Lage M, Torres-Ruiz R, Puig-Serra P, et al. *In vivo* CRISPR/Cas9 targeting of fusion oncogenes for selective elimination of cancer cells. *Nat Commun* 2020;11:5060. DOI: 10.1038/s41467-020-18875-x.
54. Tan Y-T, Ye L, Xie F, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene deletion efficiently retards the progression of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in a p210 BCR-ABL1(T315I) mutation mouse model. *Haematologica* 2020;105:e232–e236. DOI: 10.3324/haematol.2019.229013.
55. Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp* 2015;e52118. DOI: 10.3791/52118.
56. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 2014;15:643–652. DOI: 10.1016/j.stem.2014.10.004.
57. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, 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* 2005;174:6477–6489. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.6477.
58. Pear WS, Miller JP, Xu L, et al. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 1998;92:3780–3792. DOI: 10.1182/blood.V92.10.3780.
59. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824–830. DOI: 10.1126/science.2406902.
60. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, et al. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6649–6653. DOI: 10.1073/pnas.87.17.6649.
61. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175–3182. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0207.
62. McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 2010;116:193–200. DOI: 10.1182/blood-2010-02-271841.
63. Eisterer W, Jiang X, Christ O, et al. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia* 2005;19:435–441. DOI: 10.1038/sj.leu.2403649.



Article

CRISPR/Cas9-Directed Gene Trap Constitutes a Selection System for Corrected *BCR/ABL* Leukemic Cells in CML

Elena Vuelta ^{1,2,3,4}, José L. Ordoñez ^{4,5}, David J. Sanz ², Sandra Ballesteros ^{1,2}, Jesús M. Hernández-Rivas ^{1,2,4,6},
Lucía Méndez-Sánchez ³, Manuel Sánchez-Martín ^{1,3,4,*} and Ignacio García-Tuñón ^{1,2,4,*}

¹ Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain;

elena.vuelta.r@usal.es (E.V.); sballesteros@usal.es (S.B.); jmhr@usal.es (J.M.H.-R.)

² Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Instituto Biología Molecular y Celular del Cáncer (USAL/CSIC), 37007 Salamanca, Spain; davidjsanz@gmail.com

³ Servicio de Transgénesis, NUCLEUS, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; mendez_lucia@usal.es

⁴ Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

⁵ Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; jlog@usal.es

⁶ Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

* Correspondence: adolsan@usal.es (M.S.-M.); ignacio.tunon@usal.es (I.G.-T.)

† Current address: Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

‡ Current address: Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

Citation: Vuelta, E.; Ordoñez, J.L.; Sanz, D.J.; Ballesteros, S.; Hernández-Rivas, J.M.; Méndez-Sánchez, L.; Sánchez-Martín, M.; García-Tuñón, I. CRISPR/Cas9-Directed Gene Trap Constitutes a Selection System for Corrected *BCR/ABL* Leukemic Cells in CML. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6386. <https://doi.org/10.3390/ijms23126386>

Academic Editor: Vassilis Gorgoulis

Received: 30 April 2022

Accepted: 5 June 2022

Published: 7 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chronic myeloid leukaemia (CML) is a haematological neoplasm driven by the *BCR/ABL* fusion oncogene. The monogenic aspect of the disease and the feasibility of ex vivo therapies in haematological disorders make CML an excellent candidate for gene therapy strategies. The ability to abolish any coding sequence by CRISPR-Cas9 nucleases offers a powerful therapeutic opportunity to CML patients. However, a definitive cure can only be achieved when only CRISPR-edited cells are selected. A gene-trapping approach combined with CRISPR technology would be an ideal approach to ensure this. Here, we developed a CRISPR-Trap strategy that efficiently inserts a donor gene trap (SA-CMV-Venus) cassette into the *BCR/ABL*-specific fusion point in the CML K562 human cell line. The trapping cassette interrupts the oncogene coding sequence and expresses a reporter gene that enables the selection of edited cells. Quantitative mRNA expression analyses showed significantly higher level of expression of the *BCR/Venus* allele coupled with a drastically lower level of *BCR/ABL* expression in *Venus*+ cell fractions. Functional in vitro experiments showed cell proliferation arrest and apoptosis in selected *Venus*+ cells. Finally, xenograft experiments with the selected *Venus*+ cells showed a large reduction in tumour growth, thereby demonstrating a therapeutic benefit in vivo. This study represents proof of concept for the therapeutic potential of a CRISPR-Trap system as a novel strategy for gene elimination in haematological neoplasms.

Keywords: chronic myeloid leukaemia; *BCR/ABL*; CRISPR; gene therapy; CRISPR-Trap

1. Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is one of the best-known haematological malignancies. Originating in the stem cell compartment, the cytogenetic hallmark of the disease is the translocation between the t(9;22)(q34;q11.2), which results in the formation of the abnormal Philadelphia chromosome that harbours the *BCR/ABL* fusion oncogene [1,2]. Lifelong treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) remains the first-line therapy for the disease due to its effectiveness and the high remission rates it provides [3–6]. Unfortunately, the appearance of point mutations, leading to the development of TKI resistance during treatment, means that up to 33% of patients do not achieve an optimal response to treatment [5].

In the context of searching for new therapies, haematopoietic gene therapy has undergone unprecedented progress in terms of safety and efficacy [7–10]. The unique self-renewing and multi-potent properties of haematopoietic stem cells (HSCs), which can generate the entire haematopoietic lineage, make them ideal targets for gene correction of haematopoietic diseases. In addition, our considerable knowledge and experience about bone marrow autologous transplantation, which makes it possible to collect, genetically manipulate ex vivo and reinfuse the edited HSCs, would allow the evaluation and selection of correctly edited cells, improving the effectiveness of the process [9].

In this sense, CML is also an excellent candidate for evaluating gene therapy strategies, since it is well-established that all pathological features of the disease can be attributed to a single genetic event, the fusion of the *BCR* and *ABL* genes [11–16]. For this reason, many works have been published in recent years focusing on the genetic disruption of the *BCR/ABL* coding sequence at the genomic level using gene-editing tools, such as zinc finger [14] and, more recently, CRISPR/Cas9 nucleases [15–17], which provide the highest level of efficiency in HSC genomic editing [18]. These approaches are based on the ability of these nucleases to induce indel mutations at the target sequence, abrogating the expression of the fusion oncogene. However, the presence of unedited cells, due to the efficiency of CRISPR system and its delivery method, is responsible for a considerable limitation in its overall efficiency. Therefore, despite the promising results obtained, which demonstrate the therapeutic potential of the elimination of *BCR/ABL* in leukemic HSCs, even in bone marrow patient-derived xenografts [19], it is still necessary to develop a cell-editing selection method to turn this approach into a therapeutic reality.

As previously mentioned, one of the greatest challenges of ex vivo gene therapy in CML, as in other haematopoietic malignancies, is that posed by the existence of residual unedited cells with tumour activity that would promote post-transplantation relapse [20]. However, the nature of ex vivo gene therapy approaches could allow cell sorting of the edited HSCs prior to bone marrow transplantation (BMT).

The CRISPR-Trap approach was first described in 2018 by Reber S, et al., who designed a system for the generation of Knockout genes based on the introduction, through HDR, of a customizable cassette in the coding sequence of the gene, completely preventing expression of the ORF [21].

In this work, we evaluated the ability of a CRISPR-Trap system to direct by homology recombination (HDR) a gene targeting strategy for specifically trapping *BCR/ABL* oncogene expression. We show that this CRISPR-Trap assay abrogated oncogene expression by inserting a fluorescent reporter gene into the coding sequence of *BCR/ABL*, which would make possible to select solely the edited haematopoietic CML cells. The CRISPR-Trap system precisely selected the cells in which the oncogene had been properly disrupted. Importantly, xenograft assays with these sorted CRISPR-Trap-edited cells demonstrated a therapeutic benefit.

We demonstrate for the first time the feasibility of the CRISPR-Trap strategy for knocking out oncogenes and sorting edited cells, and thereby its value as a new tool in gene therapy approaches for treating haematological malignancies.

2. Results

2.1. The CRISPR/Cas9 System Efficiently Directs the Specific Integration of a Gene Trap Donor Cassette at the *BCR/ABL* Locus.

To explore the effects of a dsDNA HDR donor containing a high-expression CMV-Venus cassette (Figure 1A), the K562 cell line was divided into three experimental groups according to the conditions for their subsequent electroporation: (a) with the donor dsDNA (donor), (b) with the donor DNA and Cas9 nuclease without sgRNA (Cas9 + donor) and (c) with the donor DNA, Cas9 nuclease and the specific *BCR/ABL* sgRNA (CRISPR/Cas9 + donor). Twenty-four hours after electroporation, fluorescent cells (*Venus*

+ cells) were observed in all three groups, being most abundant in the CRISPR/Cas9 + donor group (32.4% vs. 23.9% in Cas9 + donor and 17.9% in donor) (Figure 2A).

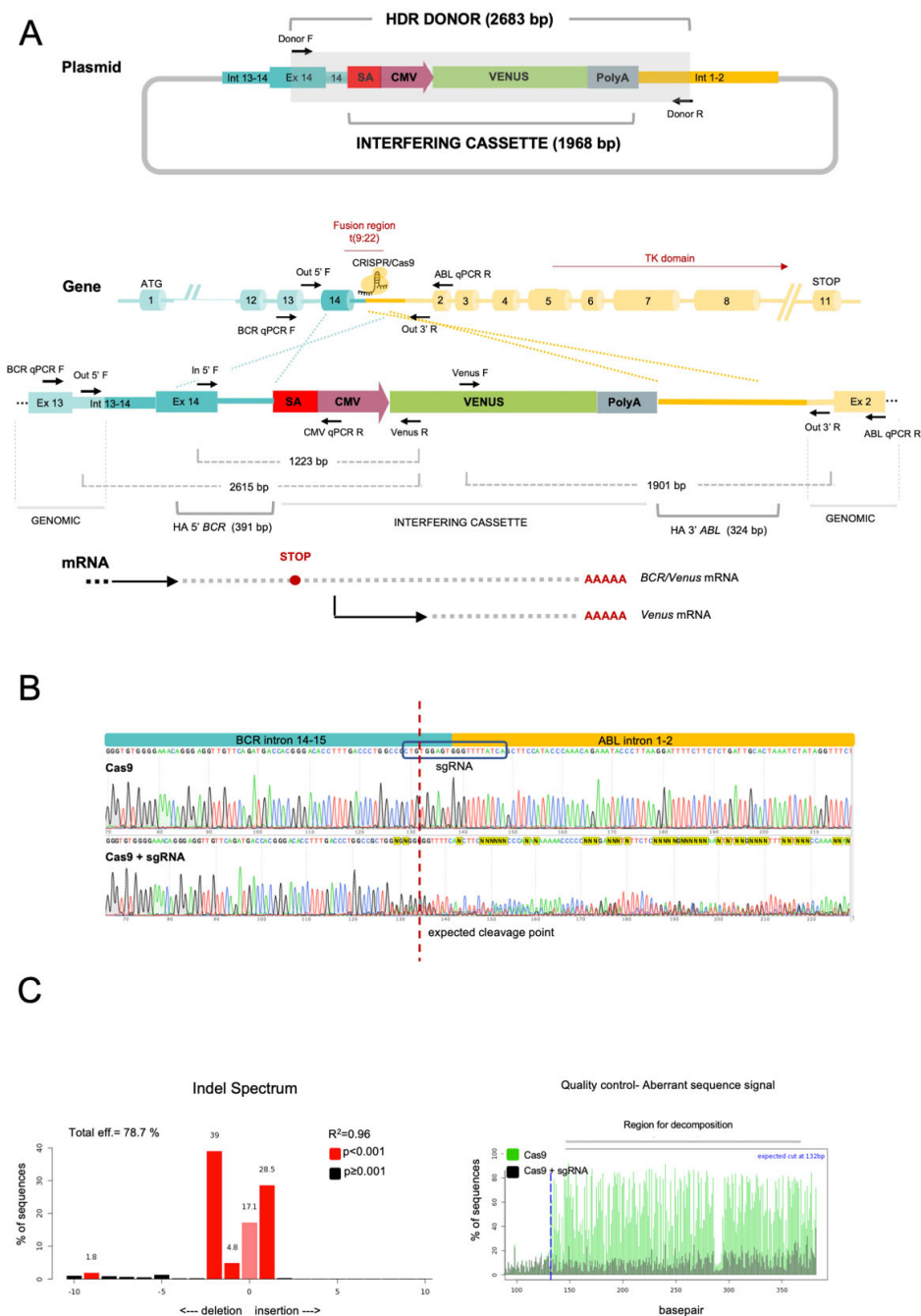


Figure 1. (A) Schematic representation of the CRISPR-Trap system plasmid and the target region of *BCR/ABL* fusion gene and the plasmid harboring the interfering cassette flanked by homology arms, containing a splicing acceptor sequence (SA), the CMV promoter (CMV) and the Venus fluorescent protein coding sequence. Black arrows represent oligos used to obtain the HDR donor molecule by PCR. CRISPR/Cas9 expected cut at *BCR/ABL* target sequence. The resulting *BCR/ABL* sequence after homology directed repair using interfering cassette as DNA donor is shown. Introduction of the SA-CMV-VENUS sequence into the intronic region of *BCR/ABL* disrupts the reading frame of the

oncogene, also promoting expression of the Venus reporter. **(B)** Sanger sequencing of the CRISPR target sequence. Cells electroporated with CRISPR/Cas9 showed a mixture of sequences at the expected cleavage point (dotted red line). **(C)** TIDE decomposition algorithm analysis of the edited sequence in Cas9 + sgRNA cells, showing high editing efficiency at the expected cleavage point. The left panel illustrates the aberrant sequence signal in Cas9 control cells (black) and Cas9 + sgRNA-edited cells (green) and the expected cleavage site (vertical dotted line).

Due to HDR dsDNA-induced fluorescence under all experimental conditions, we investigated possible differences in reporter expression levels by qPCR. We found the *Venus* mRNA levels in the CRISPR/Cas9 + donor group to be significantly higher in the CRISPR/Cas9 + donor group than in the donor and Cas9 + donor groups (Figure 2B).

The result of the 5' arm (Out 5'F/Venus R, Table 1), 3' arm (Venus F/Out 3'R, Table 1) and full-length (Out 5'F/Out3'R, Table 1) site-specific PCRs corroborated the correct insertion of the donor HDR dsDNA at the *BCR/ABL* target sequence only in the CRISPR/Cas9 + donor group, with no site-specific integration detected in any of the controls (Figure 2C; Supplementary Materials Figure S3). Furthermore, the subsequent Sanger sequencing of the PCR products confirmed the proper junction between the genomic DNA and the interference cassette (data not shown), corroborating the HDR-mediated insertion of the donor dsDNA into the CRISPR/Cas9 + donor group.

Table 1. Oligonucleotides used.

Name	Sequence
Donor F	ACCCACATCCCACATCACCC
Donor R	CATGGTCTCCACTATCAAGGG
Out 5' F	ATCAAGGATCTCCGGGCAGC
Out 3' R	CCAAGGCAAATCTGGGAGTTG
In 5' F	TCCACTCAGCCACTGGATTTAAGCA
Venus F	TGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
Venus R	GGACACGCTGAACTTGTGGC
BCR qPCR F	AGTTACACGTTCTGATCTCC
ABL qPCR R	TTGGGCTTCACACCATTCCCC
CMV qPCR R	GCGGGCCATTTACCGTAAG
Venus qPCR R	GCGGGCCATTTACCGTAAG
Gapdh qPCR F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
Gapdh qPCR R	CACCACCTTCTTGATGTCATCA

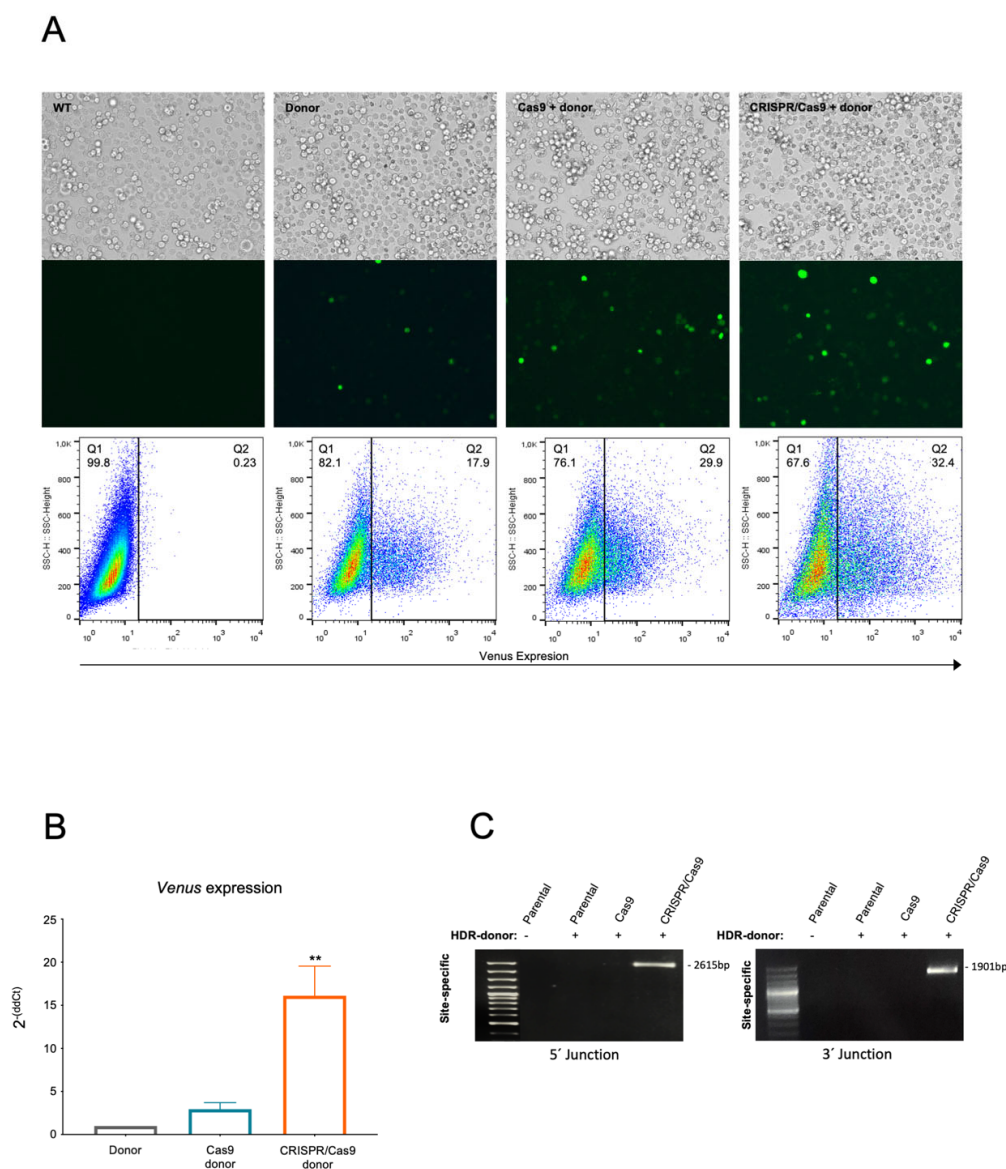


Figure 2. CRISPR-Trap system electroporation in K562 cells. **(A)** *Venus* expression K562 electroporated with HDR donor (used as control) and CRISPR-Trap system (CRISPR/Cas9-HDR donor), and *Venus*-positive cell quantification by flow cytometry of each condition. **(B)** *Venus* expression quantification by real-time PCR. **(C)** Molecular characterization of the CRISPR-Trap system. 5' and 3' junction site-specific PCR amplification in cells electroporated with CRISPR-Trap system in 5' (oligos: Out5'F/*Venus*R) and 3' (oligos: *Venus*F/Out3'R junctions (2615 bp and 1901 bp, respectively)). ** $p < 0.01$.

2.2. The BCR/ABL Trapped Allele Is Properly Expressed When the Expression of the Oncogenic Version Is Reduced

To verify the proper functionality of the CRISPR-Trap system, we studied all the possible mRNAs generated from the trapped allele. We designed a pair of oligonucleotides to amplify a region of the donor DNA (In 5' F/*Venus* R; Table 1). This in-in RT-PCR showed a 900-bp band, corresponding to the size of the predicted *BCR/Venus* mRNA under all three experimental conditions (Figure 3A). Nevertheless, the site-specific in-out RT-PCR (*BCR* qPCR F/*Venus* R; Table 1) confirmed the correct expression of the cassette,

specifically inserted into the *BCR/ABL* locus, only with the CRISPR/Cas9 + donor condition (Figure 3A). Interestingly, Sanger sequencing of the PCR products confirmed the existence of a processed *BCR*-CMV-Venus mRNA, containing a premature termination codon (PTC), which escapes the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) signalling pathway (Figure 3B).

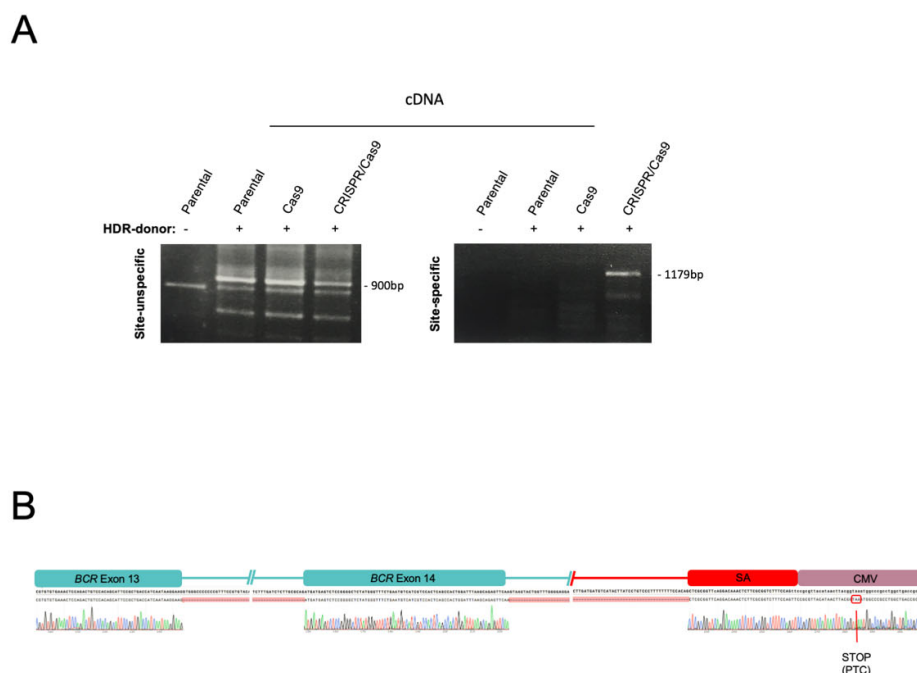


Figure 3. Expression analysis of target locus. (A) RT-PCR of *BCR/Venus* fusion RNA (900 bp site-unspecific, oligos: In5'F/VenusR; 1179 bp site-specific, oligos: BCRqPCR/VenusR), in cells electroporated with the CRISPR-Trap system (CRISPR-Cas9 + HDR donor) and controls (Parental, Parental + donor, Cas9 + donor). (B) Sanger sequencing of site-specific RT-PCR corresponding to a *BCR/Venus* of K562 electroporated cells with the CRISPR-Trap system.

These results, coupled with the presence of fluorescent cells in the control groups, suggest an unspecific expression of the cassette when the dsDNA HDR donor was delivered either alone or with an “unguided” Cas9. As expected, site-specific HDR-mediated integration of the cassette was only detectable when all CRISPR/Cas9 trap reagents were delivered.

Having demonstrated the expression of the interfering cassette, we proceeded to quantify the expression levels of the *BCR/ABL* trapped locus versus native *BCR/ABL* allele in the pool of electroporated cells using a common forward oligonucleotide in the *BCR* sequence (BCR qPCR F) and two reverse oligonucleotides hybridizing in the *ABL* (ABL qPCR R) or CMV differential sequence (CMV qPCR R), respectively (Table 1).

BCR/Venus qPCR confirmed the significant expression of the *BCR*-CMV-Venus allele solely in the CRISPR/Cas9 + donor group, in which it attained expression levels 800-fold greater than in the controls groups (Figure 4A). On the other hand, the *BCR/ABL* qPCR showed significantly lower oncogene mRNA levels in cells electroporated with the CRISPR-Trap system relative to control groups, thereby demonstrating the proper working of the gene trap when all the CRISPR/Cas9 components were present (Figure 4B).

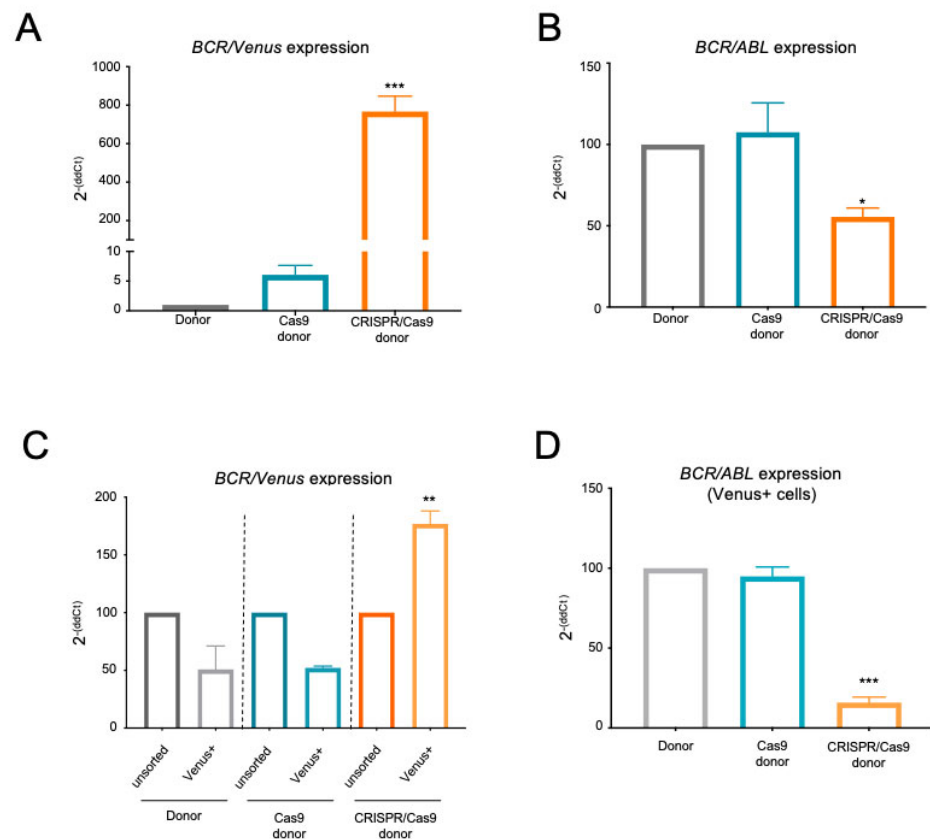


Figure 4. Expression analysis of targeted *BCR/ABL* locus. (A) qPCR of *BCR/Venus* and (B) *BCR/ABL* in K562 cells electroporated with the CRISPR-Trap system (CRISPR/Cas9 + donor) and controls (donor and Cas9 + Donor). (C) qPCR of *BCR/Venus* expression in electroporated K562 cells, comparing pool and *Venus*⁺ cells. (D) qPCR of *BCR/ABL* in *Venus*-positive cells electroporated with the CRISPR-Trap system (CRISPR/Cas9 + Donor) and controls (donor and Cas9 + donor) (mean $\pm$ SEM; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

2.3. The *BCR/ABL* CRISPR-Trap Enables the Selection of Gene-Targeted Cells

To examine whether the expression of the *Venus* reporter gene allows the successful selection of *BCR/ABL*-trapped cells, we compared the pool of electroporated cells in parallel with the sorted *Venus* fluorescent cell fraction from each experimental group. Selection of *Venus* fluorescent cells in the CRISPR-mediated group resulted in an almost two-fold higher level of expression of the *BCR/Venus* allele ($176.9 \pm 11.1\%$ compared with the unsorted pool) (Figure 4C). However, no differences in *BCR/Venus* expression between pools and sorted cells were observed under any control conditions (Figure 4C).

Additionally, qPCR quantification of *BCR/ABL* mRNAs in *Venus* fluorescent cell fractions from all control groups showed high levels of oncogene expression ($94.8 \pm 5.9\%$ of expression relative to the donor group), revealing the unspecific expression of the *Venus* cassette (Figure 4D). Conversely, *Venus* fluorescent cells sorted from the CRISPR/Cas9 + donor group showed significantly lower oncogene expression levels of up to $15.9 \pm 3.5\%$ relative to the control groups (Figure 4D).

2.4. The BCR/ABL CRISPR-Trap Promotes Apoptosis and Inhibits Proliferation in K562 Leukemic Cells

To evaluate the biological effect of the BCR/ABL CRISPR-Trap strategy, we measured the apoptotic levels and proliferative capacity of each group of electroporated cells. Forty-eight hours after electroporation, Annexin-V staining showed no significant differences between parental K562 cells (7.9 uf) and control groups (29.4 and 57.7 uf with the donor and Cas9 + donor conditions, respectively). In contrast, cells electroporated with the entire CRISPR-Trap system showed significantly higher levels of Annexin-V (165.4 uf) with respect to all control groups (Figure 5A).

The cell proliferation assay was carried out by seeding 1.5×10^4 cells of each experimental condition 24 h after electroporation. At 48, 72 and 96 h, cells were counted using a cytometer. At 48 h, the control groups (donor and Cas9 + donor) had cell frequencies of $15,685 \pm 6862$ and $14,904 \pm 4742$, respectively, like that observed in K562 parental cells ($19,946 \pm 6035$) (Figure 5B). However, cells from the CRISPR/Cas9 + donor group featured fewer cells (9936 ± 3602) at 48 h. After 72 h of culture similar raised frequencies of cells were observed for all control conditions (Figure 5B; parental: $59,896 \pm 15,088$; donor: $45,371 \pm 23,313$; Cas9 + donor: $35,689 \pm 13,143$). Nevertheless, this increase was lower in CRISPR-Trap electroporated cells (Figure 5B; $13,622 \pm 4739$). Finally, after 96 h of culture, a similar number of cells was observed for all conditions.

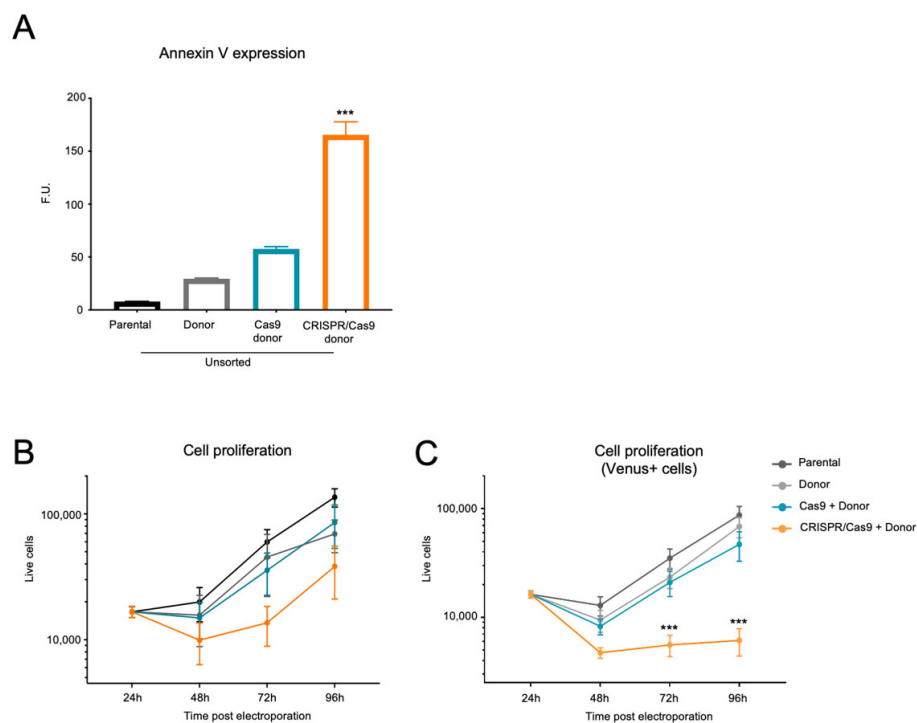


Figure 5. Functional analysis of CRISPR-Trapped BCR/ABL. (A) Annexin V expression analysis by flow cytometry of K562 cells 48 h after electroporation with the CRISPR-Trap system (CRISPR/Cas9 + Donor) and controls (Parental, Parental + Donor, Cas9 + donor). (B) Cell proliferation assay of K562 24 h after electroporation with CRISPR-Trap system and controls, and (C) Venus-positive sorted cells, over 96 h (mean $\pm$ SEM; ***, $p < 0.001$).

To investigate the tumour activity of CRISPR-Trap selected cells, a cell proliferation assay was performed using sorted parental cells and the Venus fluorescent cell fraction from all experimental conditions (Figure 5C). As expected, the Venus fluorescent cell

fraction of both controls showed no differences in proliferation with respect to the sorted parental cells during 96 h of culture (parental: $59,896 \pm 15,088$; donor: $45,371 \pm 23,313$; Cas9 + donor: $35,689 \pm 13,143$). However, the Venus fluorescent cell fraction from the CRISPR/Cas9 + donor group revealed a substantially lower proliferation rate, with significantly fewer cells at 72 and 96 h than for the control groups (Figure 5C; 5572 ± 2465 and 6117 ± 3448 , respectively).

2.5. The CRISPR-Trap System Prevents Tumour Activity of BCR/ABL, Thereby Producing a Therapeutic Effect in a CML Xenograft Model

Finally, we studied the in vivo therapeutic effect of the CRISPR-Trap system in a CML xenograft model. 4×10^5 Venus fluorescent cells from Cas9 + donor and CRISPR/Cas9 + donor groups, as well as 4×10^5 parental cells, were sorted from the electroporated or parental pools, respectively. NSG mice were injected subcutaneously in both flanks with these cell suspensions, and tumours were allowed to develop for 23 days (Figure 6A).

Tumour growth over the 23 days post-cell injection revealed strong oncogenic activity in cells from the Cas9 + donor group, which gave rise to tumours similar to those of the parental K562 control group), reaching a volume of 1433.8 ± 219.6 and 1584.6 ± 453.8 mm³, respectively, after 23 days. Strikingly, the Venus fluorescent cells from the CRISPR/Cas9 + donor group developed tumours that were 90% smaller (166.8 ± 71.6 mm³ by 23 days post-injection) than those of the controls, implying that tumour activity was strongly inhibited in the cells selected by the CRISPR-Trap system (Figure 6B). Accordingly, after sacrifice at 23 days, the tumours had a significantly lower mass in the CRISPR-mediated condition than in the controls (0.13 ± 0.06 g vs. 1.3 ± 0.2 and 1.4 ± 0.2 g).

H&E staining also revealed significantly fewer tumour cells in BCR/ABL-targeted tumours. This reduction in the malignant capacity of the trapped cells corresponded to a lower frequency of Ki-67+ cells within the tumour compared with controls (Figure 6C).

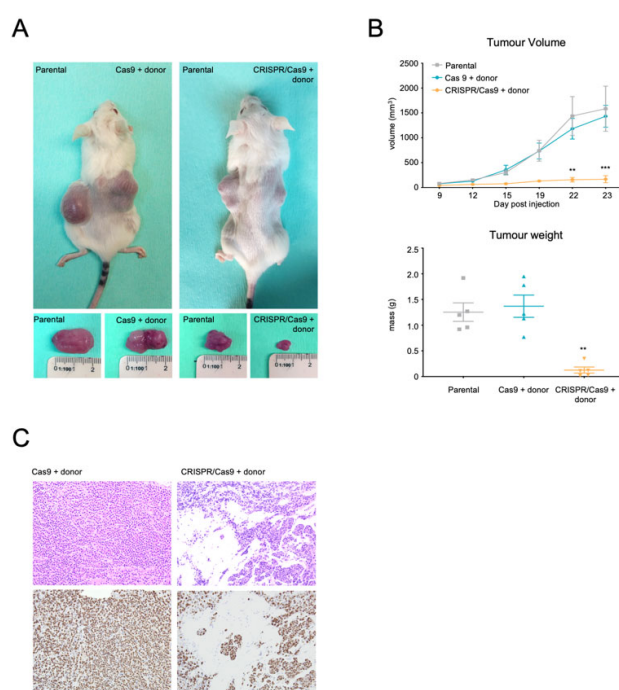


Figure 6. In vivo effects of CRISPR-trapped BCR/ABL oncogene. (A) External image of mice and developed tumors 23 days after subcutaneous cell injection. (B) Tumor growth (mm³) over the 23 days following subcutaneous cell injection. After 23 days, mice were sacrificed, and their tumor mass measured. The plots show means and SEM; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Histological analysis

of tumors. Hematoxylin/eosin and Ki67 proliferation marker staining of tumor developed after Cas9 + donor and CRISPR/Cas9 + donor cell injection (20X magnification).

3. Discussion

The field of gene therapy for monogenic haematological disorders has advanced significantly in the last two decades, from being a promising strategy to becoming a therapeutic reality. The characteristics of HSC, which can repopulate a patient's bone marrow and give rise to all haematopoietic lineages, mean that most of these haematological disorders can ultimately be treated by allogenic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) [22]. This standard treatment is the only conventional alternative with the potential to definitively cure these haematological diseases and is, in several cases, the last-resort salvage option [23,24]. However, the lack of suitable compatible donors and associated immunological complications, such as graft-versus-host disease, are serious clinical barriers that limit the success of this treatment and prevent its application in a wide range of haematological diseases [25].

In this context, autologous HSC-based gene therapy benefits from all the experience gained in bone marrow manipulation, autologous and allogenic HSC transplantation and HSCs extraction through CD34+ cell selection, while avoiding all the immunological risks associated with the allo-HSCT process [22,26]. Furthermore, the rapid advances in gene-editing techniques using the CRISPR/Cas9 system and the development of safer therapeutic viral vectors (LVs) that make ex vivo correction of HSCs feasible, have prompted a large number of HSC-based gene therapy clinical trials [27–30]. Autologous HSC-based gene therapy has demonstrated its curative potential, especially in those pathologies in which gene correction confers a proliferative advantage to those edited cells and, along with the attainment of certain levels of chimerism of genetically modified cells in the graft, is enough to produce full therapeutic benefits [31]. Nevertheless, there are other scenarios, such as the elimination of oncogenes in cancer-therapy, in which achieving certain levels of corrected-cell chimerism is not sufficient.

CML is an excellent example of a haematological malignancy in which all pathological aspects can be attributed to a single oncogene: *BCR/ABL* [10,32]. Our previous study [19] and subsequent others [15,16], have shown that anti-*BCR/ABL* gene therapy could have enormous therapeutic potential, although guaranteeing the absence of residual unedited cells is imperative if this potential is to be realised [18]. A possible solution to this difficulty is to employ a strategy that allows in vitro editing and selection of the HSCs. This approach would overcome the well-established limitations, such as low editing efficiency, and would offer new possibilities, such as in vitro expansion of the virtually pure population of edited cells before their reinfusion into the patient. In this work, we show for the first time an anti-*BCR/ABL* CRISPR-Trap approach that allows the simultaneous genetic correction and expression of a selectable cell marker.

The CRISPR-Trap strategy unites CRISPR/Cas9 technology, which targets the specific *BCR/ABL* fusion sequence, with a non-viral gene trap donor inserted via HDR. The gene trap donor contains a splicing acceptor sequence, which ensures disruption of the *BCR/ABL* reading frame, followed by the *Venus* fluorescent reporter gene sequence. Our preliminary results, using a promoterless SA-T2A-Venus cassette in which *Venus* expression is under the control of *BCR* promoter, showed that the system was able to specifically integrate the cassette, reducing the *BCR/ABL* expression and its oncogenic effect. However, using this strategy, the expression level of *BCR* is not enough to generate detectable fluorescence (Supplementary Materials). Currently, there are new modifications in the gene-trap donor sequence to improve the sensibility of the reporter system, such as enhancers, positive/negative selection systems or tandem repeats of the reporter gene [33–35]. However, in all these cases, the increase in the reporter signal was weak and involves a process of selection/expansion of the cells. In the HSC-based therapy, where the expansion of the selected cells is not possible and the use of negative selection genes is not suitable, achieving a robust fluorescent monitoring system becomes imperative.

In this sense, others studies have shown the need to include an exogenous promoter in gene therapy donors to ensure high locus-independent expression of the selection gene [31]. Accordingly, we modify our interfering cassette to led *Venus* expression under the control of the CMV promoter. However, the use of a promoter-containing donor implies that off-target integrations of the cassette, detected in our control conditions, led to an observable expression of the reporter gene [36] obtaining similar fluorescence percentages among all experimental conditions. Interestingly, this result contrasts with that obtained in the *Venus* qPCR quantification, where the sensitivity of the technique revealed large and significant differences in reporter expression levels. There was a more than 13-fold higher level for the donor + CRISPR/Cas9 condition, suggesting an increase in the HDR-mediated integration efficiency of the cassette when CRISPR/Cas9 drives the system.

Our analyses conducted in the *Venus* fluorescent cell fractions corroborated the adequate selection of the *BCR/ABL*-trapped cells for the donor + CRISPR/Cas9 condition, as well as the unspecific origin (random-integrated and non-integrated donor) of *Venus* expression under control conditions. Separation of the *Venus* fluorescent cell fraction from the control conditions did not result in an enrichment of the cell population carrying the trapped *BCR/Venus* allele, nor consequently in a reduction in the frequency of the native *BCR/ABL* allele, thereby revealing locus-independent reporter expression. Moreover it is not possible to distinguish between *Venus* expression from unspecific integrated donor and from non-integrated free donor, since the K562 cell line depends on *BCR/ABL* to grow in culture and, therefore, it is not possible to carry out the several division rounds needed to get rid of the free donor [37,38]. Conversely, in the CRISPR-mediated group, the selection of *Venus* fluorescent cells led to an enrichment of the *BCR/ABL*-trapped cell fraction in which the CMV-*Venus* expression cassette was successfully inserted into the *BCR/ABL* locus. These results are consistent with those of previous reports in which the “on target” HDR-mediated integration of the cassette increased by over 1000-fold when using engineering nucleases capable of generating a double-stranded cut in DNA [39]. This site-specific integration caused the expression of the *BCR/ABL* oncogene, which was already reduced in the set of electroporated cells, to decrease to substantially lower levels in the *Venus* fluorescent cell fraction.

Finally, we demonstrated the therapeutic benefit of a *BCR/ABL* CRISPR-Trap strategy in vitro and in vivo. The effects of the constitutive *BCR/ABL* activity are pleiotropic and promote leukaemogenesis by acquisition of tumour abilities. These abilities include the increase in cell survival [40,41], apoptosis inhibition [42,43] and genomic instability that downregulates the DNA-repair mechanism [44,45]. In the K562 CML-derived cell line, the CRISPR-Trap system disrupted the *BCR/ABL* sequence, entirely preventing any oncogenic effect on in vitro survival and proliferation in selected *Venus* fluorescent cells in the CRISPR/Cas9-mediated group. Subcutaneous injection of these *BCR/ABL*-trapped cells into immunodeficient mice led to a strong inhibition of tumour growth, resulting in a 90% reduction in tumour burden relative to control tumours (Cas9 + donor and parental), 23 days post-injection. Earlier results from our group [19] and others [15] were obtained using a strategy based on the induction of aleatory mutations in the reading frame of the oncogene to prevent its expression. In any case, the possibility of inducing mutations without frame-shift consequences, together with the inability to select the edited cells, led to higher-than-desired levels of oncogene expression. By contrast, the CRISPR-Trap system showed, after selecting the edited cells, a more than 80% reduction in *BCR/ABL* expression levels, which represents a substantial improvement in the efficiency of genome editing in those cases where it is possible to select the cells, such as in HSC-based therapies, before transplant.

These results demonstrate that the CRISPR-Trap system achieves adequate selection of *BCR/ABL* null cells, limits the residual unedited events with oncogenic potential and bestows a long-term therapeutic effect in a CML mouse model. Further studies are needed to improve the efficiency of the delivery system, editing, and selection process, but our results represent an advance in gene therapy of haematological genetic diseases and offer

a new approach to selecting the correctly edited cells before carrying out an autologous transplant. The CRISPR-Trap design combines established gene trapping strategies, which simultaneously disrupt and report by expression of a selectable marker gene, with the mechanisms of homologous recombination (HR), which direct the system in a site-specific way via designable homology arms. Our study demonstrates the CRISPR-Trap system to be a promising and versatile strategy for gene deletion monitoring that is applicable to any genomic sequence.

4. Materials and Methods

4.1. Cell lines and Culture Conditions

The human CML-derived K562 cell line was purchased from the DMSZ collection (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany). K562 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Pleasanton, CA, USA) supplemented with 10% FBS, and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA) and were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

4.2. Cloning of Targeting Vectors and HDR DNA Donor Obtention

The target vectors pTC201B HA BCR/ABL SA-T2A-CMV-Venus and pTC201B HA BCR/ABL SA-T2A-Venus were generated by modifying the pTC201B vector, kindly provided by Tian Chi [46] (Addgene plasmid # 52193; <http://n2t.net/addgene:52193> (accessed on 4 June 2022); RRID:Addgene_52193), containing the Neo-IRES-GFP cassette, preceded by a splicing acceptor sequence (SA). The 5′ and 3′ homology arms of the *BCR/ABL* target site were obtained by PCRs from K562 genomic DNA and subsequently inserted flanking the cassette of the targeting vector using the *Cla*I and *Xho*I sites, respectively. The original Neo-IRES-GFP reporter cassette was removed using the *Not*I and *Sal*I restriction sites and replaced by the CMV-Venus or T2A-Venus constructs obtained by PCR from plasmid pShuttle, kindly provided by Zheng-Xu Wang (Addgene plasmid # 62621; <http://n2t.net/addgene:62621> (accessed on 4 June 2022); RRID:Addgene_62621) (Figure 1A; Supplementary Materials Figure S1A).

The double-strand donor DNA molecule (DNA donor), containing the interference cassette (SA-CMV-Venus or T2A-Venus) flanked by the *BCR/ABL* homology arms of 491 and 327 bp, respectively (Figure 1A), was obtained by PCR from the targeting vector using Donor F and Donor R oligonucleotides (Table 1). PCR product was purified using the NZYGelpure kit (NZYTech), digested with *Dpn*I, phosphorylated with T4 polynucleotide kinase, re-purified and eluted in 40 µL of ddH₂O to a final concentration of 200 ng/µL.

4.3. CRISPR/Cas9 System Design

In most CML patients, the *BCR/ABL* fusion region comprises the major cluster region of *BCR* (M-bcr), downstream of exons 13 or 14, and the region upstream of the second exon (a2) of *ABL* [47,48]. However, the specific genomic breakpoints of both genes involve regions of 3 kb for *BCR* and 200 kb for *ABL*, making each patient's fusion sequence almost unique.

To specifically target *BCR/ABL*, we sequenced the genomic K562 fusion region and designed a specific sgRNA targeting the *BCR/ABL* junction sequence, using the Breaking-Cas web-tool (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/> (accessed on 4 June 2022)) (Figure 1B). The editing efficiency of the sgRNA was assessed in vitro by Sanger sequencing of the *BCR/ABL* genomic region from electroporated cells and analysed by Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) software (<https://tide-calculator.nki.nl> (accessed on 4 June 2022); Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands) (Figure 1C).

4.4. CRISPR/Cas9 Ribonucleocomplex Assembly, DNA Donor Delivery and Electroporation

The BCR/ABL-sgRNA was prepared by equimolar mixing of the crRNA containing the target sequence (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) with the tracrRNA (Integrated DNA Technology, Belgium) to a final concentration of 44 μ M. Duplex annealing was carried out by heating at 95 °C for 5 min, followed by a ramp-down of temperature to 25 °C. The ribonucleoprotein complex was obtained by incubating 22 pmol of the previous duplex with 18 pmol of Cas9 enzyme. For each electroporation, we added 1 μ L of the ribonucleoprotein, 1 μ L of donor DNA (200 ng), 2 μ L of 10.8 μ M of Electroporation Enhancer (Integrated DNA Technology, Belgium), and 6 μ L of cell suspension of 1×10^7 cells/mL.

Cells were electroporated using a Neon Transfection System Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) following the manufacturer's instructions and using the electroporation parameters of 1450 v, 10 ms and 3 pulses.

4.5. DNA/RNA Isolation, Retrotranscription and PCR-Based Detection of HDR Events

Genomic DNA and total RNA from K562 cells were extracted using the AllPrep DNA/RNA Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. 100 ng of total RNA was used in an in vitro retrotranscription using SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). DNA and cDNA were amplified in several PCRs, using different pairs of primers for specific 5' (Out 5'F and Venus R) and 3' (Venus F and Out 3'R) integration junction, in order to detect targeted integration of the DNA donor or unspecific cDNA expression (In 5'F and Venus R; Table 1). PCR and RT-PCR were performed using the Phusion Taq polymerase (Thermo Fisher). All PCR products were cleaned up using an NZYGelpure kit (NZYTech, Lisbon, Portugal) and directly sequenced by the Sanger method using forward and reverse PCR primers.

4.6. Cell Viability and Cell Proliferation Assay

Cell viability was determined by annexin V-Dy634 (apoptosis-detection kit ANXVVKDY, Immunostep, Spain). A total of 5×10^4 pool or Venus+ sorted cells, according to the experimental design, were seeded in 48-well plates after electroporation. At each time point, cells were harvested, washed twice in PBS and labelled with annexin V (AV) staining, which enabled living cells to be identified.

For cell proliferation assays, 1.5×10^4 cells from the electroporated cell pool or from the Venus+ cell fraction were seeded 24 h after electroporation. Cells were harvested at 48, 72 and 96 h, and the number of live cells was counted by flow cytometry. These experiments were performed using FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the data were analysed using FlowJo software (vX.0.7. TreeStar, Woodburn, OR, USA).

4.7. Flow Cytometry and Cell Sorting

K562 cells were analysed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using FACSaria (BD Biosciences, CA, USA) 24 h after electroporation with the CRSPR/Cas9 reagents and the donor DNA. Cell sorting was used to select the gene-targeted cells by separation of the Venus+ cell population. Results were analyzed using FlowJo software.

4.8. qPCR.

Expression levels of BCR/ABL, BCR/Venus and Venus were measured by qPCR using the cDNA from gene-targeted cells and SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Expression levels were normalized relative to the GAPDH housekeeping gene. qPCR was performed and data were analysed using the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems) (Table 1).

4.9. Mouse Xenograft Tumorigenesis

Ten 4–5-week-old female NOD-scid IL2Rgammanull mice (Strain #005557) (Charles River, Barcelona, Spain) were used (five mice per group). Tumour xenografts were

induced by subcutaneous injection of cell suspensions containing 4×10^5 cells in 0.1 mL of RPMI medium and 0.1 mL of Matrigel® (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix) into the mouse flank. This study followed the Spanish and European Union guidelines for animal experimentation (RD 1201/05, RD 53/2013 and 86/609/CEE, respectively). The study received prior approval from the Bioethics Committee of our institution.

Before injection, 4×10^5 Venus+ cells were sorted by FACSaria (BD systems) from Cas9 + donor or CRISPR/Cas9 + donor electroporated cells. The same number of live cells were sorted in parental K562 cells and used as a control. Cells were counted using a Neubauer chamber (VWR) and cell viability monitored by trypan blue staining (Sigma).

In the first group of mice, K562 parental cells were injected into the left flank and Cas9 + donor sorted cells into the right flank; in the second group, K562 parental cells were injected into the left flank and CRISPR/Cas9 + donor sorted cells into the right flank. Tumours were measured on days 9, 12, 15, 19, 22 and 23, and their volume calculated as described elsewhere [49] by the formula $a^2b\pi/6$ (where a and b are, respectively, the smallest and the largest diameters). Mice were sacrificed by anaesthesia overdose 23 days after cell injection, whereupon the tumours were collected and weighed.

4.10. Immunohistochemical Studies

Tumour tissues were fixed with 10% formaldehyde in PBS overnight at RT and paraffin-embedded. Tissue sections of 2 μ m were deparaffinized, rehydrated, blocked with 3% hydrogen peroxide (Merck), subjected to heat-induced antigen retrieval, and incubated with a 1:50 dilution of rabbit anti-Ki-67 (Roche) and an Omnimap Rabbit secondary antibody (Roche). Immunostained preparations were revealed with DAB and counterstained with haematoxylin.

4.11. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 Software (GraphPad Software). Group differences between annexin V labelling levels were assessed with Mann-Whitney U tests. Differences in *BCR/ABL* and *BCR/Venus* expression levels among different groups were estimated by Student's t-tests or two-way ANOVAs with Tukey multiple post hoc comparisons. Statistical significance of different levels was concluded for values of $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23126386/s1.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.-M.; data curation, E.V., J.L.O. and I.G.-T.; formal analysis, E.V., S.B. and I.G.-T.; funding acquisition, J.M.H.-R., M.S.-M. and I.G.-T.; investigation, E.V., M.S.-M. and I.G.-T.; methodology, E.V., J.L.O., D.J.S., S.B., L.M.-S. and I.G.-T.; project administration, J.M.H.-R., M.S.-M. and I.G.-T.; resources, M.S.-M. and I.G.-T.; software, E.V. and I.G.-T.; supervision, M.S.-M. and I.G.-T.; validation, E.V., D.J.S. and I.G.-T.; visualization, S.B. and L.M.-S.; writing—original draft, E.V. and I.G.-T.; writing—review & editing, E.V., M.S.-M. and I.G.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Support Platform of the University of Salamanca (NUCLEUS), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), PI18/01500, PI21/00983, PI17/01895 and PI22/00694 co-funded by the European Union, Novartis Farmaceutica S.A., Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso FS/29-2020 (USAL), “Consejería de Educación, Junta de Castilla y León” SA118P20 “Proyectos de Investigación del SACYL”, Spain and Fundación Mutua Madrileña FMM21/002 (AP176752021), by grants (RD12/0036/0069) from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC CB16/12/00233), and a predoctoral grant from University of Salamanca-Banco Santander, and “Jabones Solidarios” from the Bomberos Ayudantes Association.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, European Union guidelines for animal experimentation (RD 1201/05, RD 53/2013

and 86/609/CEE), and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of UNIVERSIDAD DE SALMANCA (protocol code 603 21/04/2021).” for studies involving animals.

Acknowledgments: We thank the Molecular Pathology, Cell Separation, Experimental Animal and Transgenic facilities of NUCLEUS, University of Salamanca, for carrying out the histological studies, FACS and animal assays. We thank the Bomberos Ayudan charity (<https://bomberosayudan.org> (accessed on 4 June 2022)) for supporting our CML research (Jabones solidarios para Daniel).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Maru, Y. Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *Int. J. Hematol.* **2001**, *73*, 308–322. <https://doi.org/10.1007/BF02981955>.
2. Quintás-Cardama, A.; Cortes, J. Molecular Biology of Bcr-Abl1-Positive Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2009**, *113*, 1619–1630. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-03-144790>.
3. Zhang, Y.; Rowley, J.D. Chronic Myeloid Leukemia: Current Perspectives. *Clin. Lab. Med.* **2011**, *31*, 687–698. <https://doi.org/10.1016/J.CLL.2011.08.012>.
4. Ross, D.M.; Branford, S.; Seymour, J.F.; Schwarzer, A.P.; Arthur, C.; Yeung, D.T.; Dang, P.; Goyne, J.M.; Slader, C.; Filshie, R.J.; et al. Safety and Efficacy of Imatinib Cessation for CML Patients with Stable Undetectable Minimal Residual Disease: Results from the TWISTER Study. *Blood* **2013**, *122*, 515–522. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483750>.
5. Bhamidipati, P.K.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Cornelison, A.M.; Jabbour, E. Management of Imatinib-Resistant Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2013**, *4*, 103–117. <https://doi.org/10.1177/2040620712468289>.
6. Zhang, H.; McCarty, N. CRISPR-Cas9 Technology and Its Application in Haematological Disorders. *Br. J. Haematol.* **2016**, *175*, 208. <https://doi.org/10.1111/BJH.14297>.
7. Reddy, O.L.; Savani, B.N.; Stroncek, D.F.; Panch, S.R. Advances in Gene Therapy for Hematologic Disease and Considerations for Transfusion Medicine. *Semin. Hematol.* **2020**, *57*, 83–91. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2020.07.004>.
8. Herzog, R.W.; Hagstrom, J.N. Gene Therapy for Hereditary Hematological Disorders. *Am. J. Pharmacogenom.* **2001**, *1*, 137–144. <https://doi.org/10.2165/00129785-200101020-00006>.
9. Ferrari, S.; Vavassori, V.; Canarutto, D.; Jacob, A.; Castiello, M.C.; Javed, A.O.; Genovese, P. Gene Editing of Hematopoietic Stem Cells: Hopes and Hurdles Toward Clinical Translation. *Front. Genome Ed.* **2021**, *3*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.618378>.
10. Lugo, T.G.; Pendergast, A.M.; Muller, A.J.; Witte, O.N. Tyrosine Kinase Activity and Transformation Potency of Bcr-Abl Oncogene Products. *Science* **1990**, *247*, 1079–1082. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2408149>.
11. Zhang, H.; Li, S. Induction of Chronic Myeloid Leukemia in Mice. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1465*, 17–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4011-0_2.
12. Warfvinge, R.; Geironson, L.; Sommarin, M.N.E.; Lang, S.; Karlsson, C.; Roschupkina, T.; Stenke, L.; Stentoft, J.; Olsson-Stromberg, U.; Hjorth-Hansen, H.; et al. Single-Cell Molecular Analysis Defines Therapy Response and Immunophenotype of Stem Cell Subpopulations in CML. *Blood* **2017**, *129*, 2384–2394. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-07-728873>.
13. Daley, G.Q.; Van Etten, R.A.; Baltimore, D. Blast Crisis in a Murine Model of Chronic Myelogenous Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11335. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.24.11335>.
14. Huang, N.; Huang, Z.; Gao, M.; Luo, Z.; Zhou, F.; Liu, L.; Xiao, Q.; Wang, X.; Feng, W. Induction of Apoptosis in Imatinib Sensitive and Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells by Efficient Disruption of Bcr-Abl Oncogene with Zinc Finger Nucleases. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 62. <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0732-4>.
15. Chen, S.-H.; Hsieh, Y.-Y.; Tzeng, H.-E.; Lin, C.-Y.; Hsu, K.-W.; Chiang, Y.-S.; Lin, S.-M.; Su, M.-J.; Hsieh, W.-S.; Lee, C.-H. ABL Genomic Editing Sufficiently Abolishes Oncogenesis of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2020**, *12*, 1399. <https://doi.org/10.3390/cancers12061399>.
16. Martinez-Lage, M.; Torres-Ruiz, R.; Puig-Serra, P.; Moreno-Gaona, P.; Martin, M.C.; Moya, F.J.; Quintana-Bustamante, O.; Garcia-Silva, S.; Carcaboso, A.M.; Petazzi, P.; et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Targeting of Fusion Oncogenes for Selective Elimination of Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5060. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18875-x>.
17. García-Tuñón, I.; Hernández-Sánchez, M.; Ordoñez, J.L.; Alonso-Pérez, V.; Álamo-Quijada, M.; Benito, R.; Guerrero, C.; Hernández-Rivas, J.M.; Sánchez-Martín, M. The CRISPR/Cas9 System Efficiently Reverts the Tumorigenic Ability of BCR/ABL in Vitro and in a Xenograft Model of Chronic Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2017**, *8*, 26027–26040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15215>.
18. Vuelta, E.; García-Tuñón, I.; Hernández-Carabias, P.; Méndez, L.; Sánchez-Martín, M. Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy. *Biology* **2021**, *10*, 118. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10020118>.
19. Vuelta, E.; Ordoñez, J.L.; Alonso-Pérez, V.; Méndez, L.; Hernández-Carabias, P.; Saldaña, R.; Sevilla, J.; Sebastián, E.; Muntión, S.; Sánchez-Guijo, F.; et al. CRISPR-Cas9 Technology as a Tool to Target Gene Drivers in Cancer: Proof of Concept and New Opportunities to Treat Chronic Myeloid Leukemia. *CRISPR J.* **2021**, *4*, 519–535. <https://doi.org/10.1089/CRISPR.2021.0009>.

20. Kohn, D.B. Update on Gene Therapy for Immunodeficiencies. *Clin. Immunol.* **2010**, *135*, 247. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2009.12.003>.
21. Reber, S.; Mechttersheimer, J.; Nasif, S.; Benitez, J.A.; Colombo, M.; Domanski, M.; Jutzi, D.; Hedlund, E.; Ruepp, M.-D. CRISPR-Trap: A Clean Approach for the Generation of Gene Knockouts and Gene Replacements in Human Cells. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 75. <https://doi.org/10.1091/MBE17-05-0288>.
22. Staal, F.J.T.; Aiuti, A.; Cavazzana, M. Autologous Stem-Cell-Based Gene Therapy for Inherited Disorders: State of the Art and Perspectives. *Front. Pediatr.* **2019**, *7*, 443. <https://doi.org/10.3389/FPED.2019.00443>.
23. Walters, M.C. Update of Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Curr. Opin. Hematol.* **2015**, *22*, 227–233. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000136>.
24. Boelens, J.J.; Aldenhoven, M.; Purtill, D.; Ruggeri, A.; DeFor, T.; Wynn, R.; Wraith, E.; Cavazzana-Calvo, M.; Rovelli, A.; Fischer, A.; et al. Outcomes of Transplantation Using Various Hematopoietic Cell Sources in Children with Hurler Syndrome after Myeloablative Conditioning. *Blood* **2013**, *121*, 3981–3987. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-09-455238>.
25. Van Rhee, F.; Szydlo, R.M.; Hermans, J.; Devergie, A.; Frassoni, F.; Arcese, W.; De Witte, T.; Kolb, H.J.; Niederwiser, D.; Jacobsen, N.; et al. Long-Term Results after Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase: A Report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **1997**, *20*, 553–560. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1700933>.
26. Morgan, R.A.; Gray, D.; Lomova, A.; Kohn, D.B. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy –Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell* **2017**, *21*, 574. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.10.010>.
27. Aiuti, A.; Biasco, L.; Scaramuzza, S.; Ferrua, F.; Cicalese, M.P.; Baricordi, C.; Dionisio, F.; Calabria, A.; Giannelli, S.; Castiello, M.C.; et al. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science* **2013**, *341*, 1233151. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1233151>.
28. Biffi, A.; Montini, E.; Lorioli, L.; Cesani, M.; Fumagalli, F.; Plati, T.; Baldoli, C.; Martino, S.; Calabria, A.; Canale, S.; et al. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy. *Science* **2013**, *341*, 1233158. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1233158>.
29. De Ravin, S.S.; Wu, X.; Moir, S.; Anaya-O'Brien, S.; Kwatema, N.; Littell, P.; Theobald, N.; Choi, U.; Su, L.; Marquesen, M.; et al. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 335ra57. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAD8856>.
30. Cartier, N.; Aubourg, P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* **2010**, *20*, 857–862. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2010.00394.X>.
31. Diez, B.; Genovese, P.; Roman-Rodriguez, F.J.; Alvarez, L.; Schioli, G.; Ugalde, L.; Rodriguez-Perales, S.; Sevilla, J.; de Heredia, C.D.; Holmes, M.C.; et al. Therapeutic Gene Editing in CD34+ Hematopoietic Progenitors from Fanconi Anemia Patients. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1574. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201707540>.
32. Kabarowski, J.H.S.; Witte, O.N. Consequences of BCR-ABL Expression within the Hematopoietic Stem Cell in Chronic Myeloid Leukemia. *Stem Cells* **2000**, *18*, 399–408. <https://doi.org/10.1002/STEM.180399>.
33. Tanaka, T.S.; Davey, R.E.; Lan, Q.; Zandstra, P.W.; Stanford, W.L. Development of a Gene-Trap Vector with a Highly Sensitive Fluorescent Protein Reporter System for Expression Profiling. *Genesis* **2008**, *46*, 347–356. <https://doi.org/10.1002/DVG.20404>.
34. Ishikawa, K.; Kobayashi, Y.; Wakabayashi, Y.; Watanabe, S.; Semba, K. A Highly Sensitive Trap Vector System for Isolating Reporter Cells and Identification of Responsive Genes. *Biol. Methods Protoc.* **2018**, *3*, bpy003. <https://doi.org/10.1093/BIOMETHODS/BPY003>.
35. Lu, H.; Liu, J.; Feng, T.; Guo, Z.; Yin, Y.; Gao, F.; Cao, G.; Du, X.; Wu, S. A HIT-Trapping Strategy for Rapid Generation of Reversible and Conditional Alleles Using a Universal Donor. *Genome Res.* **2021**, *31*, 900–909. <https://doi.org/10.1101/GR.271312.120/-/DC1>.
36. Roth, T.L.; Puig-Saus, C.; Yu, R.; Shifrut, E.; Carnevale, J.; Li, P.J.; Hiatt, J.; Saco, J.; Krystofinski, P.; Li, H.; et al. Reprogramming Human T Cell Function and Specificity with Non-Viral Genome Targeting. *Nature* **2018**, *559*, 405. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0326-5>.
37. McGahon, A.J.; Brown, D.G.; Martin, S.J.; Amarante-Mendes, G.P.; Cotter, T.G.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Downregulation of Bcr-Abl in K562 Cells Restores Susceptibility to Apoptosis: Characterization of the Apoptotic Death. *Cell Death Differ.* **1997**, *4*, 95–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400213>.
38. Rangatía, J.; Bonnet, D. Transient or Long-Term Silencing of BCR-ABL Alone Induces Cell Cycle and Proliferation Arrest, Apoptosis and Differentiation. *Leukemia* **2006**, *20*, 68–76. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403999>.
39. Porteus, M.H.; Baltimore, D. Chimeric Nucleases Stimulate Gene Targeting in Human Cells. *Science* **2003**, *300*, 763. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078395>.
40. Colicelli, J. ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, re6. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.3139RE6>.
41. Melo, J.V.; Deininger, M.W.N. Biology of Chronic Myelogenous Leukemia—Signaling Pathways of Initiation and Transformation. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2004**, *18*, 545–568. <https://doi.org/10.1016/J.HOC.2004.03.008>.
42. Lin, H.; Monaco, G.; Sun, T.; Ling, X.; Stephens, C.; Xie, S.; Belmont, J.; Arlinghaus, R. Bcr-Abl-Mediated Suppression of Normal Hematopoiesis in Leukemia. *Oncogene* **2005**, *24*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208500>.
43. Sánchez-García, I.; Martín-Zanca, D. Regulation of Bcl-2 Gene Expression by BCR-ABL Is Mediated by Ras. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 225–228. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0779>.

44. Deutsch, E.; Dugray, A.; AbdulKarim, B.; Marangoni, E.; Maggiorella, L.; Vaganay, S.; M'Kacher, R.; Rasy, S.D.; Eschwege, F.; Vainchenker, W.; et al. BCR-ABL down-Regulates the DNA Repair Protein DNA-PKcs. *Blood* **2001**, *97*, 2084–2090. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V97.7.2084>.
45. Koptyra, M.; Cramer, K.; Slupianek, A.; Richardson, C.; Skorski, T. BCR/ABL Promotes Accumulation of Chromosomal Aberrations Induced by Oxidative and Genotoxic Stress. *Leukemia* **2008**, *22*, 1969–1972. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.78>.
46. Chaityachati, B.H.; Kaundal, R.; Zhao, J.; Wu, J.; Flavell, R.; Chi, T. LoxP-FRT Trap (LOFT): A Simple and Flexible System for Conventional and Reversible Gene Targeting. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 96. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-96>.
47. Groffen, J.; Stephenson, J.R.; Heisterkamp, N.; de Klein, A.; Bartram, C.R.; Grosveld, G. Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, Bcr, on Chromosome 22. *Cell* **1984**, *36*, 93–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90077-1).
48. Heisterkamp, N.; Stam, K.; Groffen, J.; De Klein, A.; Grosveld, G. Structural Organization of the Bcr Gene and Its Role in the Ph' Translocation. *Nature* **1985**, *315*, 758–761. <https://doi.org/10.1038/315758a0>.
49. Ordóñez, J.L.; Amaral, A.T.; Carcaboso, A.M.; Herrero-Martín, D.; Del Carmen García-Macías, M.; Sevillano, V.; Alonso, D.; Pascual-Pasto, G.; San-Segundo, L.; Vila-Ubach, M.; et al. The PARP Inhibitor Olaparib Enhances the Sensitivity of Ewing Sarcoma to Trabectedin. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18875. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4303>.