Análisis de líneas celulares eritroleucémicas con deleciones de genes implicados en el desarrollo de enfermedades hematológicas severas

Horacio Sosa Galeano¹, Vanessa Fernández-Calleja², Pablo Hernández², Jorge B. Schwartzman², Dora B. Krimer², María José Fernández Nestosa¹

RESUMEN

Introducción: La línea celular murina MEL (Murine Erythroleukemia cell line) deriva de progenitores eritroides transformados con el complejo vírico Friend, formado por el “spleen focus forming virus” (SFFV) y el “Friend murine leukemia virus” (F-MuLV). Un atributo extremadamente útil de las células MEL radica en su capacidad para retomar el programa de diferenciación mediante la utilización de inductores químicos tales como el hexameten-bisacetamida (HMBA). En un intento por identificar posibles dianas del HMBA se establecieron líneas celulares eritroleucémicas, derivadas de MEL, que son resistentes a la acción del agente inductor (MEL-R). En un estudio reciente, se han identificado los genes Was y Btk con mayor expresión diferencial en MEL respecto a MEL-R. Estos genes comparten dos características comunes importantes: están implicados en la organización del citoesqueleto de actina y se activan específicamente en el linaje hematopoyético. Las mutaciones producidas en Was y Btk provocan el desarrollo de enfermedades hematológicas severas. La pérdida de función de Was desencadena el desarrollo del síndrome de Wiskott-Aldrich, asociado a defectos en una gran cantidad de procesos celulares que inducen inmunodeficiencias, trombocitopenia y alteraciones autoinmunes. Asimismo, la inhibición de Btk afecta a las vías de señalización TLR2 y TLR4 de células mieloides, la función de la interleuquina 10 y STAT3 de células dendríticas.

Objetivo: Obtener y analizar líneas celulares derivadas de MEL con deleciones bialélicas de los genes que codifican para las proteínas Wasp y Btk.

Material y Método: La eliminación genómica de Was y Btk en células MEL

1. Universidad Nacional de Asunción, Facultad Politécnica, Paraguay.

2. Centro de Investigaciones Biológicas – CSIC, Departamento de Biología Celular y Molecular, Madrid, España.

E-mail: biososa20@gmail.com

DOI: 10.26885/rcei.foro.2019.19

El presente trabajo forma parte del proyecto RGA N°18-095 RG-BIO-LA_I-FR3240303635 financiado por el TWAS.

se realizó mediante la tecnología CRISPR/Cas. Se co-transfectaron las parejas vectores, derivadas del plásmido pX330 vector (Addgene plasmid ID 42230), con los sgRNAs correspondientes a cada gen, en células MEL-DS19. Se aisló DNA genómico de los clones y se seleccionaron las deleciones bialélicas mediante PCR usando cebadores para la No Delección (ND), que amplifican dentro la secuencia que se quiere eliminar, y cebadores para la Delección (D), que amplifican en los extremos 5' y 3' de los sitios de hibridación de los sgRNAs. A continuación, se preparó el protocolo para el análisis de la expresión diferencial en células MEL Was^{-/-} y MEL Btk^{-/-} con respecto a la línea parental MEL.

Resultados: Las amplificaciones mediante PCR con cebadores ND y D, nos permitieron seleccionar clones con deleciones bialélicas. Se aislaron muestras de RNA y se diseñó un protocolo para analizar los transcriptomas de MEL Was^{-/-} y MEL Btk^{-/-} mediante RNA-seq.

Conclusiones: Se han generado líneas celulares eritroleucémicas con deleciones bialélicas de los genes que codifican para las proteínas Wasp y Btk. y se diseñó el protocolo para analizar el transcriptoma de ambas líneas celulares.

Palabras clave: was, btk, eritropoyesis.

REFERENCIAS

- Fernández-Calleja, V., Hernández P., Schwartzman, J. B., García de Iacobam M., Krimer, D. B. (2017). Differential gene expression analysis by RNA-seq reveals the importance of actin cytoskeletal proteins in erythroleukemia cells. *PeerJ*, 5, e3432.
- Fernández-Calleja, V., Fernández-Nestosa, M. J., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Krimer, D. B. (2019). CRISPR/Cas9-mediated deletion of the Wiskott-Aldrich syndrome locus causes actin cytoskeleton disorganization in murine erythroleukemia cells. *PeerJ*, 7, e6284
- Fernández-Nestosa, M. J., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Krimer, D. B. (2008). PU.1 is dispensable to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Leuk Res*, 32, 121-130.
- Fernández-Nestosa, M. J., Monturus, E., Sánchez, Z., Torres, F. S., Fernández A. F., Fraga, M. F., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Krimer, D. B. (2013). DNA methylation-mediated silencing of PU.1 in leukemia cells resistant to cell differentiation. *Springerplus* 2, 392.