

Título: AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA ANEMIA DE BLACKFAN DIAMOND Y DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS.

Nombre: Giménez Martínez, Yari

Universidad: Universidad Complutense de Madrid

Departamento: Comisión Académica del Programa

Fecha de lectura: 14/07/2021

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Complutense de Madrid

Dirección:

> **Director:** SUSANA NAVARRO ORDOÑEZ

Tribunal:

> **presidente:** JOSÉ MANUEL BAUTISTA SANTA CRUZ

> **secretario:** ÓSCAR ESCRIBANO ILLANES

> **vocal:** ROSARIO PERONA ABELLON

> **vocal:** Jordi Barquinero Mañez

> **vocal:** FRANCISCO MARTÍN MOLINA

Descriptor:

> CULTIVO CELULAR

> INGENIERIA GENETICA

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

> <https://eprints.ucm.es/id/eprint/69249/>

Localización: E-PRINTS COMPLUTENSE

Resumen: La anemia de Blackfan-Diamond (DBA) es un síndrome hereditario de fallo de médula ósea (SFMO) que se caracteriza principalmente por aplasia de glóbulos rojos, anomalías congénitas y un elevado riesgo de desarrollar determinados tipos de cáncer, y cuya incidencia es de 5-10 casos por millón. Se han identificado mutaciones en 20 genes relacionados con la formación de proteínas ribosomales (PR), aunque las mutaciones en el gen RPS19 representan el 25% de los pacientes con DBA. El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) es hasta ahora el único tratamiento curativo del problema hematológico de los pacientes con DBA. Teniendo en cuenta las limitaciones de este tipo de tratamientos, proponemos que la TG podría constituir un enfoque terapéutico para pacientes con DBA con mutaciones en el gen RPS19. Nuestros estudios realizados en pacientes con DBA, han mostrado que los números de células CD34+ eran comparables a los que poseían los donantes sanos y unas 10 veces más altos respecto a los valores obtenidos en pacientes con anemia de Fanconi (AF), otro de los SFMO más estudiados. Asimismo, aunque se observó que el contenido de unidades formadoras de colonias (CFU) fue significativamente inferior en pacientes con

DBA frente a los donantes sanos, estos valores fueron significativamente superiores cuando se compararon con valores de pacientes con AF. Además, mientras que las CMH no corregidas de pacientes con AF tenían una muy limitada capacidad de reconstitución en ratones inmunodeficientes, en este trabajo no observamos alteraciones significativas en el potencial de repoblación de células CD34+ de pacientes con DBA frente a los donantes sanos.

Para el desarrollo de un protocolo de TG, decidimos desarrollar dos vectores lentivirales con diferentes promotores que dirigían la expresión de una versión de codones optimizados del gen RPS19. Los promotores utilizados fueron el de la fosfoglicerato quinasa (PGK) y el factor de elongación 1 alpha en su versión corta (EF1 alpha short).

Ambos VL fueron capaces de expresar la versión optimizada de codones para el gen RPS19 y corregir la alteración de la biogénesis ribosomal de la línea celular K562, cuya expresión del gen RPS19 había sido silenciado mediante ARN de interferencia. Para analizar la eficacia terapéutica de estos vectores lentivirales, células CD34+ de la médula ósea de pacientes deficientes en el gen RPS19 se transdujeron con estos vectores. El número de colonias granulomacrofágicas (CFU-GM) y eritroides (BFU-Es) aumentó 1,5 y 3,9 veces respectivamente, en comparación con el grupo de control transducido con un vector que portaba el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP). Además, los vectores terapéuticos revirtieron el defecto de la diferenciación eritroide característico de los progenitores eritroides de pacientes con DBA, aumentando 2,5 veces la producción de células eritroides maduras. Asimismo, la transducción de estos progenitores preservó la capacidad de repoblación de estas células en ratones inmunodeficientes NSG, sugiriendo que esta capacidad no está severamente afectada.

Finalmente, se realizaron estudios de toxicidad para analizar si la sobreexpresión de la versión optimizada del gen RPS19 en células de donantes sanos resultaba tóxica. Los estudios realizados con el vector terapéutico PGK.CoRPS19.Wpre no mostraron ningún signo de toxicidad en comparación al vector EGFP no terapéutico. Finalmente, se observó un perfil de integración policlonal del VL PGK.CoRPS19.Wpre en el genoma de las células transducidas, sin que se observara una expansión de clones con interacciones próximas a genes involucrados en procesos de oncogénesis (CCND2, LMO2, MDS1 / EVI1 (MECOM), MN1).

En conclusión nuestros estudios preclínicos sugieren que la terapia génica mediada por vectores lentivirales como los desarrollados en esta Tesis Doctoral, ha de constituir una aproximación eficaz y segura para el tratamiento de pacientes con DBA que presentan mutaciones en el gen RPS19.