

# Generación de un alelo knockout del gen Has1 mediante CRISPR/Cas9 en un modelo de ratón de adenocarcinoma pancreático ductal.

Laura Martín Díaz<sup>1, a</sup>, Carmen Guerra<sup>2</sup>, Mariano Barbacid<sup>2</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 28029 Madrid, España.

a. laura.martind@edu.uah.es

**Palabras clave:** estroma tumoral; CAFs; CRISPR/Cas9; Has1; PDAC

## Resumen

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) es un tipo de cáncer que destaca por su letalidad y frente al cual no existe aún una terapia efectiva. La detección del PDAC suele ser en etapas tardías, donde su agresividad es máxima y los quimioterapéuticos no funcionan. Por lo que se hace patente la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas. El PDAC destaca por tener un estroma desmoplásico denso, compuesto en su mayoría de matriz extracelular y células, que van a provocar la fibrosis y la pobre vascularización característica de este tipo de tumor. El estroma no sólo representa una barrera física sino que a su vez interacciona con las células tumorales influyendo en su comportamiento. Los fibroblastos (CAFs) son las células estromales mayoritarias, responsables de producir la extensa matriz extracelular. Nuestro laboratorio ha comparado el patrón de expresión de los CAFs y los fibroblastos pancreáticos normales y ha observado varios genes sobreexpresados en los CAFs. Uno de ellos es la sintasa de ácido hialurónico 1 (Has1). Varios estudios han revelado que el ácido hialurónico tiene un papel importante en el progreso tumoral y en la resistencia a los tratamientos. El objetivo del presente trabajo es la generación de una línea de ratón de PDAC con un alelo knockout para el gen Has1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 por microinyección en embriones de un modelo de ratón de PDAC. Las modificaciones en el alelo de Has1 de los 9 ratones generados se identificaron mediante el ensayo T7 endonucleasa y secuenciación de Sanger. Finalmente de esos 9 ratones se ha observado que 5 de ellos presentan uno o dos eventos de mutación, concretamente deleciones; y que 2 de ellos transmiten germinalmente las mutaciones. La línea de ratón seleccionada se expandirá y cruzará para conseguir la mutación en homocigosis y poder así estudiar el papel de Has1 en el progreso tumoral de PDAC.

**Cita:** Martín Díaz, Laura; Guerra, Carmen; Barbacid, Mariano (2016) Generación de un alelo knockout del gen Has1 mediante CRISPR/Cas9 en un modelo de ratón de adenocarcinoma pancreático ductal. *Dianas* 5 (2): e20160904. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160904](http://www3.uah.es/dianas?e20160904) <http://www3.uah.es/dianas?e20160904>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Martín-Díaz L, Guerra C, Barbacid M. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) supone un 90% de los casos de cáncer de páncreas. Aunque su incidencia es baja, es la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, con una tasa de supervivencia a 5 años de tan sólo un 5% [1]. En los últimos 10 años los casos de cáncer de páncreas y sus tasas de mortalidad han aumentado en promedio un 0,8% y un 0,4% cada año, respectivamente [2], por lo que se prevé que en 2020 sea la segunda causa de muerte por cáncer, sólo por detrás del cáncer de pulmón. La elevada letalidad se debe principalmente a su detección en estadios avanzados y a la resistencia a las terapias actuales. Los ensayos clínicos en cáncer de páncreas durante los últimos 20 años han dado resultados decepcionantes con poco impacto en la supervivencia de los pacientes. El uso de Gemcitabina ± Nab-paclitaxel sigue siendo la terapia estándar. La supervivencia es ligeramente mayor con FOLFIRINOX, pero a costa de severos efectos secundarios. Aunque se desconocen las causas que dan lugar a este tipo de cáncer, se han descrito diferentes factores de riesgo como la edad, el estilo de vida (principalmente el tabaquismo), la predisposición genética y enfermedades como la pancreatitis y diabetes [3].

El páncreas exocrino está constituido por células epiteliales acinares y ductales. Las células acinares producen enzimas digestivas y el jugo pancreático, que liberan a un sistema de conductos formados por las células ductales. Se conoce que el PDAC evoluciona desde lesiones precursoras no invasivas hasta carcinomas invasivos. Entre estas lesiones preneoplásicas se diferencian histológicamente tres tipos: neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN), neoplasia pancreática intraductal mucinosa (IPMN) y neoplasia cística mucinosa (MCN) [4]. A nivel anatomopatológico la lesión mejor caracterizada es el PanIN, que son lesiones microscópicas de tipo ductal que se clasifican de menor a mayor grado de

displasia en: PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 y PanIN-3 (Fig.1A). El origen de las lesiones PanIN parece estar en las células acinares [5]. Las células acinares se transforman en estructuras de tipo ductal (PanIN) al expresar el oncogén *K-Ras*, pasando por una estructura intermedia conocida como metaplasia acino-ductal (ADM), que se considera el precursor directo de las lesiones de PanIN.

Mediante el análisis genético de diferentes tumores PDAC de pacientes se ha determinado que hay hasta 12 vías de señalización y procesos alterados [6]. Entre estas vías se encuentran *K-Ras* y otras GTPasas monoméricas, *TGF-β*, *JNK*, *Wnt/Notch*, *Hedgehog* e integrinas. Entre los procesos alterados se pueden encontrar: ciclo celular, apoptosis, reparación del DNA, invasión y adhesión. Se ha descrito que los diferentes estadios de lesiones PanIN presentan muchas de las mutaciones identificadas en el PDAC, encontrándose una acumulación progresiva de alteraciones moleculares según se avanza en la secuencia de progresión tumoral de las lesiones PanIN. Así, la activación del oncogén *K-Ras*, al que se considera el evento iniciador, se detecta ya en etapas tempranas (PanIN-1). Otra alteración temprana es el acortamiento de los telómeros, lo que contribuye a la acumulación de alteraciones cromosómicas. En etapas intermedias (PanIN-2) tienen lugar mutaciones inactivantes en *INK4A*, mientras que en etapas tardías (PanIN-3) ocurre en otros genes supresores de tumores como *TP53*, *SMAD4* y *BRC42* [7](Fig.1B).

El desarrollo de modelos de ratón modificados genéticamente (GEMs) ha sido fundamental para comprender la biología del desarrollo tumoral y permitir el estudio de nuevas terapias [8,9]. Estos modelos experimentales expresan diferentes mutaciones consiguiendo reproducir el desarrollo de las lesiones histológicas características de los tumores humanos. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un GEM denominado “modelo terapéutico” [Elas-tTA; TetO-Flp; *K-Ras*<sup>FSG12V</sup>; *Tp53*<sup>flr/flr</sup>; UbqC-CreERT2; *EGFR*<sup>lox/lox</sup>, *C-Raf*<sup>lox/lox</sup>], que emplea dos sistemas de recombinación diferentes, lo que permite separar temporal y físicamente el desarrollo tumoral en páncreas de la validación genética de dianas terapéuticas. La primera recombinasa (Flp) induce la expresión del oncogén *K-Ras* e inactiva el gen supresor de tumores *Tp53* permitiendo la iniciación tumoral. La segunda recombinasa (Cre) se expresa una vez desarrollado el tumor y deleciona de manera sistémica dianas terapéuticas (por ejemplo, *EGFR* y *C-Raf*), pudiendo estudiar así su efecto sobre el tumor, a la vez que sobre el organismo para analizar los efectos secundarios.

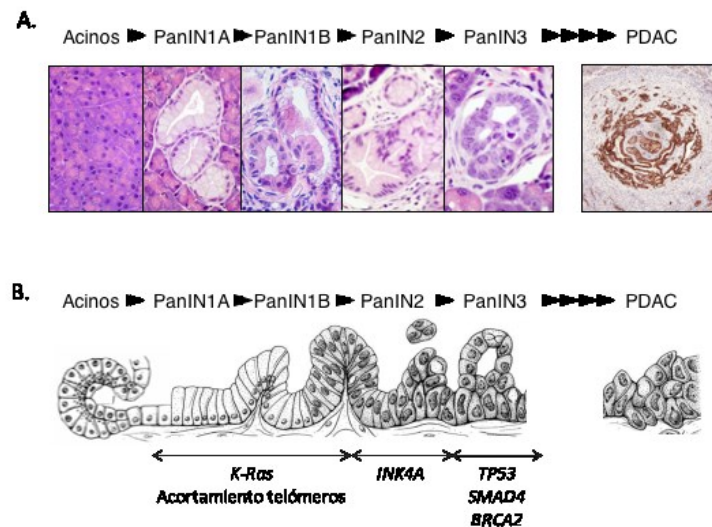


Figura 1.- Progresión tumoral observado en el desarrollo de PDAC. (A) Cambios histológicos desde un páncreas sano a lesiones precursoras hasta PDAC en un modelo de ratón *in vivo*. (B) Diagrama de los diferentes eventos de mutación secuenciales que preceden el desarrollo de PDAC según las alteraciones descritas a partir de muestras de pacientes [10].

Los tumores PDAC se caracterizan por tener un estroma desmoplásico denso, que representa hasta un 90% de la masa tumoral. Este estroma es un sistema complejo compuesto por matriz extracelular (ECM), células del sistema inmune, células endoteliales y fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Diversos estudios han indicado que el estroma representa una barrera física a la entrada de los quimioterapéuticos, aunque también parece ser un compartimento dinámico que interacciona con las células tumorales e influye en la formación, progresión e invasión tumoral [11]. Por ello, cabe pensar que el estroma pueda representar una nueva aproximación para desarrollar otras estrategias terapéuticas y por ello, diferentes grupos de investigación están centrando sus esfuerzos en entender el papel del estroma. Olive *et al.* [12] han descrito que la inhibición de la vía Hedgehog en el estroma aumenta la distribución y eficacia del quimioterapéutico Gemcitabina. Sin embargo, dos grupos diferentes [13,14] han reportado que la ablación de los CAFs acelera la progresión tumoral y la agresividad del mismo. Esto sugiere que hay que analizar mejor la contribución del estroma y sus componentes a la iniciación y a la progresión del PDAC para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Los CAFs son el elemento celular más abundante del estroma y tienen un papel importante ya que producen gran cantidad de ECM, responsable de la fibrosis y de la pobre vascularización de estos tumores [15]. Entre los principales componentes de la ECM cabe destacar el ácido hialurónico (HA), que es un polisacárido compuesto por la repetición de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. El HA participa en una gran variedad de procesos celulares, como son la adhesión, migración y proliferación, mediante receptores específicos como CD44 y el receptor para la motilidad mediada por HA (RHAMM) [16]. El HA es sintetizado por sintetasas (HAS, incluyendo HAS1, HAS2, HAS3) y degradado por hialuronidasas (HYAL1 y HYAL2). En condiciones fisiológicas la cantidad de HA está regulada por un balance entre su síntesis y degradación. Sin embargo, en condiciones tumorales este balance se pierde y el HA se acumula en el estroma. Se cree que este exceso de HA podría favorecer la progresión tumoral potenciando la proliferación celular, migración, invasión, angiogénesis y resistencia a los quimioterapéuticos [17]. El PDAC se caracteriza por un estroma rico en ECM, por lo que es muy probable que el HA sea un factor que favorezca el desarrollo tumoral. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de *Has* en un modelo experimental acelera el crecimiento tumoral [18]. Además, se ha comprobado que el aumento de HA se correlaciona con un incremento en la expresión de sus receptores [19]. Algunos estudios en modelos animales han evidenciado que el aumento de la degradación del HA mediante hialuronidasas aumenta el efecto de la Gemcitabina [20,21]. De hecho, debido a los buenos resultados ya hay en marcha ensayos clínicos en fase I/II que emplean una hialuronidasa modificada en pacientes de PDAC (clinicaltrials.gov, NCT01959139). El HA parece ser una diana prometedoras, por lo que muchos investigadores han propuesto diferentes estrategias dirigidas contra el HA, como son la inhibición de su síntesis, el bloqueo de su señalización o la eliminación del HA en el estroma.

En nuestro laboratorio se ha analizado el perfil de expresión de los CAFs frente a fibroblastos pancreáticos normales mediante secuenciación del RNA. Se han encontrado 15 genes sobreexpresados en los CAFs respecto a los fibroblastos normales, que se relacionan con procesos celulares como remodelación de la ECM, crecimiento tumoral, invasión, metástasis y procesos inmunológicos. Estos genes al presentar mayor expresión cabe pensar que puedan ser probables dianas terapéuticas, siguiendo esta línea de investigación nuestro grupo está interesado en la validación funcional de estos genes en el PDAC. Uno de los genes que hemos comprobado que está sobreexpresado en los CAFs es *Has1*. Así, con el fin de conocer su posible papel terapéutico e implicación en el desarrollo tumoral, nuestro laboratorio se ha propuesto generar alelos *knockout* germinales de este gen mediante el sistema CRISPR/Cas9 en la línea de ratón “modelo terapéutico”. Para ello se han realizado microinyecciones en embriones del “modelo terapéutico” de un sgRNA contra el gen *Has1*. El objetivo del presente trabajo es detectar los ratones parentales que nazcan con alteraciones en el locus de *Has1* tras la microinyección y posteriormente caracterizar dichas alteraciones para identificar las que resultan en la inactivación del alelo (*knockout*) y se transmitan por línea germinal a la descendencia. Posteriormente, los ratones seleccionados se cruzarán con el objetivo de expandir la línea y obtener la alteración en homocigosis para poder estudiar su función en el desarrollo tumoral y su posible valor como diana terapéutica.

## Materiales y métodos

### 1. Línea de ratón

Se empleó la línea de ratón “modelo terapéutico” [Elas-tTA; TetO-Flp; K-Ras<sup>FSFG12V</sup>; Tp53<sup>frt/frt</sup>; UbqC-CreERT2; EGFR<sup>lox/lox</sup>; C-Raf<sup>lox/lox</sup>] desarrollada en nuestro laboratorio para la obtención de los embriones. Esta línea de ratón cuenta con 2 recombinasas inducibles (Cre, Flp), lo que permite separar temporalmente el desarrollo tumoral de la escisión de las dianas terapéuticas de interés.

En este modelo, el oncogén *K-Ras*<sup>FSFG12V</sup> se encuentra precedido de un *cassette* de parada transcripcional flanqueado por sitios *frt* (*frt*-STOP-*frt*; FSF), por lo que el alelo permanece silenciado hasta que se expresa la recombinasa Flp. El gen supresor de tumores *Tp53* también se encuentra flanqueado por sitios *frt*, por lo que se produce su pérdida bialélica en presencia de Flp. Esta recombinasa se expresa bajo una estrategia Tet-off en las células acinares gracias al promotor del gen de la Elastasa (Elas-tTA; TetO-Flp). Así, en ausencia de doxiciclina, la recombinasa Flp se expresa en las células acinares desde el estadio embrionario E16.5, y con ello se activa el oncogén *K-Ras* e inactiva *Tp53*. Sin embargo, la adición de doxiciclina al agua de bebida de los ratones permite bloquear la expresión de Flp y por ende, la subsecuente escisión de sus dianas, impidiendo la expresión del oncogén *K-Ras* y la inactivación de *Tp53*.

El desarrollo de los tumores PDAC se puede monitorizar mediante ecografía abdominal y en el momento en el que los tumores pancreáticos presentan unas medidas determinadas se procede a la escisión de la diana terapéutica con la segunda recombinasa, la recombinasa Cre modificada (CreERT2) cuya actividad es controlada mediante tratamiento con tamoxifeno. Esta recombinasa Cre está fusionada al dominio de unión de hormonas esteroideas del receptor de estrógenos (ER) previamente modificado (ERT2) de manera que se impide su unión a los esteroides endógenos. La unión de determinados esteroides sintéticos, como el 4OH-tamoxifeno, induce un cambio conformacional en el dominio ERT2 haciendo activa la recombinasa Cre, que se trasladará al núcleo y escindirán los alelos floxeados de las dianas

terapéuticas (EGFR y C-Raf). La recombinasa CreERT2 se expresa de forma ubicua e inducible bajo el promotor humano de la Ubiquitina C, consiguiéndose la delección sistémica de los alelos floxeados tras el tratamiento con tamoxifeno.

## 2. Diseño de sgRNAs y microinyección en embriones

Para el diseño del sgRNA de *Has1* se empleó un programa informático (CRISPRscan, Yale University) que mediante un algoritmo genera diferentes posibles sgRNAs. Se probaron *in vitro* diferentes sgRNA y se escogió el que mejor resultados mostró en función del nivel de proteína detectado por *Western blot*. Este sgRNA seleccionado está dirigido contra el primer exón del gen *Has1* (Tabla 1). Para las microinyecciones la secuencia guía del sgRNA se produce como un oligo de DNA precedido por el promotor T7 y mediante PCR se incorpora la parte estructural del sgRNA. En esta reacción se emplea una DNA polimerasa de alta fidelidad (2.5U, Sigma-Aldrich), 1X de su correspondiente tampón, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de desoxinucleótidos trifosfato, 0.2 μM de cada cebador, 20 ng de DNA molde (PX330, Addgene), 100 ng del oligo de sgRNA y agua estéril hasta un volumen final de 50 μl. El programa seguido consistió en: 95°C 2 min, 24 ciclos x (95°C 30 s, 50°C 30 s, 68°C 20 s), 68°C 7 min y finalmente enfriamiento a 4°C. Para la producción del sgRNA se realizó una transcripción *in vitro* con la T7 RNA polimerasa del producto de PCR obtenido empleando el kit MEGAscript™ (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. El sgRNA producido (30 ng/μl) junto con el mRNA de Cas9 (50 ng/μl) se microinyectó en embriones en estado de cigoto (Unidad de Ratones Transgénicos, CNIO). Los embriones se implantaron después en hembras pseudopreñadas.

### Secuencia 5'-3' sgRNA

GATGATCGTGAGTGCTCGCC TGG

Tabla 1.- Secuencia del sgRNA diseñado por CRISPRscan para el gen *Has1* empleado en las microinyecciones. La secuencia TGG representa el elemento PAM requerido por la nucleasa Cas9.

Para determinar el genotipo de los ratones nacidos tras la microinyección de sgRNA/Cas9 en embriones se les realiza una biopsia de cola a las 3-4 semanas de vida y se aísla el DNA genómico (DNAg) (apartado 3). Posteriormente con este DNA se realiza una PCR de la región de alelo modificado (apartado 4) y se realiza un ensayo de T7 endonucleasa (apartado 5) para detectar los ratones que portan modificaciones del gen producidas por el sistema CRISPR/Cas9. De los ratones que resulten ser positivos para el ensayo T7, se procede a clonar el producto de la PCR (apartado 6) para realizar su análisis mediante secuenciación.

## 3. Aislamiento de DNA genómico de biopsias de cola

Para realizar el aislamiento del DNAg se añade a las porciones de cola 500 μl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS) y proteinasa K (400 mg/ml), y se incuban a 55°C durante la noche. Al día siguiente se añaden 300 μl de sal saturada para neutralizar, se mezcla y se deja en hielo durante 10 min. Luego se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, se toma el sobrenadante y se añade isopropanol en proporción 1:1. Tras mezclarlo se vuelve a centrifugar durante 20 min. El sobrenadante se retira y se lava el sedimento con etanol al 70%, para finalmente resuspender el DNA en agua estéril.

## 4. PCR

El exón 1, contra el que se dirige el sgRNA, se amplifica por PCR a partir del DNAg de la cola mediante el uso de cebadores específicos (Tabla S1). En la reacción de PCR se empleó la DNA polimerasa BIOTaq (2.5U, Ecogen), 1X de su correspondiente tampón, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 0.2 μM de cada cebador, 2 μl de DNAg y agua estéril hasta un volumen final de 50 μl. El programa seguido consistió en: 94°C 4 min, 30 ciclos x (94°C 30 s, 58°C 30s, 72°C 30 s), 72°C 7 min y finalmente enfriamiento a 4°C. La PCR se confirmó mediante la carga de 5 μl de la reacción en geles de 1.5% agarosa-TAE con bromuro de etidio. Las muestras se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification según las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de ADN por su absorción a 260 nm empleando un espectrofotómetro Nanodrop.

## 5. Ensayo T7 endonucleasa

Se preparó un tubo con 200 ng del producto de PCR purificado y 1X del tampón correspondiente en un volumen final de 20 μl. La mezcla se somete a un ciclo de temperatura que permite su desnaturalización y posterior renaturalización, que consiste en un ciclo a 94°C durante 10 min, seguido de una disminución progresiva de 10°C por minuto hasta enfriamiento a 4°C. Tras este paso se forman homoduplex y heteroduplex del DNA modificado y sin modificar. Después se añadió la enzima T7 (10U, NEB), que

reconoce los errores de apareamiento, y se incubó a 37°C durante 1 h. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 10%, que posteriormente se tiñe con bromuro de etidio.

## 6. Clonación y secuenciación

Se clonó el producto de PCR (20 ng) empleando el vector pGEM®-T Easy (Promega), que emplea la  $\beta$ -galactosidasa como marcador de selección. Se realizó una mezcla de DNA y vector (1:3), junto con T4 ligasa (1 Weiss U) y 1X de tampón en un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción de ligación se llevó a cabo a 4°C durante la noche. Se utilizaron bacterias competentes de la cepa DH10 $\beta$  de *Escherichia coli* preparadas en 15% glicerol y 50 mM CaCl<sub>2</sub> para la transformación. Este proceso consistió en añadir todo el producto de reacción de ligación (10  $\mu$ l) a las bacterias (100  $\mu$ l), mantenerlo en hielo 2 min y posteriormente realizar un choque térmico poniendo la mezcla 90 seg a 42°C, pasando inmediatamente a hielo. Se añade medio S.O.C (300  $\mu$ l) especial para recuperar a las células de la transformación y se incubó 1 h a 37°C con agitación fuerte (250 rpm) para su posterior cultivo en placas LB/Amp/IPTG/X-Gal. Al día siguiente, se picaron y expandieron colonias individuales transformadas en un cultivo de 2.5 ml de medio LB suplementado con Ampicilina (200  $\mu$ g/ml) a 37°C y en agitación, para posteriormente realizar el aislamiento del DNA plasmídico mediante lisis alcalina. Los productos se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger empleando un cebador específico del vector: promotor T7 (Unidad de genómica, CNIO). Estas secuencias se comparan con la secuencia de referencia del gen para encontrar las mutaciones *indels* que produzcan alelos *knockout*.

## Resultados

Se diseñaron varios sgRNA contra el gen *Has1*, estos se probaron en cultivos celulares y el que mejor resultados demostró se escogió. El sgRNA escogido se preparó en el laboratorio a partir de un oligo que contenía la secuencia de reconocimiento de *Has1* e introduciendo mediante PCR la secuencia estructural del sgRNA. Posteriormente se transcribió *in vitro* gracias al promotor T7 que incluye.

Para la obtención de embriones se hormonaron con PMSG y HCG 10 hembras de la línea “modelo terapéutico”, posteriormente se cruzaron con los machos de la misma línea. Al día siguiente se comprobó en las hembras la presencia de tapón vaginal, las que lo presentaban se sacrificaron y se extrajeron los oocitos de los oviductos. Se microinyectaron 100 embriones en estadio 1 célula con mRNA Cas9 (50 ng/ $\mu$ l) y sgRNA (30 ng/ $\mu$ l) en el citoplasma. Al día siguiente había 84 embriones en estado 2 células, estos se implantaron a 5 hembras pseudopreñadas. Este proceso se realizó por la Unidad de Ratones Transgénicos, CNIO.

Finalmente nacieron 9 crías “*founders* o F0”. A las 3-4 semanas de vida de los ratones (línea MTL), se les cortó una porción de cola para aislar el DNAG y analizarlo buscando mutaciones en el alelo de *Has1*. Para ello, se amplificó la parte del gen a la que está dirigida el sgRNA a partir del DNAG mediante PCR empleando unos cebadores específicos que se diseñaron. El producto de la PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las bandas obtenidas se corresponden con el tamaño del producto amplificado (~495 pb). En el caso de las muestras de los ratones MTL5 y MTL7 se observa una segunda banda de un tamaño ligeramente inferior, cuya diferencia en tamaño se debe muy probablemente a las modificaciones (*indels*) introducidas por CRISPR (Fig. 2).

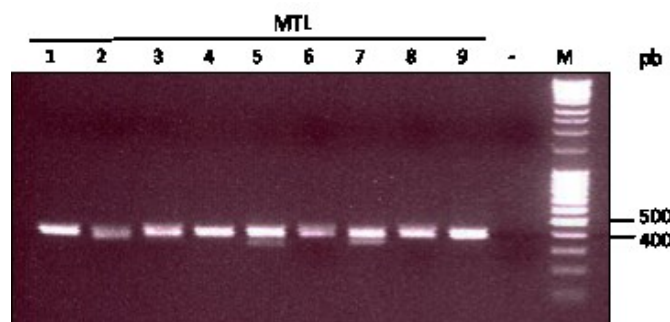


Figura 2.- Visualización de los productos amplificados por PCR (5  $\mu$ l) en gel de agarosa. De izquierda a derecha: muestras de MTL1-9, control negativo y marcador de peso molecular (M; MassRuler, ThermoScientific).

Seguidamente, con los productos de PCR se realizó el ensayo de la T7 endonucleasa, que permite detectar los ratones portadores de alteraciones en el alelo de *Has1*. Este ensayo consiste en desnaturalizar el DNA para permitir después su renaturalización, momento en el cual se pueden formar heteroduplex de DNA mutado y sin mutar por CRISPR; así como los homoduplex respectivos. La enzima T7 es una endonucleasa capaz de reconocer los errores de apareamiento del heteroduplex y escindirlos. Los productos se analizan por electroforesis en gel de acrilamida, lo que permite distinguir los ratones modificados por CRISPR/Cas9. Los ratones MTL2, 3, 5 y 7 presentan un patrón de bandas, lo que

significa que contienen alelos mutantes para el gen *Has1* (Fig. 3). Sin embargo, en los ratones MTL1, 4, 6, 8 y 9 sólo aparece una banda lo que sugiere que el gen *Has1* no ha sido modificado por CRISPR.

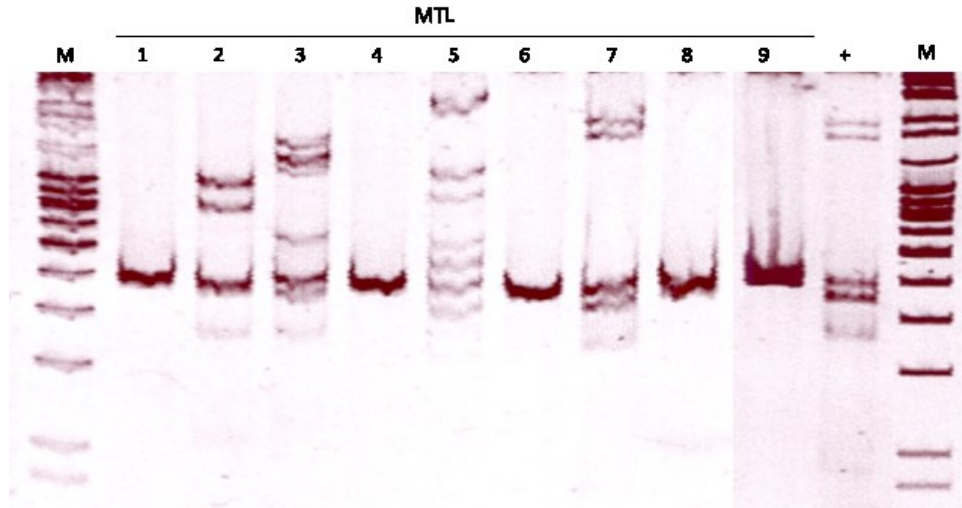


Figura 3.- Visualización de los productos del ensayo T7 en gel de acrilamida. De izquierda a derecha: marcador (MassRuler, ThermoScientific) de peso molecular (M), muestras de MTL1-9, control positivo del ensayo T7 (+) y marcador (MassRuler, ThermoScientific) de peso molecular (M).

Ratón	Mutación	Knockout
MTL2	-13 pb, -28 pb	Sí
MTL3	-35 pb, -8 pb	Sí
MTL5	-9 pb	No
MTL7	-49 pb	Sí
MTL8	-1 pb	Sí

Tabla 2.- Mutaciones encontradas en los ratones *founders* cuyo DNA fue modificado mediante CRISPR/Cas9. Se muestra también el efecto de la mutación en la proteína.

Los ratones generados por microinyección son en general mosaicos genéticos, ya que tienen una mezcla de células modificadas y sin modificar por CRISPR. Por ello, los productos de PCR se clonaron para realizar su secuenciación. Se analizaron un mínimo de 5 clones bacterianos transformados (ver métodos) por cada ratón y se secuenciaron para comprobar e identificar las mutaciones *indels*. Las secuencias obtenidas se alinearon con el sgRNA y la secuencia de referencia del gen *Has1* (MGI:106590). En los casos en los que se identificó mutación se estudió su efecto en la secuencia de la proteína.

Por secuenciación, los ratones MTL1, 4, 6 y 9 presentaron la secuencias de referencia; es decir solo la secuencia WT. Sin embargo, el resto de ratones presentaron uno o dos eventos de mutación *indels*: MTL2 (-13 pb, -28 pb), MTL3 (-8 pb, -35pb), MTL5 (-9 pb), MTL7 (-49 pb) y MTL8 (-1 pb) (Fig. S1, Tabla 2). Todas estas mutaciones, a excepción de la observada en MTL5, dieron lugar a desplazamiento del marco de lectura, generando un codón de parada prematuro. De los 9 *founders* sólo 5 ratones resultaron modificados por CRISPR/Cas9, por lo que la eficiencia obtenida fue de un 55.55%. Los 5 *founders* (MTL2, 3, 5, 7 y 8) que portan *indels* según el análisis de las secuencias se pusieron en cruce con ratones de la línea “modelo terapéutico”. La idea es expandir estas cinco líneas de ratón y comprobar que las mutaciones se transmitan a la descendencia por línea germinal, ya que como se indicó anteriormente estos ratones *founders* (F0) son mosaicos. Con los ratones obtenidos (F1) se siguió el mismo procedimiento de genotipado que con los parentales (F0): se realizó el ensayo T7 y se secuenció el DNA de los ratones T7 positivos.

El macho MTL2 resultó ser infértil, ya que no generó descendencia en 2 meses de cruce. Asimismo, aún se está analizando la progenie de los ratones MTL5 (macho) y MTL8 (hembra). Por otro lado, se ha analizado la descendencia (tres camadas) de MTL3 (macho) y MTL7 (hembra) y se ha encontrado que las mutaciones observadas en los parentales se transmiten germinalmente a la descendencia. Sin embargo, como son mosaicos, su transmisión está por debajo del ratio mendeliano (Tabla 3).

Parental	Progenie	Portadores observados/esperados	Silvestres observados/esperados
MTL3	MTL10-14	1/2.5	4/2.5
MTL3	MTL22-28	2*/3.5	5/3.5
MTL3	MTL48-56	2/4.5	7/4.5
MTL7	MTL15-21	2/3.5	5/3.5
MTL7	MTL42-47	3/3	3/3
MTL7	MTL57-62	1/3	5/3

Tabla 3.- Análisis de la descendencia de diferentes camadas de MTL3 y MTL7. Los portadores presentan una de las mutaciones observadas en los parentales, los silvestres no presentan mutación. \*Las 2 mutaciones de MTL3 se segregan a la descendencia, MTL27 porta la mutación de -35 pb y MTL28 porta la de -8 pb.

## Discusión

Los CAFs, componente celular más abundante del estroma, producen gran cantidad de ECM, siendo así responsable de la fibrosis y de la pobre vascularización de los PDAC. Entre los principales componentes de la ECM cabe destacar el HA, que se sintetiza por sintasas (HAS1, HAS2, HAS3). En el caso del PDAC ha quedado demostrado que presenta un nivel elevado de HA [22]. Se cree que el HA puede promover el desarrollo tumoral, porque potencia procesos celulares como la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis entre otros [17]. De hecho, previamente se ha observado que en una variedad de tipos de cáncer existe una correlación entre el pronóstico y el HA, así como con las enzimas que controlan sus síntesis y degradación [23].

Diversos estudios sugieren que la eliminación de HA podría tener un beneficio terapéutico, al menos, a nivel de eliminar la barrera física que parece impide la entrada de fármacos en el PDAC [20,21]. Se están desarrollando diferentes estrategias terapéuticas dirigidas contra el HA, como son la inhibición de su síntesis, el bloqueo de su señalización o la eliminación del HA en el estroma. Nuestros estudios de expresión en CAFs han mostrado que *Has1* es uno de los genes que se encuentra sobreexpresado comparado con los fibroblastos pancreáticos normales. Los estudios realizados por otros grupos se han realizado a nivel farmacológico, por lo que para caracterizar mejor la función de este gen hemos decidido realizar los estudios a nivel genético.

En este trabajo se planteó generar alelos *knockout* para el gen *Has1* mediante CRISPR/Cas9 en un modelo de ratón de cáncer de páncreas para estudiar el beneficio terapéutico de eliminar este gen, solo o en combinación de otras dianas terapéuticas. Para ello se realizaron microinyecciones de sgRNA/Cas9 en embriones del modelo terapéutico de PDAC y se analizaron las mutaciones obtenidas mediante el ensayo T7 y secuenciación. La eficiencia del proceso se encuentra dentro del rango (50-90% ratones portadores) que describe la literatura [24], pero habría que estudiar si sería posible aumentarla mediante alguna modificación en el proceso.

El sistema CRISPR/Cas9 representa una gran ventaja para incorporar nuevos alelos en nuestro modelo, ya que incorporar alelos a un modelo tan complejo (8 alelos) puede llevar años de cruces. Con esta herramienta no perdemos la homocigosidad de los alelos, ni la combinación de los mismos. Aún así, el estudio no es simple, porque la microinyección en embriones es una técnica nueva que se ha tenido que poner a punto en el laboratorio y en el Centro. Además, hay que validar los sgRNAs que se usan y los ratones que nacen son generalmente mosaicos que pueden no transmitir por línea germinal y que cuando lo hacen, transmiten muy por debajo de la frecuencia mendeliana. El genotipado inicial para identificar al *founder* ideal, que porte un *indel* que resulte en *knockout*, y que se transmita es un proceso largo, como se ha explicado en la memoria. El estudio a veces se ha complicado, ya que hemos encontrado falsos negativos en el ensayo de la T7 (como en el *founder* MTL8), así como detectado 2 eventos de mutación en el mismo ratón (como en los *founders* MTL2 y 3).

A pesar de las dificultades, el proceso es mucho más rápido que obtener el *knockout* en estas líneas por la vía clásica, que supondría la recombinación homóloga de un vector dirigido en células ES y posteriores cruces. Ahora que está puesta a punto la tecnología CRISPR/Cas9, se calcula que se podrá obtener ratones *knockout* para los genes de interés en 6 meses. Como alternativa, por si la técnica CRISPR no funcionaba mediante microinyección en embriones, se generaron en paralelo células ES de la línea modelo terapéutico. Con estas células ES se pueden usar bien vectores dirigidos para obtener recombinación homóloga o intentar la técnica CRISPR *in vitro*.

Aunque mediante CRISPR/Cas9 el sistema de recombinación no homóloga permite reparación mediante deleciones e inserciones, en nuestro caso sólo han tenido lugar deleciones. Algunas de estas mutaciones se detectan ya en la PCR (Fig. 2), como ocurre para MTL7 que presenta una banda de menor tamaño que se corresponde con la deleción de 49 pb que porta. En el caso de MTL5 también aparece esta banda pero la mutación que se ha detectado es de -9 pb, por lo que debe existir otra mutación que aún no hemos detectado. Esto puede deberse, según nuestras observaciones, a que la polimerasa presenta cierta preferencia hacia una de las poblaciones de DNA. Así, al clonar es más probable obtener una de las dos secuencias presentes. Para evitar este suceso se podrían analizar más clones bacterianos o analizar la descendencia de ese parental.

Los resultados del ensayo de la endonucleasa T7 se correspondieron con los observados por secuenciación. Excepto para MTL8 que presenta una deleción de 1 nucleótido que no se detectó por el ensayo T7. Esto puede deberse a que el heteroduplex formado sólo tiene una base mal apareada y puede que no sea suficiente para el reconocimiento por la enzima T7, aunque se ha reportado que la enzima T7 tiene sensibilidad suficiente para ello. La alternativa para la detección de esta mutación será su análisis por la empresa Transnetyx, que genera sondas específicas para la mutación usándose para la detección de la misma en las muestras de DNAg de cola.

Según el análisis de la descendencia de MTL3 y MTL7 las mutaciones que presentan han resultado ser transmisibles. Se está estudiando la descendencia de MTL5 y MTL8 para comprobar que sus mutaciones también lo sean. En el caso de la infertilidad del macho MTL2 habría que comprobar si se debe al procedimiento (manipulación de los embriones) o es un hecho puntual.

La generación F1 obtenida se está expandiendo para conseguir parejas de heterocigotos para la misma mutación que se puedan cruzar entre ellos. Los homocigotos obtenidos se emplearán para estudiar la función del gen *Has1* en el desarrollo del adenocarcinoma pancreático ductal. A estos ratones no se les proveerá de doxiciclina con lo que se expresará el oncogén *K-Ras* y se inactivará el gen *p53*, iniciándose el crecimiento tumoral. Una vez detectado el tumor por ecografía se le suministrará tamoxifeno, lo que permitirá escindir las dianas terapéuticas C-Raf y EGFR. Concretamente se estudiará el desarrollo tumoral *in vivo* (supervivencia, histología...), se estudiará si el tratamiento con Gemcitabina funciona mejor y en el caso de que se produzca un desarrollo tumoral mayor habría que comprobar si hay compensación por otras proteínas HAS u otros miembros de la ECM. Además se generarán modelos ortotópicos en ratones desnudos a los que se les inyectaría diferentes combinaciones de células, como: Has1 KO CAFs + células tumorales, Has1 WT CAFs + Has1 KO células tumorales, Has1 KO CAFs + Has1 KO células tumorales.

Aunque la técnica CRISPR ha funcionado muy bien para la generación de *indels* por microinyección de embriones, los alelos *knockouts* que se generan son constitutivos. Lo deseable sería generar modelos *knockouts* condicionales, que permitieran estudiar el efecto terapéutico de la deleción del gen una vez desarrollado el tumor, o eliminar el gen exclusivamente en células tumorales o en CAFs. En la literatura se han descrito pocos casos de modelos condicionales generados mediante CRISPR/Cas9 [25], en nuestro laboratorio estamos intentando poner a punto la técnica, pero los resultados de momento no son buenos. Por microinyección de embriones se ha logrado incorporar un sitio loxP, pero no ambos. Las células ES generadas y el uso combinado con vectores dirigidos, puede que ayude en la generación de estos modelos. La generación de modelos condicionales será también imprescindible cuando se estudien alelos cuya deleción vía línea germinal sea letal para el ratón. Por suerte, sabemos que el *knockout* del gen que estamos estudiando, *Has1*, es viable [26].

Este trabajo ha supuesto los primeros pasos necesarios para la generación de una línea *knockout* del gen *Has1* en un modelo de ratón de PDAC. En 3 meses se ha conseguido caracterizar las mutaciones de los ratones parentales, obtener mediante cruces la generación F1 y genotiparla. Como conclusión cabe destacar la utilidad del sistema CRISPR/Cas9 que permite introducir de forma bastante rápida, en comparación con otros métodos, nuevos alelos modificados (mutaciones constitutivas inactivantes que se transmiten por vía germinal) en modelos de ratón complejos formados por múltiples alelos.

## Referencias

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. 2014. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*64(1):9-29.
2. SEER Stat Fact Sheets: Pancreas Cancer. 2016. In [www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov)
3. Hidalgo, M. 2014. Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 64(1):9-29.
4. Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K. and Hruban, R.H. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol.* 12(2):81-91.
5. Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P. and Barbacid, M. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogene in adult mice. *Cancer Cell* 11(3):291-302.



6. Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., et al. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 321(5897):1801-6.
7. Maitra, A. and Hruban, R.H. 2008. Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol* 3:157-188.
8. Guerra, C. and Barbacid, M. 2013. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol*. 7(2):232-47.
9. Pérez-Mancera, P.A., Guerra, C., Barbacid, M. and Tuveson, D.A. 2012. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology*.142(5):1079-92.
10. Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, et al. 2006. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res*. 66(1):95-106.
11. Feig, C., Jones, J.O., Kraman, M., Wells, R.J., Deonarine, A., Chan, D.S., Connell, C.M., Roberts, E.W., Zhao, Q., et al. 2013. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(50):20212-7.
12. Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., et al. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 324(5933):1457-61.
13. Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C et al. 2014. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*.25(6):719-34.
14. Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., et al. 2014. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 25(6):735-47.
15. Erkan, M., Adler, G., Apte, M.V., Bachem, M.G., Buchholz, M., Detlefsen, S., Esposito, I., Friess, H., Gress, T.M., et al. 2012. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 61(2):172-8.
16. Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R. and Ghatak, S. 2015. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.*;6:201.
17. Sironen, R.K., Tammi, M., Tammi, R., Auvinen, P.K., Anttila, M. and Kosma, V.M. 2011. Hyaluronan in human malignancies. *Exp Cell Res*;317(4):383-91.
18. Kultti, A., Zhao, C., Singha, N.C., Zimmerman, S., Osgood, R.J., Symons, R., Jiang, P., Li, X., and Thompson, C.B. Accumulation of extracellular hyaluronan by hyaluronan synthase 3 promotes tumor growth and modulates the pancreatic cancer microenvironment. 2014. *Biomed Res Int*. 2014:817613
19. Whatcott, C.J., Diep, C.H., Jiang, P., Watanabe, A., LoBello, J., Sima, C., Hostetter, G., Shepard, H.M. 2015. Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*.21(15):3561-8.
20. Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Neesse, A., Bapiro, T.E., Cook, N., Frese, K.K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M.E., et al. 2013. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. 62(1):112-20.
21. Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D. and Hingorani, S.R. 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*.21(3):418-29.
22. Theocharis, A.D., Tsara, M.E., Papageorgacopoulou, N., Karavias, D.D., and Theocharis, D.A. 2000. Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition. *Biochim Biophys Acta*.1502(2):201-6.
23. Cheng, X.B., Sato, N., Kohi, S., Yamaguchi, K. 2013. Prognostic impact of hyaluronan and its regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 8(11):e80765.
24. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153(4):910-8.

25. Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154(6):1370-9.
26. Siiskonen, H., Oikari, S., Pasonen-Seppänen, S., Rilla, K. 2015. Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions. *Front Immunol*. 6:43.

## Material Suplementario

Cebador	Secuencia 5'-3'	Longitud	T <sub>m</sub> (°C)	%GC
Cebador 1	ACCAGGAGTAAAGTCACTCCA	22	55	50
Cebador 2	TAAGCGGGATCCTCTGGTA	20	52	50

Tabla S1.- Secuencia de los cebadores empleados para amplificar el exón 1 del gen *Has1* modificado por CRISPR/Cas9.

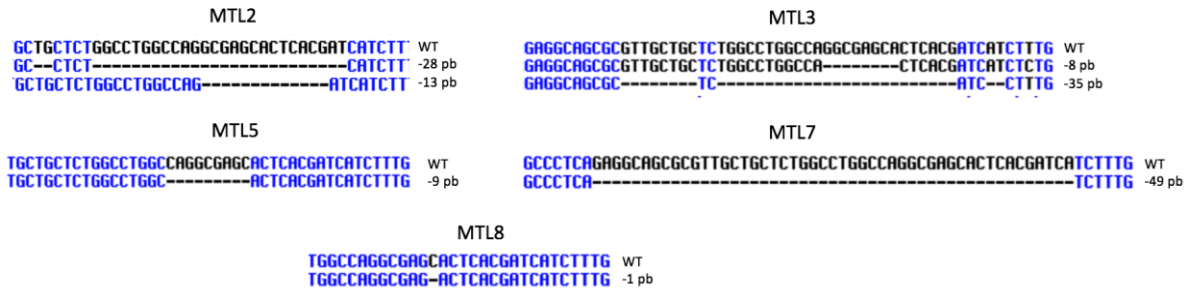


Figura S1.- Deleciones observadas en los ratones *founders* provenientes de las microinyecciones de Cas9 y *Has1* sgRNA. Para cada ratón se muestra un alineamiento de la secuencia de referencia para el gen *Has1* (arriba, WT) con las secuencias clonadas que contienen mutaciones (abajo, -# pb).