



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Neurofibroma-MPNST
progresioaren ikerkuntza
induzituriko zelula ama
pluripotenteen (iPSC)
ereduan oinarritutako sistema
erabiliz**

*Itziar Uriarte Arrazola,
Helena Mazuelas Gallego,
Juana Fernández Rodríguez,
Miriam Magallón Lorenz,
Sara Ortega Bertran,
Conxi Lázaro Garcia,
Bernat Gel Moreno, Meritxell Carrió
eta Eduard Serra*

129-136 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.16>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Neurofibroma-MPNST progresioaren ikerkuntza induzituriko zelula ama pluripotenteen (iPSC) ereduaren oinarritutako sistema erabiliz

Itziar Uriarte-Arazola¹, Helena Mazuelas¹, Juana Fernández-Rodríguez², Miriam Magallón-Lorenz¹, Sara Ortega-Bertran², Conxi Lázaro², Bernat Gel¹, Meritxell Carrió¹, Eduard Serra¹

¹Minbizi Hereditario taldea, Germans Trias i Pujol Ikerketa Institutoa (IGTP), Can Ruti Kanpua, 08916 Badalona, Bartzelona, Espainia

²Minbizi Hereditario programa, Onkologia Instituto Katalana (ICO-IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08098 Bartzelona, Espainia
iuriarte@igtp.cat (I. U-A.)

Laburpena

Nerbio periferiko zorroaren tumore gaiztoa (*Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*, MPNST) ehun biguneko sarkoma oldarkorra da eta espontaneoki (%50) edo 1 motako neurofibromatosia (NF1) jasaten duten pertsonen (%50) garatu dezakete. MPNST-en terapian ezinbestekoa da erabateko erresektzioa eta erradioterapia. Hala ere, pronostiko txarra dute eta heriotza-tasa oso altua da. Tumore gaizto hauek osatzen dituzten zelulen genomak berrantolaketa handia dute, hiperploideak dira eta ehuneko oso altu batek *NF1*, *CDKN2A/B* eta *PRC2* tumore gene supresoreak inaktibatuta dauzkate. Induzituriko zelula ama pluripotenteak (iPSC) erabiliz eta hiru gene hauek CRISPR-Cas9 teknologiaren bidez mutatu, MPNST-aren garapenean daukaten funtzioa eta garrantzia ulertu nahi da.

MPNST, NF1, iPSC, NC, CRISPR-Cas9, zelula-lerroak

Abstract

Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST) is an aggressive soft tissue sarcoma that can develop equally spontaneously or in Neurofibromatosis type 1 patients. Complete resection with wide margins is essential in MPNST therapy, followed by radiation, but it is not always successful and has a very bad prognosis and high mortality rate. There is a lack of therapeutic options. MPNSTs are composed of hyperplod cells with structural variants and rearranged genomes. Most of them have NF1, CDKN2A/B and PRC2 tumor suppressor genes inactivated. Using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and editing the three tumor suppressor genes by CRISPR-Cas9, we aim to understand the function and implication of these genes in the progression of MPNSTs.

MPNST, NF1, iPSC, NC, CRISPR-Cas9, cell lines

1. Sarrera eta motibazioa

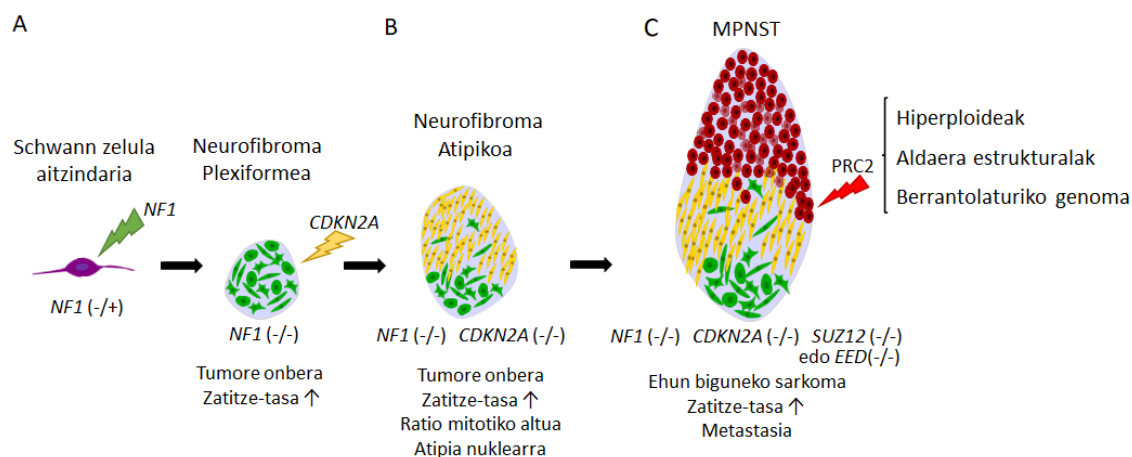
Nerbio periferiko zorroaren tumore gaiztoa (MPNST) ehun biguneko sarkoma da. Tumore hauen %50-a 1 motako neurofibromatosia (NF1) jasaten duten pertsonen garatzen dute. NF1 tumoreak garatzeko joera duen nerbio sistema periferikoko gaixotasun hereditarioa da. Hau da, *NF1* tumore supresore genearen aleloetako bat mutatuta heredatzeagatik sortzen da. Hots, pertsona hauen zelula guztiak *NF1* (+/-) dira. Munduan 1/3500 pertsonen jasaten dute, eta klinikoki, gaixotasun oso heterogeneoa da (Evans et al, 2002). Gaixoen Lisch noduluak garatu ditzakete irisean, edota kafesne orbanak, hezur-arazoak, begiko gliomak, ikasmen nahasmendua eta neurofibroma izeneko tumore onberak, besteak beste. NF1 jasaten duten pertsonen %8-13ak MPNST bat garatzeko arriskua dute, neurofibroma batzuk MPNST tumore gaiztoak bihurtu baitaitezke. Tumore gaizto hauek NF1 gaixotasuna daukatenean heriotza-kausa nagusia da.

Neurofibroma mota ezberdinak daude: alde batetik, azaleko neurofibromak, nerabezarotik aurrera garatzen diren eta azal osoan zehar agertu daitezkeen konkor itxurako tumoreak dira. NF1 gaixoen >%98-ak gutxienez bat garatzen du, eta milaka hazi ahal zaizkie bizi-kalitatea eta autoestimua murriztuz. Beste aldetik, neurofibroma plexiformeak (PNF) daude, sortzetiko tumoreak dira eta gorputzaren barnealdean etengabe hazi daitezke. Bi kasuetan, tumore hauek nerbio baten ondoan hazten dira, eta Schwann zelula aintzindariak *NF1* genea guztiz inaktibatu behar da. Hau da, neurofibromak sortzen eta osatzen dituzten zelulak *NF1*(-/-) dira (1A. irudia).

Neurofibroma plexiformeen kasuan, *CDKN2A* gene tumore supresorea ere guztiz inaktibatzerakoan, neurofibroma atipiko (aNf) izeneko tumorea garatzen da (Beert et al, 2011; Magallón-Lorenz et al, 2021). Hau da, aNF-ak osatzen dituzken zelulak *NF1* (-/-) *CDKN2A* (-/-) dira. Kasu honetan, zelulek zatitze-tasa handiagoa dute, indize mitotiko altua dute eta bereizgarriak diren nukleo handi eta atipikoak izaten dituzte (1B. irudia). Hazkunde azkarreko noduluak dira eta tumore onberak izaten jarraitzen dute. Gainera, pNF-en eta aNF-en zelulek Kresta Neuralaren (NC) eta Schwann zelulen (SC) arteko nortasun zelularra daukate.

aNF-ak aurrera egin dezake eta MPNST bat bilakatu daiteke. Sarkoma oldarkorra da, eta tumorea osatzen duten zelulak hiperploideak dira eta berrantolaturiko genoma daukate. Batez ere aldaera estrukturalak dituzte, baina %80-a polycom II konplexu errepresiboa (PRC2) osatzen duen geneatariko bat (*SUZ12* edota *EED*) guztiz inaktibatuta daukate (1C. irudia). Kasu honetan, histopatologikoki, genomikoki zein adierazpenari dagokionez, zelula mesenkimalen nortasun zelularra daukate (Miettinen et al, 2017; Magallón-Lorenz et al, 2023).

1. irudia. MPNST-aren garapena (Zhang et al, 2020)-tik eraldatua. A) Tumoreen eratorria den Schwann zelula aitzindaria eta neurofibroma plexiformearen sorrera *NF1* genearen inaktibazioaren ondorioz. B) Neurofibroma atipikoaren sorrera *CDKN2A* genearen inaktibazioaren ondorioz. C) MPNST-en sorrera eta ezaugarriak esanguratsuenak.



Orain dela gutxi, pNF-ak tratatzeko MEK bidezidorraren inhibitzailea den Selumetinib farmakoa erabiltzen hasi da, eta tumoreak desagertarazten ez baditu ere, tamainaz murriztea edo gehiago ez haztea lortzen du. Hala ere, ahal den kasuetan, erresektzioa da aukerarik onena. Farmakoak ez du aNF eta MPNST-etan eraginik, eta azkenekoaren kasuan, dagoen tratamendu bakarra erresektzioaren osteko erradioterapia da. Hala ere, 4 urteko epean, soilik %50-30ek bizirauten dute.

Aurretik azaldutako guztia kontuan izanda, gure helburua MPNST-en sorreran hiru gene tumore supresore hauen eragina eta funtzioa ulertzea da. Modu honetan, MPNST-en aurkako ezinbestekoa den terapia eraginkor bat aurkitzeki hurbilago egongo gara.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

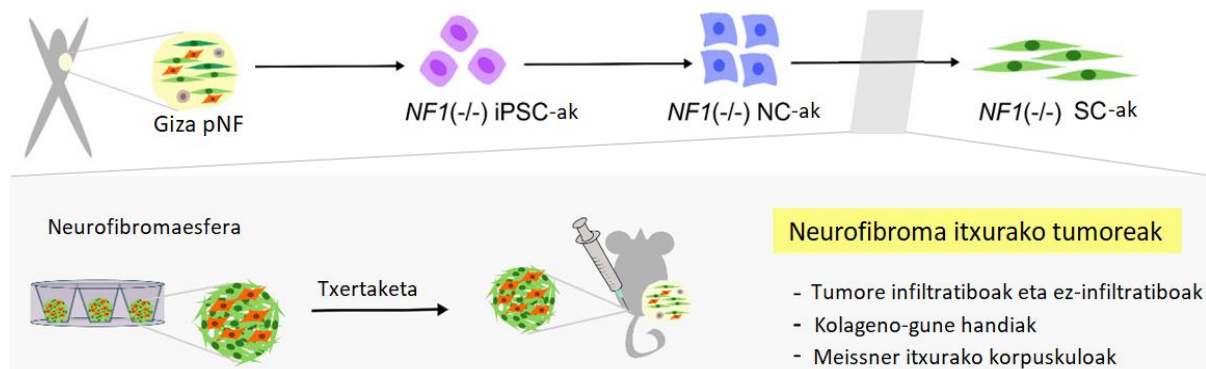
MPNST-en garapena ikertzeko lehenengo pausua eredu on bat izatea da. Alde batetik, tumore guzti hauen eratorria den Schwann zelula aitzindaria zein den jakin eta kultibatu behar da. Beste alde batetik, zelulek garapen eta ezberdintze prozesua jarraitzeko aukera ematen duen eredu behar da. Eta azkenik, hiru tumore supresoreak inaktibatze eredu moldakorra beharrezkoa da.

Gaur egun, MPNST-ak ikertzeko hainbat eredu daude. Alde batetik zelula primarioak daude, baina *in vitro* denbora epe motzetan soilik kultibatu daitezke. Hilezkorturiko zelulak ere erabiltzen dira. Hauek *in vitro* etengabe hazi daitezke, eta geneak arazorik gabe editatu daitezke. Baina hilezkortze prozesuak aldaketa biologiko ugari dakartza, eta horrek MPNST-en garapenaren ikerketa asko mugatzen du. Ikerketa arlo honetan ere, animala ereduak (batez ere sagu ereduak) erabiltzen dira. MPNST-en garapena ikertzeko behar diren ezaugarri guztiak betetzen dituzte, baina prozesu biologiko honetan arratoi eta giza zelulen arteko ezberdintasunak nabarmenak dira, eta lortu daitezkeen ondorioak mugatuak dira.

Induzituriko zelula ama pluripotenteak (iPSC) erabilera anitzeko erreminta da. Zelula iturri amaigabea da, beste edozein zelula motatara ezberdindu daitezke (neuronak, adipozitoak, osteozitoak, etab.), eta MPNST-en eratorriak diren zelulak ezagutu, ulertu eta kultibatze aukera paregabea da.

Gure laborategian, *NF1(-/-)* giza iPS zelulak erabiliz, pNF-ak ikasteko 3D eredua sortu da (Carrió et al, 2019; Mazuelas et al, 2022). Schwann zelula aitzindariak lortzeko, iPS zelulak Kresta Neurala (NC) izeneko zelula multipotentetara ezberdintzen dira. Hauek soilik oso zelula espezifikoetara ezberdindu daitezke: zelula mesenkimaletara, pigmentarioetara, adipozitoetara, kondrozitoetara... eta guri interesatzen zaizkigun Schwann zeluletara. Laborategian 3D eredua sortzeko, zelulak NC-etatik SC-tara ezberdintzeko prozesuan, zelulak esferoideak sortzeko plaketan hazten dira pNF-etatik eratorritako fibroblastoekin batera kultibatuz. Modu honetan, neurofibromaesfera izeneko zelula egitura tridimentsionalak lortzen dira. Esferoide hauek immunoeskasia daukaten saguetako nerbio ziatikoetan txeratu dira eta giza neurofibromen ezaugarriak dituzten tumoreak hazi dira, pNF-ak ikasteko eredu gokia denaren seinale (2. irudia).

2. irudia. pNF-ak ikertzeko 3D *NF1(-/-)* iPSC-en ereduaren eskema, (Mazuelas et al, 2022)-tik eraldatua.



Errepikapen Palindromiko Laburrak, Multzokatuak eta Tarteka Bateratuak (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) bakterioen immunitate-sistema mota bat da. Bakterioei eraso egin dieten birusen DNA zatiak dituzten sekuentziak dira eta birusen eraso berrietan DNA detektatu eta suntsitzeko erabiltzen dituzte, haietatik eraginkortasunez defendatzeko. Gaur egun sistema hori moldatu eta ingenieritza genetikorako tresna bat bihurtu da, non oso espezifikoak diren edozein espezietako DNA-locusetan base-pareak gehitu eta ezaba ditzakeen. Gehien erabiltzen dena CRISPR-Cas9 da. Molekula hau zeluletara sartzeko sistema berriena erribonukleoproteinen (RNP) bideko transfekzioa da. Beste sistemekin (plasmidoak, mRNA eta birusak) konparatuz abantai ugari ditu: efizientzia altuagoa, zitotoxizitate baxuagoa, errazagoa zein azkarragoa, *off-target* efektu baxuagoa eta transfektatzen oso zailak diren zeluletan eraginkorra. Hau da, iPS zeluletan hiru gene tumore supresoreak editatzeko aparteko tresna da.

2.1 Ikerketaren helburua

Neurofibroma plexiforme batetik MPNST-a garatzeko inaktibatu behar diren hiru gene tumore supresoreen (*NF1*, *CDKN2A*, *PRC2 (SUZ12)*) funtzioen garrantzia ulertzea da helburua. Horretarako:

- 1) CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz, hiru geneak editatutako induzituriko zelula ama pluripotenteen (iPSC) zelula-lerroak sortu.
- 2) Zelula lerroak Kresta Neuraleko (NC) ama zeluletara eta Schwann zeluletara (SC) ezberdindu eta geneen ekarpen tumorigenikoa *in vitro* (3D eredu) zein *in vivo* (saguetan txertatuz) ebaluatu.
- 3) *In vitro* (3D eredua) farmako behaketa egitea.

3. Ikerketaren muina

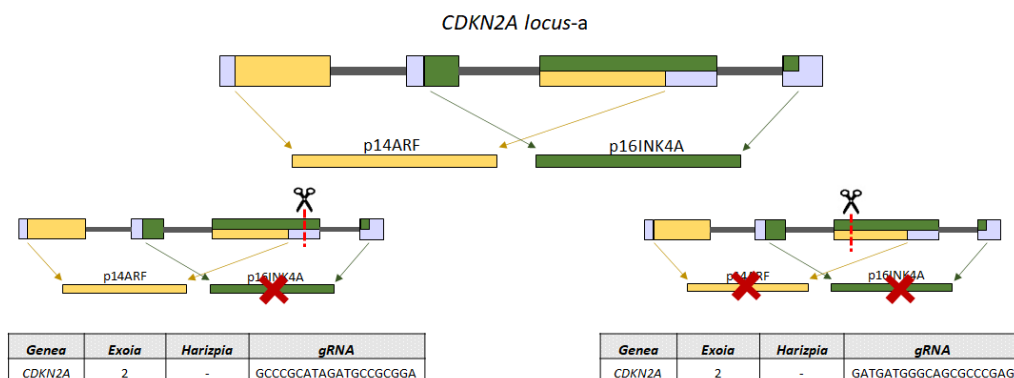
3.1 *NF1(-/-) CDKN2A(-/-)* zelula-lerroak

CDKN2A locus berezia daukan gene tumore supresorea da. Irakurketa patroia ezberdina daukaten bi proteina kodifikatzen ditu: p14ARF, p53 bidezidorrarekin eta zelularen apoptosi mekanismoarekin loturiko proteina da. Eta beste aldetik p16INK4A, erretinoblastoma bidezidorrarekin, ziklo zelularrekin eta seneszentziarekin erlazionaturiko bidea (3A Irudia). Babes mekanismo hauen bidez, zelula ezin bada modu zuzen batean zatitu edota arriskuren bat nabaritzen badu, apoptosiaz (suizidio

zelularra) edota seneszentziaz (ziklo zelularren etenaz) baliatzen da. Baina *CDKN2A* inaktibaturik badago, zelula akastunek etengabe zatitzen jarraitu dezakete.

Giza aNF-etan *CDKN2A locus*-a translokazioen bidez guztiz inaktibatzen da, hau da, p14ARF zein p16INK4A ez dira funtzionalak (Magallón-Lorenz et al, 2021). Hori frogatzeko, CRISPR-Cas9 bidez *NFI(-/-)* den iPS zeluletan bi proteinak kodifikatzen dituen sekuentzia eta soilik p16INK4A kodifikatzen duen sekuentzia editatu ditugu (3B Irudia).

3. irudia. *CDKN2A locus*-a editatzeko erabilitako estrategia. A) *CDKN2A locus*-ak kodifikatzen dituen bi proteinak: p14ARF eta p16INK4A. B) Editatutako sekuentzien kokalekua eta kasu bakoitzean erabilitako edizio-sekuentziak (gRNA).



Zelula bakarretik datozen iPS zelula editatuak lortzeko, GFP proteina fluoreszentea daukaten RNP konplexuak erabili dira. Transfektaturiko zelulak GFP positiboak dira, eta fluxu zitometriaren bidez RNP-a bereganatu duten zelulak banatu ditzakegu. Ondoren, diluzio limitea egiten da, eta 96 putzuetako plakak erabiliz, putzuko 2 zelula plakeatzen dira. Kolonia bakarra hazten diren putzuak anplifikatu egiten dira DNA lortzeko eta zelulak kriomantentzeko kantitate nahikoa izan arte. Azkenik, Sanger sekuentziazioa erabiliz, zelula klon bakoitzean dauden *CDKN2A* mutazioak detektatzen dira. Guztira 5 *NFI(-/-) CDKN2A(-/-)* lortu ditugu: 2 klon soilik *CDKN2A locus*-aren p16INK4A sekuentzia mutatu daukatenak eta 3 *locus* osoa inaktibaturik daukatenak (1. taula).

1.taula. Lortutako *NFI(-/-) CDKN2A(-/-)* klonak, eta mutazioei dagokien informazioa.

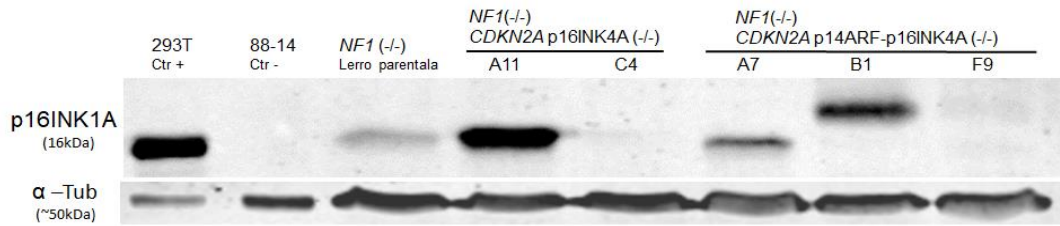
Klona	Aleloa	Mutazioa	Isoforma	cDNA
C4	1	Ins1	p16INK4A	c.473insC
	2	Ins1del2	p16INK4A	c.472delinsT+475del
A11	1	Del10	p16INK4A	c.472_481del
	2	Del85	p16INK4A	c.394_478del

Klona	Aleloa	Mutazioa	Isoforma	cDNA
A7	1	Del36	p16INK4A	c.187_222del
			p14ARF	c.261_296del
	2	Del8+ins4	p16INK4A	c.194_201del197TCAT
			p14ARF	c.268_275del271TCAT
B1	1	Del 19	p16INK4A	c.194_212del
			p14ARF	c.268_287del
	2	Ins11	p16INK4A	c.203insATCATCATGGC
			p14ARF	c.276insATCATCATGGC
F9	1	Del 1	p16INK4A	c.202del
			p14ARF	c.276del
	2	Del 22	p16INK4A	c.194_215del
			p14ARF	c.268_289del

iPS-NC ezberdinketa

Immunozitokimika teknika erabiliz, 4/5 klon zelula pluripotenteek soilik adierazten dituzten markatzaileak (OCT3/4 eta Tra1-81) detektatzen ditugula egiaztatu dugu, hala, iPS zelulak izaten jarraitzen dute. Beste aldetik, NC zeluletara ezberdindu ditugu, eta NC leinuko zelulak direla egiaztatu da immunozitokimikaren bidez (SOX10 eta p75) eta fluxu zitometriaren bidez (p75 eta Hnk1). Western blot teknikaren bidez p16INK4A proteinaren adierazpenaren analisia egin da. DNA mutatu egon arren, kasu batzuetan aberrantea den proteina detektatzen da. Hala ere, *NFI(-/-) CDKN2A p16INK4A(-/-)* eta *NFI(-/-) CDKN2A p14ARF-p16INK4A(-/-)* lerro-zelular bana lortu ditugu, C4 eta F9 klonak hain zuzen ere (4 Irudia).

4. irudia. *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) klonetan p16INK4A proteinaren adierazpen-eza detektatzeko Western blot-a.



Bidezidor biokimikoekin erlazonaturiko hainbat entsegu funtzional egin dira *NF1*(-/-) zelula-lerro parentalarekin konparatuz. Baina ziklo zelularrari, zatitze-tasari, migrazioari edota seneszentziari dagokionez, *in vitro*, ez dira ezberdintasun estatistiko bereizgarriak aurkitu.

3.2 *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula-lerroak

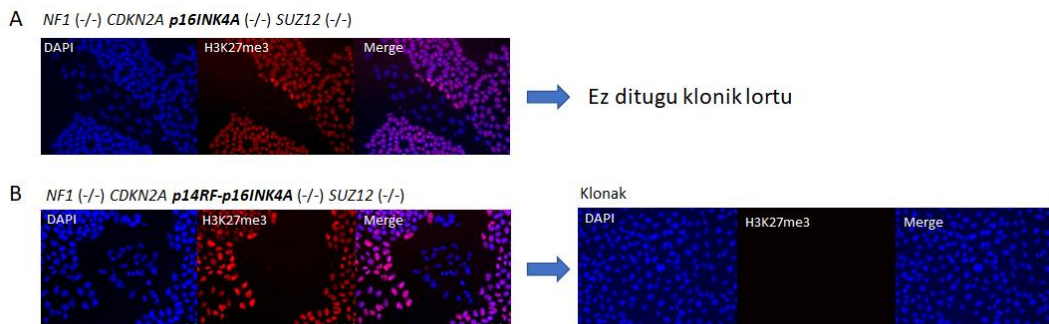
SUZ12 gene tumore supresorea polycom II konplexu errepresiboa (PRC2) osatzen duen molekuletako bat da. Konplexu honen funtziorik garrantzitsuenetakoa H3K27 histona trimetilazioa da. Honela, metilatutako DNA zonaldeak ezin dira transkribatu, hau da, geneen adierazpena erreprimatua mantentzen du. MPNST-en ehuneko oso altu batean *SUZ12* edo *EED* geneak inaktibatzen daude. Beraz, hautaturiko *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) iPS zelula lerroetan *SUZ12* genea editatu dugu, RNP CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz.

Kasu honetan, H3K27me3 detektatzeko antigorputz ona dagoenez, RNP konplexuen bidez transfektaturiko GFP positiboak diren zelulak fluxu zitometriaren bidez banatu ondoren immunozitokimika teknika erabili dugu editatutako zelulak identifikatzeko (5A Irudia). Ondoren, amplifikazio prozesuan entsegu funtzionala errepikatu egiten dugu soilik H3K27me3 negatiboak diren zelulak amplifikatzen jarraitzeko eta aurrerago Sanger sekuentziazioaren bidez mutazioak identifikatzeko.

Mutazioen ordenaren garrantzia: *NF1*, *CDKN2A* eta *SUZ12*

Hautatutako bi *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) iPS zelulak editatzea lortu dugu, baina amplifikatzerakoan p14ARF aktibo daukan kлона zatitzeari uzten dio (5A. Irudia). *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) kasuan, ordea, hiru klon lortu ditugu (5B. irudia). Hau da, *CDKN2A* geneak kodifikatzen dituen bi proteinak inaktiboak izan behar dira MPNST-a garatzeko.

5. irudia. Hautaturiko bi klonen *SUZ12* edizioa, detekzioa eta lortutako *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) klonen mutazioen informazioa. A) *NF1*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) GFP positiboak diren H3K27me3-rako immunozitokimika, non *SUZ12*(-/-) zelulak antzeman ditzakegun, baina ez ditugu klonik lortu. B) *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) GFP positiboak diren H3K27me3-rako immunozitokimika, lortu ditugun klonak eta mutazioen informazioa.



Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
<i>SUZ12</i>	1	-	GCCGAAAATGGAGCACGTC

Klona	Aleloa	Mutazioa	cDNA
F9C6	1	Del2	c.474_475del
	2	Del10	c.476_485del

Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
<i>SUZ12</i>	10	-	CGAAGAGTGAAGTCAACG

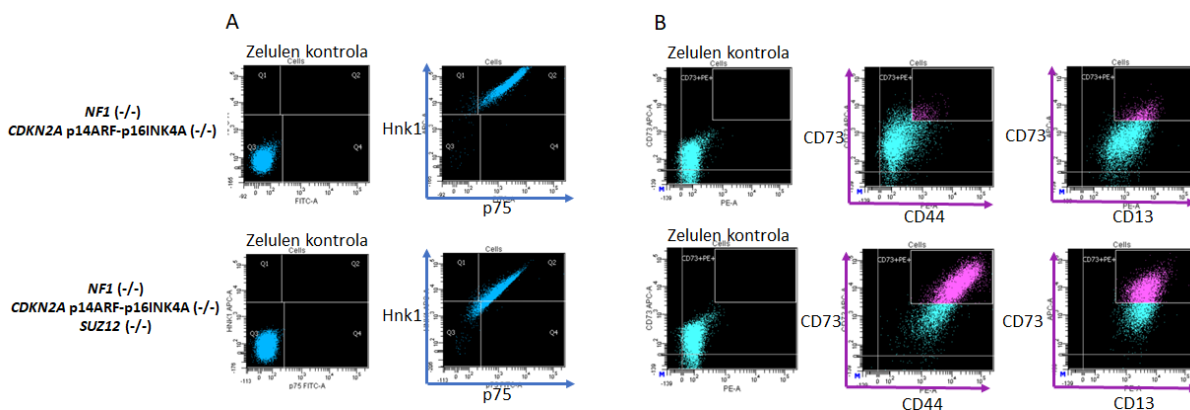
Klona	Aleloa	Mutazioa	cDNA
F9H8	1	Del6	c.1236_1241del
	2	Del18	c.1229_1247del
F9D8	1	Del21Ins4	c.1216_1236delinsCCTG
	2	Ins11	c.1236insCACTCTCGTT

SUZ12 edizioaren ondorengo iPS zelulen ezberdintze espontaneo eta zelula mesenkimalen nortasunaren eskuraketa

Beste aldetik, klon hauek anplifikatzen goazen heinean, iPS zelulen morfologia galtzen doaz, hau da, pluripotenteak izateari uzten diote espontaneoki ezberditzeko. Zelulak iPS baldintzetan kultibatzen jarraituz, morfologia mesenkimala eskuratzen dute, eta azkenean zatitzeari uzten diote. Editatuturik dauden zelulak *in vitro* mantentzeko, edizioaren ondoren NC baldintzetan kultibatzen ditugu, eta kultibo homogeenak eta egonkorak lortu ditugu.

Hiru zelula-lerro berri hauek karakterizatzeko, alde batetik, NC leinuko markatzaileak (p75 eta Hnk1) fluxu zitometria teknikaren bidez aztertu ditugu. Lerro parentalarekin konparatuz, patroia pixka bat ezberdina izan arren, zelula gehienek bi molekula adierazten dituzte (6A Irudia). Beste aldetik, morfologia mesenkimala izateko joera ikusita, zelula ama mesenkimalen (MSC) markatzaile batzuk (CD73, CD44 eta CD13) aztertu ditugu teknika berdina erabiliz. *NF1(-/-) CDKN2A p16INK4A(-/-)* zelula lerro parentalak ia ez ditu molekula hauek adierazten, baina *NF1(-/-) CDKN2A(-/-) SUZ12(-/-)* zelula gehienak mesenkimalen bereizgarriak diren hiru molekula ere adierazten dituzte (6B. irudia).

6. irudia. *NF1(-/-) CDKN2A(-/-)* eta *NF1(-/-) CDKN2A(-/-) SUZ12(-/-)* zelula-lerro bakoitzeko fluxu zitometriaren bidezko karakterizazioa. A) NC leinuko Hnk1 eta p75 markatzaileen adierazpena. B) MSC-en CD73, CD44, eta CD13 markatzaileen adierazpena.

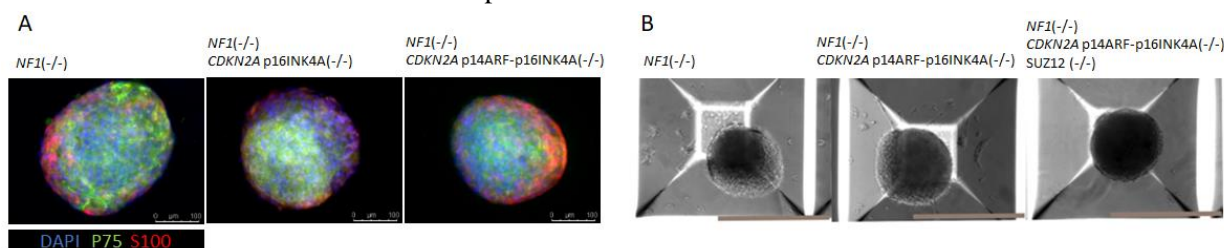


3.3 3D ereduak

pNF-ek eta aNF-ek antzekotasun ugari dituzte: fibroblastoen portzentaia, zelulen nortasuna... Horregatik, *NF1(-/-) CDKN2A(-/-)* zelula lerroen kasuan, pNF-aren 3D ereduaren erabiliz protokoloa aplikatu da. NC zelulak SC zeluletara 2D plaketan ezberdintzen hasten dira, eta 5. egunean mikroputzuak dituzten Aggrewell™ plaketara pasatzen dira pNF-etatik eratorriko fibroblastoei batera. Azkenean, 15. egunean immunozitokimika teknika erabiltzen da egindako NC-SC leinuko markatzaileen bidez karakterizatzeko. *NF1(-/-)* zelulen kasuan bezala, *NF1(-/-) CDKN2A(-/-)* hautagaietan ere esferoideak lortu ditugu (7A. irudia).

MPNST-en 3D ereduaren lortzeko, protokoloan aldaketa batzuk egin dira. Alde batetik, MPNST errealetan oso fibroblasto gutxi daudenez, kultibo sinpleak egin ditugu. Beste alde batetik, *NF1(-/-) CDKN2A(-/-) SUZ12(-/-)* zelula lerroek MPNSTak bezala NC-MSC nortasuna dutenez, mikroputzuak dituzten Aggrewell™ plaketan kultibatu ditugu 2D-n erabiltzen den medio berdina erabiliz. (7B. Irudia).

7. irudia. 3D ereduak. A) pNF ereduaren protokoloa jarraituz sortutako esferen immunozitokimika bidezko karakterizazioa NC-SC leinuko markatzaileekin (p75 eta S100). B) Aggrewell™ plaketako mikroputzuetan sortutako esferak.



4. Ondorioak

CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz, *CDKN2A* genearen *locus* osoa (p14ARF zein p16INK4A) *NFI*(-/-) genotipoa daukaten iPS zeluletan editatzea lortu dugu, eta guztira 5 klon lortu ditugu. Guztiak NC zelula multipotentetara zuzenki ezberdindu ditugu, eta morfologiari zein adierazpenari dagokionez, *NFI*(-/-) zelula-lerroarekin konparatuz, ez dago ezberdintasunik. Klon guztietatik, p16INK4A proteina detektagarria ez den *NFI*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) zelula-lerro bat eta *NFI*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) beste bat lortu ditugu. Egin diren entsegu funtzionaletatik (zaititze-tasa, ziklo zelularra, seneszentzia...), *NFI*(-/-) zelula-lerroarekin konparatuta, ez daude ezberdintasun estatistiko bereizgarririk. Gainera, pNF 3D ereduaren neurofibromaesferen protokoloa jarraituz, editaturiko zelula-lerro hauekin esferak sortu daitezke.

Hiru gene tumore supresoreen inaktibazioak, eta hauen orden espezifikoak (*NFI-CDKN2A-PRC2*) MPNST-en garapen prozesuan garrantzi handia dute. Gainera, MPNST-en genoma sakonki ikertu den kasuetan, *CDKN2A locus*-a guztiz inaktibatuta aurkitzen da translokazio baten ondorioz. Kasu errealetan bezala, guk laborategian soilik *NFI*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) iPS klonak lortu ditugu. P14ARF proteina funtzionala daukan zelula-lerroa editatzea lortzen badugu ere, klonak anplifikatzen goazen heinean, zaititzeari uzten diote. Hau da, neurofibroma atipikotik ezin da MPNST-a garatu *CDKN2A* genea guztiz inaktibatuz ez badago. Gainera, gene tumore supresoreen ordena (*NFI-CDKN2A-PRC2*) zentzu biologikoa daukala frogatzen dugu.

Beste alde batetik, pNF-ak eta aNF-ak osatzen dituzten zelulek NC-SC nortasuna daukate. MPNST-ak osatzen dituzten zelulek ordea, nortasun mesenkimala daukate. *SUZ12* genea guk sortutako iPS zeluletan editatzerakoan, gaitasun pluripotentea galdu eta espontaneoki ezberdintzen dira. Kasu guztietan, NC leinuko markatzaileak (p75 eta HNK1) zein MSC leinuko markatzaileak (CD73, CD44 eta CD13) adierazten dituzte. Nortasun mesenkimalaren zergatia PRC2-aren funtzioa galtzearen ondorioa dela frogatzen dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

MPNST-ak osatzen dituzten zelulen ezaugarri bereizgarrirenetarikoa bat berrantolaturiko genoma konplexuak dira. Laborategian sortutako *NFI*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula-lerroek ez daukate ezaugarri hori. Hiru gene tumore supresoreen edizioa ezegonkortasun genomikoa sortzeko nahikoa den ikertzeko, zelula-lerroak zahartuko ditugu bi hilabeteetan zehar etengabe kultibatuz eta aldaketa morfologikoak edota zaititze-tasan ezberdintasunak dauden ala ez frogatuz.

Beste aldetik, sortutako *NFI*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelulen nortasuna sakonago ikertzen dihardugu. Horretarako, zelulen adierazpenari, epigenetika eta kromatinaren egoerari buruz informazio gehiago ematen dizkiguten teknikak erabiliko ditugu. Modu honetan, tumore bakoitzak (pNF, aNF eta MPNST) errepresentatzen dituen genotipo zehatzeko zelula-lerroak beraien artean konparatuko ditugu hiru gene supresoreen edizioek nola eragiten duten ulertzeko.

Sortutako zelula-lerroek *in vivo* tumoreak sortzeko gaitasuna duten ikertu nahi dugu. Horretarako, pNF-ak ikertzeko dagoen 3D iPS zelulen eredu zein hiru geneak editatuta dauzkaten zelula-lerroentzako moldaturiko eredu aplikatuko dugu, eta immunoeskasia daukaten saguen nerbio ziatikoan txertatuko ditugu. Modu honetan *NFI*(-/-) *CDKN2A*(-/-) zelula lerroetatik aNF-ak lortzen badira eta *NFI*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula lerroetatik MPNST-ak hazten badira, bi tumore hauek ikertzeko *in vitro-in vivo* ereduak lortuko ditugu.

Azkenik, MPNST-ak garatzen dituzten gaixoentzat tratamenduren bat aurkitzeko lehenengo pausoak eman nahi ditugu. Horretarako hiru gene tumore supresoreetako bidezidorretan eragina daukaten farmakoak frogatuko ditugu 3D ereduari: *NFI*-arekin erlasionaturiko MEKi, CDK4/6i *CDKN2A* inaktibatuzko zelula-lerroetan, eta BETi edo farmako epigenetikoak PRC2 funtzionala ez den kasuetan.

6. Erreferentziak

Carrió, M, Mazuelas, H, Richaud-Patin, Y, Gel, B, Terribas, E, Rosas, I, Jimenez-Delgado, S, Biayna, J, Vendredy, L, Blanco, I, E Castellanos, E, Lázaro, C, Raya, A & Serra E (2019). Reprogramming captures the genetic

- and tumorigenic properties of Neurofibromatosis Type1 plexiform neurofibromas. *Stem cell Reports* 2019 12-3, pp.639-64 <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.001>
- Evans, DGR, Baser, ME, McGaughan, J, Sharif, S, Howard, E & Moran, A (2002). Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 39, 311-314. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.5.311>
- Magallón-Lorenz, M, Fernández-Rodríguez, J, Terribas, E, Creus-Batchiller, E, Romagosa, C, Estival, A, Perez Sidelnikova, D, Salvador, H, Villanueva, A, Blanco, I, Carrió, M, Lázaro, C, Serra, E & Gel, B (2021). Chromosomal translocations inactivating CDKN2A support a single path for malignant peripheral nerve sheath tumor initiation. *Hum Genet*. Aug;140(8):1241-1252. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02296-x>
- Magallón-Lorenz, M, Terribas, E, Ortega-Bertran, S, Creus-Bachiller, E, Fernández, M, Requena, G, Rosas, I, Mazuelas, H, Uriarte-Arazola, I, Negro, A, Lausova, T, Castellanos, E, Blanco, I, DeVries, G, Kawashima, H, Legius, E, Brems, H, Mautner, V, Kluwe, L, Ratner, N, Wallace, M, Fernández-Rodríguez, J, Lázaro, C, A. Fletcher, J, Reuss, D, Carrió, M, Gel, B & Serra E (2023). Deep genomic analysis of malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines challenges current malignant peripheral nerve sheath tumor diagnosis. *iScience* 26, 106096. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106096>
- Mazuelas, H, Magallón-Lorenz, M, Fernández-Rodríguez, J, Uriarte-Arazola, I, Richaud-Patin, Y, Terribas, E, Villanueva, A, Castellanos, E, Blanco, I, Raya, Á, Chojnacki, J, Heyn, H, Romagosa, C, Lázaro, C, Gel, B, Carrió, M & Serra, E (2022). Modeling iPSC-derived human neurofibroma-like tumors in mice uncovers the heterogeneity of Schwann cells within plexiform neurofibromas. *Cell Rep*. 15;38(7):110385. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110385>
- Miettinen, MM, Antonescu, CR., Fletcher, CDM., Kim, A, Lazar, AJ, Quezado, MM, Reilly, KM, Stemmer-Rachamimov, A, Stewart, DR, Viskochil, D, Widemann, B & Perry, A (2017). Histopathologic evaluation of atypical neurofibromatous tumors and their transformation into malignant peripheral nerve sheath tumor in patients with neurofibromatosis 1-a consensus overview. *Hum Pathol* 67, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.010>
- Zhang, X, Murray, B, Mo, G Shern, JF (2020). The role of Polycomb Repressive Complex in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. *Genes (Basel)*. 11(3):287. <https://doi.org/10.3390/genes11030287>

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi diot Tv3 Maratoia fundazioari, proiektu hau (51/C/2019) finantziatzeagatik eta Carlos III Osasun Institutoari (ISCIII), PFIS dirulaguntzarekin doktoretza egitea zaidalako. Ehunak eta tumoreak dohaintzan eman dizkiguten gaixo guztiei, *Afectados de Neurofibromatosis* asoziazioari eta AcNefi-ri, gure ikerketei eskainitako laguntzazagatik eta euskarria izateagatik. IGTP-ko Zitometria plataformari, bereziki Gerard Requerari, fluxu zitometrian lortutako informazio guztia ondo prozesatzeko eta irudikatze eskainitako laguntzazagatik. Proiektu honetan parte hartzen ari diren kolaboratzaile gutiei. Nire taldeari, Minbizi Hereditarioaren IGTP-ko taldeari, proiektu honetan eman diren aurrerapauso guztiak taldean egindako lan gogorraren ondorioa direlako. Batez ere, taldeko Helena Mazuelas doktoreari, lankide eta lagun paregabea izateagatik, laborategiko teknika ugari irakasteagatik eta bere doktoretzan pNF-ak ikasteko *NF1(-/-)* iPSC ereduak sortzeagatik. Eta azkenik, Eduard Serra eta Meritxell Carrió doktoreei, doktoretza ezin hobeto zuzentzeagatik eta edozein arazoren aurrean laguntza eskaintzeagatik.