



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: CRISPR/Cas9 como herramienta
natural de edición genética y su aplicación en el
tratamiento inmunológico del cáncer**

Autor: Teresa Sanz Portillo

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: Febrero

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
4. METODOLOGÍA.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
5.1. ANTECEDENTES EN EDICIÓN GENÉTICA	5
5.2. CRISPR, SISTEMA DE INMUNIDAD ADAPTATIVA BACTERIANO	7
5.2.1. Identificación complejo CRISPR/CAS.....	7
5.2.2. CRISPR/CAS como Sistema Inmunológico Adaptativo.....	8
5.2.2.1. Adquisición en CRISPR/Cas tipo II.....	9
5.2.2.2. Biogénesis del cr-RNA en CRISPR/Cas tipoII.....	10
5.2.2.3 Interferencia en CRISPR/Cas tipo II.....	10
5.2.2.4. Anti-CRISPR	12
5.3. COMPLEJOS DE INTERFERENCIA COMO HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÉTICA.....	12
5.3.1. Desafíos en el desarrollo de la tecnología CRISPR.....	12
5.3.2. Aplicaciones adicionales a la producción de DSB por CRISPR.....	14
5.3.3. Construcción y técnicas de inserción genética en CRISPR.....	15
5.4. CRISPR/CAS9 EN EL TRATAMIENTO INMUNOLÓGICO DEL CÁNCER. CART-CELLS	16
5.4.1. Introducción inmunológica.....	17
5.4.2. CAR T19 como tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda tipo B.....	18
5.4.3. Fundamentos CART19.....	19
5.4.4. Células universales <i>off-the shelf</i>	20
5.5. IMPLICACIONES ÉTICAS.....	21
6. CONCLUSIONES.....	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. RESUMEN

El reciente descubrimiento de un sistema de inmunidad adaptativa en procariotas constituido por repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats o CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR, proteínas Cas, ha provocado gran entusiasmo entre la comunidad científica, incluyendo campos como microbiología, biología del RNA y biotecnología, aunque no exclusivamente.

El sistema CRISPR-Cas se encuentra ampliamente extendido en los genomas de bacteria y archaea. Este locus otorga a los microorganismos un sistema de defensa frente a elementos genéticos invasores de forma específica. La inmunidad mediada por CRISPR-Cas incluye tres procesos fundamentales: la adquisición de espaciadores con información genética en una primoinvasión, la biogénesis y maduración de CRISPR RNA (crRNA) y por último la interferencia, en la que tras re exposición al agente invasor, se emplea la maquinaria formada previamente en la primoinvasión, para destruir el material genético extraño de manera eficaz y potente.

Estos tres procesos son esenciales para la inmunidad mediada por CRISPR y resultan de gran interés por sus aplicaciones biotecnológicas e industriales, dentro de las cuales se ha destacado la ingeniería genética de células T para el desarrollo de células CAR (chimeric antigen receptor) T que posean un receptor de antígeno quimérico dirigido a células tumorales.

2. INTRODUCCIÓN

Con la secuenciación del Genoma Humano en 2003 se dilucidó el código con el que está programado nuestro organismo y ahora, gracias a CRISPR, contamos con las herramientas necesarias para editar ese código con sencillez y rapidez.

El fenotipo de los organismos viene directamente determinado por su secuencia génica y por tanto, cada modificación o mutación del genoma posibilita la alteración en el correcto funcionamiento del mismo. Debido a ello, es de especial importancia el desarrollo de tecnología que aporte herramientas eficaces y sencillas en el ámbito de la edición genética, siendo CRISPR la mejor aproximación a este respecto.

La ingeniería genética mediante nucleasas de diseño se basa en los principios que regulan la reparación del material genético en los organismos, por lo que su entendimiento es de especial importancia a la hora de elegir qué estrategia llevar a cabo en la edición genética. (Salsman, 2017). El primer paso en su implementación consiste en la obtención de una rotura de doble cadena (DSB) en el locus de interés. Una vez producido el corte, se pone en marcha la maquinaria celular de reparación del daño en el DNA (Urnov, 2010), existiendo dos vías para llevar a cabo este cometido: la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la vía de reparación directa por homología (HDR). Dependiendo de la presencia o ausencia de un molde de reparación, se seguirá una u otra vía y, por lo tanto, se conseguirán diferentes resultados de edición genética. Además ha de tenerse en cuenta que la NHEJ resulta menos precisa pero más eficaz mientras que HDR presenta más precisión pero menos eficacia y dependencia del estado del ciclo celular. (Salsman, 2017)

En ausencia de molde de reparación, se sigue la vía propensa a errores (NHEJ). En ella, tras la rotura DSB, los dos fragmentos resultantes son religados produciéndose inserciones o deleciones que, si se producen en el exón diana, pueden provocar *knock-outs* y/o aparición de codones de terminación prematuros.

En el caso contrario, para la activación de la vía HDR de reparación del DNA, se introduce exógenamente un molde con la secuencia diana que lleve incorporadas las modificaciones deseadas. El patrón empleado puede presentarse tanto en forma de DNA bicatenario o como oligonucleótido monocatenario, siendo necesario en ambos la presencia de homología con la secuencia en el DNA diana que flanquea la secuencia de inserción. (Agarwala, 2013)

Una de las ramas médicas en la que la herramienta de edición genética CRISPR suscita más interés es la oncología. Años atrás, las enfermedades infecciosas eran consideradas la primera causa de muerte en el mundo occidental. Sin embargo, esta tasa de mortalidad ha ido disminuyendo de manera paralela al aumento de la misma por cáncer.

Si analizamos el cáncer dentro de una perspectiva inmunológica, las células cancerígenas pueden considerarse como células propias alteradas que han escapado a los mecanismos normales de regulación del crecimiento (Goldsby, 2007). Por tanto, el uso de tratamientos que logren restaurar o intensificar la capacidad del sistema inmune se presenta actualmente como uno de los enfoques más prometedores. En este trabajo se ejemplifica el empleo de inmunoterapia en el tratamiento del cáncer a través de la estimulación de las actividades de componentes específicos del sistema inmunitario, en nuestro caso, células T, gracias a la modificación de las mismas mediante técnicas de edición genética.

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este estudio son:

- Comprender el mecanismo de acción de CRISPR/Cas como sistema de inmunidad adaptativa para bacterias y archaea.
- Obtener una visión de los desafíos tecnológicos en la implementación de CRISPR/Cas9 en la práctica clínica.
- Abordar el amplio abanico de posibilidades generadas del desarrollo de la tecnología CRISPR.
- Aplicar el conocimiento de CRISPR como herramienta de edición genética en la terapia inmunológica del cáncer mediante CART CELLS
- Valorar las implicaciones éticas en el empleo de CRISPR.

4. METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los estudios publicados en las bases de datos “PubMed” (NCBI), “Medline” y “Google Scholar”. Además se ha revisado libros de texto de Biología Molecular e Inmunología en formato online y/o papel. Por último, se consultaron diferentes webs institucionales (OMS, FDA, EMA, AEMPS, Ministerio de Sanidad) y webs de organismos especialistas en la investigación del cáncer (National Cancer Institute, Fundación Jusep Carreras).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ANTECEDENTES EN EDICIÓN GENÉTICA

La capacidad de editar y modificar de manera precisa el genoma abre un sinfín de posibilidades para investigar las propiedades de los sistemas vivos así como para avanzar en técnicas médicas y en aplicaciones de bioingeniería. (Kolomeisky, 2017). Las tecnologías de edición genética han evolucionado rápidamente permitiendo un acercamiento en la obtención de un mecanismo que permita alterar el genotipo y fenotipo de los organismos con eficacia, especificidad y con el menor número de efectos colaterales. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, todavía no se ha logrado desarrollar una herramienta que cumpla en su totalidad estos requisitos.

Las primeras aproximaciones a este respecto llegaron de la mano del descubrimiento de la vía endógena de reparación del ADN por recombinación homóloga, que permitía su uso para el remplazo de una pequeña porción de genoma endógeno por una secuencia, con homología al DNA diana, de DNA de un donador exógeno (figura 1). El uso de esta técnica de manera espontánea resultó tener baja eficacia y un alto número de resultados colaterales de edición genética no deseados.

El siguiente paso para superar las limitaciones mencionadas vino dado por el empleo de nucleasas que producían cortes de doble cadena, activándose así los mecanismos de reparación del DNA y con ello incrementando la posterior incorporación de DNA por recombinación homóloga. A pesar de que este avance incrementó la tasa de éxito, dos obstáculos seguían produciendo bajas magnitudes de eficacia; en primer lugar la existencia de un camino alternativo de reparación de roturas de doble cadena, mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que incluso se produce de manera más eficaz que la recombinación homóloga, y que deriva en inserciones y deleciones fortuitas que disminuyen la precisión de la técnica. En segundo lugar la probabilidad de que la nucleasa produzca cortes en el lugar deseado es baja, para abordar este aspecto, los investigadores emplearon nucleasas dirigidas: nucleasas de dedos de Zinc (ZFN) y nucleasas tipo activador de la transcripción (TALEN).

Finalmente, la revolucionaria técnica CRISPR/Cas ha dejado atrás a sus predecesoras superando la necesidad de las anteriores de rediseñar mediante ingeniería cada proteína de unión a DNA con cada secuencia diversa de DNA diana, limitándose en el caso de CRISPR/Cas a la obtención de una secuencia de RNA guía apropiada a cada DNA blanco (figura 1).⁴

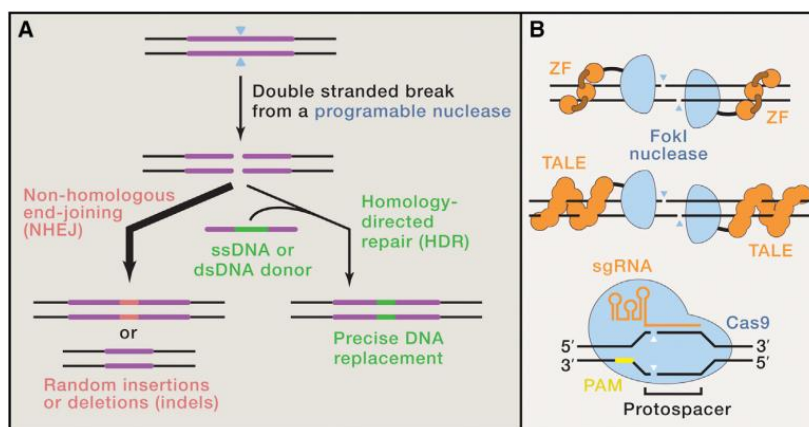


Figura 1. EDICIÓN GENÉTICA POR ROTURA DE DOBLE CADENA. Komor A.C, Badran A.H, Liu D.R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. Cell 168:21. January 2017

5.2 CRISPR, SISTEMA DE INMUNIDAD ADAPTATIVA BACTERIANO

5.2.1. Identificación complejo CRISPR/CAS

La investigación del genoma de procariotas ha aportado grandes herramientas para el estudio de las plantas, animales y del propio ser humano, sirviendo de sustrato sobre el que construir nuevas hipótesis. Un claro ejemplo ha sido el descubrimiento del sistema CRISPR-Cas, un complejo hereditario de inmunidad adaptativa para bacterias y archaea.

En 1989, Francisco Juan Mojica comenzó a formar parte del grupo de Microbiología de la Universidad de Alicante, integrándose en una tesis cuyo objetivo era desvelar la expresión de genes dependiente de salinidad, sin embargo, simultáneamente, otro grupo de investigación produjo los mismos resultados que se estaban buscando por el grupo de Mojica, por lo que su investigación giro de orientación hacia la búsqueda de regiones genéticas no caracterizadas de *Haloferax mediterranei*, encontrando un inesperado patrón de segmentos de DNA, de unas 30 pares de bases de longitud, que eran repetidos en distancias regulares. A pesar de que estas repeticiones regulares no habían sido encontradas anteriormente en *archaea*, estructuras similares habían sido observadas en el cromosoma de *Escherichia coli* y de *Mycobacterium spp*. En ese momento a estas repeticiones les asigna una supuesta función en el reordenamiento cromosómico y en la regulación de genes próximos. La mejora de las técnicas de secuenciación genética, que permitió la primera secuenciación completa de un genoma bacteriano “libre” en 1995, y con ella, años después, los datos adicionales de genomas de procariotas derivó en el descubrimiento de las regiones repetidas en otras 12 especies de bacterias y archaea llevando a la denominación de estos dominios como SRSR del inglés *Spacer-Repeat-Spacer-Repeat*, aunque posteriormente se le asignaron otros nombres hasta que finalmente fue acuñado como CRISPR , *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*.

En el 2002, cuatro genes que codificaban proteínas asociadas a CRISPR, proteínas Cas, fueron identificados en locus cercanos. La clave para resolver la unión entre estos dos sistemas llegó con el descubrimiento de la procedencia de las secuencias espaciadoras, que hasta ese momento permanecía desconocido. El análisis de las estructuras de CRISPR procedentes de cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus vestibularis* confirmó la homología entre espaciadores y elementos extracromosómicos (Bolotin, Quinkis, Sorokin, & Ehrlich, 2005) . El último paso en el descubrimiento de este complejo sistema era averiguar el por qué de toda esta maquinaria, utilizando para ello cuatro microorganismos representativos

y llegando a la conclusión definitiva de la presencia de las secuencias espaciadoras en elementos móviles que infectaban a la célula procariota ineficientemente: fagos y plásmidos ⁵

5.2.2. CRISPR/CAS como Sistema Inmunológico Adaptativo.

CRISPR/Cas es un complejo altamente expandido en bacteria y archaea que media una respuesta inmunitaria adaptativa ante la presencia de ácidos nucleicos invasores de origen desconocido. La región CRISPR está constituida por dos elementos: segmentos repetidos, de aproximadamente 20-50 pares de bases y espaciadores de la misma longitud, que son únicos y representan los segmentos adquiridos de DNA extraño.

El CRISPR/Cas actúa de forma general mediante tres etapas. En primer lugar acontece el estadio de adquisición, en el cuál la célula identifica, procesa e incorpora el DNA ajeno, conocido como protoespaciador, como un nuevo espaciador en el locus CRISPR. Posteriormente, en una segunda etapa, se produce la transcripción del locus CRISPR, obteniéndose un primigenio pre-crRNA que, tras someterse a procesamiento y maduración, se transformará en cr-RNA. En último lugar, un complejo efector, constituido por cr-RNA y por proteínas Cas colaboradoras, funciona como guía para el anclaje al DNA foráneo para una posterior rotura de sus cadenas (Figura 2) (Deveau, Garneau, & Moineau, 2010).

Este sistema funciona análogamente al sistema de inmunidad adaptativa en vertebrados, mediante la generación de memoria inmunológica con objeto de obtener una rápida y potente respuesta tras una posterior exposición al mismo agente infeccioso (Doudna, Nuñez, & Wright, 2016)

Los sistemas CRISPR/Cas pueden ser clasificados en tres tipos distintos, con subclasificaciones internas a cada tipo en función de la presencia de un juego distintivo de proteínas Cas, asociadas a cr-RNA, para la interferencia por CRISPR (Charpentier, 2013). CRISPR/Cas tipo II supera en sencillez al tipo I y tipo III gracias a la necesidad de una única proteína, Cas9 endonucleasa, para reconocer la doble hélice de DNA y unirse a cada cadena mediante un dominio distinto nucleasa, HNH o RuvC (Makarova, 2015) , por ello, ha sido el sistema que primero se ha adaptado para su uso en edición del genoma de células eucariotas. (Cong, 2013)

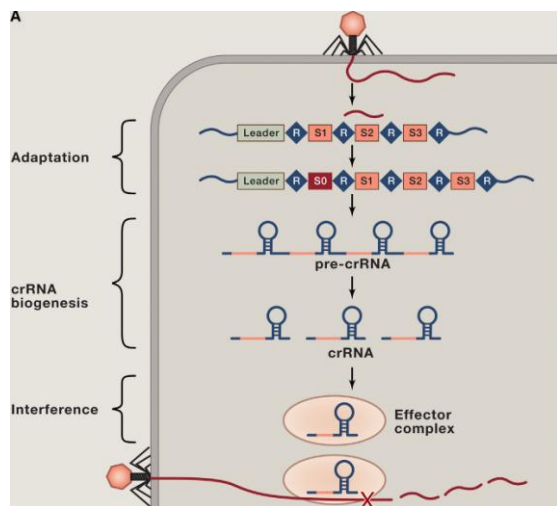


Figura 2. FUNCIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS SISTEMAS CRISPR. Doudna, J.A; Nuñez, J.K; Wright, A.V. *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering*. Cell164:30.2016

5.2.2.1. Adquisición en CRISPR/Cas tipo II.

La selección de protoespaciadores no se encuentra del todo esclarecida y difiere entre los distintos tipos de complejo efector. Centrándonos en CRISPR/Cas tipo II, se puede a su vez dividir tres tipos de modelos de adquisición: IIA, IIB y IIC dependiendo de la presencia o ausencia de diversos genes Cas como factores colaboradores a un conjunto común mínimo de proteínas Cas1, Cas2 y Cas9. En el tipo IIA está presente Csn2 mientras que en tipo IIB, subtipo menos frecuente, se encuentra Cas4. Por su parte, en el tipo IIC, no existe ninguna proteína adicional.

El mecanismo más probable en los sistemas Tipo II se inicia con un primer reconocimiento de una secuencia adyacente al protoespaciador en el DNA invasor, conocida como secuencia PAM (protospacer adjacent motif), por parte de Cas9. De esta forma quedaría “marcada” como potencial espaciador a ser incorporado.

Posteriormente, el complejo Cas1-Cas2, reconoce la secuencia previamente señalizada por Cas9 y actúa como integrasa, adquiriendo el protoespaciador, que flanquea al PAM marcado, como un nuevo espaciador en el locus CRISPR. El mecanismo de integración comienza con la formación del complejo Cas1-Cas2-Protoespaciador, el cual reconoce la repetición adyacente a la secuencia líder en el locus CRISPR (repetición 1) y cataliza dos reacciones de transesterificación. En ellas, el grupo hidroxilo en 3' de cada cadena del protoespaciador realiza un ataque nucleofílico hacia el segmento repetido 1, produciendo dos ataques al mismo: uno en la posición adyacente al líder y el otro contiguo al espaciador 1. Estas dos reacciones culminan con la formación de un “hueco” que, tras ser posteriormente reparado, culmina con la duplicación del segmento repetido. (Figura 3).⁶

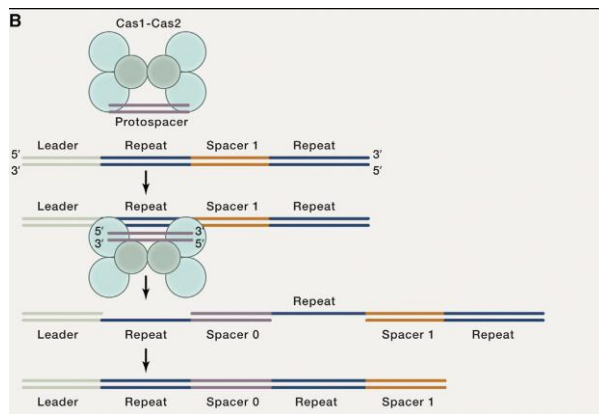


Figura 3. INTEGRACIÓN PROTOESPACIADOR. Doudna, J.A; Nuñez, J.K;Wright, A.V. *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering.* Cell164:30.2016

5.2.2.2. Biogénesis del cr-RNA en CRISPR/Cas tipoII.

Durante esta segunda etapa, el locus CRISPR con los espaciadores recién adquiridos se transcribe a una molécula de CRISPR RNA precursor (pre-crRNA). Posteriormente, este pre-crRNA es sometido a un procesamiento para dar lugar a pequeñas moléculas de crRNA maduro, que estarán formados por una única secuencia espaciadora flanqueada por una región repetidora. (Charpentier, 2013)

En los sistemas tipo II el procesamiento a crRNA se vale de dos herramientas. En primer lugar una molécula de RNA no codificante, tracrRNA, forma un complejo con el transcrito pre-crRNA a través de complementariedad de bases y se estabiliza por la presencia de Cas9. El gen que codifica tracrRNA se localiza en la proximidad o dentro del locus CRISPR-Cas.

Por otro lado, se requiere una RNAsa III, que va a reconocer el dúplex precrRNA-tracrRNA, y va a llevar a cabo el procesamiento. Este punto difiere entre los diferentes tipos de sistema CRISPR, requiriéndose en los tipo I y III la presencia de Cas ribonucleasas del propio sistema CRISPR para llevar a cabo esta función.^{7 8}

5.2.2.3 Interferencia en CRISPR/Cas tipo II

Para la obtención de cortes en DNA exógeno por CRISPR entran en acción varios elementos del propio sistema, por lo que es necesario abordar su organización individual para poder comprender el proceso en conjunto.

El pilar del sistema recae en Cas9. Esta proteína presenta una estructura bilobular constituida por un lóbulo de reconocimiento del RNA guía (REC) y un lóbulo nucleasa (NUC). A su vez, el lóbulo NUC presenta un dominio RuvC, otro HNH y, por último, un dominio de interacción con la secuencia PAM, llamado PI. Los dominios, HNH y RuvC, cortan

respectivamente la hebra del DNA diana complementaria al RNA guía y la no complementaria al RNA guía. Además, el dominio PI reconoce la secuencia PAM en la hebra no complementaria en el DNA diana. El ensamblaje tridimensional de esta proteína crea, en última instancia, una superficie con carga positiva que será importante para su posterior anclaje a la superficie negativa del sgRNA (crRNA:tracrRNA) (Figura 4) (Nishimasu, 2014)

Por otro lado el sistema guía es otro elemento funcional de relevancia. Como se ha mencionado anteriormente, la naturaleza de este componente es la de un hetero- dúplex de RNA constituido por crRNA y tracrRNA. La función del crRNA es ligarse, por complementariedad de bases, al protoespaciador del DNA diana a lo largo de veinte nucleótidos. A su vez, en el extremo 3' de estos veinte nucleótidos del protoespaciador, se encuentra una repetición que aparea con el tracr-RNA, formando una horquilla característica.

El tracr-RNA presenta un papel fundamental en la unión a Cas9 y en la generación de una conformación adecuada para el apareamiento de crRNA al protoespaciador.

Aunque este sea el mecanismo natural de acción de CRISPR-Cas, en los procesos de edición genética, que trataremos más adelante, se tiende a la simplificación de la maquinaria fusionando en una quimera a tracrRNA y crRNA y dando lugar así al denominado sgRNA.

La secuencia PAM se compone de una serie de nucleótidos en la región 3' de la hebra no complementaria al RNA guía, en la proximidad de la secuencia diana en el DNA exógeno. Su importancia radica en que resulta el primer elemento de reconocimiento para Cas9. Esta unión provoca la separación de las dos hebras y, en último lugar, la maquinaria rastreará el código genético corriente arriba hasta encontrar la secuencia diana y cortarla.

Con todo esto, el mecanismo de interferencia propuesto se iniciaría con colisiones al azar con el DNA, disociándose CRISPR rápidamente en ausencia de secuencia PAM. Esta sencilla discriminación sirve como sistema de seguridad que evita la unión de CRISPR a secuencias endógenas de la célula, *self-targeting*, debido a la ausencia en estas de secuencia PAM (Sternberg, 2014)

Tras encontrar y unirse a la secuencia PAM, se inicia una desestabilización de la secuencia adyacente con objeto de permitir la unión entre la secuencia guía del crRNA y el protoespaciador diana, acomodándose en este proceso el RNA guía en el surco de carga positiva generado entre los lóbulos REC y NUC. En último lugar, reorganizaciones tridimensionales activan la actividad catalítica nucleasa de HNH y RuvC que permite llevar a cabo el corte de doble cadena (DSB). (Doudna, Nuñez, & Wright, 2016)

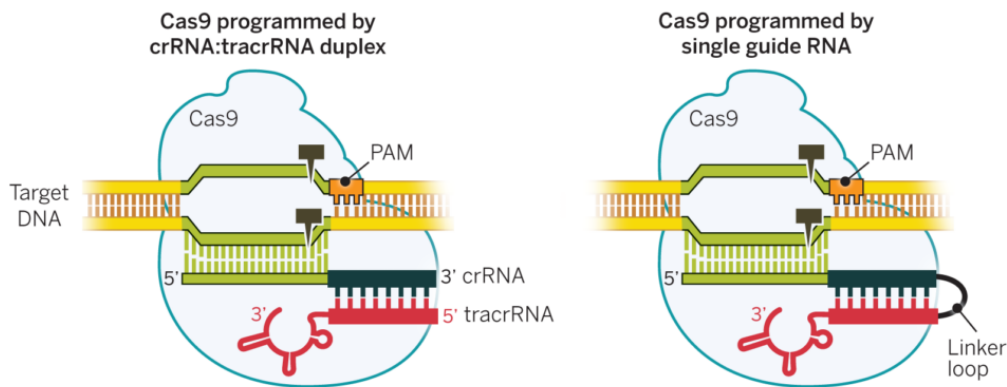


Figura 4. EVOLUCIÓN Y ESTRUCTURA DE CAS9. Charpentier, E., Doudna, J.A. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346. 2014

5.2.2.4. Anti-CRISPR.

Como se ha descrito, las bacterias han desarrollado mecanismos para defenderse de elementos genéticos móviles (MGE) invasores, como es el caso de CRISPR-Cas. Sin embargo, en respuesta a esto, los MGE han evolucionado, obteniendo mecanismos de resistencia a CRISPR. A día de hoy se han descrito veintiún familias de proteínas anti-CRISPR, sin haberse observado secuencias conservadas características entre estas.

El conocimiento de estas proteínas puede abrir nuevas puertas en aplicaciones biotecnológicas, ya que, el empleo del complejo CRISPR-Cas desactivado por proteínas anti-CRISPR permite el anclaje del sistema a la secuencia de DNA diana pero sin obtener el subsiguiente corte de doble cadena. Este hecho es aprovechado para impedir la transcripción de esa secuencia diana por impedimento estérico para la acción de enzimas implicadas en la transcripción, como la RNA polimerasa. (Davidson, 2017)

5.3. COMPLEJOS DE INTERFERENCIA COMO HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÉTICA.

5.3.1. Desafíos en el desarrollo de la tecnología CRISPR.

CRISPR-Cas9 se ha convertido rápidamente en la herramienta de edición genética más prometedora, con un gran potencial para revolucionar la medicina. Uno de sus puntos fuertes es el hecho de que a través del diseño de un único híbrido quimérico de RNA, sgRNA, que auna en una única estructura la función natural de crRNA y tracrRNA, CRISPR- Cas9 encuentra y produce un corte en una secuencia diana. Sin embargo, aún existen algunas limitaciones que han de ser superadas.

Potenciación vía HDR

Como hemos explicado anteriormente, las actuales herramientas de edición genética dependen de la maquinaria de reparación del DNA para introducir tanto pérdidas de funcionalidad como modificaciones precisas. A pesar de que Cas9 puede producir inserciones o deleciones vía NHEJ con alta eficacia, la tasa de éxito en la vía HDR permanece relativamente baja, por tanto, se requieren nuevos métodos para estimular esta última vía o estrategias alternativas de inserción genética. (Hsu, 2014)

Efectos *off-target*

Uno de los retos más importantes a día de hoy se basa en reducir o evitar la actividad *off-target* en secuencias con homología a la diana, de especial relevancia en su implementación en la práctica clínica. Precisamente es el hecho de que solo se requiera para su puesta en marcha de la presencia de un único sgRNA de veinte nucleótidos lo que crea el mayor desafío a superar. Esto es debido a la posibilidad de su unión a otras localizaciones genómicas, incluso únicamente con complementariedad parcial a las mismas. (Zhang, 2016). Para abordar este problema se pueden emplear numerosas estrategias como crear estructuras secundarias en sgRNA que inhiban las interacciones no-diana, modificar la longitud de los sgRNA, o por ejemplo modificar Cas9 para que actúe como “nickasa”, de tal forma que sólo genere corte en una de las cadenas de DNA. El fundamento de la generación de Cas9 nickasas se basa en la posibilidad de desactivar uno de los dominios nucleasa de Cas9: HNH o RuvC, de tal forma que si se introducen dos nickasas, cada una con un dominio nucleasa diferente activo y, cada una asociada a una secuencia guía diferente, la región que debe ser identificada por complementariedad resulta mucho mayor y se consigue así reducir apareamientos indeseados (Yang, 2014).

Otro último enfoque en la reducción *off-target* consiste en el estudio de los requerimientos estructurales para el reconocimiento de PAM por parte de Cas9, gracias al cual se podrá llegar a un diseño de estas proteínas con mayor especificidad. (Sampson, 2014)

Las consecuencias de estos efectos colaterales en medicina son inaceptables. Un claro ejemplo a este respecto se puede observar en un artículo publicado en junio de este año en la revista *Nature*. En él se menciona la posibilidad de haber creado cientos de mutaciones fortuitas a ratones como consecuencia de su tratamiento con CRISPR (Schaefer, 2017). Sin embargo, críticos con este artículo han cuestionado esta primera interpretación, argumentando que la aparición de cambios aislados en nucleótidos dentro de toda la secuencia de dos ratones

tratados con CRISPR puede no deberse al propio tratamiento con CRISPR, sino a variaciones genéticas habituales.^{11 12 13}

Restricción mediada por PAM

La actividad de CRISPR-Cas9 está directamente condicionada por la presencia de la secuencia PAM, existiendo amplia variedad tanto en composición como en extensión en esta secuencia entre diferentes especies de bacteria. Cada tipo de PAM determina la frecuencia de corte para un genoma determinado. Ninguno de los PAM identificados hasta ahora, ni siquiera una combinación de todos ellos, puede cubrir la totalidad de las secuencias genómicas, lo que puede restringir el uso de esta tecnología (Adikaram, 2016).

Variaciones en la eficacia.

La eficacia de CRISPR varía ampliamente dependiendo de la composición en nucleótidos y del contexto genético de PAM en el DNA diana así como de la estructura secundaria del sgRNA. Sin embargo, a día de hoy no contamos con los medios bioinformáticos necesarios para predecir las tasas de éxito para cada sgRNA asociado a CRISPR/Cas9 (Adikaram, 2016).

Mutaciones en múltiples genes por CRISPR.

Un sello de identidad de CRISPR-Cas9 es su capacidad para unirse a diferentes secuencias diana en paralelo por medio de un pre-crRNA que contenga varios espaciadores dentro de un complejo individual de RNA guía. El aprovechamiento de este aspecto puede permitir la generación de múltiples modificaciones simultáneas, empleando estrategias como la coexpresión de *arrays* CRISPR que contengan espaciadores enfocados en diversos genes o una batería de varios sgRNA juntos con una proteína Cas9. (Hsu, 2014). Una aplicación a este enfoque sería su empleo en el entendimiento de procesos patológicos en los que subyace una alta variedad de genes con mutaciones, como por ejemplo, el desarrollo de un tumor. (Hsu P. L., 2014)

5.3.2. Aplicaciones adicionales a la producción de DSB por CRISPR.

La primera utilidad biotecnológica empleada en CRISPR se basó, como hemos comentado, en la creación de roturas de doble cadena. No obstante, en los últimos años se ha comprobado que el abanico de posibilidades de CRISPR es mucho mayor.

Uno de los planteamientos llevados a cabo por investigadores consiste en la desactivación de uno o ambos dominios nucleasa en Cas9 y, tras ello, la introducción de nuevas actividades enzimáticas en la misma. De esta manera, Cas9 puede ser empleada para transportar estas

enzimas a una diana específica del DNA. Un ejemplo podría ser la fusión de Cas9 con una enzima desaminasa, cuya función es la modificación específica de bases en el DNA (*Base editing*). Este tipo de modificación tan precisa abre la posibilidad de modificar un gen causante de una enfermedad a una versión correcta del mismo o la introducción de un codón de parada en un punto específico de la secuencia.

Por otro lado, alejándose de su empleo en edición genética, algunos laboratorios han empleado CRISPR para promover la transcripción de genes. Para ello, desactivan Cas9 completamente, dCas9, de tal forma que pierda ambos dominios de rotura del DNA. En su lugar, bajo esta utilización, se añaden activadores de la transcripción a la proteína desactivada o incluso al RNA guía, reclutando así RNA polimerasa y otros factores a la secuencia seleccionada para aumentar la transcripción de ese gen (CRISPRa). El mismo principio es aplicable al silenciamiento de genes (CRISPRi). Un dominio KRAB ligado a Cas9 inactiva la transcripción por atracción de factores que bloquean el gen físicamente.

Otra posibilidad es adjuntar proteínas fluorescentes al complejo (*CRISPR imaging*) de tal forma que permita conocer el lugar que ocupa un gen determinado dentro del DNA. Una posible utilidad a este respecto es dilucidar la estructura tridimensional del genoma o marcar un cromosoma entero para seguir su posición en el núcleo. (Nature Methods)

5.3.3. Construcción y técnicas de inserción genética en CRISPR.

Para llevar a cabo edición genética por CRISPR-Cas9 se siguen, a día de hoy, tres estrategias. La primera y con un enfoque más directo es el empleo de plásmidos que codifiquen Cas9 y el sgRNA en el mismo vector, evitando así múltiples transfecciones. La segunda estrategia se basa en la introducción de una mezcla de mRNA de Cas9 y sgRNA. El tercer y último planteamiento consiste en la inserción de proteína Cas9 junto a sgRNA.

El sistema basado en el uso de plásmidos evita múltiples transfecciones y además presenta mayor estabilidad que el sistema que combina mRNA de Cas9 junto a sgRNA. Dos ejemplos de sistemas basados en esta estrategia sería el uso de pX260 o pX330. En ambos, los vectores son digeridos por enzimas de restricción y posteriormente unidos a oligonucleótidos diseñados para su unión a una diana concreta. Sin embargo, este sistema presenta inconvenientes. En primer lugar, el plásmido debe llegar al núcleo, hecho generalmente difícil. En segundo lugar, el plásmido necesita ser traducido a mRNA Cas9 dentro de la célula, requiriendo más tiempo para llevar a cabo la edición genética. Por otro lado, la entrega basada en plásmido produce mayor número efectos colaterales.

El suministro directo del mRNA de Cas9 y sgRNA presenta la ventaja de la disminución del tiempo necesario para la edición genética. Además, se generan menos efectos colaterales y no se requiere la entrada al núcleo, sino únicamente al citoplasma para ejercer sus efectos. Sin embargo, cuenta con la desventaja de su baja estabilidad.

La estrategia más ampliamente estudiada es la transfusión directa de la proteína Cas9 cargada positivamente en complejo con sgRNA, llamado Cas9/sgRNA ribonucleoproteína (RNPs). Como ventajas se debe destacar su rápida acción y eficacia así como la disminución de efectos colaterales, toxicidad y respuesta inmunitaria.

En adición a lo mencionado, se debe plantear qué técnica de inserción genética resulta más apropiada para una posible comercialización de esta tecnología en su aplicación clínica. Los métodos físicos, no virales, como pueden ser electroformación, nanopartículas, microinyección, etc., presentan como principal ventaja su seguridad de uso, además de la ausencia de limitación en el tamaño del material genético contenido. A pesar de ello, su baja eficacia limita su uso *in vivo*, siendo desplazados por vectores virales (Retrovirus, Lentivirus, Adenovirus) que han sido usados de manera eficaz desde hace décadas. Sin embargo, estos vectores virales pueden inducir respuesta inmunitaria y mayor tasa de efectos colaterales.¹⁵

5.4. CRISPR/CAS9 EN EL TRATAMIENTO INMUNOLÓGICO DEL CÁNCER. CART-CELLS

Durante años, los pilares en el tratamiento del cáncer han sido cirugía, quimioterapia, y radioterapia. En las últimas dos décadas, el empleo de fármacos dirigidos a dianas moleculares que presentan modificaciones diferenciales en células cancerígenas se ha consolidado. Si bien no ha sido hasta hace pocos años que la inmunoterapia, cuyo objetivo es emplear y fortalecer el propio poder del sistema inmune del paciente para atacar tumores, ha entrado como alternativa terapéutica.

El enfoque emergente en el campo de la inmunoterapia es el denominado ACT, del inglés *adoptive cell transfer*, cuya base es la recolección y uso de las propias células del paciente en terapia contra el cáncer. Dentro de este tipo de terapia la aproximación más relevante es la terapia con células CAR T (CAR T Cells: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers, 2017). El fundamento de las células CAR T es la modificación, mediante edición genética, de linfocitos T para provocar la expresión en la superficie de los mismos de un receptor de antígeno quimérico que redirija la especificidad de estas células. Esta terapia

empleada en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda tipo B ha resultado el primer tratamiento de terapia génica aprobado por la FDA. ¹⁷

5.4.1. Introducción inmunológica

El linfocito T es una célula con un papel primordial en el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa, caracterizándose por la presencia en su superficie de un receptor, denominado TCR, capaz de reconocer complejos formados por péptidos antigénicos ligados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y presentados por células endógenas denominadas células presentadoras de antígeno (APC) con objeto de iniciar una vía de señalización capaz de provocar una respuesta efectora y de memoria contra el antígeno presentado.

Los linfocitos T reconocen antígenos a través de TCR, receptor organizado en heterodímeros, que permite su división en dos subpoblaciones:

- TCR-2: compuesto por una cadena α y una cadena β , mayoritario en las células T del ser humano.
- TCR-1: compuesto por una cadena γ y una cadena ζ

EL TCR-2 es homólogo al fragmento Fab de inmunoglobulina: presenta dos cadenas polipéptidicas α y β unidas por puentes disulfuro. A su vez, cada cadena, contiene un dominio variable aminoterminal responsable de la especificidad del TCR y un dominio constante.

El TCR se asocia a proteínas CD3 para la trasducción de señales tras la unión con el antígeno gracias a la existencia de un elemento en la cola citoplasmática de CD3 denominado motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM).

De forma resumida podríamos decir que el acontecimiento que dispara la cascada de activación en células T vírgenes es el reconocimiento por TCR de complejos de MHC y péptido en células presentadoras de antígeno. Esta interacción sumada a la acción de respuestas activadoras provoca el inicio de una vía de señalización que culmina con la entrada de las células T en reposo en fase de división, en su proliferación y diferenciación a células efectoras o de memoria.

Como hemos mencionado en el párrafo anterior, para obtener la activación completa de células T vírgenes se requiere señales coestimuladoras:

- Señal 1, generada por la interacción entre el complejo antigénico y TCR-CD3

- Señal 2 coestimuladora, principalmente ocasionada por la interacción de CD28 en células T con moléculas de la familia B7 de la célula presentadora de antígeno (CD80 y CD86)

Estas señales estimulan la entrada de la célula T en la fase G_1 del ciclo celular y su diferenciación en diversas células T efectoras especializadas tanto en secreción de citoquinas y colaboración con células B (células T_h $CD4^+$ activadas) como en actividad citotóxica destructura (CTL $CD8^+$). También existe diferenciación a células T de memoria latentes, de vida prolongada y que responden con reactividad muy elevada ante un contacto ulterior.¹⁸

5.4.2. CAR T19 como tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda tipo B.

Todas las células sanguíneas provienen de una célula madre hematopoyética con capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares en el seno de la médula ósea. Esta diferenciación irá ligada a la adquisición del grado de madurez requerido para poder cumplir su función fisiológica. Una célula madre sanguínea puede convertirse en célula madre mieloide o linfoide. Si en un primer momento se diferencia a línea linfoide, proseguirá su maduración hasta llegar al estadio de linfoblasto y posteriormente sufrirá transformaciones que culminarán con la formación de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales (Instituto Nacional del Cáncer, 2017) (Figura 5). La leucemia linfoblástica aguda o LLA tipo B es un cáncer de la sangre en el que se producen cantidades anormalmente altas de células inmaduras en la línea linfoide, específicamente en los precursores de linfocitos B. Estas células cancerosas invadirán los tejidos linfáticos, la sangre y la médula ósea (Fundación Josep Carreras., 2017)

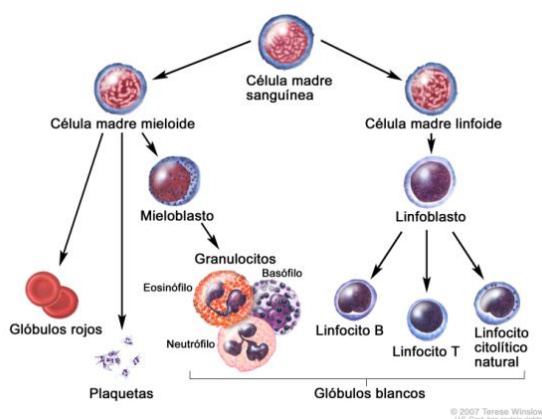


Figura 5. EVOLUCIÓN DE UNA CÉLULA SANGUÍNEA.
Sitio web del Instituto Nacional del Cáncer
(<https://www.cancer.gov/espanol>).2017

Los pilares en el tratamiento de LLA son quimioterapia, terapia dirigida y trasplante de células madre (American Cancer Society, 2017). En el caso de LLA tipo B que curse con recaída o LLA refractaria al tratamiento, el empleo de células CART dirigidas al antígeno de

superficie de linfocitos B, CD19, ha demostrado generar remisión en más del 90% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda y, además, actividad clínica significativa en más de un 50 % de pacientes con leucemia linfoblástica crónica refractaria. Estos resultados han sustentado su aprobación por parte de la FDA, KYMRIAH®, convirtiéndose en punto de referencia para posteriores aprobaciones en el ámbito de la Terapia Génica. (June, 2017)

Como hemos mencionado anteriormente, esta novedosa terapia inmunocelular utiliza las células T del propio paciente para combatir el cáncer. Para ello, se recogen las células T del paciente y se modifican genéticamente en el laboratorio para que expresen la proteína que dirige estas células específicamente hacia el antígeno de superficie CD19 de linfocitos y células precursoras B. En un último paso, se transfunden de nuevo las células ya modificadas. (U.S. Food and Drug, 2018)

5.4.3. Fundamentos CART19.

La idea subyacente a esta innovadora terapia de las enfermedades malignas hematológicas consiste en el diseño de una proteína sintética, el receptor de antígeno quimérico CAR, con objeto de redirigir la acción de las células T hacia las células cancerígenas.

La estructura básica de CAR consiste en un dominio extracelular de unión a antígeno y un dominio intracelular de señalización. El dominio de reconocimiento de antígeno tiene naturaleza scFv y procede de un anticuerpo monoclonal. Su función es ligar con el antígeno asociado a tumor (TAA), siendo este CD19 para LLA tipo B. Por su parte, la región intracelular incorpora dominios de señalización necesarios para la activación celular. Las células CAR de primera generación, únicamente buscaban alcanzar la señal 1 de activación y por ello incluían como dominio intracelular una cadena ζ CD3 procedente del complejo TCR-CD3, mostrando baja eficacia en ensayos clínicos. Como fue comentado en la introducción inmunológica, el sistema natural del TCR requiere de señales coactivadoras para una correcta activación de los linfocitos T, y por ello, se implementó la idea añadiendo dominios cooperadores a los CAR de primera generación, comúnmente CD28 o 4-1BB en CAR de segunda generación. La última mejora ha llevado a CAR con dos dominios intracelulares coestimuladores, CAR de tercera generación (CD3 ζ /CD28/4-1BB). (FIGURA 6) (Brentjens, 2016)

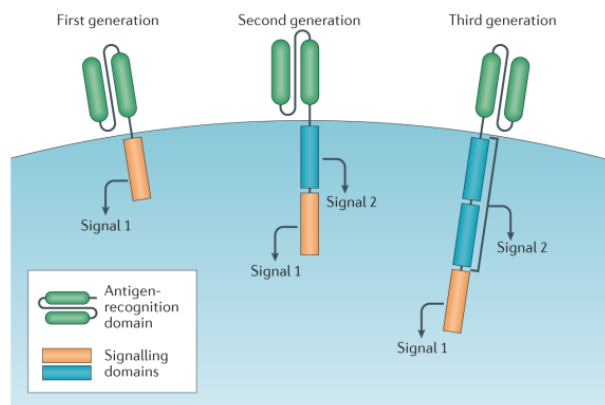


Figura 6. DISEÑO CÉLULA CAR-T. Brentjens, R.J., Jackson, H.J., Rafiq, S. Driving CAR T- cells forward. Nature reviews 13: 370-383.2016

Para poder comprender el porqué de semejantes tasas de éxito, debemos preguntarnos cuál es la importancia de CD19. CD19 es un antígeno de superficie, alta y homogéneamente distribuido en células B malignas y con una significativa restricción a células cancerígenas. Las únicas células fisiológicas que presentan esta molécula son los propios linfocitos B y su deplección tras el tratamiento con CART19 resulta manejable y con un balance beneficio/riesgo positivo. (Karadimitris, 2017)

5.4.4. Células universales *off-the shelf*

El uso de células T alogénicas en la terapia con CAR se encuentra limitado por su potencial para generar enfermedad de injerto contra huésped (EICH), mediado principalmente por activación de TCR. La disponibilidad de estos productos *off the shelf* generaría la posibilidad de incrementar el número de pacientes con acceso a estas terapias y de ahí, su potencial.

Las líneas de investigación a este respecto se basan en la supresión de EICH a través de la desactivación de regiones funcionales de TCR a través de técnicas de edición genética. Una aproximación en este sentido fue llevada a cabo mediante la alteración de la cadena α de TCR mediante TALEN. Dos pacientes pediátricos tratados con estas CAR T modificadas, desarrollaron EICH, probablemente como resultado de células con TCR+ remanentes en el producto, resaltando la importancia de la eficiencia en edición genética. Aludiendo al empleo de CRISPR existen dos líneas actuales. La primera aprovecha la posibilidad de edición genética múltiple para inactivar ambas, la cadena α y la cadena β de TCR y, el segundo planteamiento utiliza la tecnología CRISPR para localizar el locus correspondiente a la cadena α de TCR e integrar en él el gen que codifica el receptor CAR CD19.²²

5.5. IMPLICACIONES ÉTICAS

Un aspecto de alta relevancia a tener en cuenta en la aplicación clínica de esta tecnología son las implicaciones éticas generadas del uso de la misma. El hecho de poseer una herramienta que permite generar cambios específicos en el DNA abre la posibilidad de utilizar CRISPR para “diseñar humanos” con propiedades mejoradas como por ejemplo poseer menos susceptibilidad a enfermedades o quizá con propiedades que puedan ser deseables: color de pelo, altura, etc. Por ello, J. Doudna, co-inventora CRISPR-Cas9, en una conferencia TED (technology, entertainment, design) en 2015 pidió cautela a la comunidad científica ante cualquier aplicación clínica de CRISPR en embriones humanos, solicitando hacer una pausa que permita considerar todas las implicaciones éticas al respecto (Doudna J. , 2017).

6. CONCLUSIONES

- El desarrollo de la tecnología CRISPR resalta la importancia de la investigación básica, gracias a la cual se ha descubierto un sistema de inmunidad adaptativo en microorganismos sin precedentes.
- El impacto científico ante la aparición de CRISPR es indiscutible, si bien, debe seguirse mejorando su desarrollo como tecnología de edición genética precisa y eficaz para su aplicación en la práctica clínica.
- El abanico de posibilidades de CRISPR es muy amplio: *Knocks-outs*, *indels* (inserción-delección), edición de bases, represión y activación de la transcripción genética o comprensión de la estructura tridimensional del genoma entre otras.
- El diseño de células T dirigidas a antígenos tumorales específicos está resultando un enfoque muy prometedor y que asienta las bases para el desarrollo de novedosas terapias cancerígenas con enfoque inmunológico.
- El empleo de técnicas de edición genética requiere considerar cuidadosamente sus implicaciones éticas así como un alto grado de responsabilidad por parte de la comunidad científica, destacando su uso en líneas germinales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Dellaire, G., Salsman, J. Precision Genome Editing in the CRISPR Era. *Biochemistry and cell biology* 95:187-201.2017
2. Urnov, F.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews* 11:636-646.2010
3. Agarwala, V., Hsu, P.D., Ran, F.A., Scott, D.A., Wright, J., Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas 9 system. *Nature protocols* 8:2281-2308.2013
4. Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168:21. 2017
5. Mojica F.J.M., Rodríguez-Valera, F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*. 283:3162-3169. 2016
6. Doudna, J.A., Nuñez, J.K., Wright, A.V. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell* 164: 29-39. 2016
7. 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. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews* 13: 2-8. 2015
8. Charpentier, E., Chylinski, K., Koonin, V., Makarova, K.S. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42:6091-6105.2014
9. Dohmae, N., Hsu, P.D., Ishitani, R., Konermann, S., Nishimasu, H., Nureki, O., Ran, F.A., Shehata, S., Zhang, F. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* 156:935-949.2014
10. Doudna, J.A., Greene, E.C., Jinek, M., Redding, S., Sternberg, S.H. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 0:1-5.2014
11. Bassuk, A.G., Colgan, D.F., Mahajan, V.B., Schaefer, K.A., Tsang, S.H., Wu, W. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nature- Methods* 14:547-548. 2017
12. Adikaram, P., Genis, A., Pandey, M., Simonds, W.F., Zhang, J.H. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered* 7:166-174. 2016
13. Sampson, T.R., Weiss, D.S. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 36:34-38.2014
14. Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157:1262-1278.2014
15. Cheng, K., Liu, C., Liu, H., Zhang, L. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of controlled release* 266:17-26.2017
16. National Cancer Institute. CAR T Cells: Engineering Patient's Immune Cells to Treat Their Cancers. 2017. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>
17. Food and Drug Administration. FDA approval brings first gene therapy to the United States. 2017. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm>
18. A. Osborne, B., A. Goldsby, R., J. Kindt, T. (2007). *Inmunología de Kuby*, México. Mc.Graw Hill.
19. Fundación Josep Carrera. Leucemia linfoblástica aguda del adulto. 2017. http://www.fcarreras.org/es/leucemia-linfoblastica-aguda-del-adulto_361671
20. Leukemia and lymphoma society. Leucemia linfoblástica aguda. https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_al1.pdf
21. American Cancer Society. ¿Qué avances hay en la investigación y el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda? 2017. <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/nuevas-investigaciones.html>
22. June, C.H., Ruella, M., Shi, J., Singh, N. Genome-Editing Technologies in Adoptive T Cell Immunotherapy for Cancer. *Current hematologic malignancy reports*. 2017
23. Brentjens, R.J., Jackson, H.J., Rafiq, S. Driving CAR T- cells forward. *Nature Reviews* 13: 370-383. 2016
24. Karadimitris, A., Rotolo, A., Ruella, M. Building upon the success of CART19: chimeric antigen receptor T cells for hematologic malignancies. *Leukemia & Lymphoma* 1-16. 2017
25. TED conference. How CRISPR lets us edit our DNA Jennifer Doudna. 2017 <https://www.youtube.com/watch?v=TdBAHexVYzc>
26. U.S. Food and Drug Administration. Primera terapia genética en los Estados Unidos es aprobada por la FDA. 2017. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/ComunicadosdePrensa/ucm574222.htm>
27. L. Nelson, D., M. Cox, M. (2009). *LEHNINGER Principios de Bioquímica*, Barcelona. Ediciones Omega, S.A.