



CRISPR-Cas9: Gene Drives

Ana Cristina García Esteban

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Julio de 2020.

INTRODUCCIÓN

Breve historia

1987. Japón.
Secuencias *E. coli*.

1993. España.
FJ Mojica. Secuencias palindrómicas en la arquea *H. mediterranei*.

2002
SRSR → CRISPR.

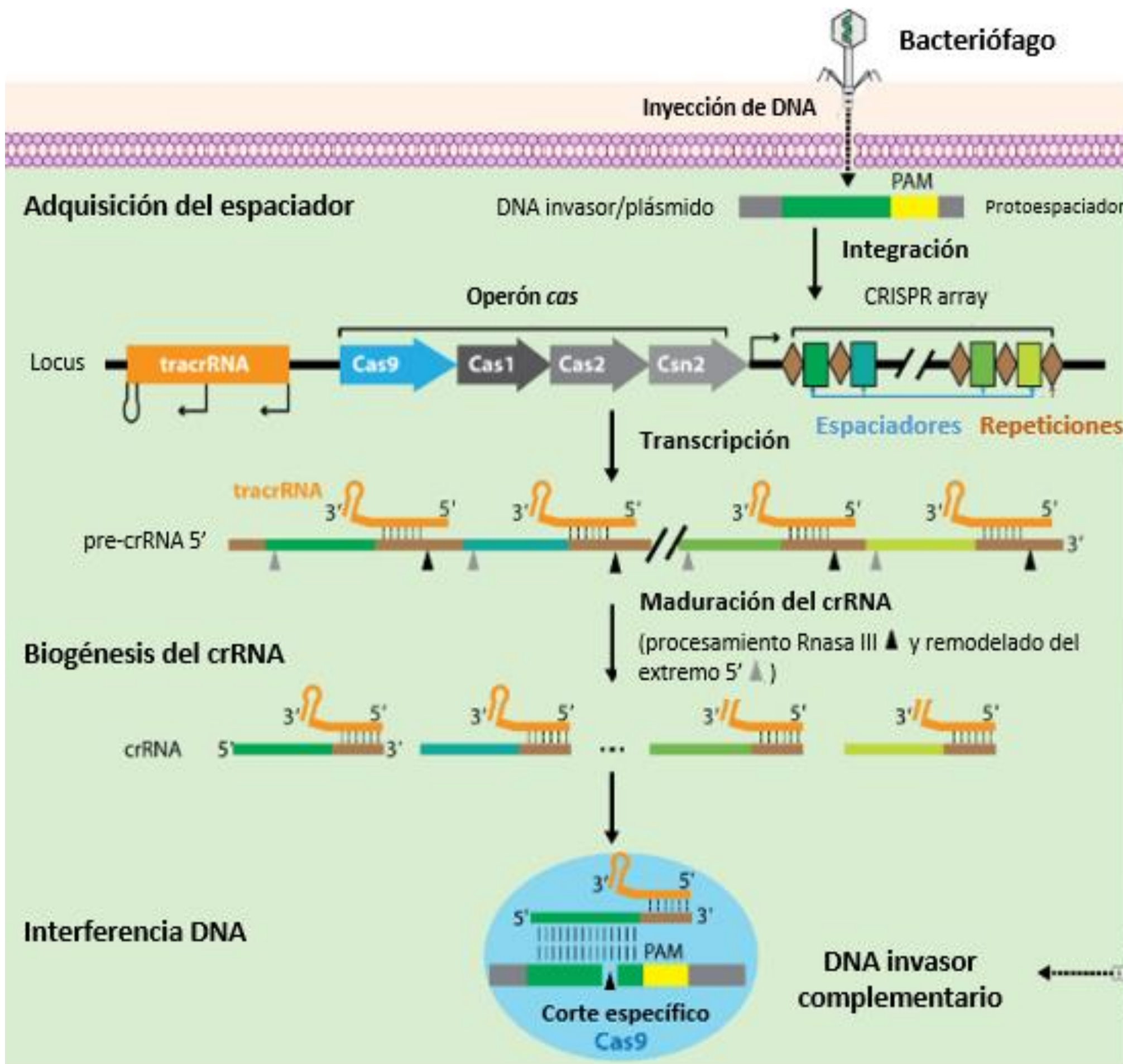
2012

E Charpentier JA Doudna.
→ **inmunidad adaptativa**.
Técnica dirigida de corte de material genético: **Enzima Cas + RNA diseñado ad hoc**.

2018-2020

Nuevos avances y variantes Cas con diferentes aplicaciones
Cas12a: edición y regulación.
Cas13b: edición de RNA.

Mecanismo básico sistema CRISPR



Aplicaciones biotecnológicas

EDICIÓN GENÓMICA: Cas9. Capacidad de modificar el DNA de un organismo.

- ✓ Corte específico y dirigido (RNA guía). Reparación: recombinación homóloga.
- ✓ Versátil, rápida, simple, precisa y de bajo coste.

Nickasas: corte de una sola hebra de DNA. **RuvC** o **HNH**.

➢ Menor riesgo de cortes *off-target*. Más eficiencia si se combinan.

Otros: ZFNs o TALENs. Difíciles de validar, costosos y lentos.

EXPRESIÓN GÉNICA Y EPIGENÉTICA: deadCas9.

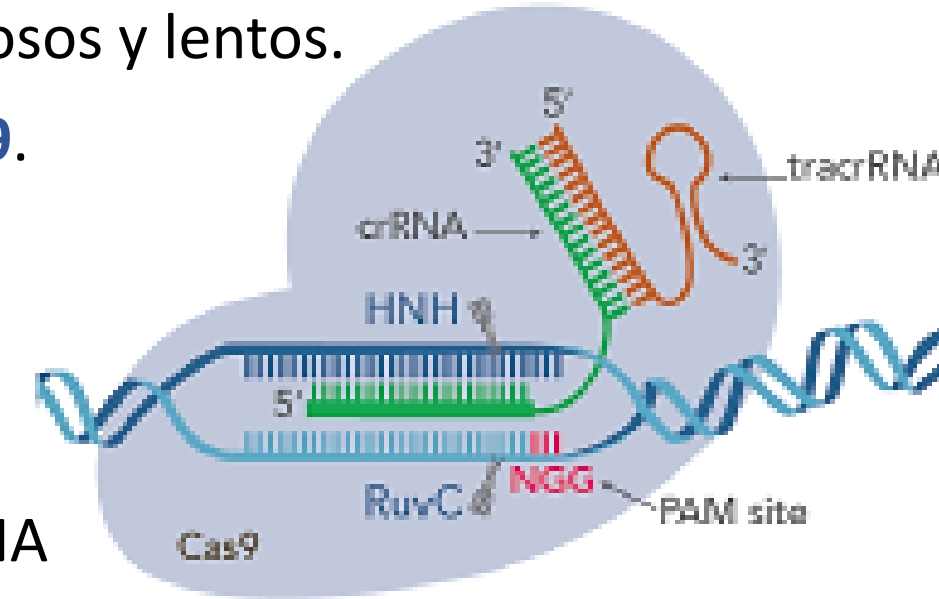
Capacidad de unión pero no de corte.

DIAGNÓSTICO:

SHERLOCK (Cas13) → **SARS-Cov-2**

TRATAMIENTO:

Cas13d → posible para **SARS-Cov-2** y virus RNA



OBJETIVOS

- Proponer el **sistema CRISPR-Cas9** para el **diseño de gene drives**.
- Mostrar las posibles **aplicaciones**.
- Presentar **soluciones** a los posibles **inconvenientes**.
- Comentar los **aspectos éticos** y **regulatorios** derivados.

MATERIALES Y MÉTODOS



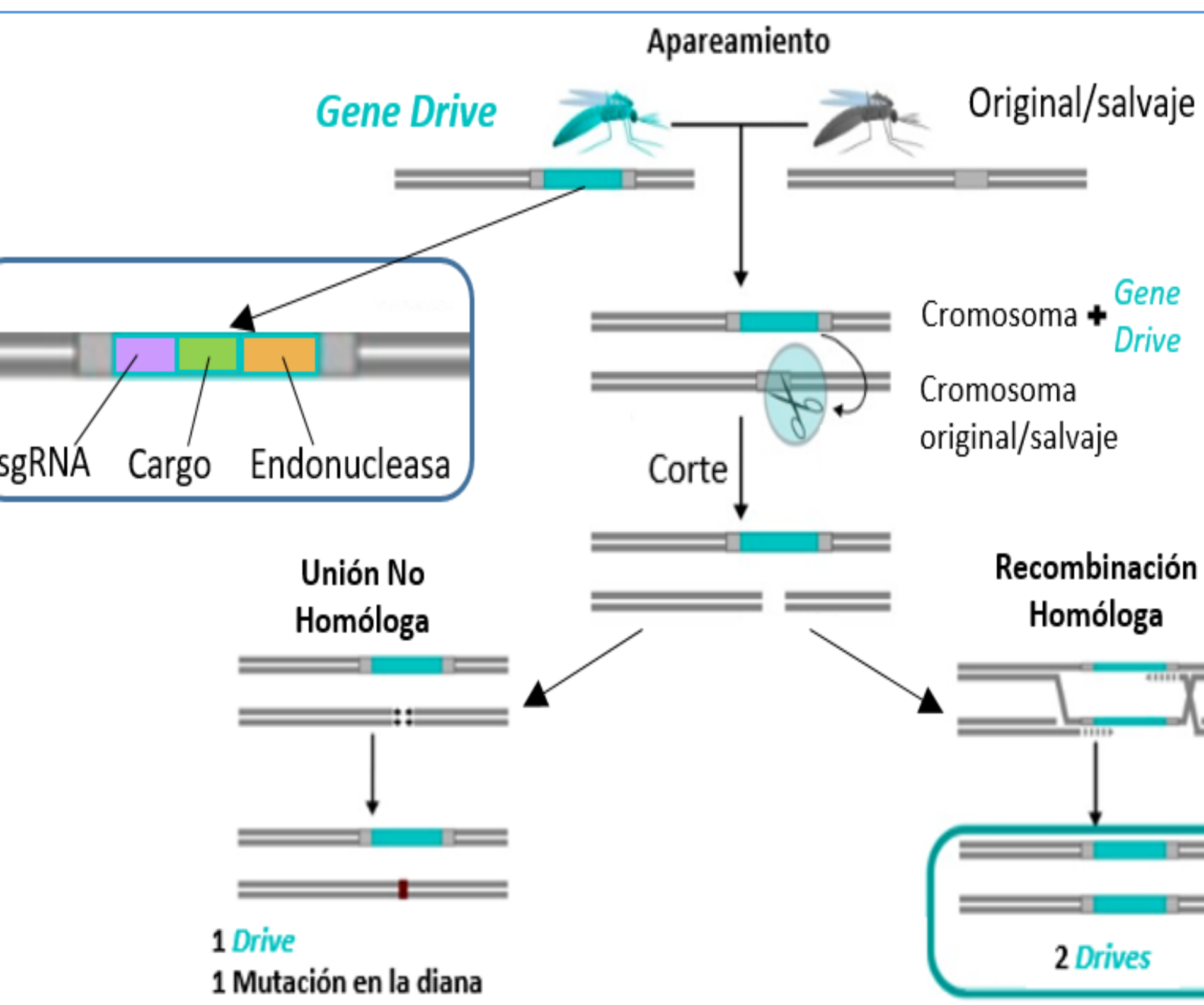
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gene drives

(motores o impulsores génicos)

- Sistemas que influyen en la herencia de un elemento genético facilitando su paso a la descendencia.
- Resultado: en el genotipo y fenotipo de la siguiente generación. Potencialmente en toda la población.

Mecanismo



Introducción de **Cas9 + RNAs** en un **locus** génico

RNA → guía a Cas9 → reconoce secuencia en el **locus** original (solo en el cromosoma homólogo)

Cas9 → corta por la zona de reconocimiento.
Reparación → **gene drive** como molde

Herencia gene drive:
Aprox. 100% de la población → **difusión rápida**

Aplicaciones

ERRADICACIÓN DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES

- Inactivación de genes responsables de la resistencia a antibióticos
- Control de plagas
- Otros

MALARIA

400 000 muertes/año



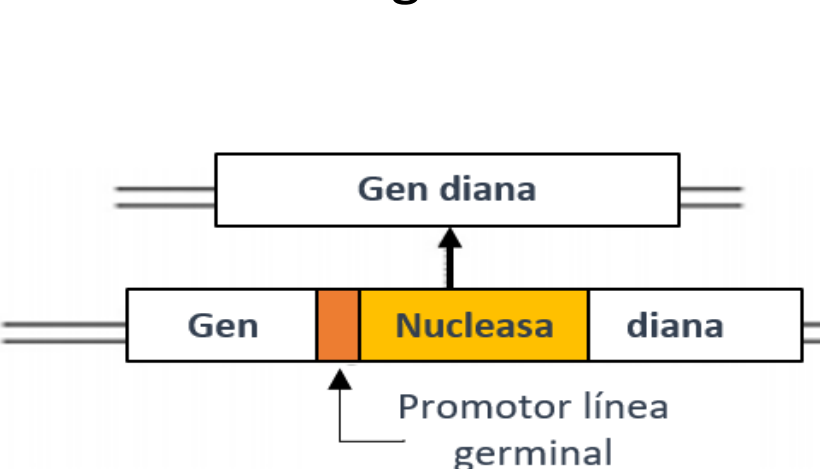
Gene Drives

- ✓ Propagación genes
- ✓ Evade selección natural
- ✓ Rápido
- ✓ Diversas estrategias

↓ nº mosquitos → interferir en su reproducción/supervivencia
Favorecer: ♂ > ♀
Cambiar preferencias del mosquito

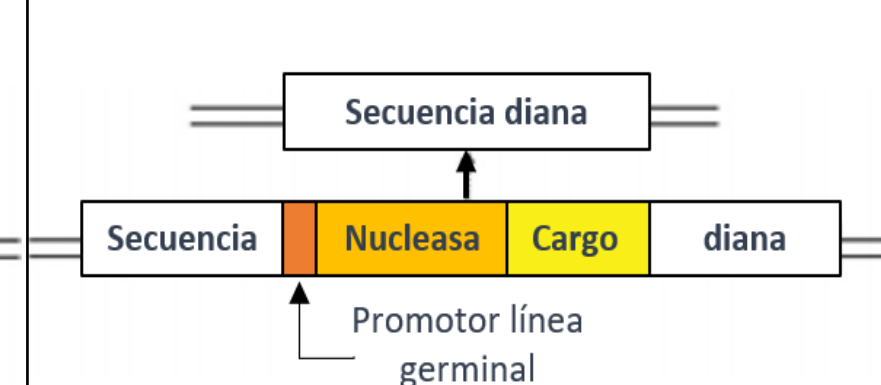
Knock-out de genes

- Inactivación de genes
- Elección de gen diana



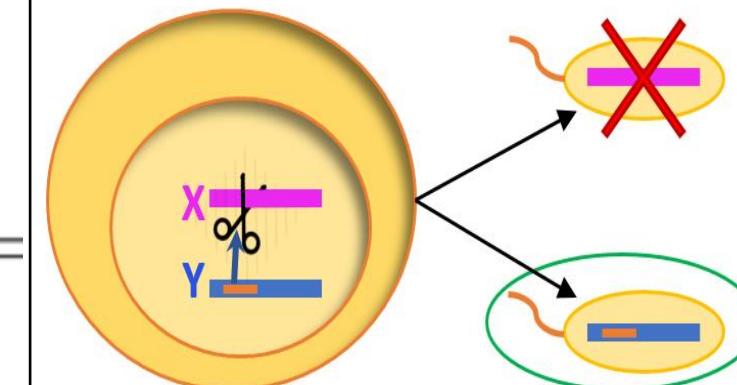
Knock-in de genes

- Introducción de información adicional (cargo): péptidos antimicrobianos, Ac...
- ¡ Evitar pérdida del cargo



Cromosomas Y

- Favorecer herencia cromosoma Y (evitar X)
- Nucleasa reconoce y corta el cromosoma X



Requisitos y control

	Requisito	Propuesta/Solución
CORTE	Completo	gRNAs adicionales
ESPECIFICIDAD	Evitar cortes <i>off-target</i>	Nickasas , estudio minucioso de las secuencias
COPIA	Recombinación homóloga	Nickasas , reprimir/activar genes (<i>dCas9</i> ...)
ESTABILIDAD EVOLUTIVA	Evitar alelos resistentes, inhibidores de Cas9, RNasas	gRNAs multi-diana, drives línea germinal masculina, diana gen esencial, variantes Cas9...

GD para revertir cambios preexistentes en el genoma → evitan cambios indeseados producidos por un GD anterior.

GD para la inmunización → bloquean la difusión de otros GD

GD de precisión → específicos para actuar sobre una población/subpoblación.

Ejemplo → islas (intercambios intermitentes de genes). Puede servir como diana para otro GD (> precisión).



Ética y regulación

- Cambios drásticos en ecosistemas
- Fines de beneficio **cuestionable**
- Efecto **global**

- ✓ **Guía para la investigación con mosquitos modificados genéticamente**
- ✓ Consentimientos
- ✓ Regulaciones multilaterales
- ✓ Pactos, protocolos
- ✓ **Compromiso** y transparencia

CONCLUSIONES

- **CRISPR-Cas9** → rápido desarrollo, rápida, efectiva → mejor que Dedos de Zinc o TALENs → Ideal para el diseño de **Gene Drives**
- Sistema capaz de **alterar poblaciones enteras** → **herencia** aproximada del **100%** → numerosas aplicaciones
- Diversas **estrategias de diseño**: **knock-out**, **knock-in**, cromosomas Y → nuevos diseños más seguros (**Daisy drives**, **Cleave and Rescue drives**, otros)
- **Normas y protocolos** para garantizar :
 - ✓ La **seguridad** → estudios minuciosos con los posibles inconvenientes
 - ✓ La **ética** → regulación multilateral, pactos, compromiso, transparencia → **Guías** para la investigación y correcto uso

BIBLIOGRAFÍA

