

CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética y sus aplicaciones en la salud humana



Ignacio Beunza González

Grado en Farmacia, UCM

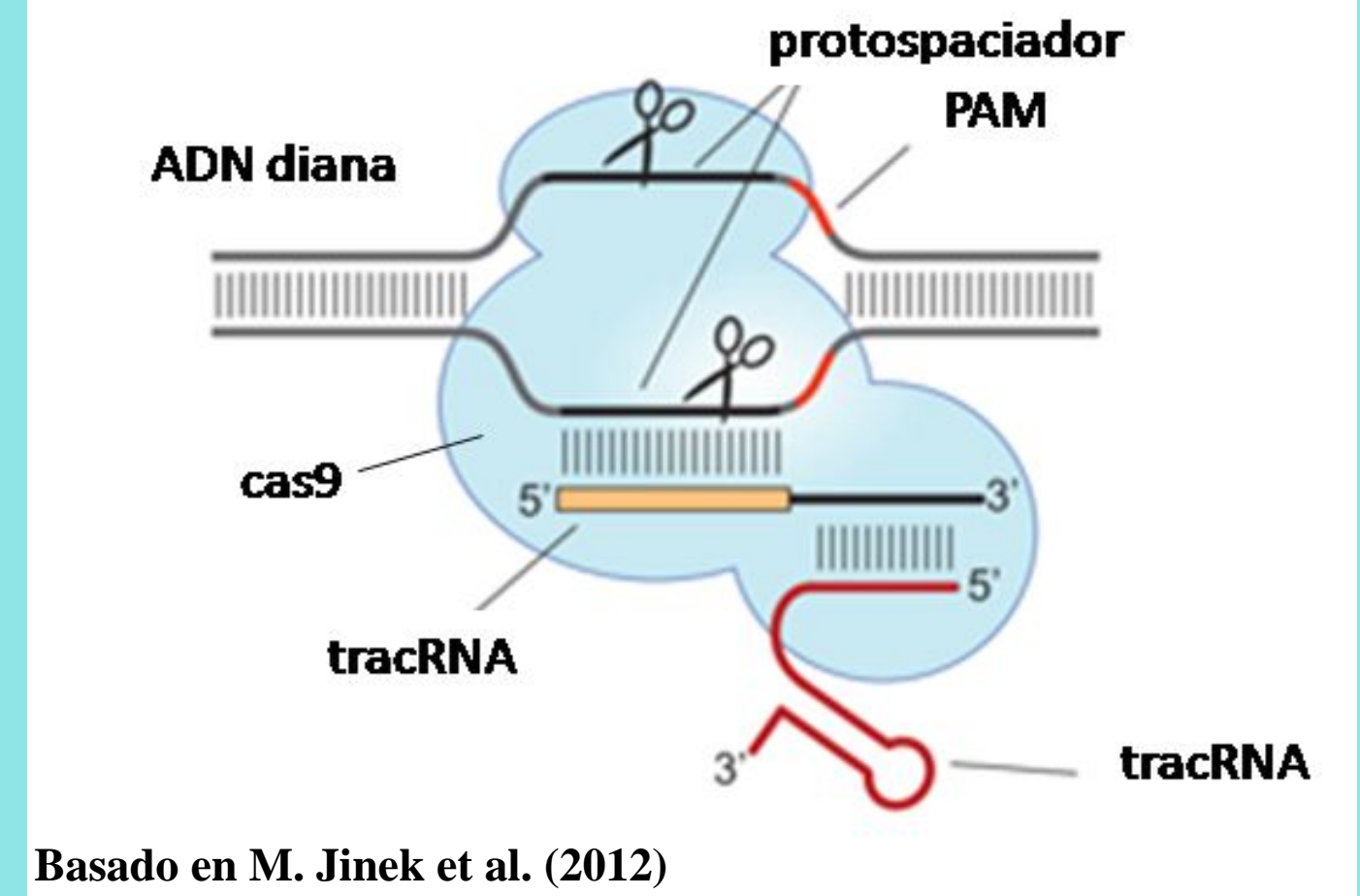
1

INTRODUCCIÓN

CRISPR/Cas9 forma parte del sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas, capaz de producir un corte en secuencias concretas en el ADN diana. El sistema se ha desarrollado con numerosas aplicaciones, hasta convertirse en la herramienta en edición genética más utilizada.

Para que el sistema funcione son necesarios los siguientes componentes:

- **Cas9:** se trata de una endonucleasa. Aunque en el reino microbiano existen otras proteínas Cas [1], como herramienta de edición genética se emplea esta por ser la más sencilla de manejar. Solamente requiere una guía de ARN complementaria al ADN diana [2] y que en este ADN, junto al punto de corte, haya una **secuencia PAM** [3].
- **sgRNA:** dirige a Cas9 al punto de corte, ya que se diseña para que sea complementario al ADN diana y así se una a él por complementación de bases [2].



2

OBJETIVOS

- Describir los principales conocimientos actuales del sistema CRISPR/Cas9
- Establecer sus ventajas frente a otras técnicas de edición genética
- Analizar algunos ejemplos prácticos de su utilidad en terapia.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se han consultado artículos de revistas como Life, Science o Nature, además de bases científicas como PubMed.

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: APLICACIONES PRÁCTICAS

INGENIERÍA (EPI)GENÉTICA

- Presenta una serie de ventajas frente a otras herramientas de edición genética [4]:
- El reconocimiento de la diana se lleva a cabo por una reacción de simple complementariedad de bases: las condiciones de reacción no son tan influyentes.
 - Por cada nueva diana solo es necesario diseñar un sgRNA, manteniendo el vehículo y la enzima, Cas9. Se reduce el tiempo, dinero y los medios necesarios.
 - Se puede modificar Cas9 para obtener una variante sin actividad nucleasa (dCas9), lo que permite llevar a cabo procesos de control epigenético.
 - Se reducen efectos sobre zonas del ADN no deseadas.

APLICACIÓN 1: OSTEOSARCOMA [5]

¿QUÉ ES?

Cáncer pediátrico muy agresivo. Se sobreexpresa VEGFA → DIANA TERAPÉUTICA?

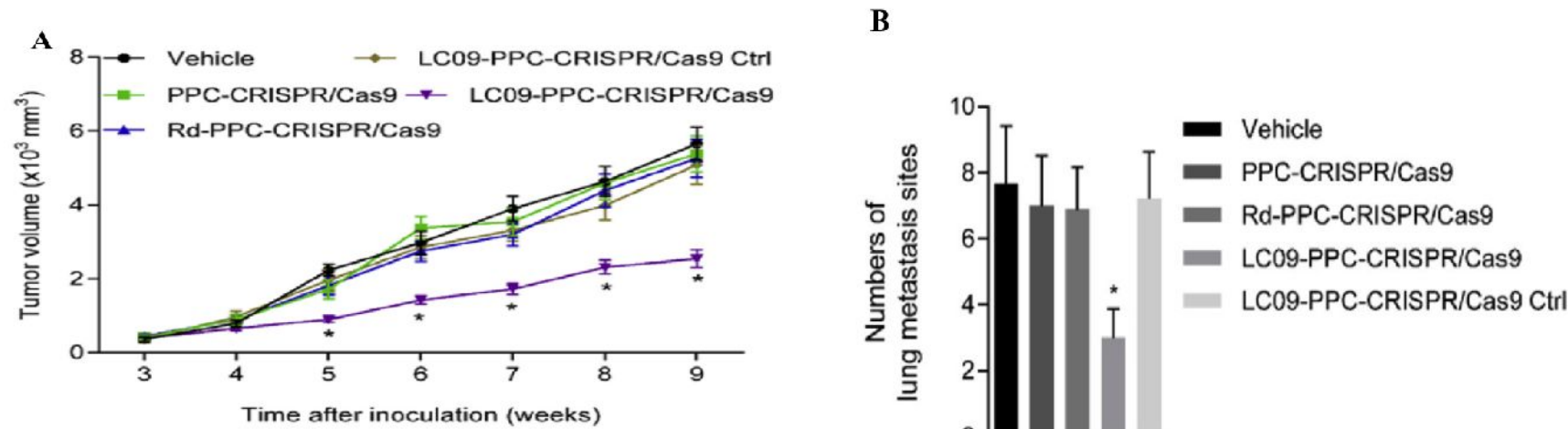


Figura 5. Resultados obtenidos de la administración de las distintas formulaciones. Se reduce el volumen tumoral (A); el número de metástasis pulmonares (B), la neovascularización y el daño óseo.

Además, se ve que la fórmula es segura y que no causa toxicidad en otros tejidos ni produce efectos off-target.

APLICACIÓN 2: SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA [6]

BASE

Una mutación CCR5 32 confiere cierta resistencia frente a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1).

ESTRATEGIA

1. Se cogen células de la sangre del paciente y se transforman en células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs).
2. Se produce la delección CCR5 32 mediante recombinación homóloga gracias a un transposón que porta la delección y que luego se elimina sin dejar huella.
3. Para aumentar la eficacia de la recombinación se utiliza tanto las TALEN como la tecnología CRISPR/Cas9, que previamente producirán un corte en el genoma.

RESULTADOS

Method	HR efficiency	Biallelic targeting efficiency	NHEJ efficiency
TALEN (L538-R557)	100%	10%	45%
CRISPR-Cas9	100%	33.3%	25%

Figura 7. Comparativa entre la eficacia de TALEN y de CRISPR/Cas9 en actuar sobre el gen CCR5. CRISPR/Cas9 produce más delecciones bialélicas y una menor incidencia de recombinaciones no homólogas respecto a TALEN.

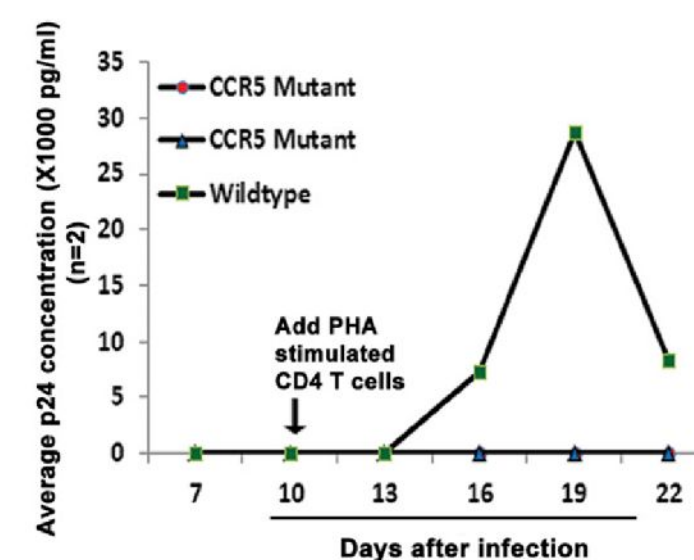


Figura 8. Detección del antígeno p24 del virus HIV1 para los cultivos de macrófagos y monocitos mutantes y los provenientes de iPSCs WT a partir del séptimo día. En los cultivos de células mutantes no se detecta antígeno de HIV-1, lo que sugiere que este no se desarrolla y por tanto que las células son resistentes a su infección.

4

CONCLUSIONES

CRISPR/Cas9 se presenta como una herramienta útil en un amplio abanico de ámbitos. Sin embargo, para poderla usar de forma generalizada, aún quedan por superar una serie de obstáculos, sin contar los problemas éticos que acarrea:

- 1 Digestión del genoma en lugares indeseados .
- 2 Tras la ruptura de la hebra, la célula la corrige por homología directa, solo actúa en células en división.
- 3 Vehiculización de la maquinaria directamente al lugar de acción.
- 4 Reacciones de inmunidad frente a un componente extraño.

5

BIBLIOGRAFÍA

1. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(11):722-736
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012; 337(6096):816-21. [PMID: 22745249]
3. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014; 157(6):1262-78.
4. Waryah CB, Moses C, Arooj M, Blancafort P. Methods Mol Biol. 2018;1767:19-63.
5. Liang C, Li F, Wang L, Zhang ZK, Wang C, He B et al. Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma. Biomaterials. 2017;147:68-85.
6. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 32 mutation confers resistance to HIV infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(26):9591-6. [PMID: 24927590]