



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



Ignacio Beunza González

Grado en Farmacia, UCM

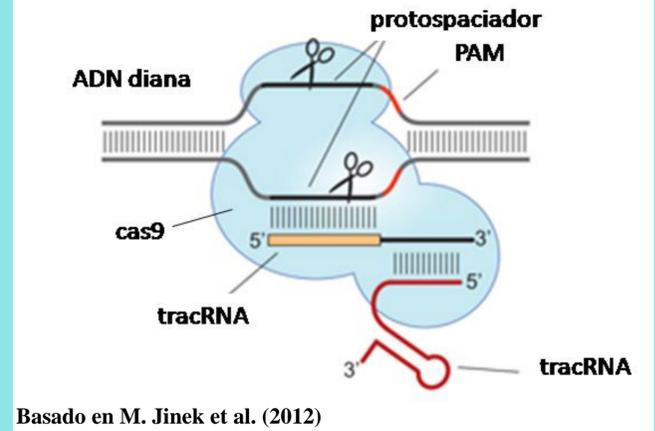
1

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].



Basado en M. Jinek et al. (2012)

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?**

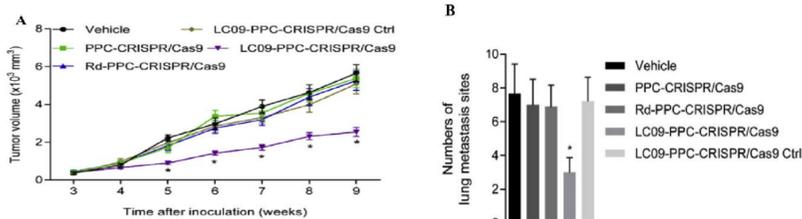


Figura 5. Resultados obtenidos de la administración de las distintas formulaciones. Se reduce el volumen tumoral (A); el número de metástasis pulmonares (B), la neovascularización y el daño óseo.

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.

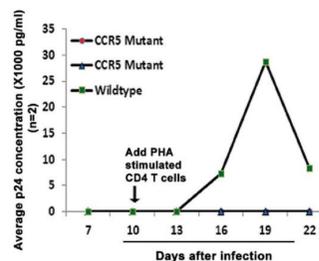


Figura 8. Detección del antígeno p24 del virus HIV1 para los cultivos de macrófagos y monocitos mutantes y los provenientes de iPSCs WT a partir del séptimo día. En los cultivos de células mutantes no se detecta antígeno de HIV-1, lo que sugiere que este no se desarrolla y por tanto que las células son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