



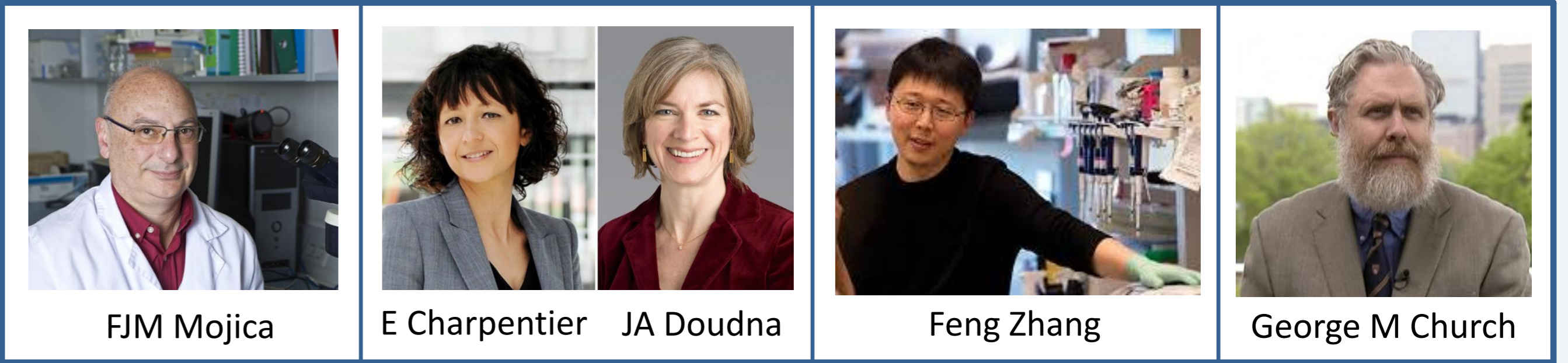
CRISPR: DE VERDUGO A CIRUJANO DEL GENOMA. OPTIMIZANDO CRISPR PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Juan Vicente Valor. 5º de Grado. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, UCM

1. ¿Qué es CRISPR/Cas?

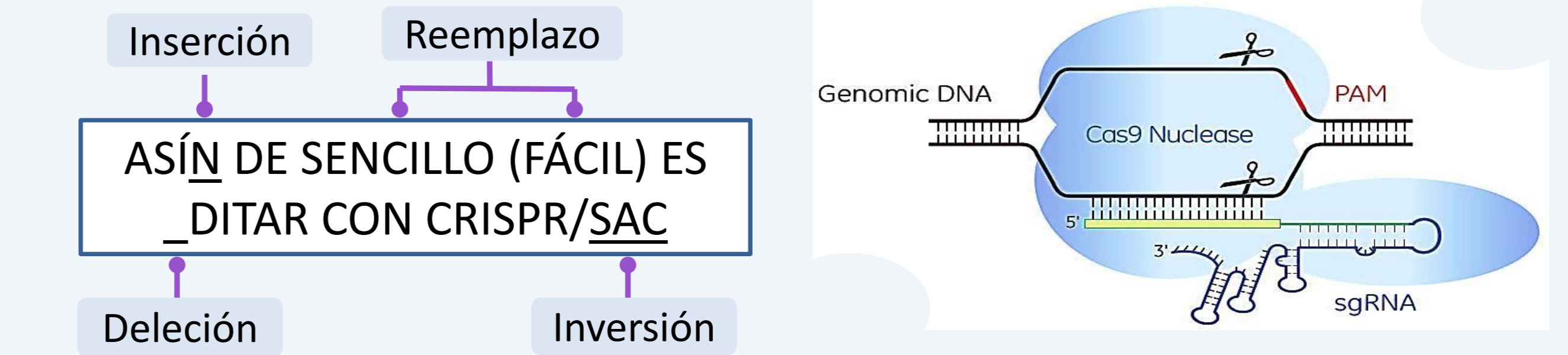
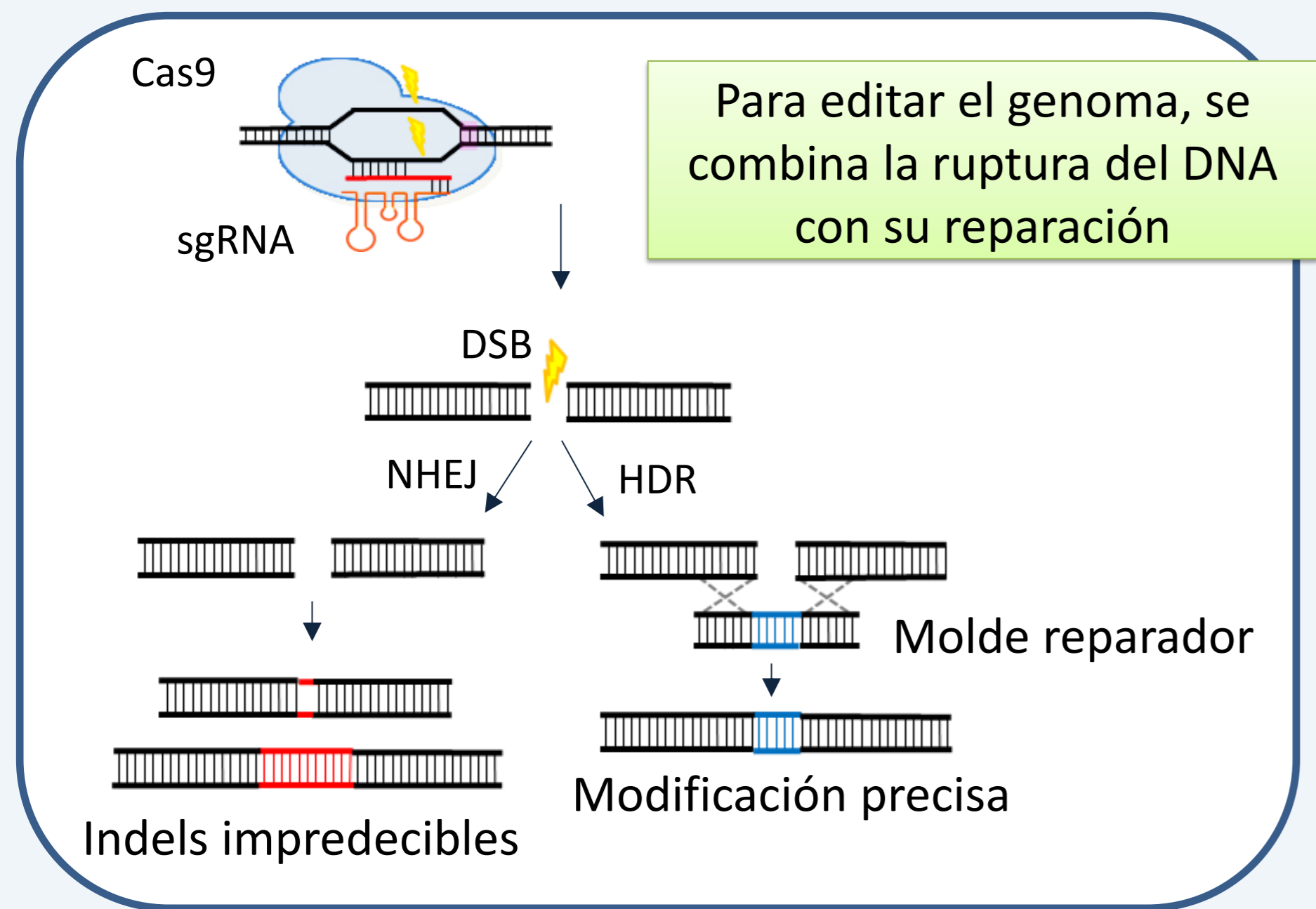
Existen varias herramientas moleculares para llevar a cabo edición génica. Entre ellas se encuentra la tecnología CRISPR/Cas, que tiene su origen en un sistema inmune adaptativo procariontico y que ha sido adaptada para reescribir las secuencias de 4 nucleótidos con las que está escrita la información genética de todos los seres vivos.

1.1. ¿Quién lo descubrió?



1.2. La tecnología. ¿Cómo funciona?

La tecnología CRISPR/Cas consiste en un complejo formado por una endonucleasa, llamada Cas9, guiada por un RNA. A través del RNA puede programarse la unión de Cas9 a una región concreta del genoma.



1.3. Avances preclínicos con CRISPR/Cas

Restauración de función muscular en modelo animal de Distrofia de Duchenne
Corrección de inversión del gen del Factor VIII en iPSC de pacientes con Hemofilia A
Corrección del gen CFTR en cultivos de SC de intestino de pacientes con CF
Eliminación del genoma del VIH integrado en linfocitos TCD4+ de pacientes infectados
Corrección de miocardiopatía congénita hipertrófica congénita en embriones humanos
Creación de linfocitos TCD4+ resistentes (CCR5) a infección por HIV (ZFN)
1er ensayo clínico: paciente adulto con síndrome de Hunter tratado (ZFN)

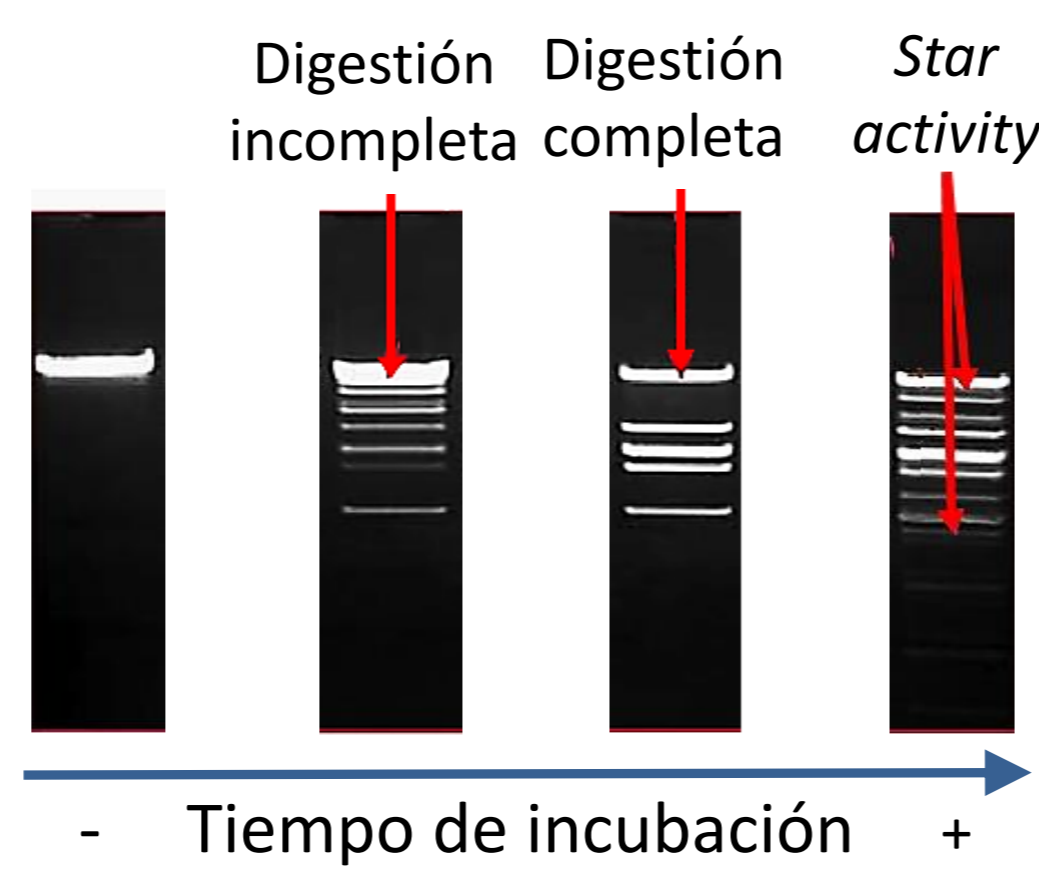
2. OPTIMIZANDO CRISPR/Cas

Problemas Soluciones

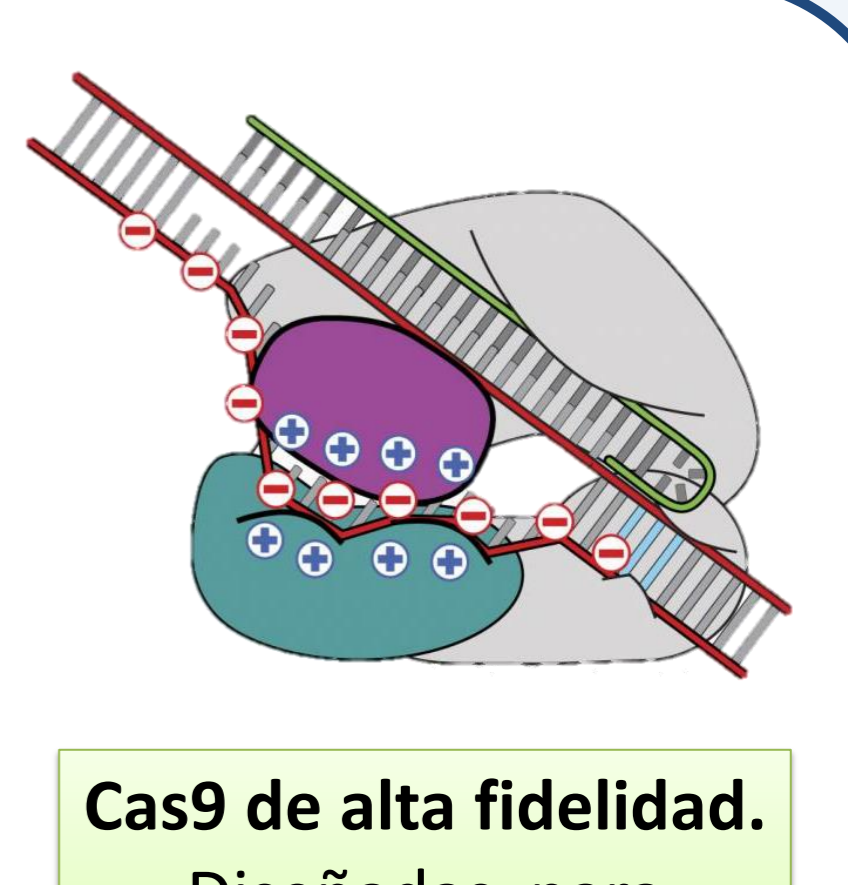
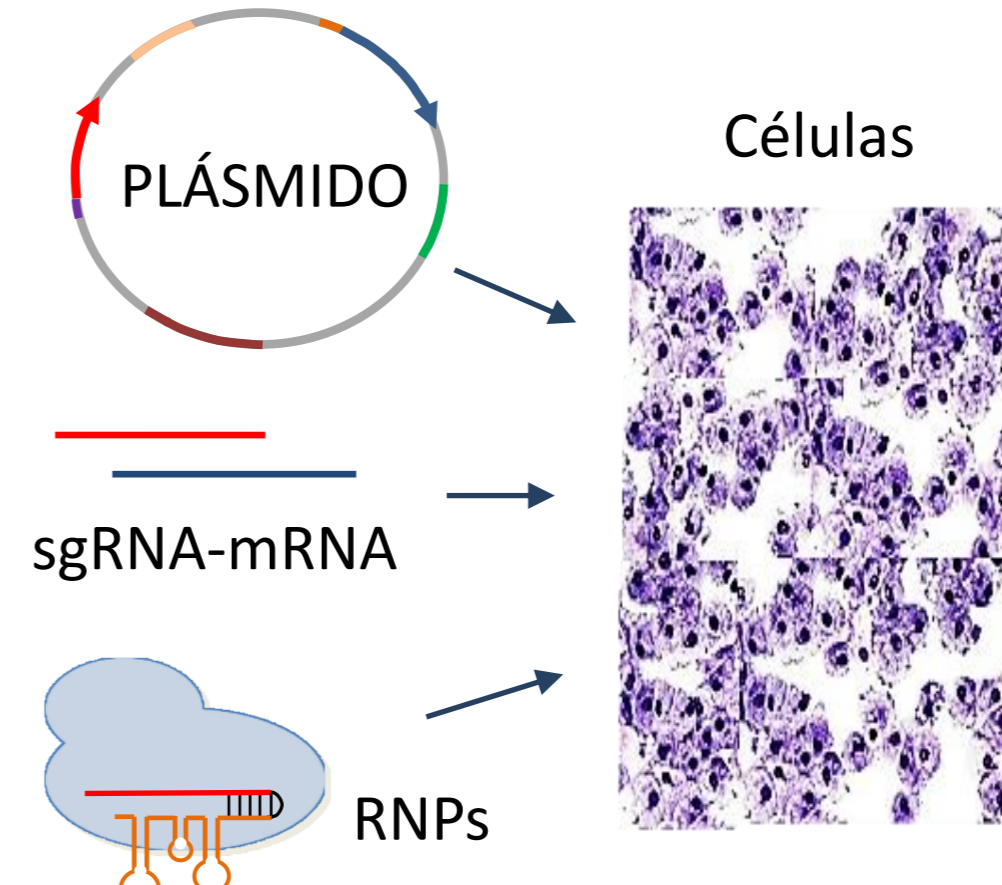
2.1. Actividad inespecífica

all guides	guide #1	quality score: 74	
scored by inverse likelihood of off-target binding mouse over for details ... show legend	guide sequence: CTGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	on-target locus: chr11:38605786	
	number of off-target sites: 228 (25 are in genes)		
score	sequence	score	mismatches
Guide #1 74	CTGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	2.4	3MMs (4:5:8)
Guide #2 67	ACTGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	1.0	3MMs (4:5:19)
Guide #3 65	TGTCCTGGCAGGCTCCCA GGG	0.9	4MMs (2:4:5:7)
Guide #4 55	GAGGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.8	4MMs (2:8:9:10)
Guide #5 54	CTGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.8	4MMs (3:4:8:11)
Guide #6 53	CGAGGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.7	4MMs (5:8:10:11)
Guide #7 51	AGCCCTGGCAGGCTCCCA GGG	0.7	4MMs (2:3:5:20)
Guide #8 50	CTGAGGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.7	3MMs (2:8:18)
Guide #9 50	GCAATGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	4MMs (2:7:8:9)
Guide #10 50	GAGGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	4MMs (2:8:10:17)
Guide #11 46	TGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	3MMs (5:10:18)
Guide #12 45	TGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	3MMs (5:11:19)
Guide #13 42	TGCAGGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	
Guide #14 42	ATGTTTGGCAGGCTCCCA GGG	0.6	

Programas bioinformáticos. Ej. MITCRIPSR

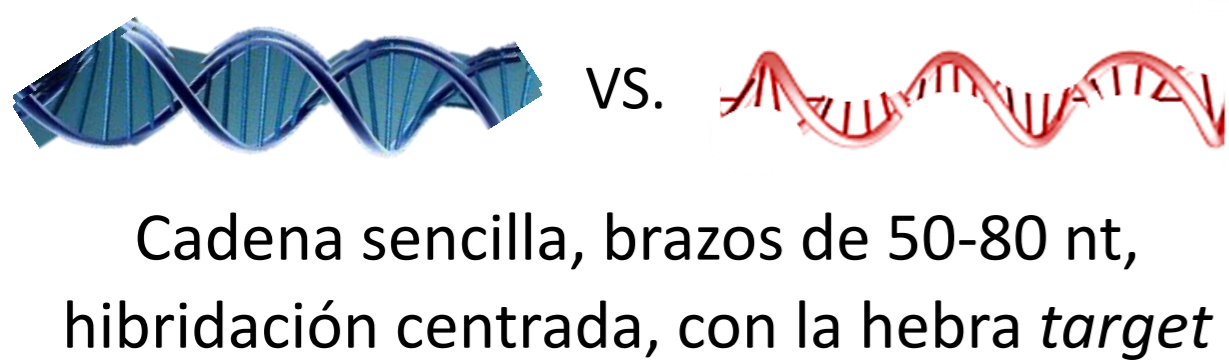


Disminución del tiempo de exposición a sgRNA:Cas9



Cas9 de alta fidelidad. Diseñadas para aumentar la precisión

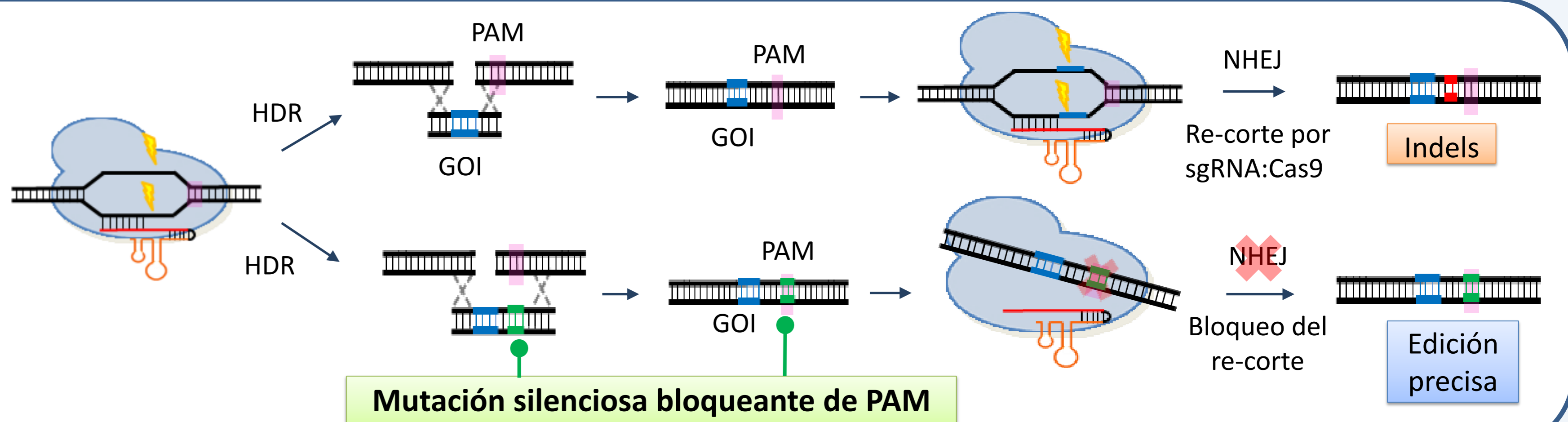
2.2. Bajas tasas de HDR



Cadena sencilla, brazos de 50-80 nt, hibridación centrada, con la hebra target

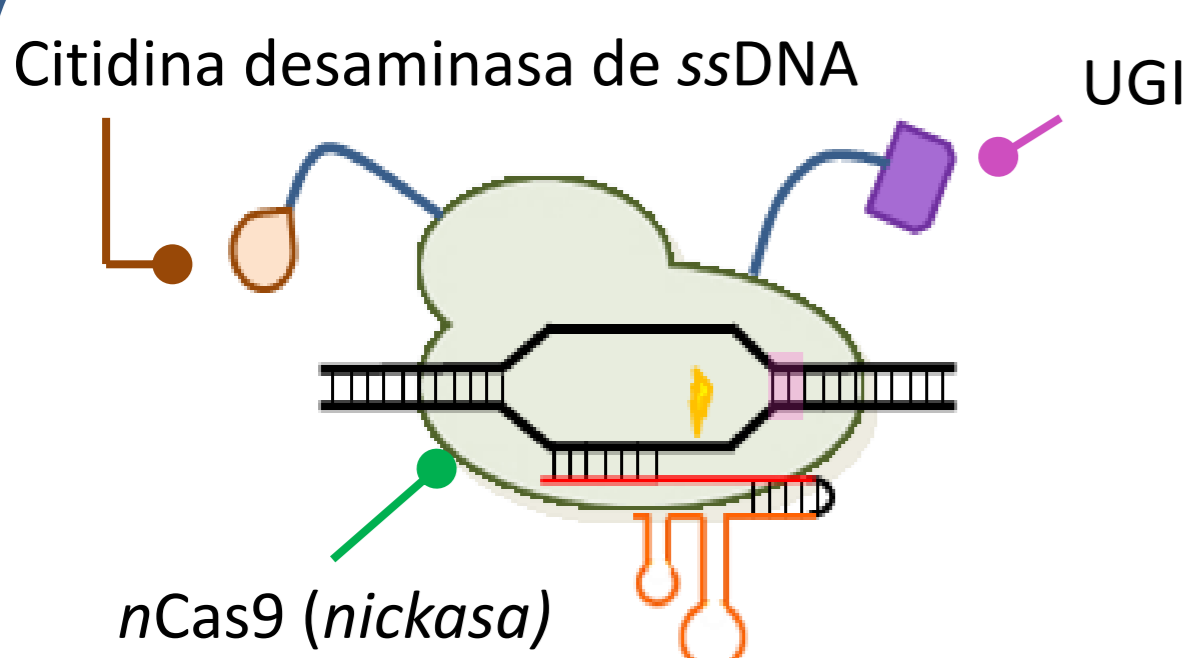
Características del DNA molde

- Estrategias específicas
- Estrategia *PITCH*
 - Estrategia *Easi-CRISPR*



Mutación silenciosa bloqueante de PAM

2.3. Introducción de DSBs



Editores de base. Modificación del genoma sin cortarlo

3. Perspectivas

Con CRISPR/Cas y la cirugía del genoma, enfermedades de causa genética como dislipemias graves, la anemia falciforme, β -talasemias, distrofias musculares, mucopolisacaridosis, leucemias, inmunodeficiencias... y 7000 enfermedades raras, algunas incompatibles con la vida, que afectan a 400 millones de personas en todo el mundo, podrían encontrar cura. Sin embargo, aún hay que superar los problemas de la técnica (los aquí expuestos y otros muchos), lidiar con las implicaciones éticas,... En definitiva, un largo camino por recorrer antes de disponer de una herramienta terapéutica efectiva y segura para reparar los genes de personas que padecen enfermedades génicas.

4. Bibliografía

1. E Lander. *Cell*, 164(1-2), 18-28 (2016).
2. FJM Mojica, et al. *Investigación y Ciencia*, 493, 20-28 (2017).
3. L Cai, et al. *Genes & Diseases* 3(4), 244-251 (2016).
4. J Tycko et al. *Mol Cell*, 63(3), 355-370 (2016).
5. G Hess, et al. *Mol Cell*, 68(1), 26-43 (2017).
6. H Chneiweiss, et al. *Transgenic Res*, 26(5), 709-713 (2017).