

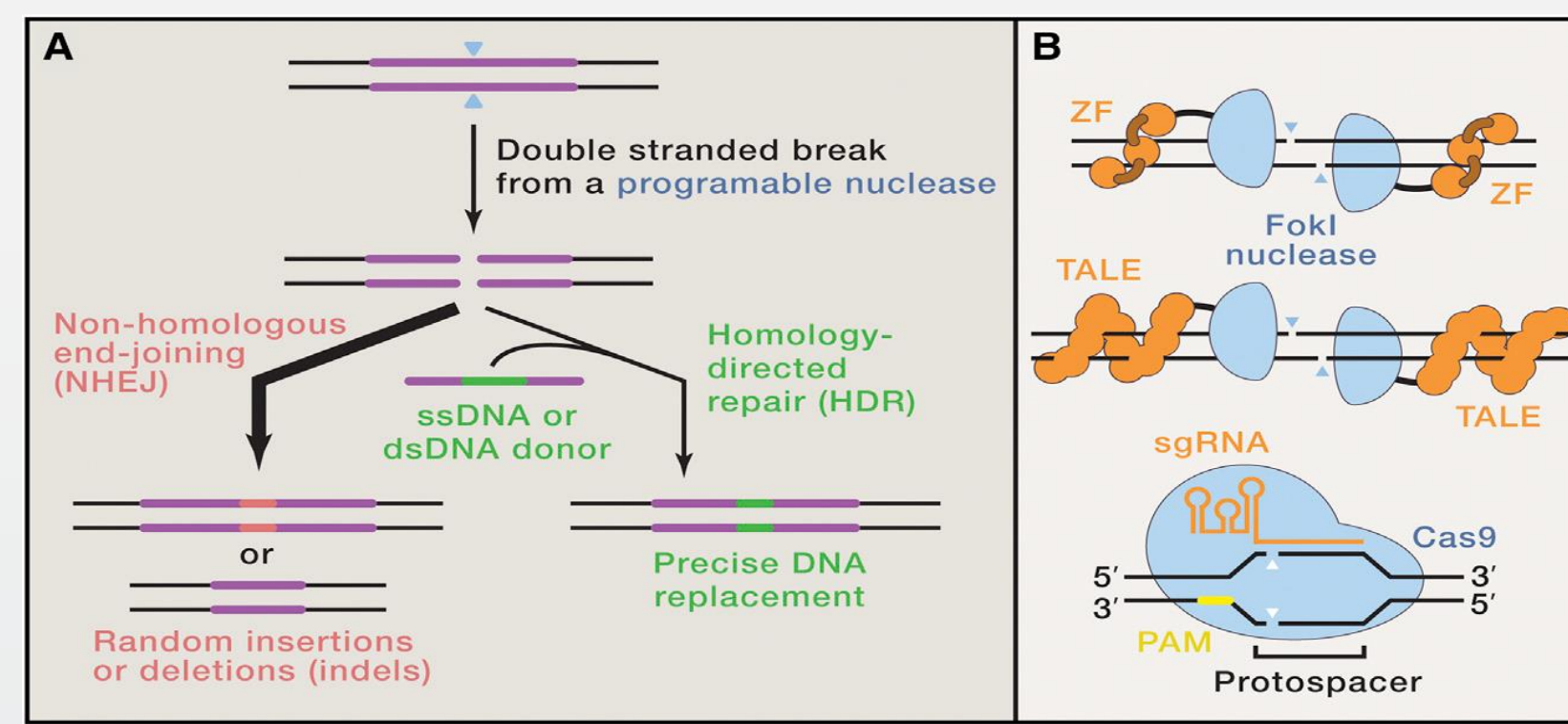
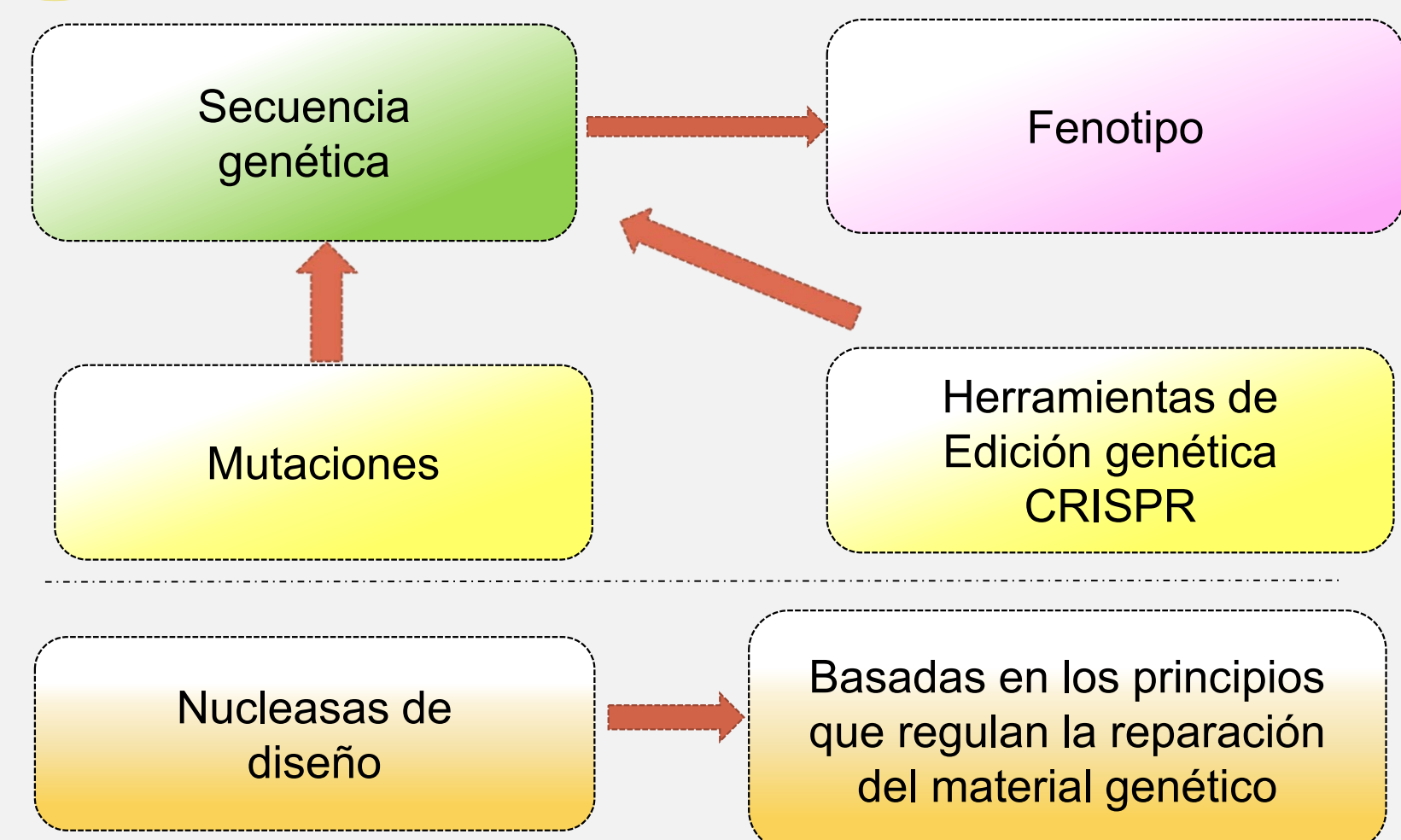


# CRISPR/Cas9 como herramienta natural de edición genética y su aplicación en el tratamiento inmunológico del cáncer.

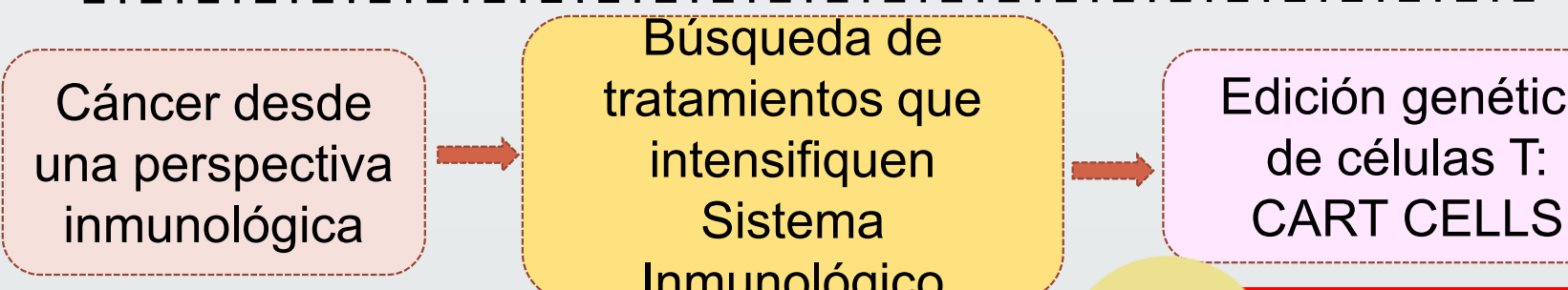
Trabajo de fin de Grado Facultad de Farmacia - Universidad Complutense de Madrid

Autora: Sanz Portillo, Teresa

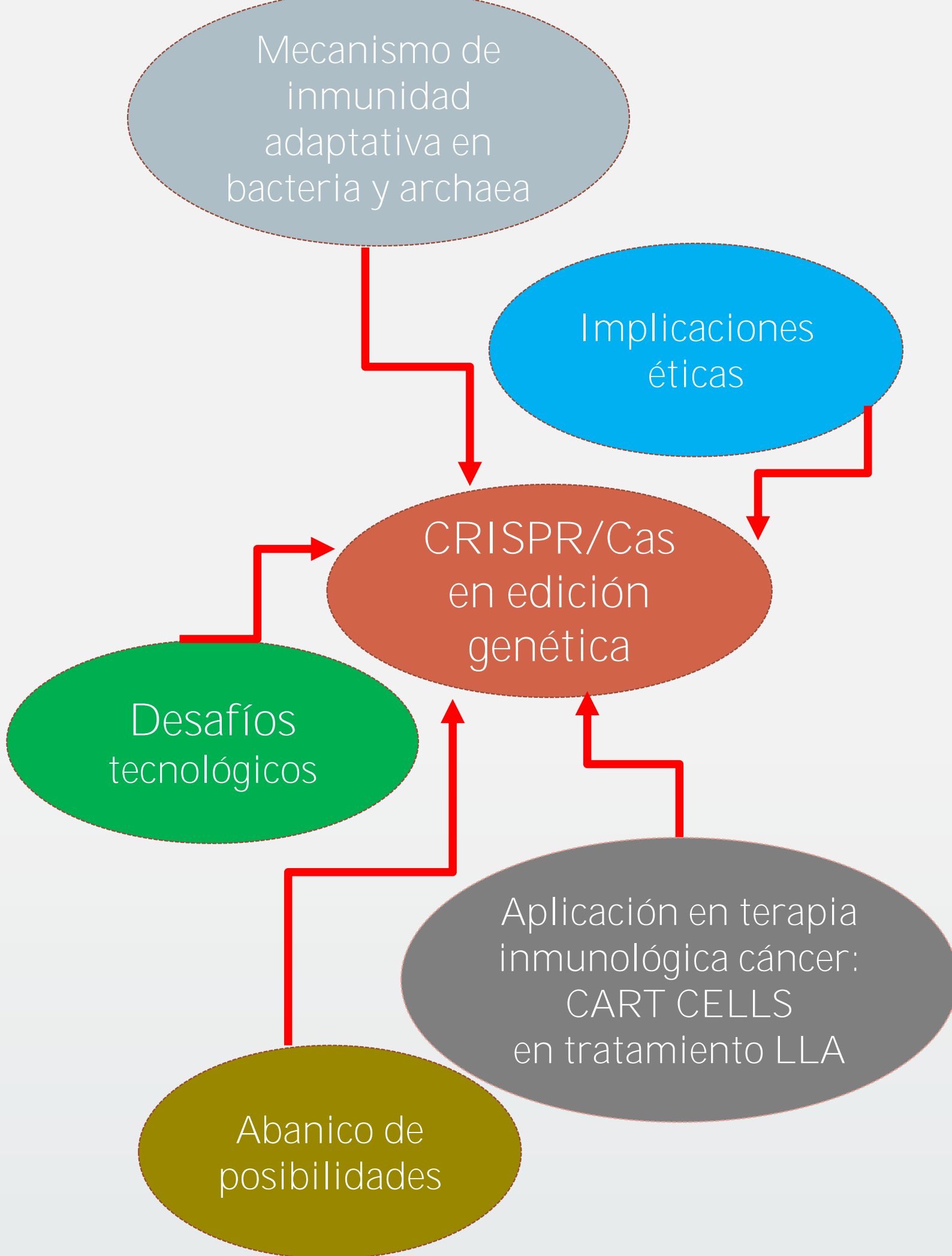
## Introducción



Edición genética por rotura de doble cadena Cell 168:21 (2017)



## Objetivos



## Metodología

❖ Búsqueda exhaustiva de estudios publicados en Base de datos:



❖ Revisión de libros de texto digitales e impresos:



❖ Consulta Webs



## Resultados y Discusión

### 1. CRISPR, SISTEMA DE INMUNIDAD ADAPTATIVO EN BACTERIAS Y ARCHAEA

**CONCEPTOS**

- ❖ **LOCUS CRISPR**: Segmentos repetidos (20-50 pares de bases), Segmentos espaciadores ⇒ segmentos adquiridos de DNA extraño, Juego de proteínas Cas asociadas
- ❖ **TRES SUBTIPOS CRISPR/CAS**: En función de la presencia de un juego distintivo de proteínas Cas
- ❖ **PROTEINAS CAS9**: Reconoce doble hélice ⇒ lóbulo REC. Unión a cada cadena ⇒ Dominio HNH nucleasa, ⇒ Dominio RuvC nucleasa
- ❖ **SECUENCIA PAM**: Secuencia Adyacente a protoespaciador en DNA invasor, Primer elemento de reconocimiento del DNA invasor para Cas9
- ❖ **RNA GUÍA**: Se liga por complementariedad de bases a protoespaciador, Heterodúplex: crRNA - tracrRNA (sgRNA)

### 2. COMPLEJOS DE INTERFERENCIA COMO HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÉTICA

**2.1 Desafíos en el desarrollo de la tecnología CRISPR**

- Potenciación vía HDR
- Efectos off-target
- Importante en implementación práctica clínica
- Restricción mediada por PAM
- Variaciones en la eficacia
- Mutaciones simultáneas en múltiples genes

**2.2 Mas allá de la producción de DSB**

- Base editing
- Promover transcripción genes
- Silenciamiento genes
- CRISPR Imaging: Marcar cromosoma, Estructura 3D Genoma

**2.3 Construcción y técnicas de inserción genética CRISPR**

- Estrategia más empleada: Transfusión directa proteína Cas9 en complejo con SgRNA
- Técnica de inserción genética: Métodos no virales, Métodos virales
- Balanza: Eficacia vs Inducir respuesta Inmune Efs colaterales

### 3. CRISPR/Cas9 EN TRATAMIENTO INMUNOLÓGICO CÁNCER: CART CELLS

Edición genética de linfocitos T para provocar la expresión, en la superficie de los mismos, de un receptor de antígeno quimérico, que redireccione la especificidad en estas células hacia las cancerígenas

Enfoque emergente en inmunoterapia → "Adaptative cell transfer" → Células CART

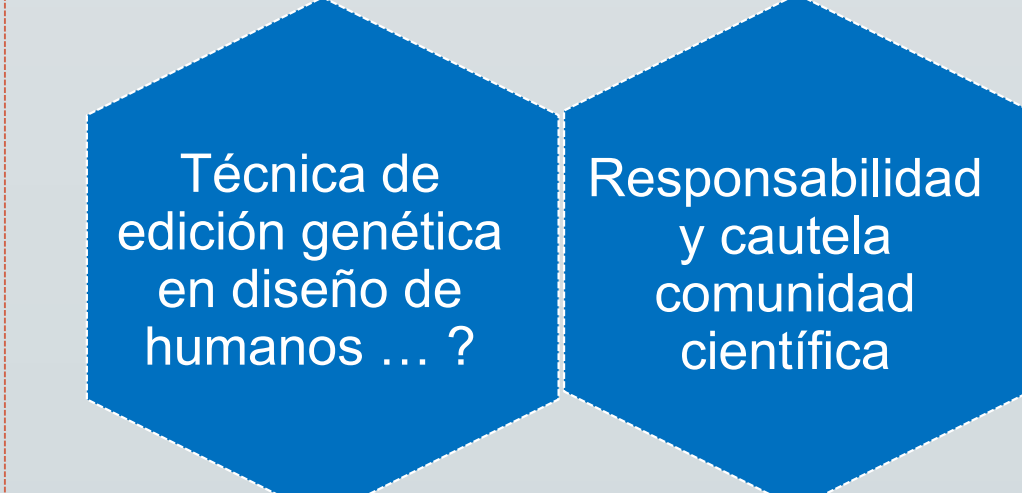
Tratamiento Leucemia Linfoblástica aguda (LLA). KYMRIAH® - FDA. CART dirigido a antígeno de superficie de linfocito B: CD19. Remisión 90% en pacientes con LLA

Células off-the shelf

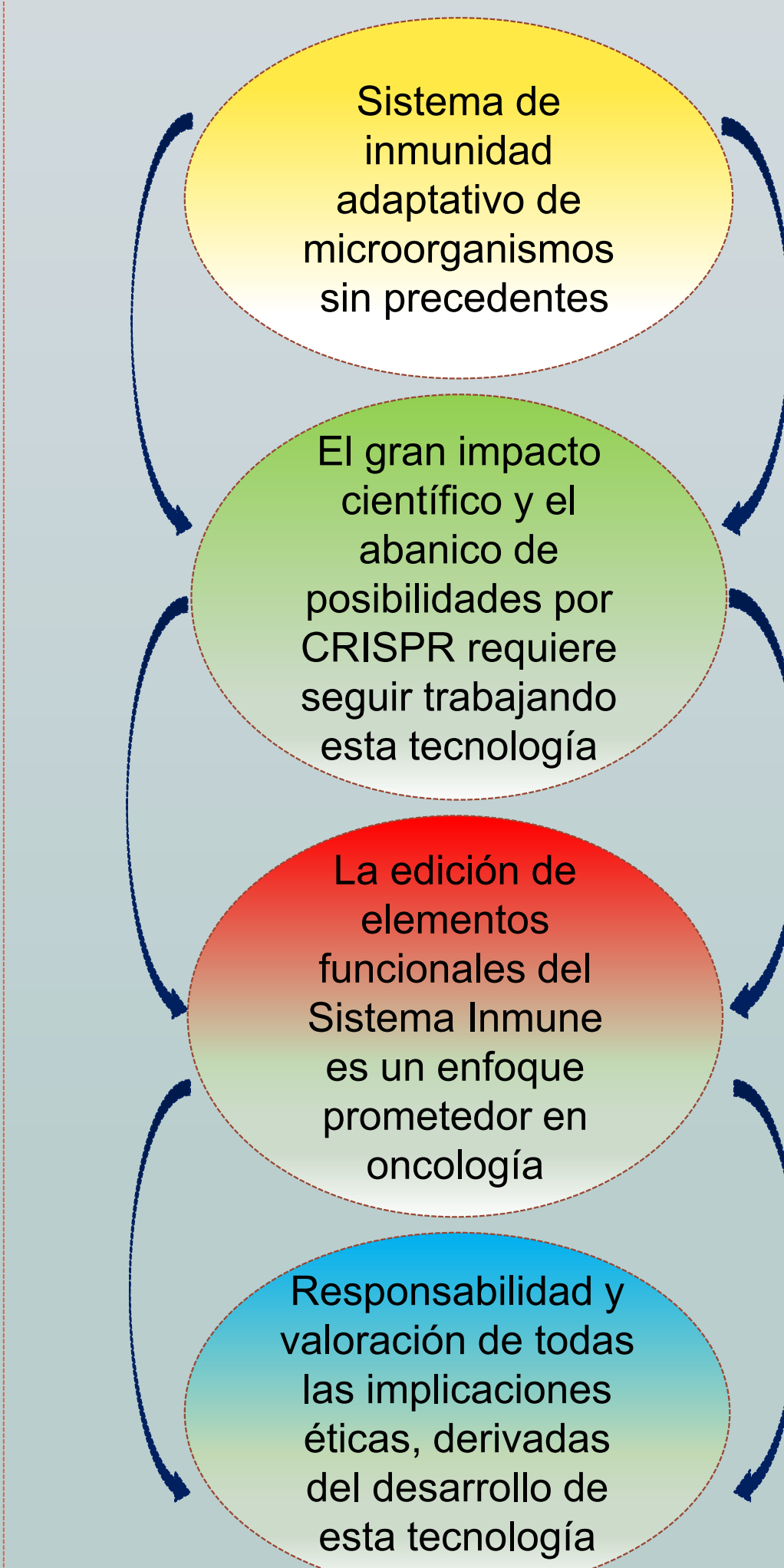
- ↑ Pacientes con acceso a estas terapias
- Empleo de edición genética para desactivar regiones funcionales TCR implicadas en Enfermedad de Injerto contra Huésped

Ingeniería de células CAR T para producir receptores especiales en su superficie Instituto Nacional del Cáncer (NIH)

### 4. IMPLICACIONES ÉTICAS



## Conclusiones



## Bibliografía

- Dellaire, G., Salsman, J. Precision Genome Editing in the CRISPR Era. *Biochemistry and cell biology* 95:187-201.2017
- Urnov, F.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews* 11:636-646.2010
- Agarwal, 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
- Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168:21. 2017
- Mojica F.J.M., Rodríguez-Valera, F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*. 283:3162-3169. 2016
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Sampson, T.R., Weiss, D.S. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 36:34-38.2014
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157:1262-1278.2014

.... Otras Fuentes bibliográficas reseñadas en la memoria

❖ **PROTEINAS ANTI-CRISPR** → Mecanismos evolutivos de resistencia CRISPR → ¿Posible aplicación biotecnológica?