



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
EDICIÓN GENÓMICA: LA TECNOLOGÍA  
CRISPR/Cas9 Y SU APLICACIÓN EN  
ENFERMEDADES HUMANAS.**

Autor: Patricia Hinojar Merín

Tutor: Elvira Román González

Convocatoria: Junio

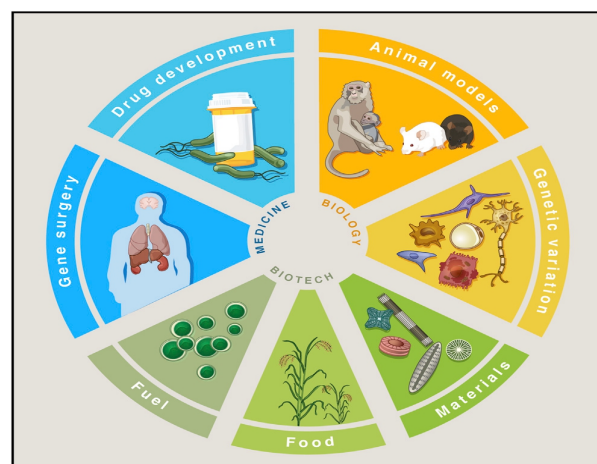
## RESUMEN

El descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9 ha revolucionado el campo de la Genómica debido a sus numerosas aplicaciones. En la actualidad, se emplea en Ciencia para generar modelos de ratón representativos de enfermedades humanas sobre los que pueden ensayarse fármacos o terapias. Además, se emplea para producir la supresión de genes in vitro con muy diferentes objetivos, y su aplicación más interesante para el ser humano quizá sea la posibilidad de acabar con enfermedades de diferente naturaleza a partir de un mismo sistema. En el presente trabajo se han revisado a grandes rasgos algunos de los artículos más relevantes en el campo de la investigación clínica, y estos han revelado unos resultados muy prometedores, que postulan a CRISPR/Cas9 como el futuro de la Genómica en general, y en concreto de la terapia génica.

## ANTECEDENTES

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante en los años 70 marca una nueva etapa para la Biología: comienza a ser posible la manipulación molecular del ADN. Esto permite alcanzar una mayor profundidad en el estudio de los genes a nivel individual: es posible comprender los mecanismos de expresión y regulación, así como sus efectos a nivel molecular y fisiológico.

La adición o supresión de genes o secuencias concretas en células o seres vivos tiene aplicaciones muy diferentes, desde la incorporación de genes de resistencia en especies vegetales para poder cultivarse en casi cualquier lugar del mundo, hasta la supresión de genes que producen enfermedades en el ser humano. Además, a nivel industrial, es posible aumentar el rendimiento de la producción de diferentes productos (fármacos, combustibles, materiales...), y en el campo de la investigación clínica estos procesos permiten generar tejidos o animales modificados genéticamente, sobre los que estudiar diferentes tratamientos para enfermedades humanas.<sup>1</sup>



**Figura 1. Aplicaciones de la edición genómica.** (Hsu et al, 2014).

En este contexto, la tecnología CRISPR/Cas9 es el método de edición genómica más recientemente adoptado, y supone una revolución por su versatilidad, especificidad y también por la sencillez de su diseño.

## **INTRODUCCIÓN**

El descubrimiento de CRISPR se remonta al año 1987, cuando Ishino et al describen la presencia de secuencias repetitivas en el genoma de la bacteria *Escherichia coli*. Dichas secuencias llamaron su atención por tener en común una separación entre ellas de 32 pares de bases no repetitivos.<sup>ii</sup> La función de estas secuencias fue desconocida durante décadas, pero la secuenciación de un gran número de genomas bacterianos en los años posteriores llevó al descubrimiento de secuencias de igual naturaleza en muchas otras especies de bacterias y arqueas. Mojica et al determinaron que estas secuencias interespaciadas y repetitivas constituyen un elemento presente en más del 40% de las especies bacterianas secuenciadas hasta la fecha, y alrededor de un 90% de las arqueas.<sup>iii</sup>

El interés por estas secuencias bacterianas cuya función era aún desconocida fue en aumento. En el año 2002, un equipo en el que colaboró el científico español José JM Mojica acuña el término CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) para referirse a ellas.<sup>iv</sup>

El estudio en profundidad de estas secuencias llevó a un nuevo descubrimiento: todas ellas presentaban secuencias adyacentes con un alto grado de conservación, que después se denominarían genes Cas.<sup>v</sup> Estos genes codifican para una familia de proteínas con dominios helicasa, nucleasa, polimerasa, y también varias regiones de unión a RNA, por lo que en un principio se postuló que estas proteínas constituían un sistema de reparación natural del material génico.

El análisis comparativo tanto de las secuencias CRISPR como de sus genes adyacentes, los genes Cas, reveló que correspondían a fragmentos nucleicos del genoma de algunos virus y plásmidos. Con este descubrimiento se postula por primera vez la posibilidad de que el sistema CRISPR sirva a las bacterias como sistema de defensa con capacidad adaptativa ante agentes exógenos.

Para confirmar esta nueva hipótesis, se insertaron secuencias víricas concretas en algunas cepas de *Streptococcus thermophilus*. Tras la infección con el fago correspondiente a dicha secuencia, se detectó la capacidad de las bacterias para eliminar los fragmentos nucleicos virales, evitando así el proceso de infección.<sup>vi</sup>

## **FUNCIONAMIENTO EN PROCARIOTAS**

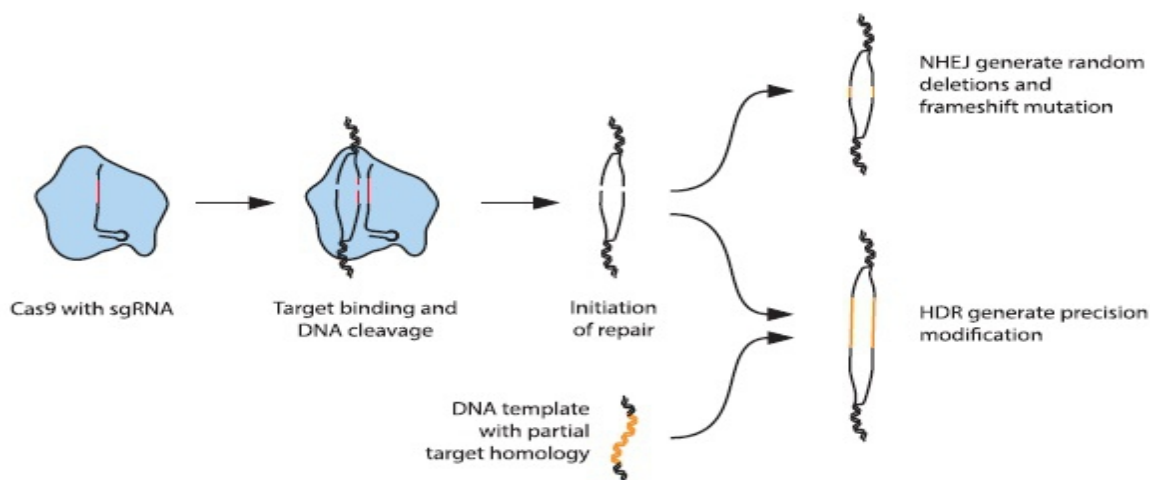
En procariotas, los sistemas de defensa ante agentes externos se clasifican en innatos y adaptativos.

Los sistemas innatos no son específicos, sino que reconocen patrones muy generales asociados a infección. Por otra parte, los sistemas adaptativos son específicos, y se basan en la adquisición de caracteres concretos y generalmente diferenciales del patógeno para así reconocerlos de forma rápida y precisa cuando se produce la infección.<sup>vii</sup>

La existencia de sistemas con capacidad adaptativa en procariotas se confirmó con el descubrimiento de CRISPR. Este sistema se basa en secuencias de ADN que al transcribirse funcionan como sistema inmune bacteriano frente a infecciones víricas. Está presente tanto en el ADN nuclear como en plásmidos, y sus secuencias espaciadoras, como ya se ha mencionado, son derivados nucleicos de secuencias víricas. Con la adición de nuevas secuencias espaciadoras, las bacterias adquieren información de reconocimiento de nuevos agentes virales. Estas nuevas secuencias se van añadiendo mediante modificaciones del genoma bacteriano, siempre adyacentes a las secuencias CRISPR anteriores, por lo que finalmente las secuencias CRISPR quedan ordenadas cronológicamente en función del orden de las infecciones a las que ha sobrevivido la bacteria.

Además de estas secuencias de reconocimiento, para el correcto funcionamiento del sistema es necesaria la presencia de genes Cas contiguos a las secuencias CRISPR. La expresión de estos genes da lugar a proteínas con actividad nucleasa, que serán las responsables de realizar cortes de doble cadena en aquellos fragmentos de ADN que se hayan unido por complementariedad de bases a alguna de las secuencias CRISPR de la bacteria.

Estos cortes de doble cadena permiten inactivar genes, pero también permiten su modificación mediante la inserción de secuencias de interés durante su reparación. El estudio de los mecanismos naturales de reparación del ADN en bacterias y levaduras, así como de sus mecanismos de recombinación, reveló la existencia de maquinaria endógena cuya función principal es la reparación de dobles cadenas de ADN. Estos mecanismos se activan cuando se produce una rotura de doble cadena en el ADN, y son imprescindibles para la supervivencia de la célula.<sup>viii</sup>

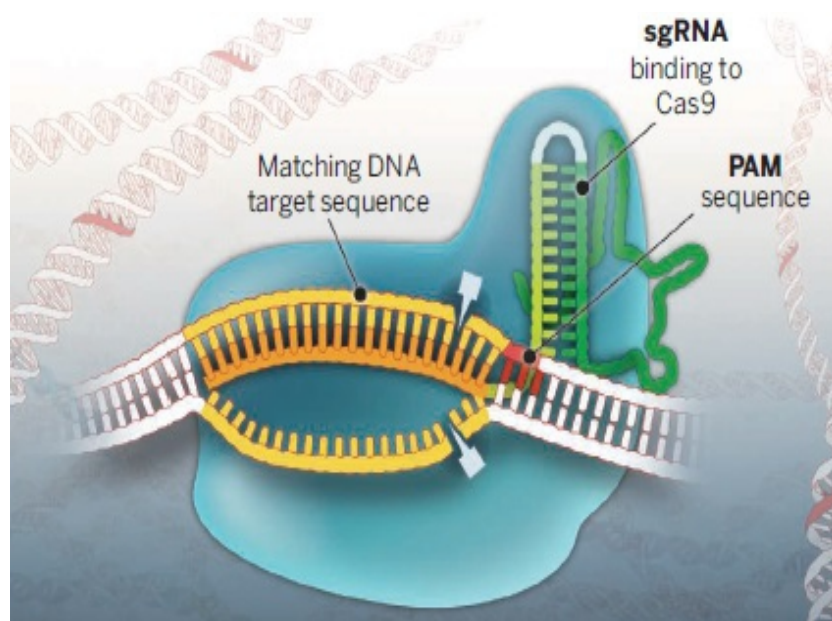


**Figura 2. Proceso de recombinación homóloga y no homóloga.** (Cai et al, 2016).

## PROCESO DE EDICIÓN EN EUCARIOTAS

Existen cuatro tipos de enzimas empleadas con el propósito de realizar cortes de doble cadena en el ADN para editarlo: meganucleasas, Nucleasas de Dedos de Zinc, TALENs, y por último el sistema CRISPR/Cas9. Todas ellas son programables para realizar cortes en regiones concretas, y sin embargo CRISPR/Cas9 es la técnica más reciente y más ampliamente utilizada.

El interés en el sistema CRISPR/Cas9 reside principalmente en la sencillez de su diseño, ya que solo es necesario producir la secuencia de RNA guía complementaria a la región de interés para dirigir a la nucleasa Cas9. El segundo requerimiento para el correcto funcionamiento del sistema es que debe existir, adyacente a la secuencia de ADN de interés, una secuencia trinucleotídica (denominada secuencia PAM, del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) de estructura -NGG-. Esta secuencia PAM permite que se produzca un cambio conformacional en la nucleasa y se active así el proceso de corte de doble cadena.



**Figura 3. Componentes del sistema CRISPR-Cas9.** (Doudna et al, 2014)

*El sistema consta únicamente de dos componentes: un ARN guía (ARNg), complementario a la secuencia que se desea cortar, que a su vez dirige al segundo componente: una nucleasa, siendo la Cas9 la más ampliamente estudiada, y la más utilizada. Tras la unión del ARNg a la secuencia de interés, la Cas9 reconoce la secuencia PAM, lo que permite producir el corte.<sup>ix</sup>*

El proceso de edición génica con CRISPR comienza realizando un corte de doble cadena en la región específica de interés que se quiere modificar. Este corte en la hélice del DNA produce la activación de dos procesos de reparación del DNA que compiten entre ellos: Recombinación Homóloga, y Recombinación no Homóloga.

La Recombinación No Homóloga puede conducir a inserciones o deleciones en la secuencia génica. Por otra parte, el proceso de Recombinación Homóloga supone la inserción de una secuencia de DNA, de manera que se introducen modificaciones en el locus concreto donde se haya producido el corte.

Este sistema de inserción de genes no sólo permite la adición de secuencias de interés para modificar genéticamente a un organismo o célula; hace posible además la regulación de la expresión génica, la visualización del genoma in vivo mediante adición de secuencias correspondientes a proteínas fluorescentes, y el etiquetado de genes y sus proteínas.

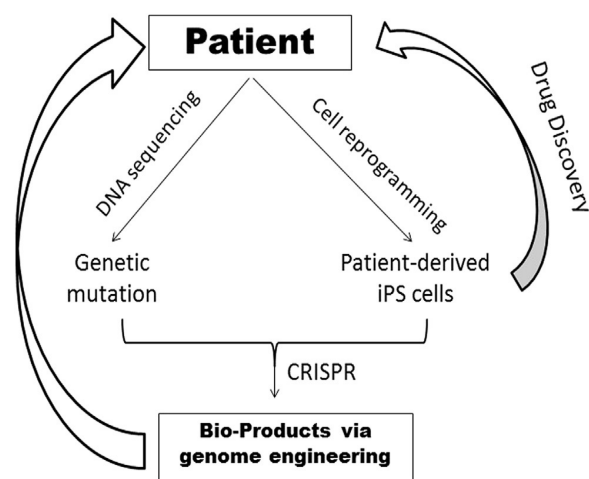
El uso de CRISPR como nueva herramienta terapéutica para cierto tipo de enfermedades ha ido ganando popularidad desde hace unos años. En la actualidad, numerosos estudios combinan este método de edición genómica con células madre pluripotentes inducidas, cuyo descubrimiento ha resultado enormemente enriquecedor para la investigación en clínica.<sup>x xi</sup>

Takahashi y Yamanaka generaron por primera vez células pluripotentes a partir de células somáticas humanas empleando cuatro factores de transcripción que ellos mismos descubrieron. Estos factores actualmente se conocen como Factores de Yamanaka: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf-4.

Este método de “reprogramación celular” se llevó a cabo a causa de la problemática derivada del uso de células pluripotentes humanas para el estudio de la curación de ciertas enfermedades. La experimentación con células embrionarias humanas supone un evidente conflicto ético que dificulta el desarrollo de la ciencia en este campo; y, por otra parte, los trasplantes alogénicos generan problemas de histocompatibilidad que se ven resueltos empleando células pluripotentes compatibles.<sup>xii</sup>

La reprogramación de células somáticas se emplea en la actualidad sobre todo para el estudio de enfermedades in vitro, mediante generación de tejidos diferenciados a partir de ellas; sin embargo su utilidad en clínica reside en la posibilidad de realizar trasplantes de estas células.<sup>xiii</sup>

En un trasplante autólogo, el donante actúa como su propio receptor. Las células reprogramadas proceden del paciente enfermo, por lo que en su estado desdiferenciado cuentan con la mutación que produce la enfermedad. Una vez terminado el proceso de reprogramación, es posible emplear CRISPR/Cas9 sobre aquellas secuencias causantes de la enfermedad, e insertar la secuencia correspondiente a un fenotipo sano. De esta forma, se obtienen células pluripotentes sanas que pueden volver a administrarse al paciente.



**Figura 4. Aplicaciones de CRISPR-Cas9 para el trasplante autólogo.** (Cai et al, 2016). El interés en esta técnica no sólo reside en la capacidad de revertir la enfermedad; además, la principal ventaja de los trasplantes autólogos es que evitan la búsqueda de donantes compatibles, y también los problemas habituales que derivan de los trasplantes alogénicos, como es el proceso de rechazo por parte del receptor. <sup>xiv</sup>

Por todo ello, la combinación del sistema de edición CRISPR/Cas9 con células reprogramadas es un método de tratamiento de enfermedades que en la actualidad está en auge: en la presente revisión se exponen algunos de los estudios más prometedores en relación con las aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en el tratamiento de enfermedades humanas.

## OBJETIVOS

El sistema CRISPR/Cas9 se ha postulado como un método revolucionario de modificación génica, pudiendo emplearse en cualquier tipo de células y con resultados muy prometedores.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca de este método de edición génica y su aplicación en enfermedades humanas. Para ello se describen varios casos representativos de la aplicabilidad de este sistema para el estudio y tratamiento de enfermedades de diferente naturaleza, con el objetivo de reflejar la versatilidad del sistema.

## METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado como fuentes de información artículos de revistas científicas como Cell, Nature, Genes and Diseases, además de bases de datos científicas como PubMed.

## RESULTADOS

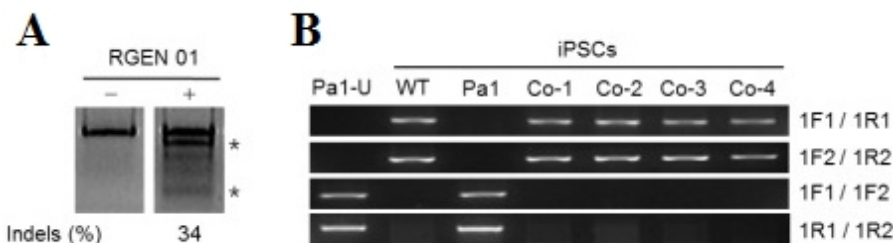
### ENFERMEDADES HEREDITARIAS MONOGÉNICAS: Hemofilia A y Beta Talasemia.

#### HEMOFILIA A

La Hemofilia A es uno de los trastornos genéticos más comunes. Está ligado al cromosoma X y se produce por mutaciones en el gen F8, en los intrones 1 o 22, que codifica para el factor VIII de la coagulación sanguínea. Los síntomas varían en un rango que va de leve a severa. Alrededor del 50% de los pacientes con Hemofilia severa presenta una inversión cromosómica en lugar de mutaciones puntuales, como ocurre con los pacientes moderados o leves.

Park et al (2015) emplean Células Pluripotentes Inducidas de pacientes con Hemofilia grave, para editarlas mediante CRISPR, con el objetivo de revertir el fenotipo enfermo (ausencia de expresión del factor VIII).<sup>xv</sup>

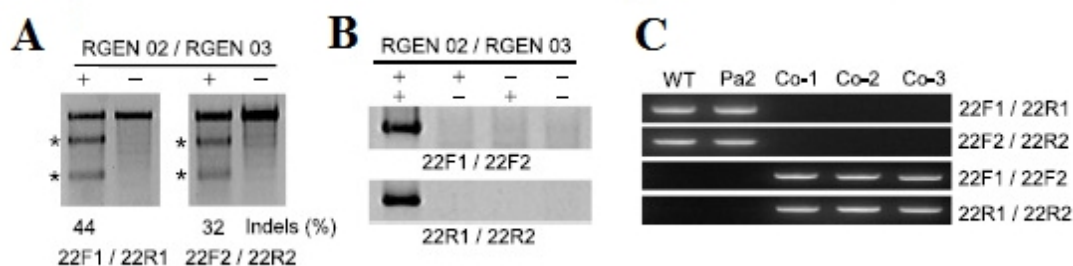
Para generar las mutaciones en cada uno de los genotipos (inversión intrón 1/intrón 22), se emplean diferentes combinaciones de ARN guía con endonucleasa Cas9 (RGENs). RGEN 01 se diseñó para unirse específicamente al intrón 1, con el objetivo de revertir la inversión por medio de un corte con la endonucleasa y su posterior reparación. La medida empírica de la eficiencia de introducción de inserciones/deleciones fue llevada a cabo en células Hela (Fig. 1a), obteniéndose un 34% de *indels*. Posteriormente, se llevó a cabo la transfección en clones obtenidos de un paciente enfermo, y se analizó por PCR la reversión al fenotipo WT (Fig. 1b). Como control del genotipo normal se emplean células WT. Como control negativo se muestran aquellas no modificadas (Pa1-U, células epiteliales urinarias, y Pa1, células pluripotentes inducidas del paciente) que siguen presentando la inversión que produce la enfermedad (Fig. 5b).



**Figura 5. Corrección de la inversión parcial del gen F8 (intrón 1) en CMPIs de un paciente con Hemofilia A. (Park et al, 2015).**

(a) Ensayo de endonucleasa T7 para RGEN01. Resultados para la eficacia del corte en la zona de interés. Se muestra la frecuencia de inserciones y deleciones en porcentaje. (b) La transfección de un plásmido codificante para Cas9 y RGEN01 en cuatro clones obtenidos de un paciente enfermo de Hemofilia A se analizó mediante PCR. WT: control positivo de ausencia de mutación (inversión parcial de F8). Pa1-U y Pa1: control negativo de reversión de la mutación característica de Hemofilia A.

Para la mutación en el intrón 2 se diseñaron dos guías diferentes, RGEN02 y RGEN03 correspondientes a dos zonas diferentes del intrón 22. De forma similar a la estrategia seguida para la inversión del intrón 1, se testó la eficiencia de RGEN02 y RGEN 03 en células HeLa (Fig. 6a). Dicha inversión sólo fue efectiva cuando se cotransfectaron ambos plásmidos, pero no por separado. (Fig 6b). La transfección de estos ARN guías en líneas celulares de pacientes portadores de la mutación, dio como resultado la corrección de la inversión obteniéndose un fenotipo similar al de células WT (Fig 6c).

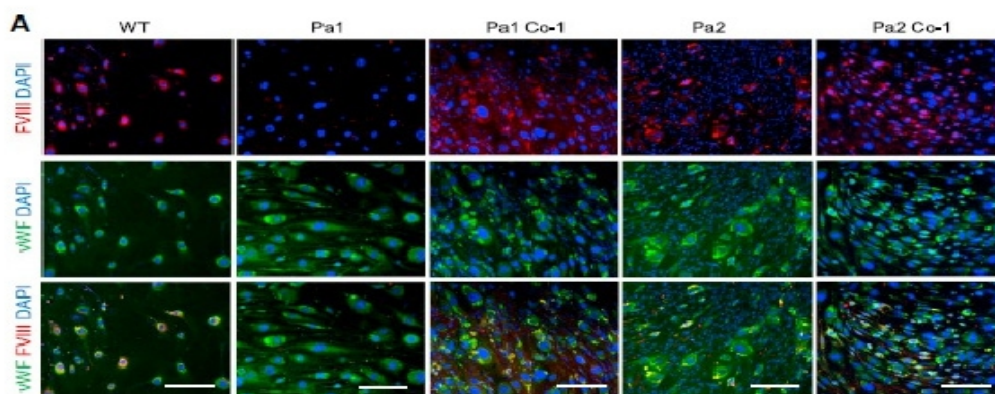


**Figura 6. Corrección de la inversión parcial del gen F8 (intrón 22) en CMPIs de paciente con Hemofilia A.** (Park et al, 2015).

(a) Resultados para el ensayo de endonucleasa T7 en células HeLa (WT para inversión Hemofilia A). En el pie de figura se muestra la frecuencia de inserciones/deleciones introducidas por Cas9 en presencia de los sgRNAs correspondientes (RGEN 02/RGEN03). (b) Análisis por PCR de células HeLa transfectadas con RGEN02/RGEN03 para detectar la corrección de la inversión del segmento cromosómico de 563 kpb correspondiente a la mutación de Hemofilia A. (c) Transfección de RGEN02 y RGEN03 en clones procedentes de células de un paciente portador de la inversión del intrón 22 del gen F8. WT y Pa2: CMPIs del paciente control negativo de reversión de la mutación característica de Hemofilia A. 22F1/22R1; 22F2/22R2: cebadores utilizados en la reacción de PCR.

Los resultados obtenidos para ambos genotipos sugieren que se ha conseguido producir una corrección en la mutación que produce la enfermedad. Mediante ensayos funcionales en modelo murino de la enfermedad, pudo observarse una reversión del fenotipo mediante la utilización de CMPIs modificadas *in vitro* mediante CRISPR-Cas9 (Fig. 7). Clones de CMPIs obtenidos del paciente portador de la mutación que provoca la enfermedad fueron aislados y modificados mediante CRISPR-Cas9 para revertir la mutación.

Posteriormente, dichos clones fueron diferenciados en células endoteliales. El análisis de expresión del Factor de von Willebrand permitió comprobar que la diferenciación fue exitosa (Fig 7). Finalmente, las células endoteliales modificadas fueron trasplantadas en un modelo murino de Hemofilia A. La reversión del fenotipo enfermo a sano se analizó mediante inmunofluorescencia para expresión del factor VIII (codificado por el gen F8) (Fig.7).



**Figura 7 Rescate funcional de la deficiencia del factor VIII en modelo murino de Hemofilia mediante utilización de CMPIs con mutación revertida por CRISPR-Cas9. (Park et al 2015)**

(a) Comparativa de expresión del Factor VIII en células endoteliales WT (Wild Type), Células Madre Inducidas de los pacientes 1 y 2 (Pa-1 y Pa-2) y Células Madre Inducidas tras la corrección con CRISPR de los pacientes 1 y 2 (Pa1-Co1 y Pa2-Co2); DAPI: marcador celular de referencia, sirve para detectar el total de células presentes.; FVIII: Factor VIII de coagulación; vWF: Factor de Von Willebrand: aparece únicamente en células endoteliales, por lo que actúa como marcador de diferenciación.

## BETA TALASEMIA.

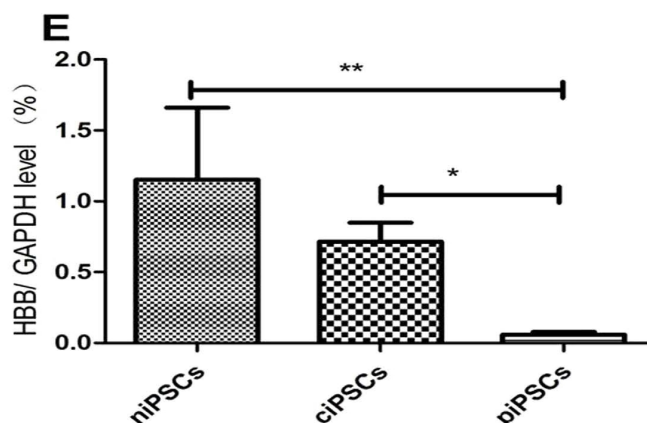
La beta talasemia es una de las enfermedades monogénicas hereditarias más prevalentes en la población. Se caracteriza por una síntesis anormal o incluso inexistente de las cadenas  $\beta$  de la globina, que forman parte de la hemoglobina. Su tratamiento se basa principalmente en transfusiones de hematíes cada uno o dos meses durante toda la vida del paciente.

Alternativamente, el trasplante de médula ósea resulta eficaz un 90% de las veces, pero las limitaciones de compatibilidad entre donantes y receptores hace que solo sea posible en un 30% de los pacientes.<sup>xvi</sup> Por este motivo, la terapia génica resulta muy prometedora para los avances en la curación de esta enfermedad.

En el siguiente estudio, Ou et al emplean CPIs que presentan la mutación que produce la enfermedad, y efectúan en ellas una corrección de la mutación para evaluar su posterior capacidad para sintetizar cadenas de  $\beta$ -globina.<sup>xvii</sup>

La estrategia de edición establecida para revertir la mutación presente en las células pluripotentes del paciente consiste en corregir la delección de una de las bases (Adenina, Fig. 8)





**Figura 10. Ensayo funcional in vivo de la corrección mediante CRISPR-Cas9 de la mutación causante de la enfermedad en el gen de la  $\beta$ -globina. (Ou et al, 2016).**

*NiPSCs: fenotipo de células procedentes de un humano sano (WT), ciPSCs: células del paciente cuya mutación ha sido corregida (ambas fenotipos sanos). PiPSCs: células que aún presentan la mutación (representativas de un fenotipo enfermo).*

## **PROCESOS INFECCIOSOS : Virus de Inmunodeficiencia Humana y Virus de la Hepatitis B.**

### **VIH**

El proceso de infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana comienza cuando el virus se une al receptor CD4. Posteriormente, interactúa con los receptores de quimioquinas CXCR4 o CCR5, para adentrarse en la célula.<sup>xviii</sup>

Los tratamientos Anti Retrovirales (AR) actualmente consiguen controlar la viremia de los pacientes, pero no elimina las secuencias virales de las células infectadas, por lo que el virus continúa en el organismo de forma latente. Para evitar su activación, es imprescindible un tratamiento continuado y crónico con los fármacos AR; de lo contrario, los virus se reactivarían generando un nuevo proceso de infección.<sup>xix</sup>

### **RESISTENCIA A LA INFECCIÓN POR MODIFICACIONES EN EL RECEPTOR CCR5.**

El receptor de quimioquinas 5 (CCR5) es el principal receptor implicado en la infección por el virus del VIH. Los individuos homocigóticos para una mutación concreta en el gen que codifica este receptor (mutación CCR5 $\Delta$ 32, es una delección de 32 pares de bases en el exón 4 del gen CCR5) presentan resistencia a la infección, mientras que aquellos individuos heterocigóticos para dicha mutación desarrollan la enfermedad de un modo mucho más progresivo.

El trasplante de células pluripotentes inducidas de aquellos pacientes que presenten la mutación podría generar resistencia a la infección en la población susceptible de infección; sin embargo, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos sanos no parece un método muy eficaz para erradicar la enfermedad. Esto se debe a la baja prevalencia de dicha mutación en la población general, y a las dificultades derivadas de la histocompatibilidad entre pacientes.

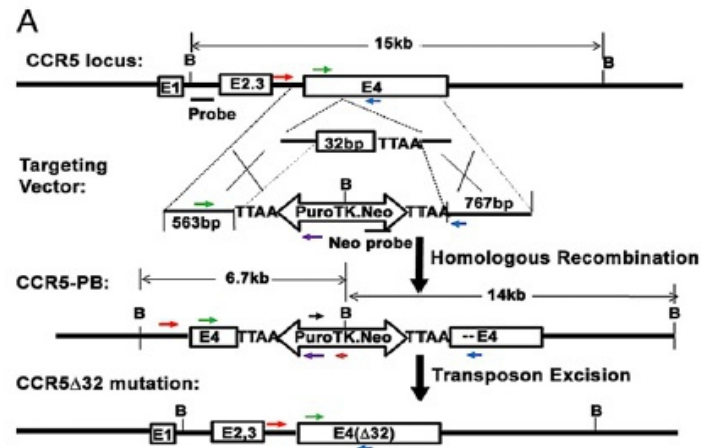
Las Células Pluripotentes Inducidas parecen ser muy prometedoras para este objetivo, ya que pueden diferenciarse en cualquier tipo celular, y también son específicas del paciente, que, como ya se ha explicado, actúa como su propio donante.

El estudio realizado por Ye et al (2014) emplea la tecnología CRISPR/Cas9 para generar la mutación que ocurre de forma natural, sin ningún otro efecto sobre el genoma de las células del paciente.<sup>xx</sup>

El objetivo es producir artificialmente la delección de 32 pb que ocurre de forma natural sin producir modificaciones residuales. Una vez obtenidas las Células Madre Pluripotenciales Inducidas, se procede a su modificación genética.

El diseño del ARN guía se llevó a cabo considerando que debía ser muy específico de esa región concreta, para no afectar a otros genes. Además, la homología del gen CCR5 con el gen CCR2 hace necesaria la especificidad. Por último, la delección iba a realizarse empleando un transposón *piggyBac*, que emplea secuencias TTAA para integrarse, por lo que el ARN guía debía ser complementario a una región con todas las características mencionadas. Tras la secuenciación del gen de interés, se estableció un ARN guía que cumplía las anteriores especificaciones.

Tras el corte de doble cadena, la activación del proceso de recombinación homóloga conlleva la inserción del transposón *piggyBac*. Este, contiene genes de resistencia a puromicina y neomicina, que permite seleccionar aquellas que han sido modificadas genéticamente. Aquellas células que incorporen el transposón correctamente en su genoma serán por tanto resistentes a la acción de la puromicina y neomicina. La selección de células modificadas se lleva a cabo por eliminación de aquellas células no resistentes (y por tanto no modificadas), de manera que se obtienen únicamente aquellas células que sí hayan sido modificadas. Posteriormente, mediante el uso de una transposasa se elimina del genoma el transposón completo, dejando atrás una delección de 32 pb que reproduce exactamente la mutación que ocurre de forma natural en pacientes resistentes. (Fig 11).



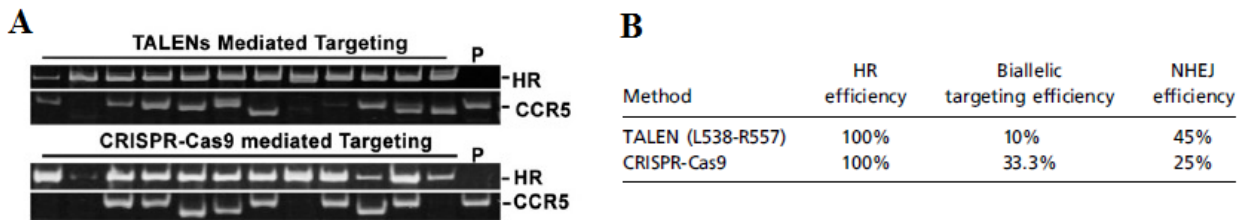
**Figura 11. Estrategia de edición para generar la delección de 32 pb en el exon 4, responsable de la resistencia a la infección por VIH. (Ye et al, 2014).**

(a) Arriba: estructura del gen CCR5; E: exón. Las flechas indican cebadores para PCR (P1, negro; p2, morado; P3, verde; P4, azul; P5, rojo; P6, marrón).

El mencionado estudio busca comparar la eficiencia de la edición realizada mediante un corte con endonucleasas TALENs, y con CRISPR-Cas9. Los ensayos de PCR realizados en los diferentes clones obtenidos tras su selección con puromicina se realizaron por duplicado, para comparar la eficiencia del sistema CRISPR-Cas y del mismo método de edición mediante TALENs (Fig. 12).

Para el ensayo de PCR (Fig. 12 a) la banda HR corresponde a las amplificaciones obtenidas al utilizar cebadores poco específicos que revelan procesos de reparación del ADN (tanto de recombinación homóloga como no homóloga). Para la banda CCR5, se establece un control (P) de un tamaño concreto; las amplificaciones obtenidas, si se han generado por Recombinación Homóloga, deberían ser del mismo tamaño que la parental. De esta forma, la banda P sirve para detectar secuencias generadas por Recombinación No Homóloga (que serán de mayor o menor tamaño, puesto que en este proceso se producen habitualmente inserciones y delecciones de bases en la secuencia). Por otra parte, puesto que la mutación generada debe ser bialélica para generar un fenotipo homocigótico para la mutación, la ausencia de amplificación en este caso revela reparación en un solo alelo; los clones en los que no aparecen secuencias amplificadas se descartan.

La tabla (Fig. 12b). Cuantifica de forma numérica la eficiencia de los procesos evaluados por PCR, revelando una mayor eficiencia en la edición bialélica para el sistema CRISPR-Cas9, así como una menor frecuencia de procesos de Recombinación No Homóloga para este método de edición.



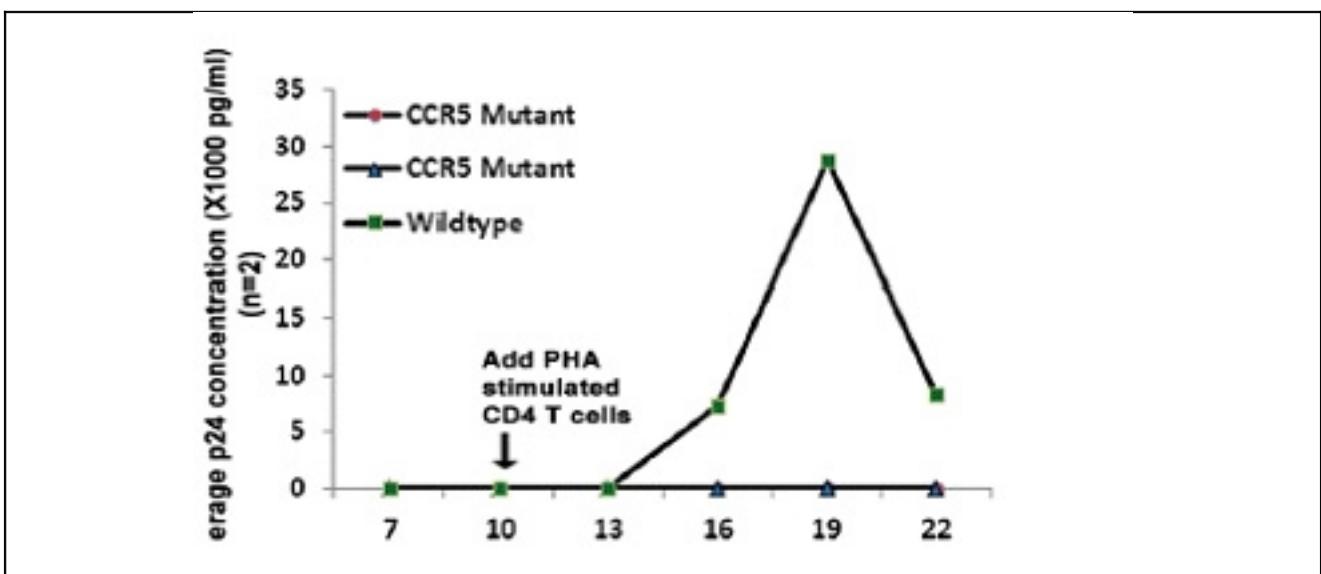
**Figura 12. Comparación de la eficiencia de CRISPR-Cas9 y TALENs. (Ye et al, 2014).**

(a) Ensayo de PCR sobre los clones obtenidos tras eliminar el transposón, para ambos métodos de edición. HR: banda de referencia de proceso de reparación del ADN. CCR5: Banda de evaluación de la eficiencia de la edición en los clones. P: Control de células no editadas.

(b) Tabla comparativa de la eficiencia (en porcentaje) de CRISPR-Cas9 y TALEN para los procesos de Reparación, Edición bialélica, y Recombinación No Homóloga respectivamente.

Una seleccionados los clones correctamente editados, se diferenciaron en monocitos y macrófagos para comprobar su resistencia a la infección por el virus VIH. Se cultivaron dos colonias de células modificadas y una como control, de células no modificadas (WT)

Los tres cultivos se inocularon con VIH-1 con tropismo por el receptor CCR5. Al décimo día post-infección, se añaden en los tres cultivos Linfocitos CD4+ para ampliar la presencia del antígeno p24 en caso de que la infección se hubiera hecho efectiva en alguna de las tres colonias. Los resultados revelan un considerable aumento de la concentración de antígeno p24 en las colonias no modificadas para la mutación que confiere resistencia(WT), mientras que en las dos colonias de células modificadas el antígeno permanece inexistente. Esto quiere decir que la infección no se ha hecho efectiva en las células mutadas, y que por tanto la mutación podría conferir resistencia a la infección (Fig. 13).



**Figura 13: Cantidad de antígeno p24 hallado en las muestras frente al tiempo de incubación. CCR5 mutant (ambas) cultivos de células modificadas para presentar la delección de 3pb. WT: control negativo de células que no presentan la mutación. (Ye et al,2014).**

## VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

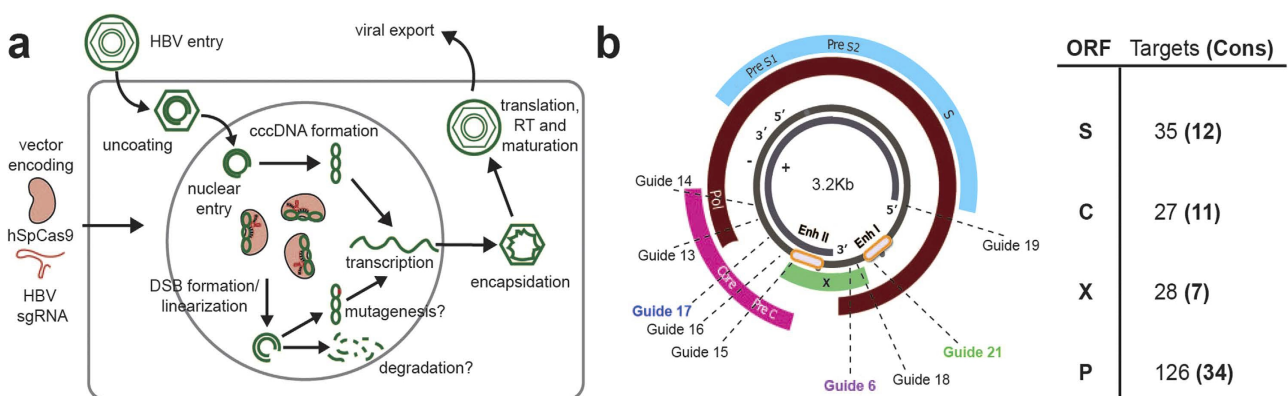
La Hepatitis B es una enfermedad infecciosa producida por un virus de la familia *Hepadnaviridae*, que infecta los hepatocitos del ser humano. Del total de personas infectadas por este patógeno, se estima que alrededor de 250 millones de personas en todo el mundo sufren Hepatitis B de tipo crónico, que deriva en cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular, llegando a producir 600.000 muertes al año.

En el interior de las células a las que infecta, el virión existe en forma de doble cadena cíclica de ADN cerrada de forma covalente. Este ADN cíclico cerrado covalentemente (ADNccc) presenta una enorme estabilidad, y es por ello que las terapias anti retrovirales, al igual que ocurría con el virus del VIH, son eficaces para inhibir la replicación viral, pero no eliminan el genoma vírico.<sup>xxi</sup>

La posibilidad de eliminar el genoma vírico mediante supresión con CRISPR/Cas9 se presenta como una alternativa muy prometedora a los tratamientos convencionales.

El objetivo del presente estudio es insertar el sistema CRISPR para realizar cortes de doble cadena en el ADN cíclico, con su correspondiente linearización. El ADN tenderá a reorganizarse de forma circular, pero si estos cortes se realizan de forma repetida cabe esperar que pierda su integridad e incluso se degrade.<sup>xxii</sup>

Para este propósito, se diseñaron 24 ARN guías diferentes complementarios a diferentes zonas del genoma vírico, en concreto regiones conservadas en los diferentes fenotipos víricos. (Fig. 14b)

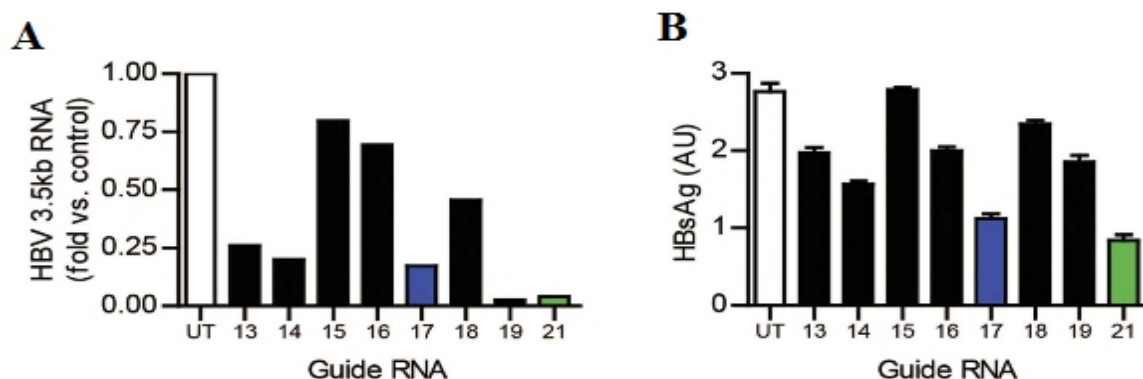


**Figura 14: Estrategia de edición para modificar el genoma vírico.** (Ramanan et al, 2015).

(a) Estrategia de edición del genoma vírico. Tras transfectar tanto la secuencia vírica junto con el sistema CRISPR-Cas9 y los diferentes guías, se espera que el corte en el genoma vírico lleve a su mutagénesis o degradación.

(b) Representación esquemática del genoma vírico y las zonas de unión de los diferentes guías (izquierda). Número total de potenciales zonas de unión en los diferentes ORFs, y aquellas conservadas del total (derecha).

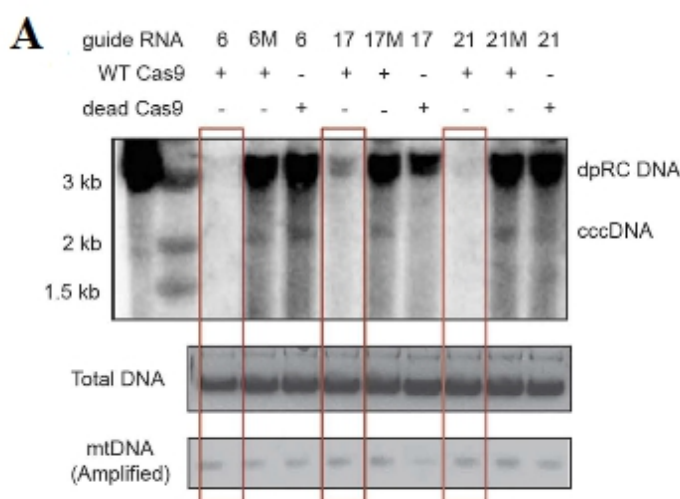
Con el objetivo de comprobar la eficacia de los diferentes ARN guías, se procedió a su transfección en células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Se cotransfectó el plásmido codificante para el genoma vírico, además de otro codificante para la Cas9 y cada uno de los guías de forma separada. Para cuantificar la eficacia de cada uno de los guías, se analizó posteriormente la producción de RNA vírico, el sustrato de la retrotranscriptasa que sintetiza el ADN vírico, y en un segundo ensayo se cuantificó el título antigénico para antígenos de superficie. Ambos parámetros se consideran indicativos de expresión y replicación de material genético viral. (Fig 15).



**Figura 15. Cuantificación de material genético vírico y título antigénico en células HepG2 transfectadas con diferentes ARNs.** (Ramanan et al, 2015).

(a) Cantidad relativa de ARN vírico para cada uno de los cultivos transfectados con cada ARNg. (b) Título antigénico presente en los cultivos HepG2 para cada ARNg.

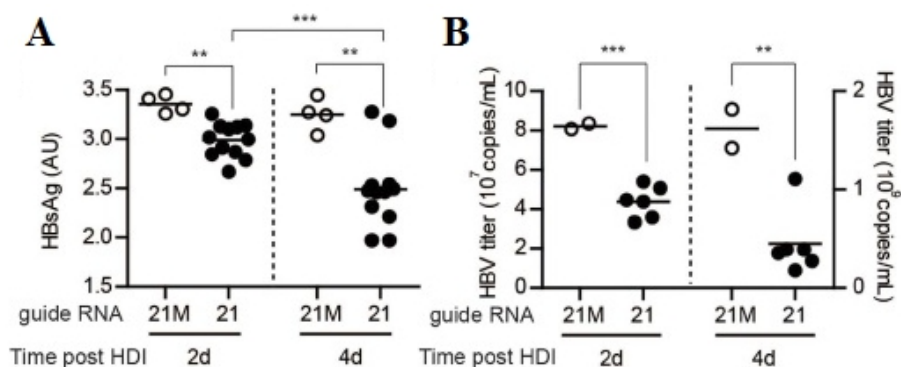
Para confirmar el correcto funcionamiento de los guías más eficaces, se realizó un Southern blot para cuantificar las diferentes formas de ADN vírico presentes en los cultivos tras el corte con CRISPR (correspondiente a cada guía) (Fig.16).



**Figura 16. Cuantificación de ADN vírico tras la transfección de células HepG2 con los guías más eficaces.** (Ramanan et al, 2015).

Los resultados anteriores se ensayaron también in vivo, mediante la inyección hidrodinámica de algunos RNA guías junto con la nucleasa Cas9, además del plásmido codificante para la secuencia viral, en un modelo de ratón inmunodeficiente.

Los resultados presentados corresponden a aquellos ratones infectados con el ARN guía 21. Los resultados revelan una supresión progresiva de la expresión del ARN viral en comparación con los controles. Las figuras corresponden, al igual que en el ensayo in vitro, a la cuantificación de material genético viral y de antígeno en sangre (Fig.17).



**Figura 17. Cuantificación in vivo de Título viral y antigénico 2 y 4 días después de la inyección hidrodinámica.** Blanco: control, corresponde al grupo de ratones infectados a los que no se les inyecta ningún ARN guía ni endonucleasa. Negro: ratones infectados a los que se les inyectó el plásmido codificante para la Cas9 y el ARN guía 21. (Ramanan et al, 2015).

## CONCLUSIÓN

1. El sistema CRISPR-Cas9 ha supuesto una revolución en la Genómica por su sencillez, versatilidad, y aplicabilidad sobre cualquier tipo de célula.
2. La posibilidad de modificar de forma tan rápida y efectiva cualquier gen era algo antes impensable, y permite la generación de modelos experimentales a gran escala.
3. Presenta gran cantidad de aplicaciones en diferentes campos: Industria alimentaria y farmacéutica, Biotecnología, Terapéutica, e Investigación Científica.
4. En la terapéutica moderna, parece ser de utilidad en enfermedades con causas muy diferentes: trastornos hereditarios, procesos infecciosos, y procesos oncológicos.
5. La investigación continua y la mejora de las técnicas lo hace cada vez más específico, y busca la inocuidad para el ser humano.
6. Perspectivas futuras: enormemente prometedor para la erradicación de enfermedades hereditarias, y la posibilidad de tratar enfermedades que hasta ahora se consideraban incurables.

- i D.Hsu P, S. Lander E, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Cell* (2014); 157: 1262-1268.
- ii Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* (1987);169(12):5429-5433.
- iii J.M. Mojica F, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*.(2000). 36 (1); 244-246.
- iv Barrangou, R., and van der Oost, J. *CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. Heidelberg, Germany. Ed. Springer.
- v Jansen R, D.A.van Embden J, Gaastra W, M.Schouls L. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* (2002); 43(6): 1565-1575.
- vi Barragou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. (2007); 215 (5819): 1709-1712.
- vii Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Bioquímie* (2015); 117; 119-128.
- viii N. Rudin, E. Sugarman, J. E. Haber. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.(1989).122; 519–534.
- ix A.Doudna J and Charpentier E. The new frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (2014); 346(6213): 1077-1089.
- x L Firth A, Menon T, S.Parker G, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell* (2015); 12 (9): 1385-1390
- xi Maetzels D, Sarkars S, Wang H et al. Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPS Cells. *Cell Stem Cell* (2014); 2 (6): 866-880.
- xii Takahashi K, Yamanaka Y. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* (2006); 126: 663-676.
- xiii Hockenmeyer D and Jaenisch R. Induced Pluripotent Stem Cells meet Genome Editing. *Cell Stem Cell*(2016); 18: 573-586.
- xiv Cai L, L.Fisher A, Huang H, Xie Z. CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes and Diseases* (2016). 3; 244-251.
- xv Park C-Y, Duk Hyoung K, Jeong Sang S, Jong-Hoon K. Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* (2015); 17: 213-220.

- xvi OMS. Beta Talasemia y otras Hemoglobinopatías. Informe OMS: Ginebra, Suiza. (2006).
- xvii Ou Z, Nu X, He W, Chen Y et al. The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human  $\beta$ -thalassemia in Mice. Nature Scientific Reports (2016).
- xviii Hütter G et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta / 32 Stem-Cell Transplantation. N Eng J Med (2009); 360: 692-698.
- xix Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, Karn J, Hu W, Khalili K. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. Scientific Reports (2016).
- xx Ye L, Wang J, I. Beyerc A, Tequea F, J. Cradicke T, Qib Z, C. Changa J, Baoe G, O. Muench M, Yub J, A. Levyd J, Wai Kana Y. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 $\Delta$ 32 mutation confers resistance to HIV infection. PNAS (2014); 111(26): 9591-9596.
- xxi Liu X, Hao R, Chen S, Guo D, Chen Y. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. Journal of General Virology (2015); (96): 2252–2261
- xxii Ramanan V, Shlomai A, B.T. Cox D, E.Schwartz R, Michailidis E, Bhatta A, David A. Scott D, Feng Zhang F, M. Rice C, N. Bhatia S. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. Scientific Reports (2015).