

TRABAJO FIN DE GRADO MEDICINA



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

**SISTEMAS DE EDICIÓN GÉNICA EN  
CÉLULAS EUCARIOTAS**

**Autora:** Lucía Velasco Martín

**Tutores:** Miguel Ángel de la Fuente, Julia Serna

**Departamento de Biología Celular, Histología y farmacología**

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**ABEs:** Editores de base de adenina

**BE:** Editores de base

**BER:** Reparación por escisión de bases

**CAS:** Proteína asociada a CRISPR

**Cas9:** Proteína asociada a crispr tipo II

**Cas9n:** Nicasa de Cas9

**CBEs:** Editores de base de citosina

**CRISPR:** Secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas

**CRISPR/Cas:** Nucleasas de secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas asociada a Cas

**CRISPRa:** CRISPR activador

**CRISPRi:** CRISPR represor

**crRNA:** RNA transcrito de CRISPR

**dCas9:** Cas9 sin actividad nucleasa

**DSBs:** Doble corte en ambas cadenas de DNA

**D10A:** Nicasa con RuvC mutado

**FokI:** Endonucleasa de restricción tipo IIS

**GFP:** Proteínas de fluorescencia verde

**HFBE3:** Editores de base de alta fidelidad

**HNH:** Dominio nucleasa de Cas9

**HR:** Recombinación Homóloga

**HDR:** Recombinación homóloga dirigida

**H840A:** Nicasa con HNH mutado

**KRAB:** Dominio inhibidor de la transcripción

**MNs:** Meganucleasas

**Nick:** Mella en DNA

**NHEJ:** Recombinación por unión de extremos no homólogos

**PAM:** Motivo adyacente al protoespaciador

**Pb:** Pares de bases

**PBS:** Sitio de unión del primer

**PE:** Prime editor (Editor de calidad)

**pegRNA:** RNA guía del Prime Editor

**pre-crRNA:** Precursor de crRNA

**RNAasa III:** Nucleasa de RNA tipo III

**RNP:** Ribonucleoproteína

**RuvC:** Dominio nucleasa de Cas9

**sgRNA:** RNA guía único. (tracrRNA y crRNA)

**SNPs:** Polimorfismos de nucleótido único

**SRSR:** Repeticiones cortas regularmente espaciadas

**TALENs:** Nucleasas tipo activadoras de la transcripción

**tracrRNA:** RNA transactivador no codificante

**UDG:** Enzima uracilo-DNA glicosilasa

**UGI:** Inhibidor de UDG

**VP46:** Dominio activador de la transcripción

**ZFNs:** Nucleasas dedos de zinc

## RESUMEN

El descubrimiento del complejo CRISPR/Cas, formado por repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas asociadas a la nucleasa Cas, ha supuesto una revolución en el campo de la edición génica e ingeniería genética, convirtiéndose en la herramienta dominante para la manipulación génica de los sistemas biológicos.

Este sistema fue hallado en el mecanismo de inmunidad adquirida de bacterias y arqueas, permitiendo incorporar material genético de fagos y plásmidos invasores en su ADN para, tras una nueva infección, ser capaces de reconocerlo mediante crRNA y degradarlo con los dominios nucleasa de Cas.

La tecnología CRISPR/cas utiliza esta herramienta de reconocimiento y escisión del ADN presente en la naturaleza y la traslada a la edición génica, permitiendo a los investigadores silenciar, activar, añadir y cambiar genes o secuencias específicas.

Además, a lo largo de los años, CRISPR/Cas ha sido modificada para conseguir técnicas más específicas y seguras que permiten aplicarlas en diversos campos de la biotecnología y la medicina, especialmente en la investigación y la terapéutica de enfermedades hasta ahora incurables.

En este trabajo se realizará una revisión bibliográfica sistemática para explicar los principales métodos de edición génica y, más en profundidad, el funcionamiento de CRISPR/Cas9 como herramienta líder de edición. Describiré su estructura, sus características y sus modificaciones más importantes como las nicasas, los Editores de Bases y el Prime Editing, y además desarrollaré sus aplicaciones en la actualidad.

**Palabras clave:** Edición génica, CRISPR/Cas, Cas9, editores de bases, prime editing.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1. ¿Qué es la edición génica?.....	6
1.2. Usos de la edición génica.....	7
1.3. Técnicas de edición génica.....	8
1.4. Nucleasas de edición génica.....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>13</b>
4.1. CRISPR-Cas como inmunidad adaptativa en organismos procariotas.....	13
4.2. Funcionamiento de CRISPR-Cas9.....	15
4.3. Edición génica con CRISPR-Cas9.....	18
4.4. Cas9 Nicasas.....	19
4.5. CRISPRi y CRISPRa.....	21
4.6. Base Editing.....	23
4.7. Prime Editing.....	26
4.8. Aplicaciones CRISPR/Cas en medicina.....	29
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La historia de la genética comenzó a mediados del siglo XIX con el trabajo de Gregor Mendel introduciendo las leyes fundamentales de la herencia y fue continuada por Watson y Crick en 1953 describiendo la estructura del ADN como una doble hélice, complementaria y antiparalela. Tras estos descubrimientos, se inició la era de la genética que no ha parado de crecer a lo largo de la historia. [1]

A partir de los años 70, se comenzaron a estudiar las técnicas que permiten aislar y manipular el ADN, es decir, se dan los primeros pasos en edición génica. Esto fue posible gracias al descubrimiento y aislamiento de las enzimas de restricción en 1970 por W. Arber, D. Nathans & H. Smith, lo que permitió la creación de la primera molécula de ADN recombinante y su inserción en una bacteria en 1973 por Stanley Cohen y Herbert Boyer. A partir de este momento, numerosos hitos históricos han ocurrido en el área de la edición génica hasta la actualidad, como la producción de somatostatina, la creación de la técnica PCR, la clonación del primer mamífero y la publicación de la secuencia del Genoma Humano.[2]

A lo largo del trabajo se realizará una revisión bibliográfica sobre las técnicas actuales de edición génica, en qué consisten, cómo se desarrollan y sus diferentes modificaciones. Más en profundidad, desarrollaré la técnica CRISPR/Cas y sus variantes debido a la gran repercusión y su evolución en los últimos años.

### 1.1. ¿Qué es la edición génica?

La edición génica consiste en la manipulación y modificación del ADN de una célula u organismo para producir cambios en sus características. Se lleva a cabo mediante la eliminación, inserción o sustitución de secuencias de interés a través de las nucleasas, también denominadas “tijeras moleculares”.

Las nucleasas son enzimas que, tras ser dirigidas hacia un gen o secuencia de ADN de interés (secuencia diana), realizan unos cortes en esa secuencia que, posteriormente serán reparados por la maquinaria natural de la célula. Al modificar este proceso de reparación, se producen modificaciones dirigidas en el genoma dando lugar a la edición génica. [3]

## 1.2. Usos de la edición génica

La edición génica puede aplicarse en cualquier situación en la que se desee modificar una secuencia de ADN, por ello sus usos abarcan el campo de la investigación, la biotecnología y la terapéutica.

En primer lugar, se utiliza en investigación para entender las funciones de los genes, la generación de modelos celulares, o para el estudio de enfermedades genéticas y la evolución del cáncer. Se generan modelos de enfermedades en animales, como ratones, para estudiarlas e investigar nuevas terapias y fármacos.

También resulta útil en la agricultura, la edición génica permite, por ejemplo, producir plantas transgénicas (aunque no se introduzcan nuevos genes, sino que se modifican), mejorar los cultivos y hacer que resistan a diferentes tipos de estrés y aumentar la producción. [4]

De la misma manera, se puede aplicar en ganadería, aumentando la producción de carne, leche, lana, etc. Por ejemplo, se han realizado experimentos editando el genoma de células embrionarias de ovejas, consiguiendo resultados prometedores en cuanto al incremento del tamaño y musculatura de éstas. [5]

Por otra parte, la edición génica también puede aplicarse en medicina, la gran esperanza de hacer realidad la terapia génica. En principio, la edición génica se dirige a curar enfermedades hereditarias causadas por alteraciones de un solo gen. Se han descrito más de 10000 enfermedades monogénicas que afectan a millones de personas en el mundo. Las enfermedades en las que más se pretende aplicar son las que afectan a lugares accesibles, como el ojo, la sangre y los músculos. Existen actualmente numerosos ensayos clínicos que utilizan esta tecnología que buscan de tratar enfermedades como la anemia de Fanconi, la beta talasemia, la amaurosis congénita de Leber, la distrofia muscular de Duchenne y el cáncer mediante la terapia de células CAR-T[6]

### 1.3. Técnicas de edición génica

Antes del descubrimiento de las nucleasas, la técnica de edición génica utilizada por los investigadores consistía en la inactivación dirigida de genes mediante la Recombinación Homóloga (RH) y ha sido ampliamente utilizada en células madre embrionarias de ratones. Sin embargo, la RH presentaba numerosas limitaciones en algunos organismos y una baja eficacia de edición (frecuencia de integración de 1 célula modificada de cada 100.0000 aproximadamente en eucariotas). Esta técnica ha sido superada por una nueva forma de edición génica dirigida basada en el diseño de las nucleasas y la formación de cortes en la doble cadena de ADN (DSBs, del inglés Double-strand Breaks) que proporciona técnicas más sencillas y económicas que las anteriores[7]

Las nucleasas, como he mencionado anteriormente, producen cortes específicos en ambas hebras del ADN. Estos cortes son denominados DSBs y resultan letales para la célula, por lo que se activan los mecanismos de reparación natural del ADN que ocurren normalmente en la célula. Esta reparación puede utilizarse en edición génica para introducir cambios en la secuencia diana. [8]

#### **Double-strand breaks (DSBs)**

En 1994, se descubrió que la introducción de DSB aumentaba la frecuencia de la Recombinación Homóloga de 2 a 3 veces, lo que confirmó la eficacia de la edición génica dirigida mediante nucleasas que generaban DSBs en loci específicos.[7]

Los DSBs son cortes en ambas hebras de ADN, que producen una discontinuidad en la información genética que activará la reparación del ADN con la maquinaria de la célula, lo que puede ser utilizado para generar cambios específicos en la secuencia deseada.

Una vez producidos los DSBs, en presencia de una secuencia donante de ADN homólogo se producirá la Reparación por Homología Directa (HDR) que es al menos dos veces más eficaz que la RH convencional. En ausencia de la secuencia de ADN donante, se producirá la reparación de forma aleatoria por unión de extremos no homólogos (NHEJ). [3]

#### **- Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)**

Se trata de un método natural y eficaz de reparación de DSBs, uniendo los extremos de ADN cortados por la nucleasa. La reparación no se basa en una hebra molde de ADN, sino que depende del “azar”, lo que hace que sea

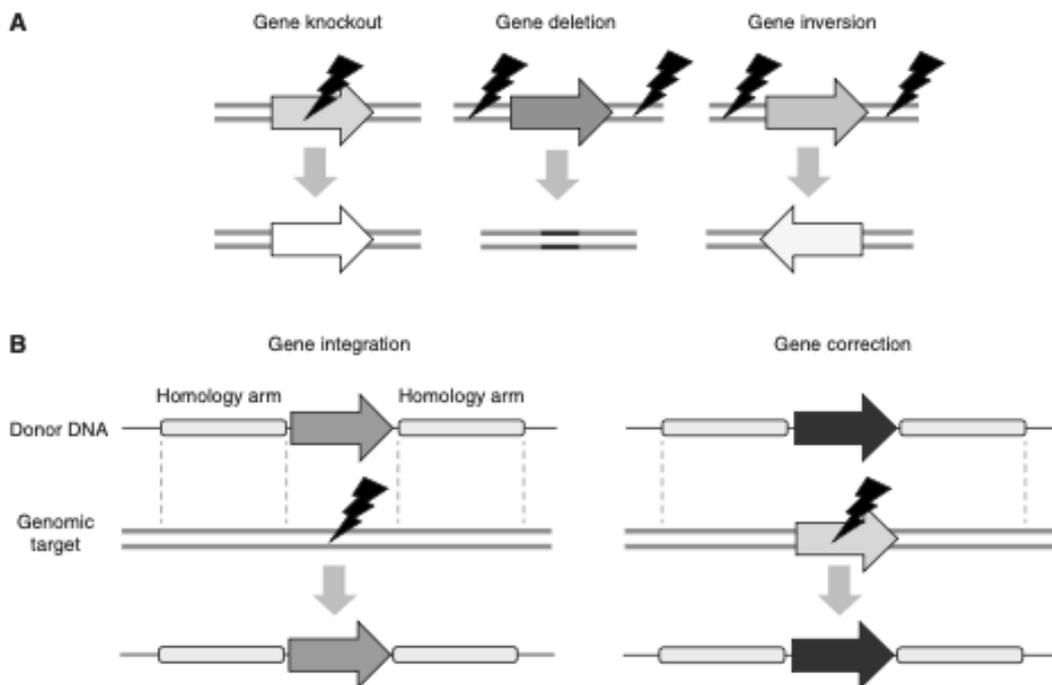
considerado un método de reparación propenso introducir errores (generalmente pequeñas inserciones o deleciones denominados indels) en el sitio de DSB.

Estos errores, que provocan inserciones o deleciones de bases nitrogenadas en la secuencia original, pueden silenciar o bloquear el gen diana al producir cambios en el marco de lectura, generando una proteína truncada o degradando el ARN mensajero por mutaciones terminadoras (NON-sense mediated decay). **(Figura 1)**

NHEJ es el sistema reparador dominante en mamíferos y su uso se basa principalmente en conseguir eliminar o interrumpir el gen diana (knockout).

- **Reparación Homóloga Directa (HDR)**

Es un sistema de reparación de DSB que ocurre en presencia de un molde de ADN homólogo, es decir, un ADN donante. No está basado en errores como el anterior mecanismo y por ello se pueden conseguir inserciones y sustituciones de nucleótidos, es decir, adición y reparación génica. [7]



**Figura 1. Tipos de reparación del ADN. A) NHEJ B) HDR. (3)**

#### **1.4. Nucleasas de edición génica**

Las herramientas más importantes en edición génica se basan en la utilización de nucleasas capaces de reconocer la secuencia diana y de generar cortes DSBs para llevar a cabo la reparación mediante NHEJ o HDR.

Existen cuatro grupos de nucleasas utilizadas en edición génica:

- Meganucleasas (MNs)
- Nucleasas de dedos de Zinc (Zinc-finger nucleases ZFNs)
- Nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción TALENs (transcription activator-like effector nuclease)
- Nucleasas de secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

#### **Meganucleasas**

Las meganucleasas (homing endonucleasas) presentan un dominio de reconocimiento muy grande (40pb) y, además, una baja citotoxicidad en células madre. Sin embargo, no son capaces de cubrir todo el genoma lo que se considera su principal limitación. Además, su complejidad y su baja eficiencia de edición hacen que hoy en día estén en desuso.[9]

#### **ZFNs**

Los ZFNs, también denominados dedos de zinc son endonucleasas artificiales que se crearon mediante la fusión de un dominio de reconocimiento de ADN de Cys2-His2 zinc (dedo pequeño de zinc) con el dominio de corte de la endonucleasa FokI.

Los ZFNs actúan como dímero y pueden ser modificados para que reconozcan una región específica (18 bp) con el dominio de unión de ADN del dedo de zinc. Es necesaria la formación del dímero para que FokI corte el ADN, por lo que se necesitan dos ZFNs por cada secuencia diana de ADN [7]

Cada dedo de zinc es capaz de reconocer 3 bp, lo que supone una desventaja al necesitar numerosas endonucleasas para editar secuencias largas de ADN.

Actualmente, además de su uso en edición génica también se utiliza en terapia antiviral al ser capaz de inhibir receptores específicos de la célula, como en el VIH y en la replicación del virus del papiloma humano mediante un nuevo híbrido de ZFNs.[10]

## **TALENs**

La edición génica continuó avanzando gracias a las TALENs y al aumento en la velocidad de producción.

Son endonucleasas artificiales similares a los ZFNs, se activan con la dimerización lo que supone la necesidad de dos TALENs para realizar el DSBs. Sin embargo, demostraron mayor capacidad de edición y menos citotoxicidad que los ZFNs, además de presentar un diseño más sencillo.

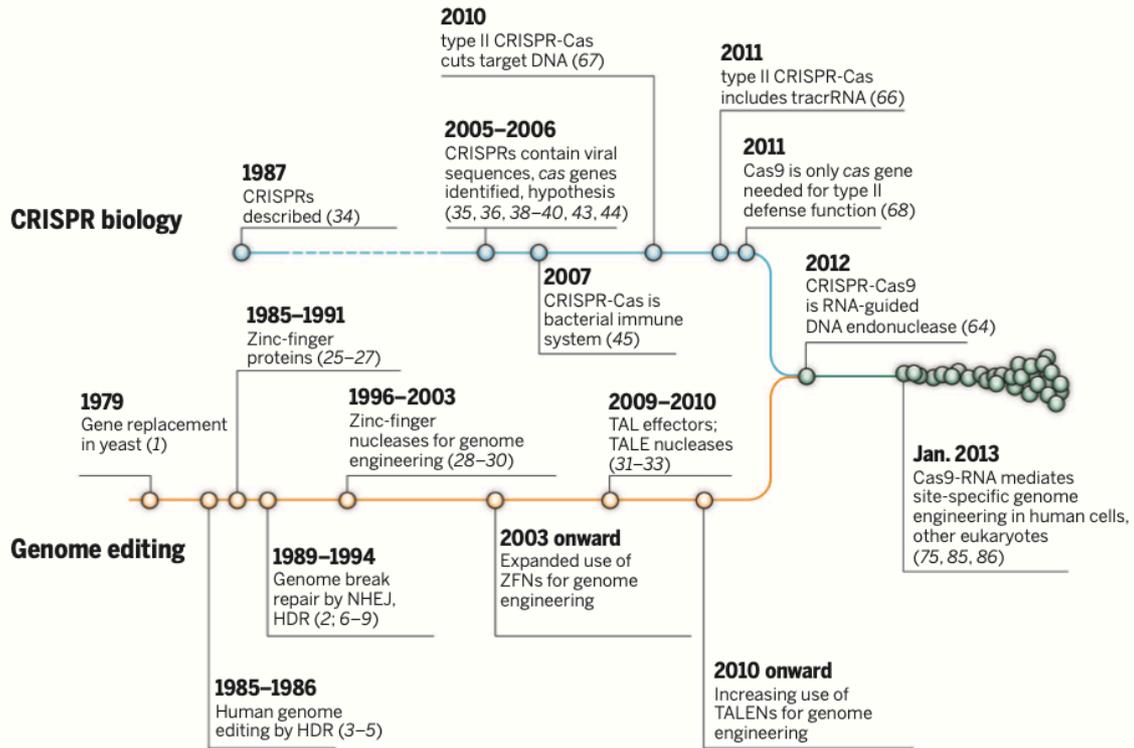
Están formados por un dominio de unión al ADN (secuencia específica de la región diana) unido al dominio endonucleasa FokI. [7]

## **CRISPR/Cas**

En 2012, Doudna y Charpentier publicaron el primer artículo describiendo CRISPR-Cas9 y sus aplicaciones en edición de genes al realizar el primer “corte” en el tubo de ensayo. Este descubrimiento supuso una revolución en la edición génica, y meses después se consiguió trasladar esta técnica a células eucariotas al realizar el primer “corte” en células vivas de mamíferos.

CRISPR-Cas consiste en la utilización de una nucleasa ya existente en la naturaleza y su programación para conseguir la edición deseada. Esta técnica conseguía superar las limitaciones que presentaban las anteriores nucleasas, ya que eran demasiado difíciles de desarrollar.

Gracias a su facilidad de uso, su eficiencia y disponibilidad, esta técnica se ha posicionado por encima de todas las anteriores y está presente en todos los laboratorios del mundo.[11]



**Figura 2. Línea temporal de CRISPR/Cas y la edición génica.** Se muestran los hitos más representativos en ambos campos. En 2012, se produce la fusión de CRISPR y la edición génica con el descubrimiento de Cas9 como endonucleasa de ADN programable por ARN. Tras ello, se produjo una explosión de artículos e investigaciones comenzando en 2013, año en el que se usó CRISPR/Cas9 para modificar genes de células humanas y en otros eucariotas. (19)

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es la descripción del sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición génica en células eucariotas, realizando un análisis detallado de sus características generales, su estructura y los procesos que se suceden para ejecutarse.

Para ello, se explicará el mecanismo natural de CRISPR en procariontas y, posteriormente, las características del mecanismo aplicado a la edición génica. Se desarrollarán las diversas modificaciones de CRISPR/Cas, sus avances a lo largo de los años y sus aplicaciones en agricultura, ganadería, investigación y medicina.

### 3. MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica sistemática, recopilando y resumiendo la información de estudios y artículos disponibles sobre CRISPR/Cas.

Se ha recopilado la información durante los meses de marzo, abril y mayo de 2021 desde las bases de datos científicas de PubMed y Google Scholar, utilizando los términos de "Genome editing", "CRISPR/Cas", "CRISPR/Cas9", "Base editing", "Prime editing". Se han incluido artículos originales y de revisión publicados en los últimos 10 años, desde 2011.

Para la realización del trabajo se ha utilizado la herramienta Microsoft Word junto con el gesto bibliográfico Zotero. Además, se han incluido figuras creadas con Biorender.

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El descubrimiento de la tecnología CRISPR-Cas ha supuesto una revolución en la edición génica en los últimos años y sus modificaciones y estudios no han parado de crecer desde entonces. Esto se debe a que se trata de una técnica muy eficaz y asequible que permite editar el genoma mediante nucleasas existentes en la naturaleza, ofreciendo grandes ventajas con respecto a las descritas como ZFNs o TALENs.

#### 4.1. **CRISPR-Cas como inmunidad adaptativa en organismos procariontas**

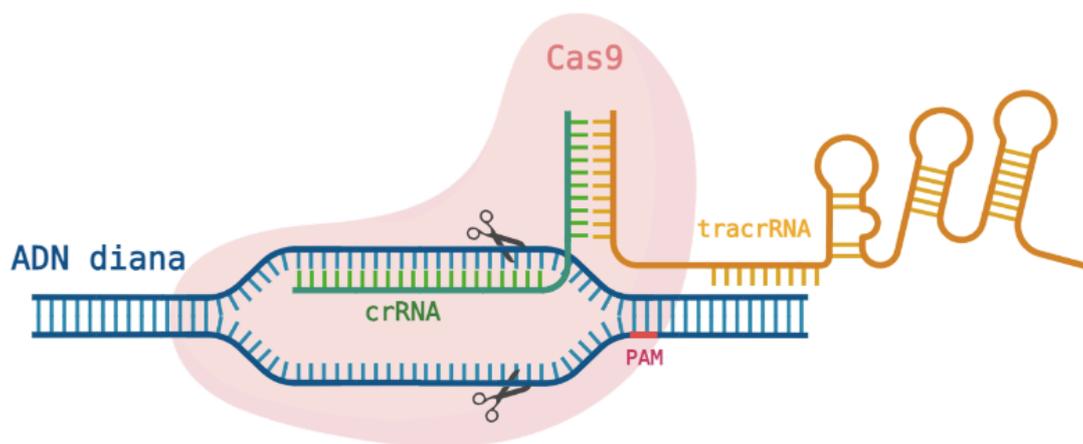
CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) fue descubierto como un sistema que formaba parte de la inmunidad adaptativa de organismos procariontas, encontrándose en el 50% de las bacterias y hasta en el 90% de las arqueas.

Este mecanismo de inmunidad adaptativa se basa en la memoria molecular. Se observó que las bacterias eran capaces de incorporar material genético de los fagos y plásmidos que les infectaban, de tal forma que al repetirse la infección podían protegerse frente a ellos con el sistema CRISPR/Cas. [12]

Los organismos procariotas presentan unas secuencias repetidas de ADN de unos 24-40 nucleótidos que fueron denominadas inicialmente SRSR y posteriormente CRISPR. Además, se observó que éstas estaban separadas por secuencias espaciadoras que se identificaron como fragmentos extracromosómicos procedentes de fagos y plásmidos de infecciones pasadas.[13][14]

Conjuntamente a estas secuencias de repetición y espaciadoras, se encontraron unos genes asociados a CRISPR que codificaban nucleasas y se denominaron CAS.

Por lo tanto, principalmente el sistema de inmunidad adaptativo de origen bacteriano CRISPR-Cas se basa en el rastreo y el corte de ácidos nucleicos invasores, gracias a unas secuencias de ARN guías y una endonucleasa, normalmente Cas9. [15]



**Figura 3. Estructura de CRISPR/Cas9.** CrRNA y tracrRNA guían a Cas9 hacia el ADN diana y genera los cortes mediante los dominios nucleasa. (Figura de creación propia con Biorender)

Podemos diferenciar dos clases de complejos CRISPR-Cas:

- **CRISPR clase 1:** Definidos por la presencia de múltiples proteínas efectoras guiadas por RNA para escindir el ADN exógeno. Dentro de ellas encontramos tipo I, III y IV
- **CRISPR clase 2:** Sistema que necesita una única proteína guiada por ARN para escindir el ADN exógeno (Cas9). Encontramos tipos II, V y VI.[16]

Actualmente, la nucleasa utilizada en edición génica es principalmente Cas9 (Tipo II), que gracias a la ingeniería genética se ha ido modificando y mejorando a lo largo de los años. A continuación, desarrollaré las características principales de este tipo y sus modificaciones más relevantes.

#### 4.2. Funcionamiento de CRISPR-Cas9

Como se ha introducido anteriormente, este sistema se basa en la presencia de un array CRISPR, compuesto por secuencias repetitivas que están separadas por secuencias espaciadoras que proceden del genoma invasor. Este array es transcrito como un precursor de crRNA (pre-crRNA), que seguirá un proceso de maduración para formar crRNA maduro, que servirá como guía a la proteína Cas hasta la secuencia diana.

En los sistemas de tipo II (Cas9), el ARN guía está compuesto por CRISPR RNA (crRNA) y un trans-activador CRISPR ARN (tracrRNA). Por lo tanto, para desarrollar Cas9 son necesarios un crRNA, un tracrRNA y cas9 como único gen operón.(14)

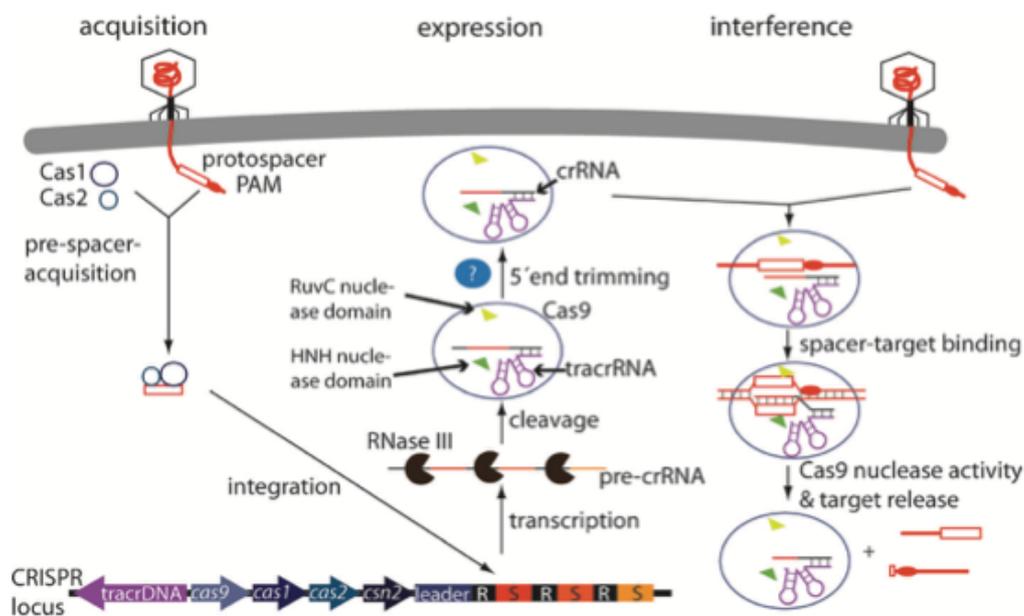
CrRNA deriva del CRISPR array, en el que las secuencias espaciadoras indican la secuencia objetivo y las secuencias repetitivas permiten la unión a Cas9. TracrRNA es un transcrito derivado de una zona cercana a CRISPR array.

Por lo tanto, podríamos decir que una estructura doble de ARN dirige a la endonucleasa al punto de corte de ADN. En la práctica de edición génica, TracrRNA y CrRNA, al presentar una zona complementaria, pueden unirse formando un dúplex para así, obtener un único ARN guía y (sgRNA) y simplificar así el proceso.[18]

Podemos dividir el funcionamiento de CRISPR/Cas9 en 3 etapas:

- 1) **Etapas de adaptación:** Consiste en el reconocimiento y adquisición del material genético externo/invasor al locus CRISPR, de tal forma que al producirse una reinfección, este material será reconocido. Este proceso es llevado a cabo por las proteínas Cas1 y Cas2 y será lo que llamaremos secuencias espaciadoras. Cada región espaciadora cuenta con una secuencia adyacente de 3-5 nucleótidos denominada PAM, que no es integrada en el genoma de la bacteria, pero será la secuencia de reconocimiento para Cas9.

- 2) **Etapa de expresión:** CRISPR se transcribe a pre-crRNA que contiene las secuencias espaciadoras, a tracrRNA (activadora) y de las proteínas Cas. Pre-crRNA y tracrRNA forman un híbrido por complementariedad de bases, que mediante la RNAasa III formará los crRNAs maduros. Como resultado final obtenemos los crRNAs compuestos por las secuencias repetidas y espaciadoras, unidos a tracrRNA.
- 3) **Etapa de interferencia:** Al entrar en contacto con material genético ya reconocido (externo/invasor), el dúplex formado por crRNA y tracrRNA guía a la endonucleasa Cas9 hacia el objetivo (material genético invasor) para degradarlo. Se forma, en primer lugar, un complejo ternario (crRNA-tracrRNA-Cas9) y posteriormente un complejo cuaternario (crRNA-tracrRNA-Cas9-ADN). Cas9 degradará el material genético generando DSBs. [19][20]



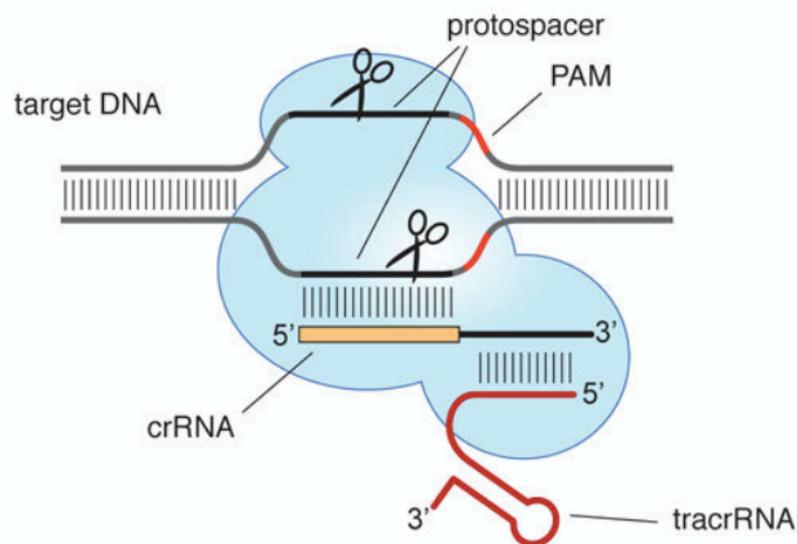
**Figura 4.** Representación de las tres etapas en CRISPR/Cas9. En la primera etapa, el ADN invasor en rojo es integrado por medio de Cas1 y Cas2 en el genoma de la bacteria (CRISPR locus). La etapa de expresión concluye con la formación de dúplex crRNA-tracrRNA y en la etapa final se produce el corte del ADN invasor con el complejo cuaternario (crRNA: tracrRNA: Cas9: ADN) (20)

En la etapa de interferencia, la unión de ARN guía a Cas9, forma una ribonucleoproteína que adquiere una conformación diferente a la que tenía la nucleasa antes de la interacción. Una vez formado el complejo, la RNP escanea las secuencias PAM del ADN para proceder a los cortes mediante DSBs.

Como he mencionado, los PAM (Protospacer Adjacent Motif) son unas pequeñas secuencias de tres a cinco nucleótidos, que se encuentran inmediatamente adyacentes al ADN diana (en la hebra no-dirigida y no complementaria al RNA guía) necesarias para iniciar el proceso de escisión del ADN. Se toma como referencia la secuencia 5'-NGG-3', ya que es la secuencia reconocida por Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Son detectadas por la nucleasa antes del apareamiento de las bases y se considera determinante en la función de la nucleasa. Además, los dominios PAM también se consideran importantes en la diferenciación de material genético propio y extraño. [21]

Una vez reconocido el dominio PAM, tiene lugar el apareamiento de bases entre el RNA guía y el ADN invasor formando un heterodúplex denominado Bucle R, que avanza desde el PAM hasta el final del ARN guía.

El complejo cuaternario provocará la escisión del ADN mediante DSBs gracias a los dos dominios nucleasa de Cas9, uno denominado HNH que genera cortes en la hebra complementaria a los 20 nucleótidos del crRNA y otro denominado RuvC-like que genera cortes en la hebra contraria a la complementaria, es decir, donde se encuentra PAM. Los cortes se producen a una distancia de 3 bp desde NGG (PAM) en cas9.[22][12] [23]



**Figura 5.** Sistema CRISPR/Cas9 guiado por el dúplex crRNA y tracrRNA. En naranja se representa la secuencia espaciadora en crRNA, mientras que tracrRNA hibrida con las secuencias repetidoras, formando un híbrido. Cas9 produce DSBs mediante RuvC y HNH. (19)

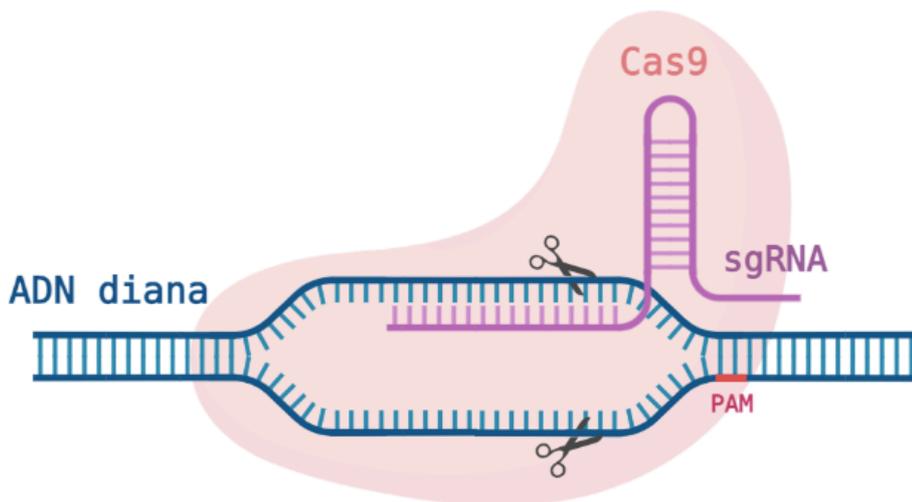
### 4.3. Edición génica con CRISPR-Cas9

La tecnología CRISPR-Cas9 ha supuesto un hito revolucionario en la edición y modificación génica debido a su facilidad, eficacia y gran disponibilidad en la naturaleza.

La edición génica mediante CRISPR-Cas9, basado en el ARN guía y la nucleasa Cas9, consiste en trasladar este sistema presente de forma natural en los organismos procariontas a la modificación génica y a la ingeniería genética, como desarrollaron Doudna y Charpentier en 2013.[19]

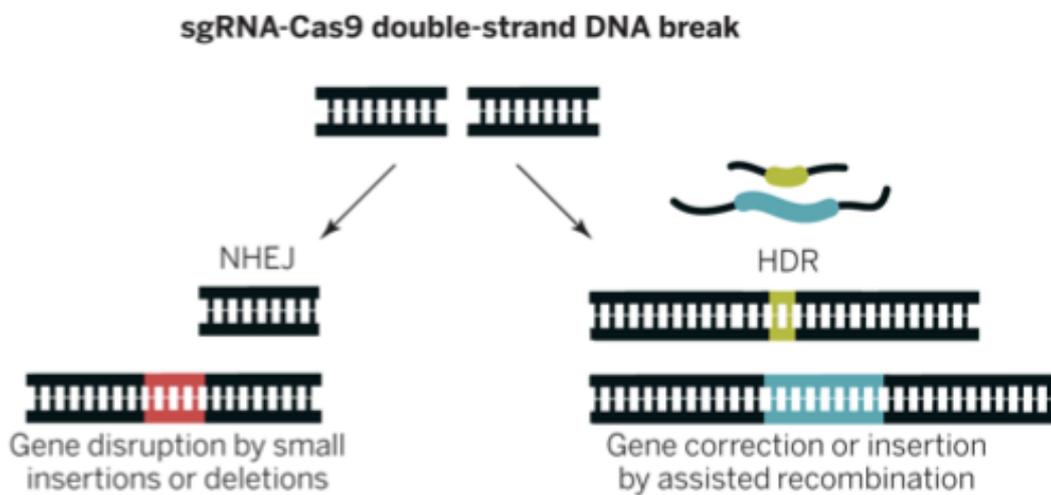
Como hemos comentado, CRISPR-Cas 9 presenta un ARN guía dual, tracrRNA y crRNA que forman un dúplex. Mediante ingeniería genética se consigue que se fusionen en una única guía, denominándose sgRNA, que contiene la zona de unión para Cas9 en 3' y la zona de apareamiento de 20 nucleótidos en 5'.

Mediante este mecanismo, sólo se necesita una modificación en la secuencia de ARN guía (sgRNA) para conseguir programar CRISPR-Cas9 y así, generar cortes en cualquier secuencia de ADN que presente PAM. [18]



**Figura 6.** Evolución de la estructura de Cas9 con la formación de sgRNA. (Figura de creación propia con Biorender)

Cas9 produce la escisión del ADN mediante la generación de DSBs, que serán detectados por la maquinaria de la célula para ser reparados. Esta reparación, como he comentado anteriormente, puede ocurrir por NHEJ o por HDR. NHEJ mediante el azar, producirá inserciones o deleciones (indels) que pueden alterar el marco de lectura o silenciar genes y elementos reguladores. HDR ocurrirá cuando exista una secuencia “donadora” introducida por el investigador y puede utilizarse para modificar determinadas regiones de un gen concreto o insertar largas secuencias en una zona específica. [12]



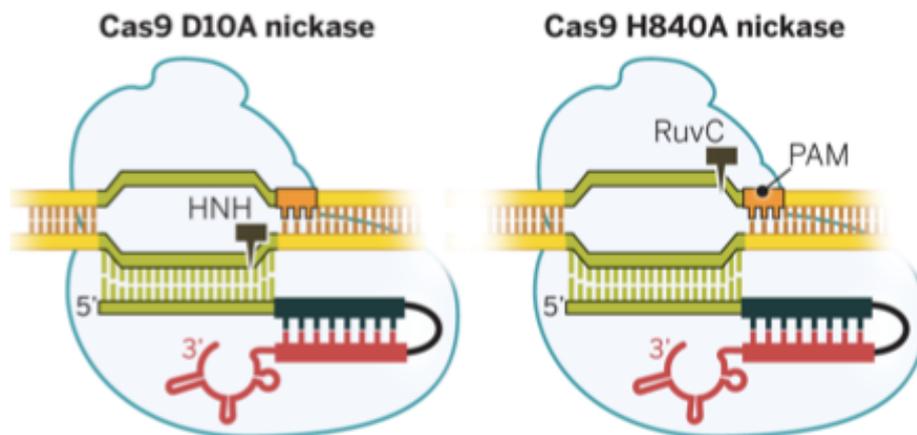
**Figura 7:** Diferentes estrategias de reparación celular de DSBs generados por Cas9 guiado por sgRNA. Reparación por unión de extremos no homólogos a la izquierda que causa inserciones y deleciones, y reparación homóloga dirigida a la derecha en presencia de una secuencia donadora, generando correcciones o inserciones. (19)

#### 4.4. Cas9 Nicasas

Tras el descubrimiento de la técnica, Cas9 ha evolucionado a lo largo de los años mediante modificaciones para mejorar la especificidad de la edición génica de Cas9, por ello se desarrollaron las nicasas (Cas9n).

Como hemos comentado, las enzimas Cas9 presentan dos dominios nucleasa, HNH y RuvC, que cortan el ADN de la hebra complementaria y la no complementaria al ARN guía, respectivamente.

Esta técnica de Cas9 nicasas consiste en producir mutaciones en estos dominios de Cas9. Si la mutación se produce en RuvC, hablamos de nicasa D10A en RuvC y si la mutación se produce en HNH, obtenemos la nicasa H840A.

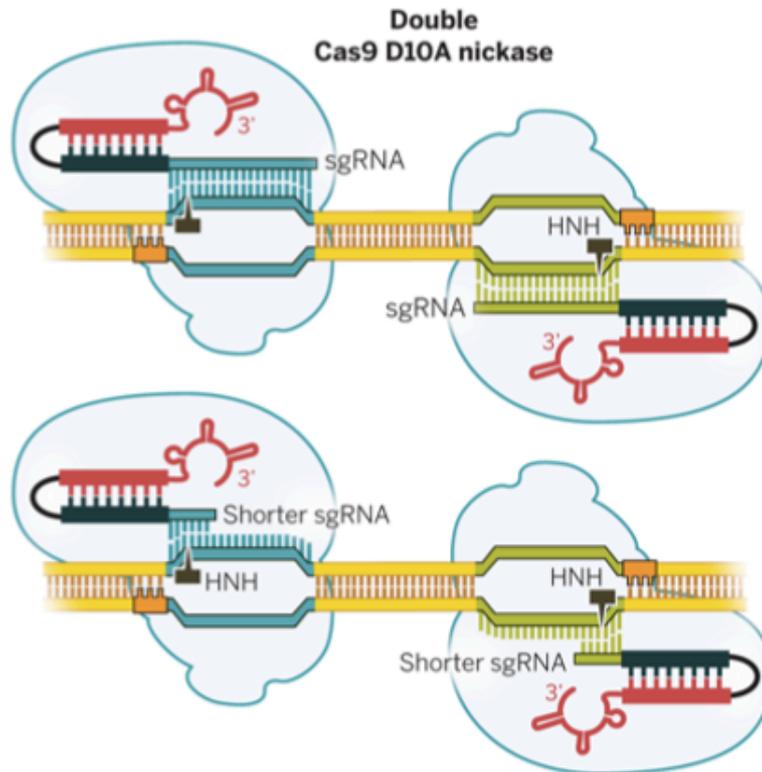


**Figura 8.** Dos tipos de nicasas Cas9 producidas por mutaciones en un dominio catalítico diferente. D10A mantiene el dominio catalítico en HNH, mientras que H840A puede producir cortes con RuvC. (19)

Al producir estas mutaciones, se inactiva un dominio catalítico y, por ello, en vez de formar DSBs se formarán cortes únicos en una sola hebra. De esta forma, se controlan los errores y mutaciones que se podrían producir por NHEJ y se favorece la reparación mediante HDR, que está asociado a una baja incidencia de “errores” y permite la edición genómica de un loci. [24][25]

Para producir DSBs, se utiliza una combinación de dos nicasas, generalmente D10A con dos sgRNA, que producen dos cortes únicos (single-nicks). Esta combinación reduce la incidencia de los errores cometidos por NHEJ y estimula HDR, permitiendo la inserción de secuencias exógenas deseadas.

En líneas celulares humanas, se prefiere la utilización de D10A con sgRNA que contenga PAM fuera del punto de corte (Nick) y que éste sea de entre 40 y 70 bp.[26]



**Figura 9.** Cas9n D10A utilizada con dos sgRNA diferentes produce DSBs mediante la generación de dos nicks, uno en cada hebra. (19)

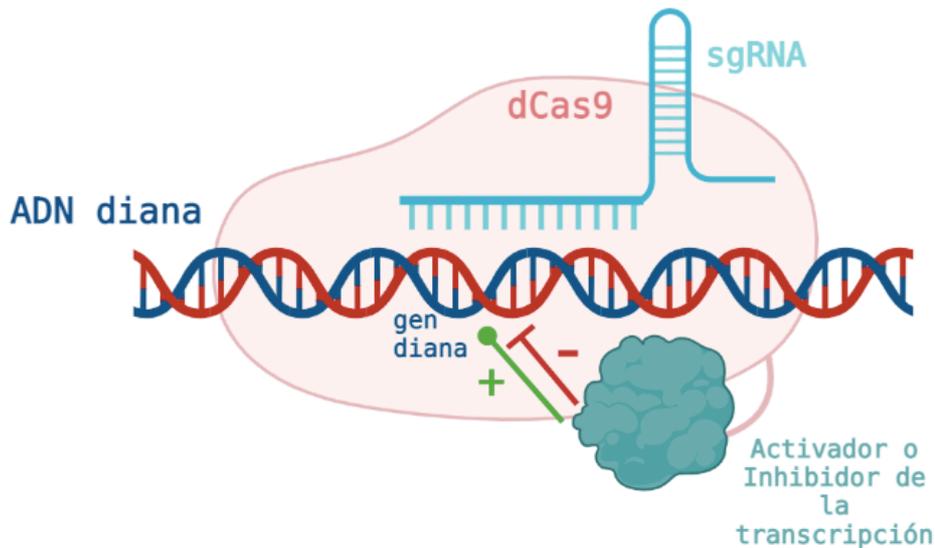
#### 4.5. CRISPRi y CRISPRa

De la misma manera que se conseguía mutar Cas9 en uno de sus dominios catalíticos para formar las nicasas, la siguiente modificación consistía en mutar ambos dominios (D10A y H840A).

De esta forma, se crea una dead-Cas9 (dCas9), que ha perdido por completo su función catalítica, pero mantiene su función de identificación y reconocimiento del ADN. Es decir, dCas9 es capaz de unirse a la región genómica deseada pero no puede generar DSB, permitiendo la identificación de regiones específicas y la regulación de la transcripción de esas regiones genómicas. [27]

Gracias a la función de reconocimiento de dCas9, ésta puede fusionarse con dominios de fluorescencia como GFP (Green Fluorescent Protein) para conseguir imágenes del genoma (imaging).

La regulación de la transcripción es posible con dCas9, ya que puede dirigirse mediante un sgRNA hacia regiones promotoras, y bloquear o activar la transcripción de genes. Estas tecnologías se denominan CRISPRi (interferencia) y CRISPRa (activación) y presentan una mayor eficacia si dCas9 se fusiona con dominios represores o activadores de la transcripción. [27]



**Figura 10.** dCas9 fusionada a dominios represores o activadores de la transcripción permite la regulación del genoma humano. (Figura de creación propia con Biorender)

CRISPRi, por tanto, emplea dCas9 unida a un dominio represor de la transcripción como KRAB junto a un ARN guía para alcanzar las regiones promotoras y conseguir así la inhibición de la transcripción. CRISPRa emplea dominios activadores como VP46.

De la misma forma, dCas9 puede alterar la expresión de genes al modificar la metilación de las citosinas de los promotores o induciendo la acetilación de histonas. Esto se consigue añadiendo dominios de modificación epigenética a dCas9 como p300. [28] [29]

#### 4.6. Base Editing

Un gran avance en el sistema CRISPR/Cas consistió en el descubrimiento de los editores de bases (BE), que realizan modificaciones en el genoma sin necesidad de formar DSBs, permitiendo la sustitución de una base por otra en la secuencia diana.

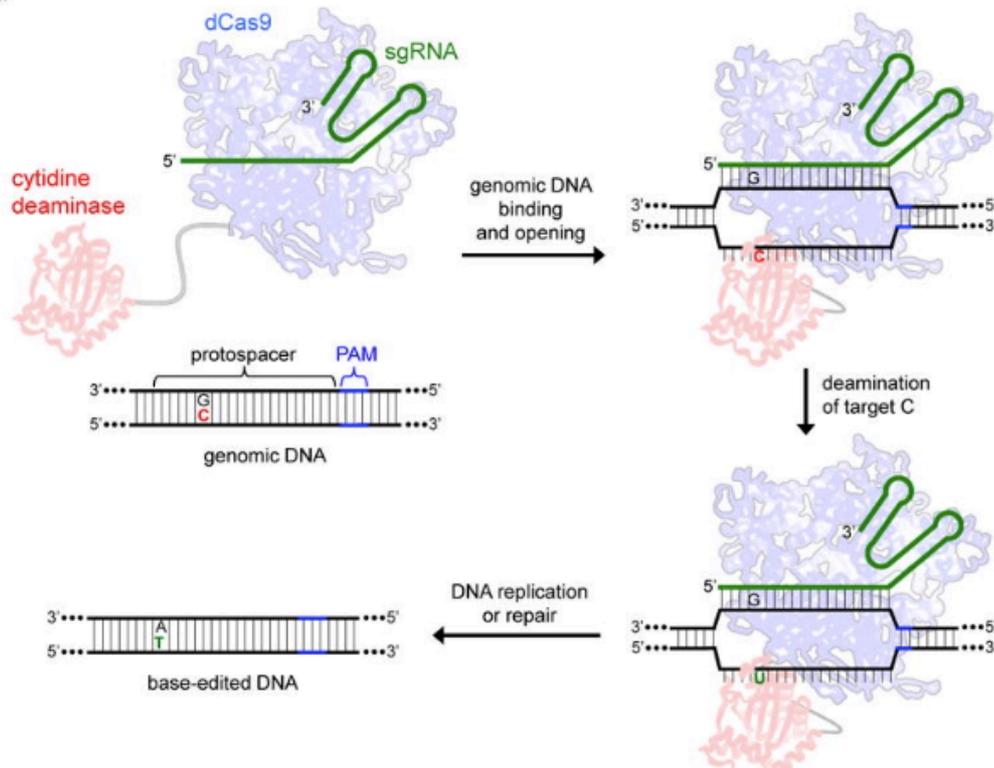
Se han descrito dos clases de editores de bases de ADN: editores de bases de Citosina (CBEs) y editores de bases de Adenina (ABEs), con los cuales se pueden realizar las cuatro transiciones de bases: C→T, T→C, A→G y G→A.

Este sistema de edición de bases utiliza principalmente dos componentes: Una enzima Cas programada para unirse al ADN diana y una enzima modificada para cambiar el nucleótido deseado.

Los primeros BE descritos, denominados BE1, fueron desarrollados por Liu en 2016, y se basaban en la fusión de dCas9 (sin dominios catalíticos, pero con función de reconocimiento del ADN) con una citidina desaminasa.

De esta manera, tras la unión del ARN guía y dCas9 a la secuencia diana, la enzima transforma una Citosina en Uracilo de la hebra no complementaria al ARN guía.

El Uracilo es entonces reconocido por la maquinaria de replicación de la célula como una Timina, produciendo un cambio entonces de C-G a T-A. [30]



**Figura 11. Estrategia de BE1 de transformación de C→U mediante dCas9 programada con un dominio citidina desaminasa y RNA guía.** En rojo se encuentra la Citosina diana del ADN. Tras la unión del sgRNA y dCas9 al locus del ADN, la citidina desaminasa convierte la citosina en uracilo, formándose como intermediario G:U que podrá ser convertido en A:T por la replicación y reparación del ADN.(30)

Los BE1 fueron superados progresivamente debido a las limitaciones que presentaban, principalmente producidas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) llevado a cabo por la enzima Uracilo ADN glicosilasa (UDG) que reconoce el intermediario U-G y regresa a C-G, resultando el cambio ineficaz.

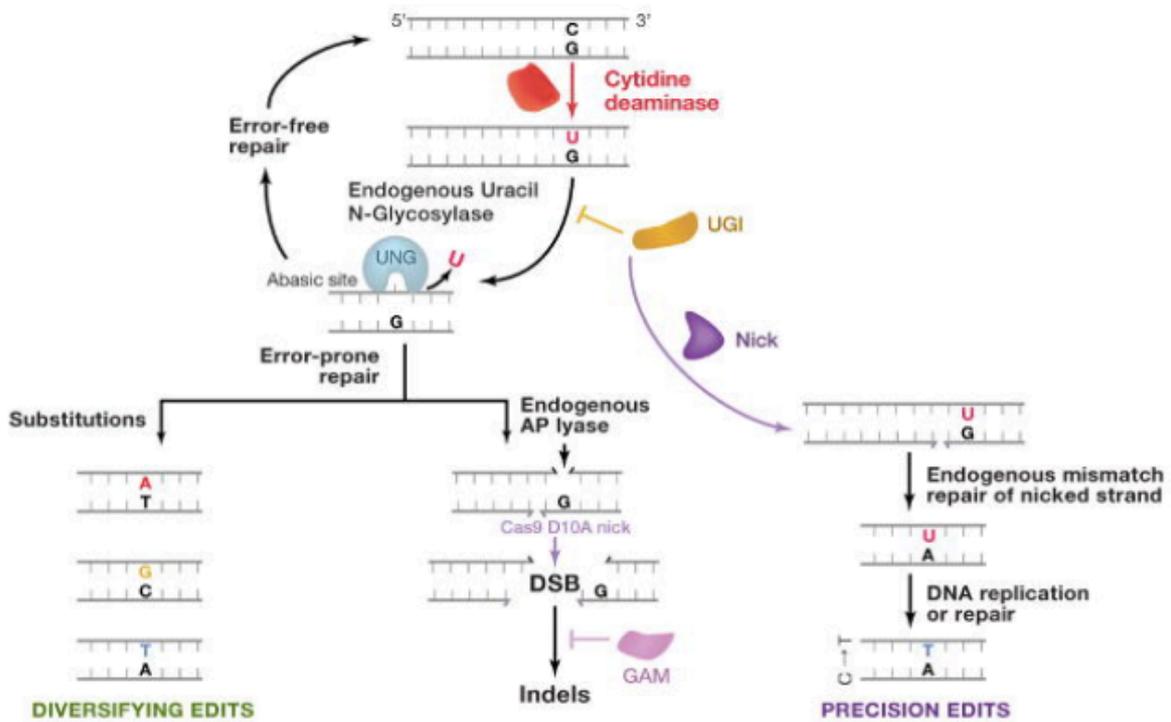
Posteriormente, se desarrollaron los editores de bases de segunda generación (CBE2) que añadían a la estructura de CBE1, un inhibidor de Uracilo ADN glicosilasa (UGI) para inhibir BER, lo que consiguió aumentar la eficacia.

Los editores de bases de tercera generación (BE3) introdujeron un cambio en Cas9 sustituyendo dCas9 por una nicasa Cas9 D10A (mantiene el dominio catalítico en HNH). Además, cuenta con la citidina desaminasa que convierte C en U en la hebra no unida a sgRNA y el inhibidor de Uracilo DNA glucosilasa (UGI).

Esta variante nCas9 tiene una especial importancia, ya que produce una mella "nick" en G del intermediario U-G (en la cadena no editada) estimulando la reparación del ADN y

dirigiéndola hacia la formación de U-A para formar después T-A en la replicación del ADN.

Estas técnicas se han ido perfeccionando con el tiempo, aumentando la precisión y eficacia gracias a los editores de bases de alta fidelidad (HFBE3) y los editores de cuarta generación (CBE4) que introducen cambios en la estructura de BE3 como un UGI adicional. [30]



**Figura 12. Mecanismo de BE3 con nCas9 y UGI.** Los mecanismos de reparación del ADN pueden producir errores en la edición de bases mediante UDG. Estos errores pueden ser libres al sustituir de nuevo U por C, o generar sustituciones y bloqueos (parte izquierda de la figura). Gracias al nick producido por nCas9 en la hebra no desaminada y la introducción de UGI se consigue solventar este error y producir una edición de precisión.

[31]

Los editores de bases de Adenina (ABEs) actúan mediante un mecanismo similar al de los CBEs. Consiste en la desaminación de la Adenina que se transforma en Inosina. Ésta es considerada como una G en la replicación del ADN, por lo que convierten A-T en G-C en el ADN genómico. [32]

El desarrollo de los BE ha supuesto un avance muy grande en la edición génica, ya que gracias a ellos se pueden corregir mutaciones de un solo nucleótido (SNPs) patogénicos, sin necesidad de formar DSBs.

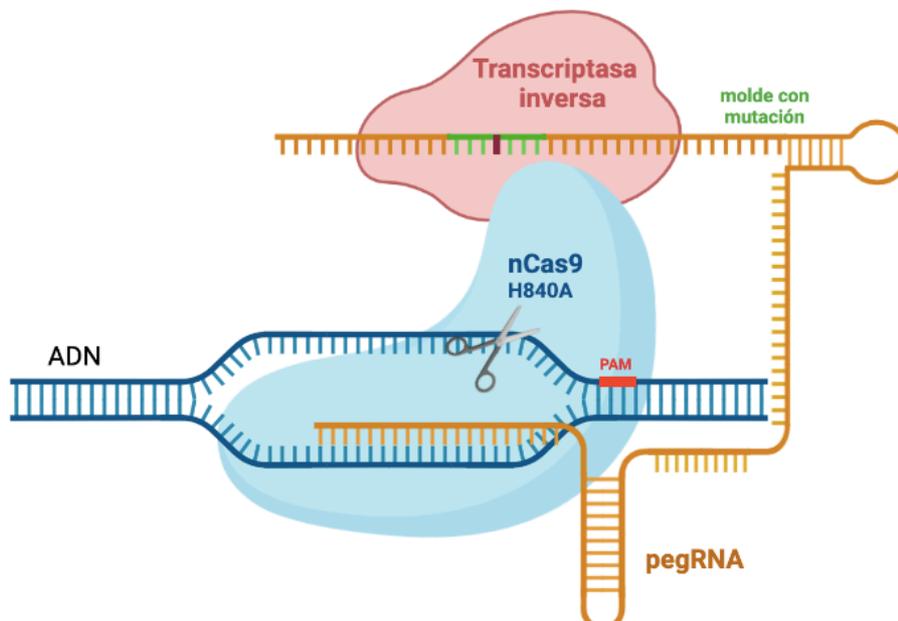
#### 4.7. Prime Editing

La edición de bases mediante CBEs y ABEs supuso un gran avance en la edición génica al permitir realizar las cuatro transversiones comentadas, sin embargo, se comprobó que con el Base Editing se producían también cambios no deseados en secuencias genómicas parecidas (mutaciones off-target).

El Prime Editing es una tecnología reciente, descrito por Anzalone, que supera las limitaciones de la edición de bases: Permite introducir las 12 posibilidades de mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones.

De la misma forma que BEs, Prime Editing es un sistema de edición génica que no genera DSBs. Un Prime Editor (PE) está formado por una nicasa Cas9 (generalmente nCas9 H840A) y un dominio de transcriptasa inversa. Además, cuenta con un prime-editing ARN guía (pegRNA) que conduce al PE hacia la secuencia diana y tiene una importancia especial por su forma y función.

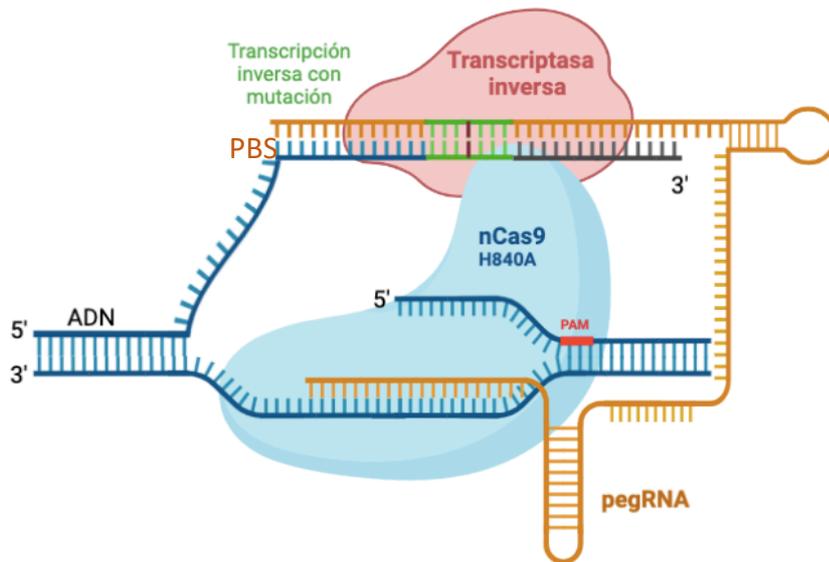
El pegRNA tiene una longitud mayor que el sgRNA, es capaz de unirse a las dos hebras de ADN y cumple dos funciones. Por un lado, el extremo 5' mantiene la función de guiar a nCas9 hacia la secuencia que queremos editar y, por otro lado, en el extremo 3' encontramos la secuencia molde para la síntesis de ADN con las correcciones o mutaciones que se desea editar y que utilizará la transcriptasa inversa.



**Figura 13. Estructura y mecanismo de acción de Prime Editing.**

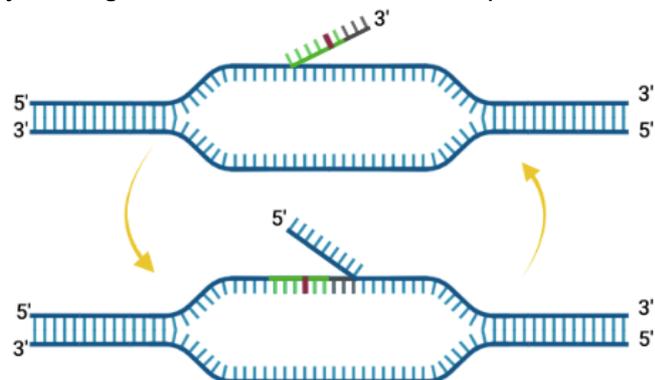
Observamos el complejo formado por PE (nCas9 y transcriptasa inversa) y pegRNA que contiene la edición deseada. El PE alcanza el ADN diana y mediante nCas9 se forma una mella en la hebra con PAM. (Figura de creación propia con Biorender)

Por tanto, el Prime Editor (PE) es guiado por pegRNA hacia el sitio de unión específico del ADN. Entonces, actuará el dominio de nCas9 produciendo una mella en la hebra que contiene el PAM, es decir, en la no complementaria. Se produce la hibridación del extremo 3' resultante de la mella con el PBS o primer binding site y esta hebra de ADN (con la mella y PAM) será alargada por la transcriptasa inversa, que a su vez usa como molde a pegRNA y que incluirá las modificaciones que se hayan programado en el extremo 3' de pegRNA.



**Figura 14. Estructura y mecanismo de acción de Prime Editing.** El extremo 3' hibrida con el PBS y la transcriptasa inversa genera un nuevo ADN que contiene la edición deseada utilizando el molde de pegRNA. (Figura de creación propia con Biorender)

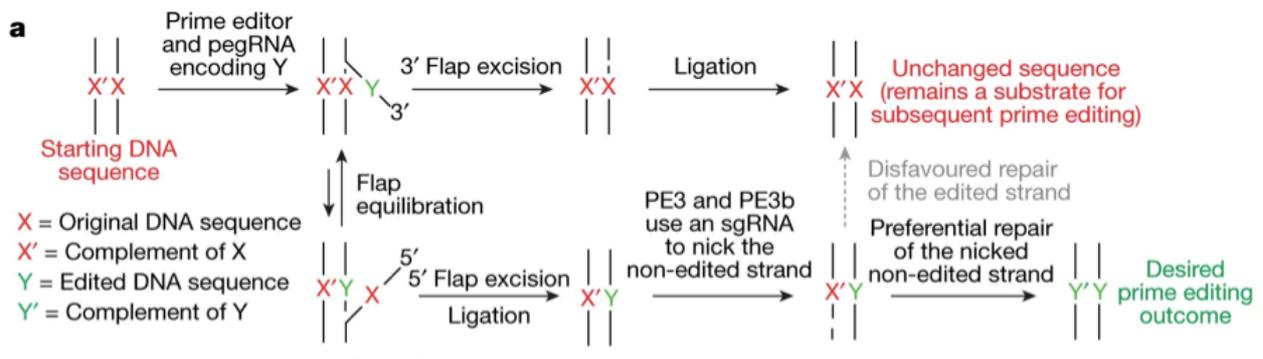
Se obtienen como resultado dos hebras de ADN en forma de solapa, una en 3' ya editada por la transcriptasa inversa, y la original, no editada en 5'. Se produce un equilibrio entre las dos hebras y para elegir que hebra hibridará, se piensa que el extremo 5', es decir, el original, está termodinámicamente favorecido. Sin embargo, la reparación celular del ADN tiende a la escisión del extremo 5' permitiendo al extremo editado en 3' integrarse establemente en el genoma mediante procesos de reparación y replicación celular.



**Figura 15. Resultados de Prime Editing.** Se produce un equilibrio entre la hebra editada en 3' y la no-editada en 5'. Finalmente, mediante la reparación del ADN dará lugar a la escisión del extremo 5' y a la estabilización de la hebra editada. (Figura de creación propia con Biorender)

Los Prime Editors han seguido una evolución muy rápida en los últimos años. En la primera generación (PE1) comenzaron utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) consiguiendo una eficacia de edición de 0,7-5,5%, que fue mejorada con el estudio de variantes de transcriptasa inversa por Anzalone (PE2).

Finalmente, como ocurría anteriormente con los editores de bases, se añadió un sgRNA separado para introducir una mella en la hebra no editada, consiguiendo así estimular y dirigir la reparación del ADN en esa cadena utilizando la hebra editada como molde. Se denominaron PE3 y se demostraron capaces de producir las 12 transiciones y transversiones con una media de eficacia del 33% ( $\pm 7,9\%$ ), además de producir inserciones y deleciones.



**Figura 16. PE3 y PE3b.** Estos sistemas producen una nueva mella en la hebra no-editada para aumentar la eficacia de la edición de calidad. Se añade un sgRNA que produce la mella en la hebra no editada, favoreciendo la reparación de la hebra conteniendo la edición deseada. (33)

La tecnología de los Prime Editors ha mostrado ventajas comparado a la técnica de los editores de bases, como, por ejemplo, la viabilidad de PAM que es menos restrictiva.

Por el momento, la técnica Prime Editing se considera menos eficaz y con mayor tasa de formación de indels que los Editores de Bases, aunque ambas modalidades ofrecen ratios muy favorables de edición.

Prime Editing está actualmente en sus comienzos y aún queda mucho por estudiar sobre ello, sin embargo, ya se considera un gran descubrimiento en el mundo de la edición génica, además de sus prometedoras aplicaciones clínicas en la corrección de mutaciones patogénicas.

Los editores de bases y el prime editing tienen un gran potencial como herramientas terapéuticas para corregir mutaciones causantes de enfermedades en el genoma humano. Gracias a su capacidad para reconocer y alterar nucleótidos, se consideran unas herramientas idóneas en terapia génica. Alrededor de un 25% de las mutaciones puntuales SNPs pueden ser corregidos con las cuatro transiciones mediante edición de bases y aproximadamente un 89% de las enfermedades asociadas a variantes genéticas podrían tratarse mediante prime editing. [33]

#### **4.8. Aplicaciones de CRISPR/Cas en medicina**

La técnica CRISPR/Cas se utiliza en edición génica con múltiples aplicaciones en biotecnología, tanto vegetal como animal, en investigación y, en uno de los campos más relevantes, la terapia génica y la medicina.

Las estrategias que ofrece CRISPR en el ámbito de la medicina están orientadas hacia la creación de modelos celulares y animales de enfermedades genéticas e infecciosas que ocurren en el ser humano, para estudiar su fisiopatología e investigar posibles opciones terapéuticas en ellos.

Enfermedades incurables y con base genética como la distrofia muscular de Duchenne, la anemia hemolítica de Fanconi y el cáncer son algunas de las dianas que se encuentran en ensayos clínicos y que han obtenido resultados prometedores en modelos animales con CRISPR/Cas. También se utiliza esta tecnología en la producción de antimicrobianos y para el estudio de infecciones virales como el VIH y el Covid-19. [34]

## **Inmunoterapia contra el cáncer**

La inmunoterapia mediante células CAR-T está dirigida actualmente a neoplasias hematológicas, fundamentalmente para tratar la leucemia aguda linfoblástica de tipo B (LLA tipo B) mediante CAR T19, que cuenta con fármacos aprobados por la FDA.

La terapia consiste en la obtención de células T del paciente y su edición mediante ingeniería genética, utilizando lentivirus o retrovirus como vector, para insertar el gen CAR (receptor antigénico quimérico) en las células. Este receptor reconocerá el ligando específico de las células tumorales, en el caso de la LLA tipo B el antígeno será CD19 de los linfocitos B, y desencadenarán la respuesta inmunitaria para su eliminación. [35][36]

Hace un año, se inició el primer ensayo clínico en humanos con células CAR-T editadas genéticamente con CRISPR/Cas9 para el tratamiento de las neoplasias hematológicas. El ensayo se lleva a cabo en tres pacientes, dos de ellos presentan un mieloma múltiple y el tercero un sarcoma.

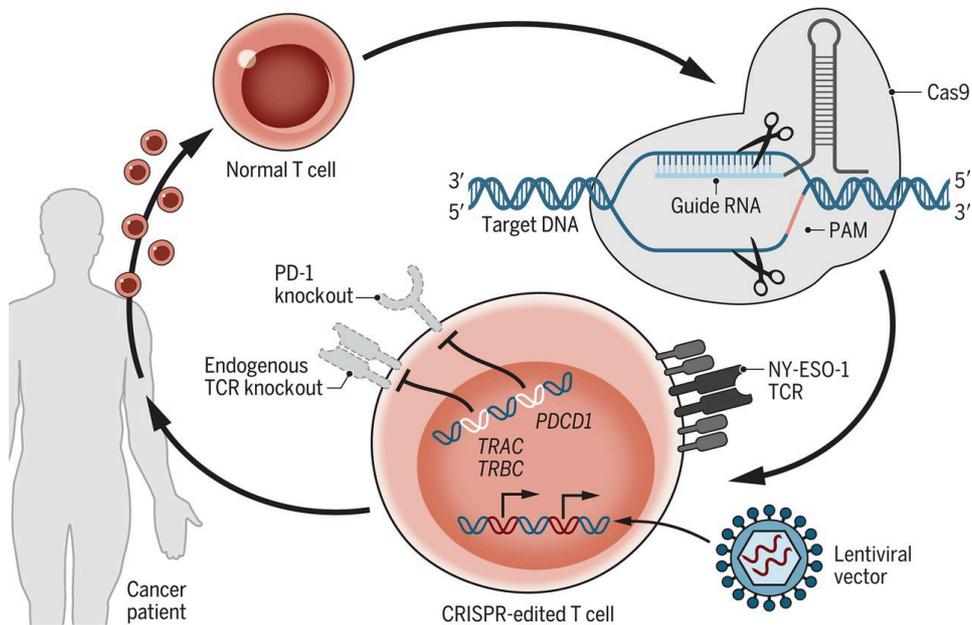
Se trata de una técnica estrechamente relacionada a la terapia CAR-T, pero dirigido contra células T y que pretende mejorar su especificidad y su seguridad.

Tras la recolección de las células T del paciente, se añade el receptor específico mediante la inclusión del gen CAR a través de un virus como vector. En este caso, se utiliza la herramienta CRISPR/Cas9 para editar y silenciar tres genes (TRAC, TRBC Y PDCD1) mediante ARNs guías (sgRNA)

TRAC y TRBC forman parte del receptor TCR (Receptor natural de células T), por ello, al ser eliminado este receptor endógeno de las células T editadas, se evitará que se unan entre ellas y se conseguirá potenciar la expresión del nuevo transgén de receptor (TCR transgene). PDCD1 codifica a PD-1, que forma parte de un control natural que inhibe a células T, de esta manera, al eliminarlo se mejora la eficacia antitumoral.

Posteriormente, utilizando un lentivirus, se inserta en la célula T editada el TRC sintético y mejorado con capacidad de reconocer las células tumorales (que presentarán el antígeno NY-ESO-1)

Las células T editadas son introducidas al paciente y con la monitorización de los resultados se determinará la seguridad y la viabilidad de utilizar CRISPR/Cas9 en pacientes con cáncer de células T refractario.[37]



**Figura 17. Edición génica mediante CRISPR/Cas9 en células T de pacientes con cáncer.** En primer lugar, se extraen las células T del paciente. El complejo CRISPR/Cas9 junto con tres sgRNA producen el silenciamiento de TRAC, TRBC y PDCD1. Se utiliza un lentivirus para introducir el receptor de células T frente a antígenos tumorales (NY-ESO-1). Se reintroducen las células T editadas en el paciente mediante infusión intravenosa. (37)

Por el momento, se ha observado que las células T persisten más de 9 meses a niveles estables y no se han identificado reacciones de toxicidad, lo que sugiere que la inmunogenicidad es mínima. Con ello, se demuestra la viabilidad y la eficacia de CRISPR/cas en la inmunoterapia contra el cáncer.

En biopsias de médula ósea se observó que las células editadas habían alcanzado los sitios del tumor, y aunque se encontraban residuos tumorales, en ambos pacientes con mieloma se produjo una reducción de los antígenos NY-ESO-1, cumpliéndose así los objetivos de la terapia con células T editadas genéticamente.[37]

## **Sars-CoV-2**

Técnicas CRISPR desarrolladas con anterioridad, han sido adaptadas y aplicadas con éxito en la detección y diagnóstico de la infección por Sars-Cov-2 durante la pandemia COVID-19.

- SHERLOCK (Cas13a)

La primera de ellas se basa en la técnica SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) y fue descrita en 2017 por Zhang como método de detección de ADN Y ARN.

Esta técnica se basa en el uso de CRISPR con una nueva proteína nucleasa, Cas13a, que, a diferencia de Cas9, es capaz de cortar ARN en vez de ADN.

Cas13a es guiado para localizar el ARN diana mediante un ARN guía. Cuando se produce la complementariedad entre ambos ARN, Cas13a genera cortes en el ARN diana y tras él, la nucleasa se activa.

Una vez activada, Cas13a genera cortes en todo el ARN presente en la muestra, sin importar la complementariedad. Ante este hallazgo, se decidió incorporar pequeñas moléculas de ARN con un fluoróforo (F) en un extremo y un inhibidor de la fluorescencia en el otro (N), de forma que al activarse CAS13a y digerir las moléculas de ARN, se liberará la molécula F y emitirá fluorescencia que podrá ser detectada y, por tanto, confirmar la presencia del ARN viral. [38]

Este método permitiría detectar la infección por Sars-CoV-2 en apenas 1 hora de una forma muy sensible, sin necesidad de un laboratorio ni equipamiento específico. Por ello, fue aprobada de emergencia por la FDA en EE. UU. en mayo de 2020 como diagnóstico en muestras humanas.[39]

- DETECTR (Cas12a)

Esta técnica se basa en los estudios publicados por Doudna en 2018 y tiene un mecanismo similar a SHERLOCK.

DETECTR (DNA Endonuclease TargEted CRISPR Trans Reporter) utiliza la capacidad de Cas12a de detectar y generar cortes en el ADN específico tras ser guiada por ARN. Por lo tanto, para poder aplicarlo a la detección del coronavirus, es necesario retrotranscribir el ARN a ADN para ser sustrato de Cas12a.[40]

En abril de 2020 se produjo el primer estudio para evaluar la técnica en la detección y diagnóstico del Sars-CoV-2, en particular los genes E y N. Aunque no está aprobado por la FDA, en los estudios se observó que el método sólo tardaba 45 minutos y que era un mecanismo más fácil y económico. Sin embargo, al compararla con la técnica comúnmente utilizada RT-PCR, se concluyó que era menos sensible. [41]

- Tratamiento de la infección (Cas13d)

Al igual que en la detección y el diagnóstico, CRISPR también ha participado en la búsqueda de un tratamiento para la infección por Sars-CoV-2.

En febrero de 2020 se propuso la utilización de Cas13d (CasRx) para destruir el ARN viral. Esta nucleasa utiliza un ARN guía para detectar el ARN diana y lo corta de manera específica, destruyendo el ARN del virus en concreto.

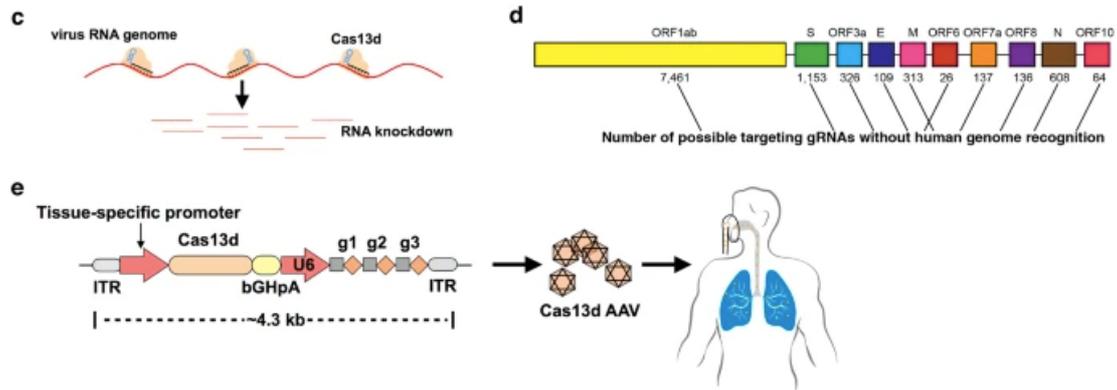
Se propuso utilizar partículas de virus adeno-asociado (AAV) para transportar el gen de CAS13d junto con múltiples guías de ARN complementarias al genoma del SARS-CoV-2 a células previamente infectadas. De esta manera, la nucleasa Cas13d cortaría y destruiría el ARN del coronavirus.[42]

Posteriormente, se desarrolló el método PAC-MAN (Prophylactic Antiviral CRISPR in huMAN cells), una técnica que utilizaba la estrategia de Cas13d comentada pero que, en lugar de introducir el gen mediante AAV, lo añadía previamente mediante modificación genética de las células para que expresasen Cas13d de forma permanente.

Realizaron el experimento con células humanas epiteliales de pulmón, generaron las modificaciones genéticas para expresar Cas13d, introdujeron los ARN guías y expusieron a las células a la infección del coronavirus y de la gripe.

Los experimentos consiguieron demostrar que con Cas13d, se producía la degradación de las secuencias del ARN de SARS-COV-2 y la inhibición de la replicación del virus de la gripe, [43]

Sin embargo, la técnica PAC-MAN no se ha puesto en práctica in vivo, ya que estos experimentos parten de células humanas editadas genéticamente, lo que clínicamente no se podría conseguir. La limitación fundamental es, por tanto, conseguir llevar el sistema CRISPR/Cas13d a las células infectadas humanas.



**Figura 18. Estrategia de tratamiento de SARS-CoV-2.** C) Representación de actuación de Cas13d, generando cortes en el ARN del virus. D) Posibles ARN guías que se pueden generar para guiar Cas13d contra el ARN del coronavirus, sin afectar al reconocimiento del genoma humano. E) Esquema de la inserción del gen de Cas13d y tres ARN guías en un virus adenoasociado (AAV) y su posterior administración por vía inhalatoria al paciente infectado. (42)

## 5. CONCLUSIONES

El descubrimiento de CRISPR/Cas como sistema de inmunidad adaptativa en procariontes y su aplicación en la modificación del ADN ha supuesto una revolución en la ingeniería genética y la edición génica. Esta técnica ha conseguido superar los sistemas de edición existentes anteriormente como los ZFNs y TALENs, debido a su sencillez, asequibilidad y eficacia sobre cualquier tipo de célula que se quiera modificar.

El complejo CRISPR/Cas9 es considerado un método de edición sencillo y económico, que está formado por una proteína nucleasa Cas9 que es guiada por un ARN guía (sgRNA en edición génica) para alcanzar la secuencia de ADN que queremos manipular. La nucleasa genera cortes de doble cadena (DSBs) que posteriormente serán reparados aleatoriamente mediante NHEJ o utilizando el molde elegido mediante HDR. De esta manera, podemos generar la delección de un gen o la inserción de una secuencia determinada en el ADN diana.

A lo largo de los años, el sistema CRISPR/Cas ha sido modificado para conseguir técnicas más específicas e inocuas, como la modificación de los dominios nucleasa de Cas9 para generar las nicasas y dCas9, que estarán presentes en herramientas posteriores como la edición de bases y el prime editing.

Con estas técnicas derivadas de CRISPR/Cas9 se consigue aumentar las funciones que puede desempeñar, como la transversión de un nucleótido por otro específico, lo que tiene una gran repercusión como posible terapia de enfermedades genéticas producidas por polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y que no tienen cura actualmente.

En cuanto a sus aplicaciones, CRISPR/Cas ha conseguido mejorar el campo de la biotecnología, la industria alimentaria, la producción ganadera y, sobre todo, ha supuesto una gran revolución en medicina, desde la investigación de enfermedades genéticas y sus terapias en modelos animales hasta la puesta en marcha de ensayos clínicos en trastornos hereditarios, en oncología y enfermedades infecciosas, abriendo así las puertas hacia la esperanzadora terapia génica.

En definitiva, observando la evolución de esta tecnología, que inició hace sólo 7 años, podemos afirmar que el sistema de edición génica mediante CRISPR/Cas avanza a pasos agigantados y que, tras superar sus limitaciones, será considerado como el mejor método de modificación del genoma que existe, cambiando la vida de los seres humanos en un futuro cercano.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:461524.
2. Márquez JG. La revolución de la ingeniería genética. *NACC Nova Acta Científica Compostel. Biología* 2013;2013-21.
3. Gaj T, Sirk SJ, Shui S-L, Liu J. *Genome-Editing Technologies: Principles and Applications.* Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2016;8.
4. Arora L, Narula A. Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1932.
5. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, et al. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One* 2015;10:e0136690.
6. Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Semin. Perinatol.* 2018;42:487-500.
7. Lee J, Chung J-H, Kim HM, Kim D-W, Kim H. Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14:448-62.
8. Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J. Mol. Biol.* 2016;428:963-89.
9. Zhang H-X, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol. Ther.* 2019;27:735-46.
10. Mino T, Mori T, Aoyama Y, Sera T. Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses. *Arch. Virol.* 2008;153:1291-8.
11. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 2013;339:819-23.
12. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 2016;85:227-64.
13. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 2000;36:244-6.
14. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 2006;1:7.
15. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002;43:1565-75.

16. 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;13:722-36.
17. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015;39:428-41.
18. 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;337:816-21.
19. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346:1258096.
20. Kirchner M, Schneider S. CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015;54:13508-14.
21. Leenay RT, Beisel CL. Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. *J. Mol. Biol.* 2017;429:177-91.
22. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 2014;507:62-7.
23. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109:E2579-2586.
24. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013;154:1380-9.
25. Xu T, Li Y, Shi Z, Hemme CL, Li Y, Zhu Y, et al. Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81:4423-31.
26. Yan S, Schubert M, Young M, Wang B. Applications of Cas9 nickases for genome engineering. *Genome Ed.* :10.
27. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 2013;152:1173-83.
28. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 2013;23:1163-71.
29. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* 2013;154:442-51.
30. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016;533:420-4.

31. Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol. Cell* 2017;68:26-43.
32. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017;551:464-71.
33. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019;576:149-57.
34. Khan S, Mahmood MS, Rahman SU, Zafar H, Habibullah S, Khan Z, et al. CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *J. Biomed. Sci.* 2018;25:29.
35. Ahmad A. CAR-T Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21.
36. Rotolo A, Karadimitris A, Ruella M. Building upon the success of CART19: chimeric antigen receptor T cells for hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma* 2018;59:2040-55.
37. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020;367.
38. Kellner MJ, Koob J, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.* 2019;14:2986-3012.
39. Guglielmi G. First CRISPR test for the coronavirus approved in the United States. *Nature* 2020;
40. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* 2018;360:436-9.
41. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* 2020;38:870-4.
42. Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. *Cell Res.* 2020;30:189-90.
43. Abbott TR, Dhamdhare G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, et al. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell* 2020;181:865-876.e12.

# SISTEMAS DE EDICIÓN GÉNICA EN CÉLULAS EUCARIOTAS



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SISTEMÁTICA

Autora: Lucía Velasco Martín

Tutores: Miguel Ángel de la Fuente y Julia Serna

Departamento de Biología, Histología y Farmacología – Universidad de Valladolid

## RESUMEN

El descubrimiento del complejo CRISPR/Cas (Repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas asociadas a la nucleasa Cas) ha supuesto una revolución en la edición génica en los últimos 7 años.

Este sistema fue hallado como un mecanismo de inmunidad adaptativa en procariontes, y gracias a su sencillez, versatilidad y eficacia se incorporó a la edición génica y se ha convertido en la herramienta dominante en la actualidad.

CRISPR/Cas se basa en el reconocimiento de una secuencia de ADN concreta mediante un ARN guía (crRNA) y la generación de cortes de doble cadena en dicho ADN mediante la nucleasa Cas. Esta tecnología permite silenciar, activar, añadir y modificar genes o secuencias específicas para conseguir cambios en el fenotipo. Además, CRISPR/Cas ha seguido evolucionando y se han desarrollado modificaciones para obtener técnicas más precisas y específicas, de forma que aumentan las posibilidades de aplicación en diversos campos de la biotecnología y, especialmente en medicina, gracias a la investigación y el estudio de opciones terapéuticas de enfermedades genéticas hasta ahora incurables.

## INTRODUCCIÓN

La edición génica consiste en la manipulación y modificación del ADN de una célula u organismo para conseguir un cambio en sus características.

Las nucleasas representan un papel clave en edición génica, ya que son enzimas capaces de generar cortes de doble cadena (DSBs) en el ADN tras ser guiadas hacia el gen o secuencia diana. Los cortes serán reparados por la célula, mediante Reparación Homóloga Directa (HDR) o Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

Las nucleasas han seguido una evolución, desde las Meganucleasas, los Dedos de Zinc (ZFNs) y los TALENs, hasta llegar a CRISPR/Cas que ha superado a las anteriores por su eficacia y facilidad de uso.

## OBJETIVOS Y MÉTODOS

Descripción del sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición génica mediante un análisis detallado de sus características, estructura y funciones.

Se desarrollarán también las diversas modificaciones de esta técnica y sus aplicaciones en medicina.

Se ha realizado una revisión bibliográfica sistemática, recopilando y resumiendo información de estudios y artículos sobre CRISPR/Cas utilizando la base de datos de PubMed y Google Scholar, incluyéndose artículos originales y de revisión publicados desde 2011 hasta la actualidad.

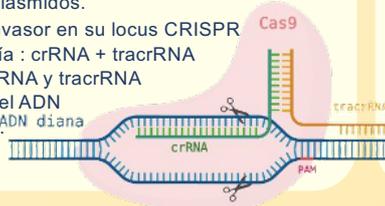
Se ha utilizado "Biorender" para la creación de figuras propias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CRISPR/Cas9 como INMUNIDAD ADAPTATIVA en procariontes:

Algunas bacterias y arqueas utilizan este sistema para protegerse frente a reinfecciones de bacteriófagos y plásmidos.

1. Incorporan el material genético invasor en su locus CRISPR
2. CRISPR se transcribe al ARN guía: crRNA + tracrRNA
3. Al producirse una reinfección, crRNA y tracrRNA guían a la nucleasa Cas9 hacia el ADN invasor para cortarlo y destruirlo.



### 2. CRISPR/Cas9 EN EDICIÓN GÉNICA:

El mecanismo natural de CRISPR/Cas9 se adapta mediante ingeniería genética, fusionando el ARN guía dual (crRNA y tracrRNA) y creando una única guía sgRNA.

Mediante la modificación de la secuencia de sgRNA, se puede programar CRISPR/Cas9 para generar cortes en la secuencia de ADN diana y conseguir el silenciamiento o la inserción de una secuencia tras la reparación celular.



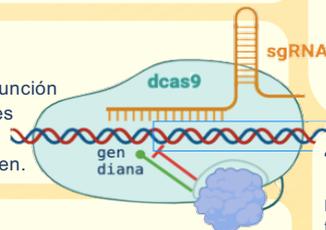
## MODIFICACIONES DE CRISPR/Cas

### 2.1. Cas9 nicasas (nCas9)

Mediante la mutación de un dominio nucleasa de Cas9 (HNH o RuvC), se forma una nicasa que produce un único corte en una hebra de ADN (nick)

### 2.2. CRISPRi y CRISPRa

Se producen mediante la fusión de Cas9 sin función catalítica (dCas9) con activadores o represores de la transcripción, bloqueando (CRISPRi) o activando (CRISPRa) la transcripción de un gen.

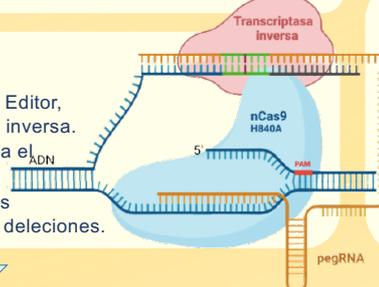


### 2.3. Base Editing

La edición de bases permite modificar un nucleótido específico mediante las cuatro transiciones: C-T, T-C, A-G y G-A. Existen editores de citosina (CBEs) y de adenina (ABEs). Utiliza nCas9 unida a una enzima desaminasa

### 2.4. Prime Editing

Edición de calidad se basa en un Prime Editor, Formado por nCas9 y una transcriptasa inversa. El ARN guía, denominado pegRNA, lleva el molde con mutaciones para la transcriptasa, consiguiendo introducir las 12 mutaciones puntuales, inserciones y deleciones.



### 3. APLICACIONES EN MEDICINA

A) **MODELOS CELULARES Y ANIMALES** de enfermedades para estudiar su fisiopatología y posibles terapias.

B) **ENSAYOS CLÍNICOS ACTUALES** de enfermedades genéticas incurables:

- Distrofia Muscular de Duchenne
- Anemia hemolítica de Fanconi
- Cáncer: Inmunoterapia de células CAR-T
- Estudio de enfermedades infecciosas como VIH y SARS-CoV-2

### 4. CONCLUSIONES

La tecnología CRISPR/Cas está avanzando a gran velocidad en los últimos años, tanto en sus modificaciones como en sus aplicaciones en medicina. Por ello, podemos afirmar que estamos ante el mejor método de edición génica y que conseguirá cambiar la vida de los seres humanos en un futuro cercano.

### Bibliografía principal

1. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 28 de noviembre de 2014;346(6213):1258096.
2. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. Cell. febrero de 2013;152(5):1173-83.
3. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 20 de abril de 2016;533(7603):420-4.
4. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature. diciembre de 2019;576(7785):149-57.
5. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. Science. 28 de febrero de 2020;367(6481).