
El càncer i la teràpia gènica: què és CRISPR?



Font: <https://medlineplus.gov/spanish/taysachsdisease.html>

Fitxa estudiant

Aquests materials didàctics són per a ús docent i d'investigació. Resta prohibida la seva comercialització o modificació.

1. Cas clínic. El càncer i la teràpia gènica: què és CRISPR?

Imagina que ets cap del departament de genètica molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona, i només fa dos dies que has començat aquesta nova feina. De cop, t'arriben els resultats d'una anàlisi de sang una mica preocupants, i decideixes anar a buscar quin pacient té aquestes anàlisis. Corresponen a un home de 55 anys, que va arribar a l'hospital fa uns quants dies perquè es notava molt cansat i tenia febre des de feia temps. Quan la metgessa li va fer l'exploració física, li va trobar un bony sota el braç, a l'aixella. Aquests símptomes van preocupar molt a la doctora, que va demanar-li una biòpsia dels ganglis limfàtics, l'anàlisi de sang que t'han fet analitzar i altres proves d'imatge. Finalment, li van fer un diagnòstic: limfoma. I a tu, et demanen que ajudis a identificar quin tipus de tumor és i a decidir quin tractament seria més efectiu. Creus que podries fer servir CRISPR?

1. Quines paraules et semblen claus per entendre què has de fer? Encercla-les al text.
2. Hi ha algun concepte que no entenguis del tot? Què creus que és?

3. Què en saps de CRISPR, o de la teràpia gènica?

2. Objectius

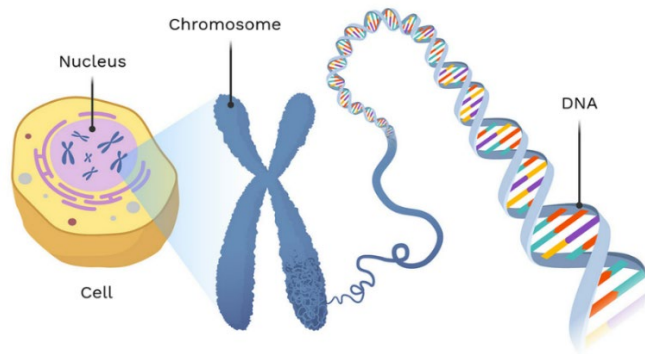
Els objectius d'aquesta pràctica són els següents:

- a) Familiaritzar-se amb el limfoma i altres tipus de tumors
- b) Entendre com funciona l'ADN i les translocacions, principal mutació dels limfomes.
- c) Aprendre el funcionament de l'edició gènica per CRISPR-Cas9.
- d) Conèixer algunes eines bioinformàtiques.
- e) Aprendre a fer i analitzar un gel d'electroforesi



3. El limfoma i les translocacions

El nostre organisme està format per molts tipus de cèl·lules diferents, que s’organitzen formant òrgans i teixits, i que ens permeten fer les nostres funcions vitals. Les cèl·lules creixen i es divideixen de manera controlada gràcies a l’ADN, el material genètic que contenen a l’interior del nucli. L’ADN és com el llibre dels organismes, ja que aporta tota la informació necessària perquè les cèl·lules puguin viure, créixer i funcionar, i és el que determinarà les nostres característiques.



Font: Django-wiki

L’ADN està format per quatre nucleòtids: adenina (A), timina (T), guanina (G) i citosina (C), units formant la cadena de DNA. Dues cadenes d’ADN s’uniran de manera complementària, és a dir, l’A s’uneix a la T, i la G a la C, i les dues cadenes s’enrotllaran sobre si mateixes formant una hèlix, i a mesura que l’hèlix es vagi condensant, és formaran els cromosomes.

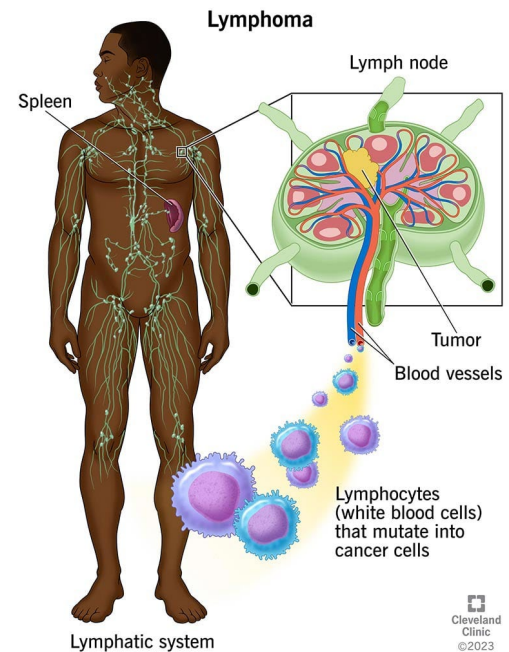
Quan les cèl·lules es divideixen, l’ADN es duplica, de manera que cadascuna de les còpies passi a cada cèl·lula filla. Però aquest procés de duplicació de l’ADN dona lloc a errors, també anomenats mutacions. Aquests errors són molt abundants, i la majoria són corregits o eliminats pel nostre propi cos. Les alteracions de l’ADN poden ser de dos tipus diferents:

Alteracions gèniques Afecten un sol gen	Pèrdua de funció El gen deixa d’expressar-se	
	Guany de funció El gen se sobreexpressa	
Alteracions cromosòmiques Afecten una part del cromosoma	Numèriques Canvien el nombre de cromosomes	Poliploidia Més de dos cromosomes d’un tipus
		Aneuploidia Falta algun cromosoma
	Estructurals Canvien l’estructura del cromosoma	Delecions S’elimina una part del cromosoma
		Duplicacions Es duplica una part del cromosoma
		Insercions S’insereix una part d’un cromosoma a un altre
		Translocacions S’intercanvien dos fragments de dos cromosomes diferents

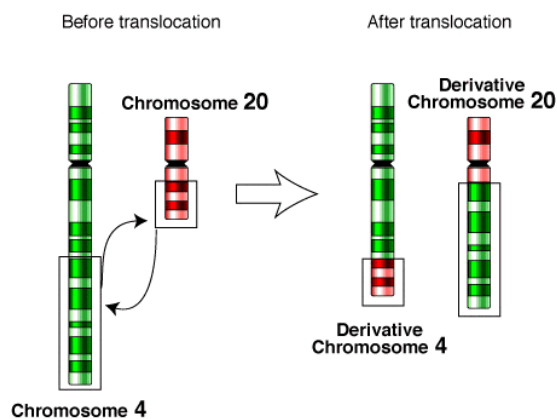
Quan el nostre cos no és capaç de corregir o eliminar aquestes mutacions, poden originar un mal funcionament de la cèl·lula, que les portarà a créixer en excés i sense control formant el que anomenem tumor. Els tumors poden ser:

- **Benignes:** les cèl·lules segueixen mantenint una part de la seva identitat cel·lular, i no es disseminaran.
- **Malignes:** les cèl·lules han mutat tant que han perdut la identitat cel·lular. També els coneixem com a **càncer**, i tenen la capacitat de disseminar-se a altres teixits, originant metàstasis.

Depenent de quines són les cèl·lules a partir de les quals s'origina el tumor, podem trobar diferents tipus de càncers. En el cas del **limfoma**, és un tipus de càncer que s'origina als **ganglis limfàtics** a partir dels **limfòcits**, que són cèl·lules del sistema immunitari. Hi ha dos tipus de limfòcits, B i T, però els dos tenen una funció en comú: detectar agents externs al nostre organisme i iniciar una resposta immunitària contra aquest.



Els limfòcits tipus B són els encarregats de generar **anticossos** específics per detectar i unir-se a l'agent extern que ha entrat a l'organisme. Per tal que els anticossos siguin específics, els limfòcits B pateixen un procés anomenat **recombinació de la regió VDJ**. Aquesta regió està formada pels gens V, D i J, localitzats al cromosoma 14, que es tallen, es delectonen i s'insereixen, fins a originar



Font: Wikimedia Commons

combinacions úniques. Però aquest procés pot comportar moltes mutacions deficitàries pels limfòcits, que fa que no sobrevisquin. En alguns casos, però, els limfòcits poden contenir mutacions que els fan créixer més que la resta de cèl·lules, i enlloc de morir, creixen descontroladament generant limfoma. La gran majoria de limfomes estan caracteritzats per contenir **translocacions** en els seus limfòcits, que són un dels causants del desenvolupament del tumor.

Depenent de quins cromosomes estiguin involucrats en la translocació, el tipus de limfoma canviarà. Per exemple, en el cas del limfoma de cèl·lules del mantell, el cromosoma 14 transloca amb el cromosoma 11, que conté el gen de la Ciclina D1 (CCND1). Aquest gen s'encarrega de controlar el cicle cel·lular, de manera que quan canvia de lloc i s'uneix al cromosoma 14, el gen CCND1 es comença a sobreexpressar, i la cèl·lula creixerà de forma descontrolada, generant el tumor.

Actualment hi ha diverses maneres de tractar un tumor com el limfoma: extraient el gangli limfàtic amb una operació, quimioteràpia, radioteràpia, transplantament de medul·la òssia, i fins i tot noves teràpies dirigides que lluiten directament contra les cèl·lules cancerígenes. Tot i així, aquestes teràpies no funcionen en tots els casos, i no hi ha cap manera de revertir la mutació o d'evitar que torni a passar.

Però a l'any 2012, una sèrie d'avanços científics van canviar la manera que teníem de pensar en la genètica: el descobriment de CRISPR.

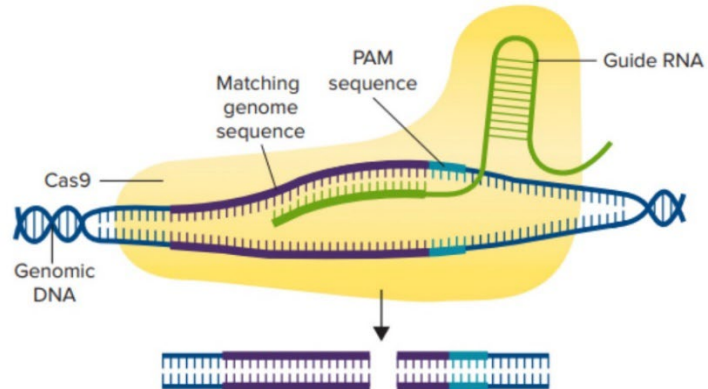
Teràpia gènica: CRISPR-Cas9

L'any 2012, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier van publicar a la revista *Science* un article demostrant com CRISPR-Cas9 podia utilitzar-se com una tècnica d'enginyeria genètica per modificar l'ADN. És a dir, amb aquest mètode es poden modificar els gens de qualsevol animal, fins i tot els gens humans.

Però com funciona **CRISPR-Cas9**? La paraula CRISPR prové de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, i fa referència a unes seqüències d'ARN repetitives que es van identificar en les bactèries, i que els serveix per identificar l'ADN de virus i evitar la seva infecció. Les molècules d'ARN s'uneixen a una proteïna anomenada Cas9, que funciona com unes tisores. Un cop s'ha format el complex CRISPR-Cas9, l'ARN s'uneix a l'ADN del virus, i Cas9 el talla, de manera que aconseguen inactivar el virus.

Doudna i Charpentier van aconseguir utilitzar aquest mètode al laboratori, per poder detectar i tallar qualsevol gen de qualsevol organisme. Per fer-ho, necessitem:

1. Un **ARN guia**: aquesta molècula conté una seqüència complementària al gen que vulguem editar. D'aquesta manera, l'ARN es pot unir a l'ADN.
2. La **proteïna Cas9**: és l'encarregada de tallar l'ADN, un cop l'ARN guia porti la proteïna cap al lloc indicat.
3. La **seqüència PAM**: l'ARN guia necessita una seqüència de 3 nucleòtids concrets (NGG) per detectar l'ADN, que es localitzin just al final de la seqüència complementària. Sense la seqüència PAM, l'ARN guia no es podrà unir a l'ADN.



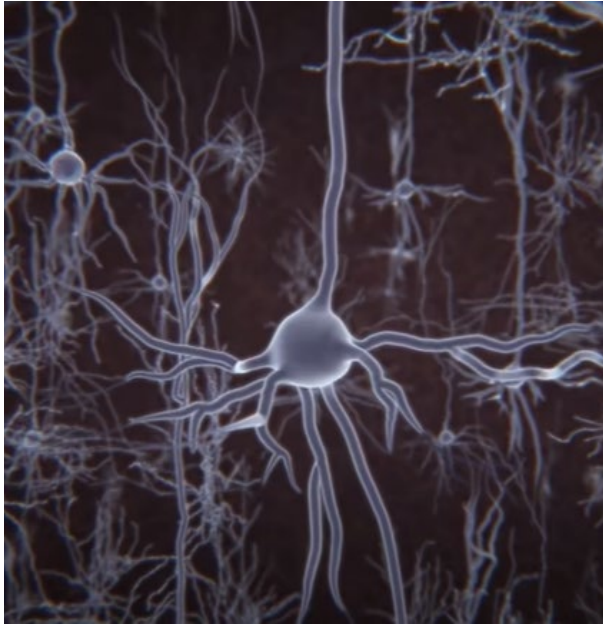
Font: <https://www.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

Aquest trencament de l'ADN pot tenir diferents efectes, però en general, s'utilitza per:

- Trencar el gen per complet, de manera que queda silenciada i no s'expressa.
- Inserir una altra seqüència d'ADN al lloc del tall, de manera que modifiquem la seqüència de l'ADN.

A vegades, però, l'ARN guia pot unir-se a altres regions de l'ADN que no és la que havíem escollit. Això s'anomenen "off-target effects", i podrien tenir conseqüències desastroses per l'organisme. Per tant, encara no és un sistema del tot segur, i per això no s'utilitza com a tractament.

Però què podríem aconseguir amb CRISPR? Podríem canviar les mutacions i curar el càncer? Podríem també canviar altres gens, per fer-nos més forts, més intel·ligents o per escollir com volem que sigui la nostra descendència? Fins on podríem arribar? Aquests dos vídeos us ajudaran a entendre millor la tècnica i les seves utilitats.



4. Hipòtesis i prediccions

El nostre pacient té limfoma de cèl·lules del mantell, que conté la translocació t(11;14) i sobreexpressa el gen de la Ciclina D1 (CCND1). Aquests són els tractaments habituals que s'han intentat amb el pacient, però no han funcionat:

Tractament	Què és?	Avantatges	Inconvenients
Quimioteràpia	Injecció de medicaments i altres químics per destruir ràpidament les cèl·lules que proliferen, com les cancerígenes. Es pot inocular de manera intravenosa o amb píndoles.	Es destrueixen totes les cèl·lules, de manera que eliminarem el tumor amb una alta probabilitat, i independentment de les mutacions que contingui.	Pel mateix motiu, com que elimina totes les cèl·lules, tant les sanes com les tumorals, tindrà molts efectes secundaris. Té una alta toxicitat per l'organisme.
Teràpia de radiació	S'utilitza rajos d'alta energia, com rajos X i protons, per destruir les cèl·lules cancerígenes per radiació.	Igual que la quimioteràpia, destruirà les cèl·lules cancerígenes independentment de les seves mutacions.	Té molts efectes secundaris i no distingeix entre cèl·lules sanes i tumorals.
Trasplantament de medul·la òssia	S'insereixen cèl·lules mare de la medul·la òssia d'un donant sa, que reconstruiran la medul·la òssia del pacient	Tenen un alt percentatge d'èxit	Es necessita fer quimioteràpia i/o radioteràpia abans per destruir per complet la medul·la òssia del pacient. Per tant, tindrà també molts efectes secundaris. A més, es necessita trobar un donant compatible.
Teràpies personalitzades/diana	Són medicaments que es dissenyen específicament per atacar les cèl·lules cancerígenes del pacient. Per exemple, la immunoteràpia feta amb cèl·lules CAR-T.	Tenen molt pocs efectes secundaris, perquè detecten específicament les cèl·lules cancerígenes del pacient. Tenen un alt percentatge d'èxit però només entre els pacients que tenen una mutació clau.	Són molt cares perquè s'ha d'analitzar cada pacient. Són específiques per certes mutacions, de manera que si alguns pacients no tenen aquestes mutacions, no poden tractar-se amb aquestes teràpies.

Sabent això, i ara que ja entenem com funciona la teràpia gènica, seria possible utilitzar-la com a tractament? Com ho faríeu?

1. Com podríem fer servir CRISPR-Cas9 com a tractament per aquest tipus de limfoma?

2. Quins elements necessitaríem?

3. Quins problemes creieu que podríem tenir?

5. Disseny de l'experiment

El pacient a qui estem analitzant té una sobreexpressió del gen CCND1. Per provar un nou tractament experimental, intentarem silenciar aquest gen fent servir CRISPR-Cas9. Per fer-ho, hem de seguir aquests passos:

1. **Dissenyar els ARN guia.** Un dels elements més importants de CRISPR-Cas9 són els ARN guia. Sense aquests, no podríem dirigir la nostra teràpia al gen d'interès, que en aquest cas és la CCND1. Aquest disseny es fa de manera bioinformàtica.
2. **Dur a terme CRISPR-Cas9.** La teràpia gènica amb CRISPR-Cas9 es farà en un laboratori extern, perquè és molt complicat, amb cèl·lules del pacient que estan en cultiu. Al cap d'unes quantes hores, ja podrem saber si la tècnica ha funcionat.
3. **Extreure l'ADN.** Per veure si CRISPR-Cas9 ha funcionat, necessitem extreure l'ADN de les cèl·lules del pacient. A més, l'ADN és massa petit per veure'l a simple vista, de manera que necessitem fer una PCR per amplificar el material genètic. La PCR és com una màquina fotocopiadora que ens permetrà tenir el mateix ADN en moltes quantitats. Això també es farà en un laboratori extern, i ens portaran l'ADN a nosaltres perquè analitzem els resultats.
4. **Fer un gel d'electroforesi.** L'ADN no es pot veure a simple vista. Per això, hem de preparar un gel d'agarosa, que és un gel amb porus on les mostres d'ADN poden córrer mogudes pel corrent elèctric. Així, les molècules més petites es mouran més ràpid i cauran més avall del gel, mentre que les més grans quedaran més amunt. Això ens permet separar les molècules d'ADN per la seva mida, i veure en quines d'elles hem pogut tallar el gen de manera eficient.

Quins resultats esperes obtenir i per què?

6. Protocol bioinformàtic

1. Observació del gen CCND1

Per tal d'aplicar la tècnica de CRISPR, necessitem dissenyar els ARN guia que detectin el gen de la CCND1, amb eines bioinformàtiques. Segueix els passos següents i contesta les preguntes.

1. Obre una finestra d'internet i busca **UCSC Genome Browser Home**. Aquesta pàgina web ens permet visualitzar els nostres cromosomes i tots els gens que hi ha.
2. A dalt a l'esquerra, clica a "Genomes" i després a "Human CRGh38/hg38". Aquesta és la última versió de l'ADN humà que s'ha seqüenciat.
3. Al buscador, escriu "CCND1" i prem a "go". Això et permetrà trobar el gen de la ciclina D1 i analitzar-lo. Contesta les preguntes següents sobre aquest gen:

A quin cromosoma està localitzat el gen CCND1?

Quina longitud té aquest gen? Ho pots escriure en **bp**, que són parells de bases de nucleòtids.

Quines coordenades té la CCND1?

2. Generació dels ARN guia

Un cop sabem tot el necessari sobre el gen de la CCND1, anem a dissenyar 5 ARN guia diferents, per veure quin d'ells funciona millor. Com que CRISPR és una tècnica amb molts "off-target", hem de fer diverses proves. Segueix els passos següents i contesta les preguntes a continuació.

1. Obre una finestra d'internet i busca CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>).
2. Escribeu el gen diana (**target**), l'espècie on volem fer CRISPR (humana), quina tècnica volem fer servir i amb quina finalitat (**knock-out**). **Knock-out** significa que volem suprimir el gen. Tot seguit, clica a "**Find target sites**".
3. Quin són els 5 millors ARN guia? Quina eficiència tenen? Comprova que es localitzin en el teu gen d'interès. Quina és la seqüència PAM que detecta cadascun dels ARN guia?

Seqüència ARN guia	Eficiència	Localització	Seqüència PAM

Ara que ja teniu els 5 candidats, aquesta nit aplicarem CRISPR-Cas9 en 5 mostres diferents del pacient, cada mostra amb un ARN guia diferent. Després, extraurem l'ADN i l'amplificarem per PCR en un laboratori especialitzat. L'endemà al matí, us portarem les mostres d'ADN perquè pugueu comprovar quins ARN guia han funcionat.

7. Protocol experimental

El dia anterior vam dissenyar els elements necessaris per fer CRISPR-Cas9, i els vam enviar a un laboratori especialitzat. Aquest laboratori va aplicar la teràpia gènica a les cèl·lules del pacient en cultiu, va extreure el seu ADN i el va amplificar fent servir PCR. Ara, ens tornen les mostres d'ADN amplificat, i nosaltres hem d'analitzar quins dels nostres ARN guia han funcionat per eliminar el gen CCND1.

Per fer-ho, utilitzarem el kit EDVOTEK ("Using CRISPR to treat cystic fibrosis"), on hem de seguir tres passos: preparar el gel d'electroforesi, córrer les mostres i tenyir el gel per visualitzar l'ADN. Abans de començar, però, tingues en compte aquests punts!

Punts a tenir en compte quan treballem al laboratori

1. Hem de portar **guants i bata** per no cremar-nos ni tacar-nos amb reactius que poden ser perillosos.
2. Hem de vigilar amb els elements que escalfem. Poden bullir i esquitxar-nos.
3. Vigileu amb l'equip elèctric.
4. Ens hem de rentar les mans i el material del laboratori sovint, i sobretot després d'acabar la pràctica.
5. Anoteu tot el que passi durant l'experiment! Pot ser clau per entendre els resultats.

Material



Proveta graduada

Matràs Erlenmeyer

Pipetes

Puntes

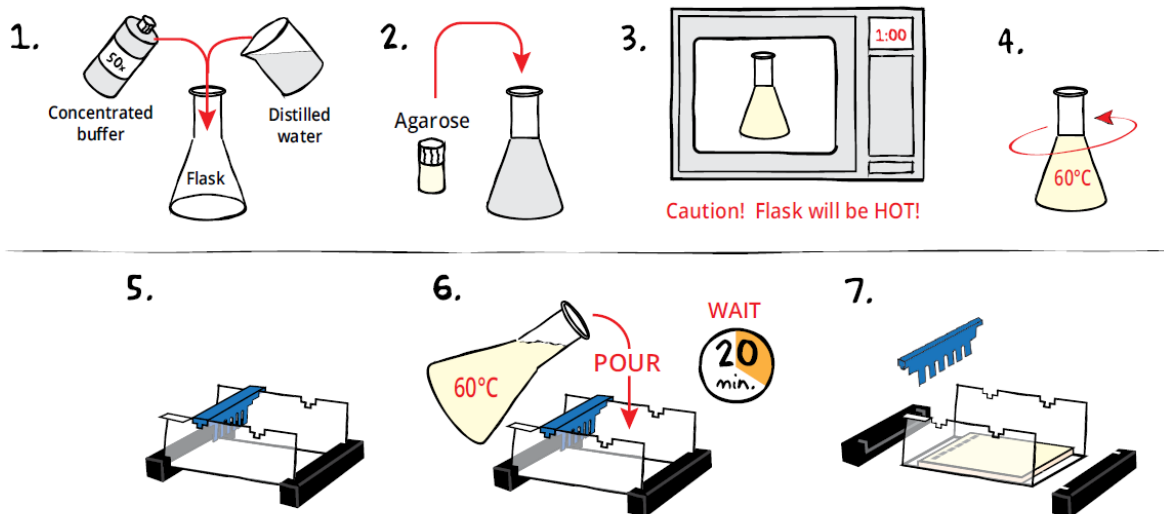
Aparell d'electroforesi

Cubetes de plàstic

Font: Lab Comercial, Lab Comercial, Hawach Scientific, AP Medical, Quirumed, Auxilab

Reactius

- Aigua destil·lada
- Tampó d'electroforesi 50x
- Agarosa
- Mostres d'ADN
- Marcador de pes molecular
- Tint FlashBlue 10x

Procediment I. Preparació del gel d'agarosa

Font: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

1. Dilueix el tampó d'electroforesi 50x amb aigua destil·lada, fins que estigui a 1x, en una proveta. Necessitarem 150 ml finals de tampó 1x.

Càlculs

2. Barreja l'agarosa en pols amb el tampó d'electroforesi 1x en un matràs de 250 ml. Tingues en compte que l'agarosa ha de tenir una concentració final del 0.8%, i el gel té un volum final de 45 ml.

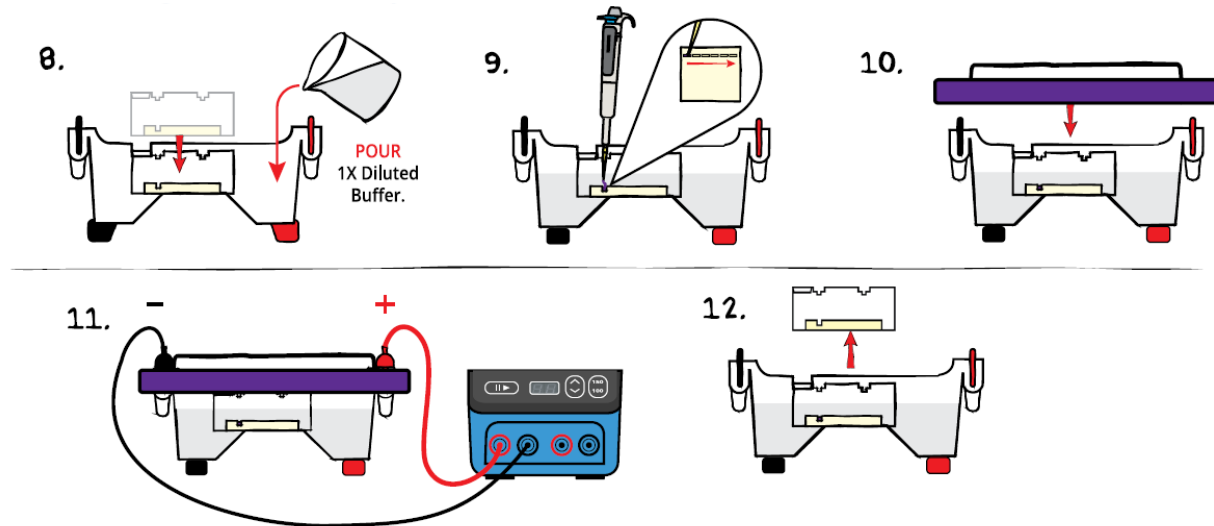
Càlculs

3. Per dissoldre l'agarosa, bull la solució posant-la al microones durant 1 minut. Amb compte, treu el matràs i remena. Si no s'ha dissolt del tot, continua escalfant la solució durant 15 segons i repeteix el procés fins que es dissolgui tota l'agarosa. La solució hauria de ser transparent com l'aigua.
4. Refreda l'agarosa fins als 60°C aproximadament mentre anem remenant el matràs.
5. Mentre l'agarosa es refreda, munta la cubeta amb els plàstics negres dels extrems ben pressionats, i la pinta a sobre, tal i com es veu en el dibuix.

6. Aboca la solució d'agarosa a la cubeta i deixa-ho refredar per complet. La solució trigarà uns 20 minuts a solidificar.

Mentre esperem que el gel solidifiqui, anirem preparant el material pel següent pas i aprendrem a fer servir la pipeta.

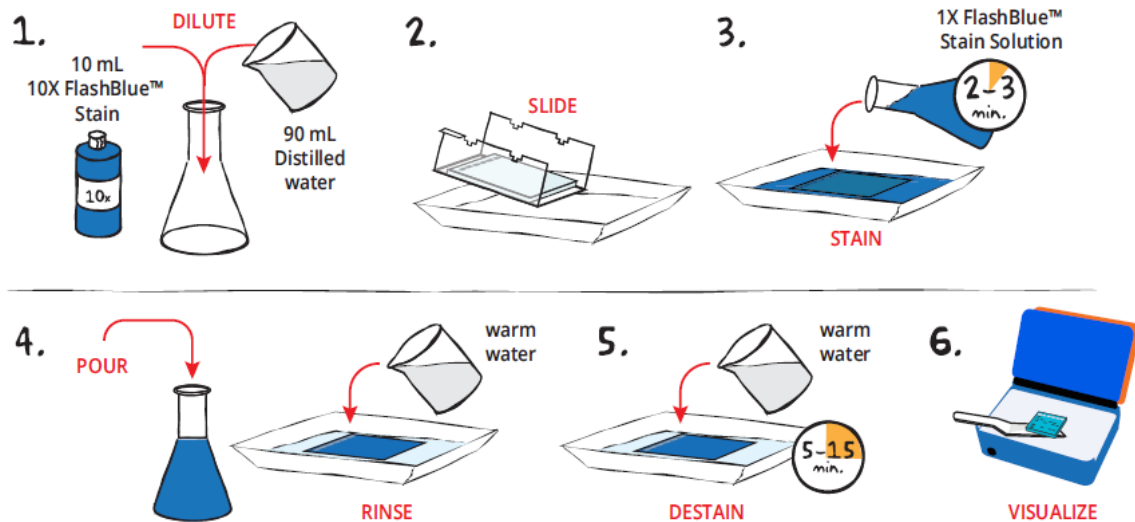
Procediment II. Electroforesi de les mostres d'ADN



Font: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

7. Un cop el gel ha solidificat, extraïem els plàstics negres i la pinta de la cubeta. Mantenim el gel sobre la cambra que l'aguanta perquè no se'ns trenqui.
8. Posem el gel a la cambra (encara amb el plàstic de suport), i ho cobrim amb tampó d'electroforesi 1x fins que quedi tot cobert.
9. Pipetegem les mostres individualment dins de cada pou. No cal treure la tapa de les mostres, es pot punxar directament amb la punta de la pipeta. Recorda canviar la punta cada cop que canvis de mostra!
10. Posa la tapa de la cubeta i comprova que la orientació és correcte. El pol negatiu (negre) ha de quedar a la zona on has posat les mostres, ja que aquestes correran des del pol negatiu fins al pol positiu (vermell).
11. Connecta els cables a cada elèctrode de la cubeta, també vigilat que els colors siguin els adients. Inicia el corrent elèctric entre 100 i 150 volts (depenent del temps que tinguem). Veurem que funciona correctament si veiem bombolles al tampó, que ens indiquen que hi ha corrent elèctric. Vigila sempre on estan les mostres, que no corrin massa i surtin del gel!
12. Un cop l'electroforesi s'ha completat (més o menys quan el marcador es troba a més de 3cm de l'inici), podem apagar el corrent elèctric i treure el gel de la cambra.

Mentre les mostres corren (entre 10 i 40 minuts), prepararem els passos següents i fem els càlculs.

Procediment III. Tinció del gel i visualització de les mostres

Font: Kit Edvotek – “Using CRISPR to treat cystic fibrosis”

1. Diluïm el tint del gel (FlashBlue) a 1x amb aigua destil·lada. Necessitarem uns 100 ml de tint.

Càlculs

2. Extraïem el gel del suport i el posem en una safata neta.
3. Cobrim el gel amb el tint 1x durant 2-3 minuts. Per obtenir millors resultats, podem col·locar la safata en una balança en moviment, o anar-la agitant nosaltres.
4. Al cap de 3 minuts com a màxim (si ho deixem més temps, necessitarem més temps per destenyir-lo), tornem el tint al matràs per reutilitzar-lo. Cobrim la safata amb aigua tèbia (40-45°C) i ho deixem durant 20-30 segons.
5. Canviem l'aigua per aigua neta i tèbia també, i ho deixem entre 5 i 15 minuts mentre ho agitem. Podrem observar les bandes d'ADN a partir dels 5 minuts. Si canviem l'aigua sovint i ho agitem, millorarem els resultats.
6. Extraïem el gel amb molta cautela i observem les bandes a contrallum. Si posem una llanterna o un sistema de llum blanca, les podrem veure millor.

8. Interpretació dels resultats

1. Dibuixa o enganxa una fotografia dels resultats que hem obtingut.



2. Què creus que vol dir cada resultat? Quins ARN guia faries servir?



3. Creus que funcionaria aquest mètode com a tractament del limfoma? Per què creus que no es fa servir aquest mètode per curar qualsevol tipus de càncer?



4. Ara, en grups, debatrem sobre els avantatges i els inconvenients de la teràpia gènica.
- a. Quins avantatges creieu que té la teràpia gènica?

- b. I inconvenients?

- c. Escriviu la conclusió del vostre grup i altres idees interessants.