

CRISPR: Com gestionem la revolució del futur?



Font: James Steinberg

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

1.1. Fa tot just dos anys que vas sortir de la carrera, i us trobeu treballant en una empresa biotecnològica a Catalunya anomenada GACT Biotech. Un bon dia, us arriben notícies de que la junta directiva ha decidit començar un nou projecte basat en la modificació d'embrions mitjançant una tècnica nova i revolucionària anomenada CRISPR/Cas9. Aquesta tecnologia sembla tenir el potencial de, per primer cop a la història de la biologia, permetre'ns modificar el genoma humà amb relativa facilitat, fiabilitat, i de manera econòmica. Respon a les següents preguntes:

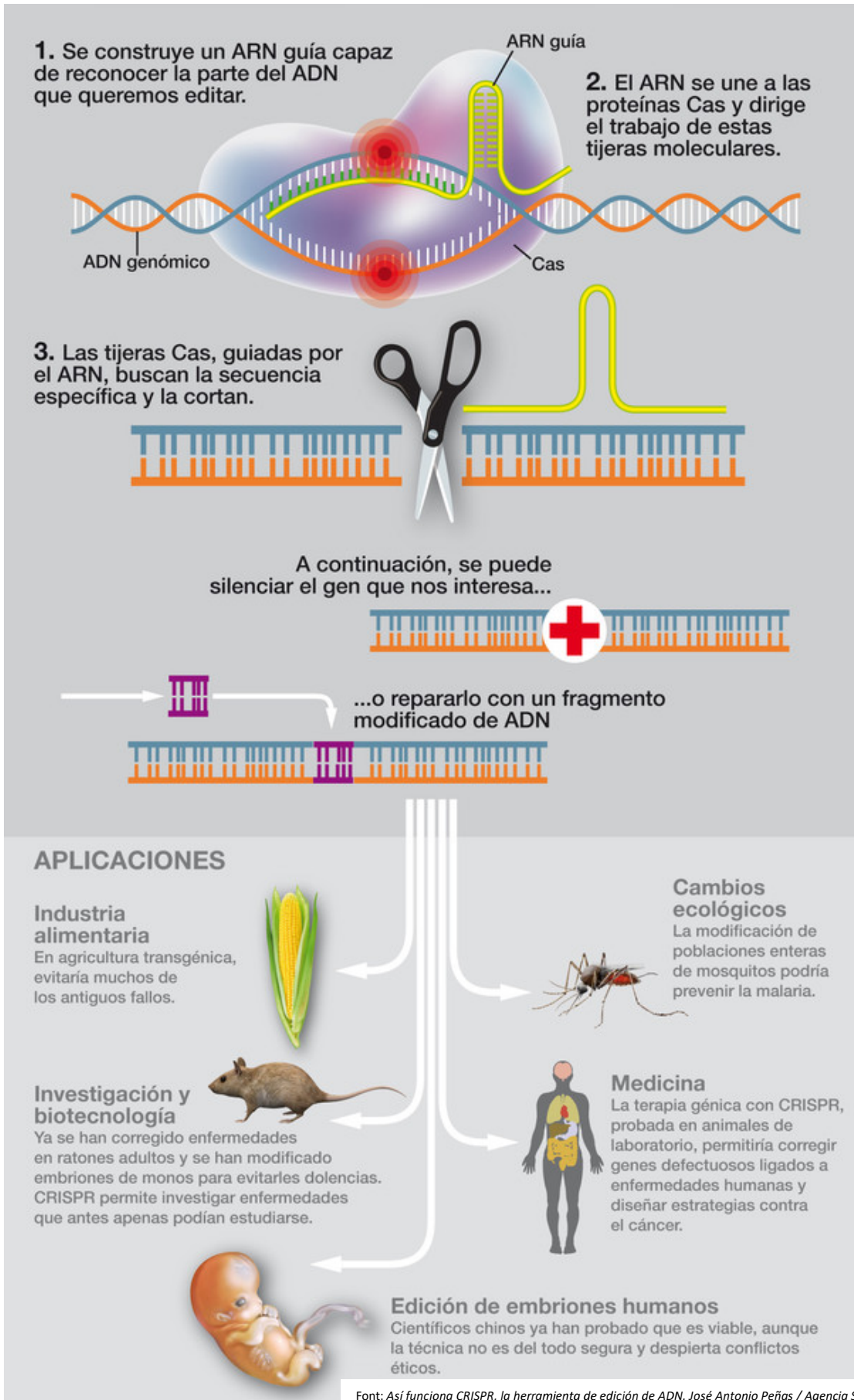
1. Com funciona la tècnica de CRISPR/Cas9?
2. Quins avantatges i inconvenients té aquesta tècnica?
3. Aquesta tècnica s'ha portat a terme en humans?
4. Quins dilemes ètics es poden derivar de l'ús d'aquesta tecnologia?

1.2. Pel que sentiu a l'oficina, sembla clar que l'objectiu de l'empresa és oferir un servei que permeti la modificació genètica d'embrions amb CRISPR/Cas9, tant per evitar malalties genètiques hereditàries com per escollir certes característiques físiques o cognitives a desig dels pares (el que es coneix com "nens a la carta"). Quan els rumors es confirmen, uns quants decideu reunir-vos i reflexionar seriosament sobre les implicacions ètiques d'aquesta aplicació biotecnològica. Alguns posen sobre la taula la possibilitat d'abandonar l'empresa, mentre d'altres semblen força decidits a seguir en el nou projecte...

- Llegiu la carta que us donaran i reflexioneu sobre les preguntes. Podeu apuntar les vostres idees o arguments al requadre de la pàgina següent. Teniu 10 minuts per dur a terme aquesta tasca.
- Un cop hagueu acabat, els que tingueu la mateixa fitxa reuniu-vos en grups i poseu en comú, durant 10 minuts, els vostres punts de vista. Apunteu les idees o arguments que aneu tractant i consensuant al requadre de la pàgina següent.
- Escolliu un representant per a que faci una introducció a la resta de grups sobre el cas que heu tractat i la discussió grupal que heu mantingut, esmentant breument els punts de vista i posicions ètiques que han sorgit durant la posada en comú.
- Quan tots els grups hagin acabat, començarà el debat a nivell classe!

- Espai per a les idees o arguments de la primera reflexió individual:

- Espai per a les idees o arguments de la reflexió grupal:



2.1. Tot i les vostres reserves ètiques, decidiu continuar a l'empresa. Al cap d'uns mesos, arriben al vostre laboratori mostres de teixit provinents dels primers pacients sotmesos a teràpia gènica. Ara, la vostra feina consisteix en identificar les mostres i comprovar si el gen d'interès ha estat modificat amb èxit o si, per contra, hem provocat mutacions no desitjades. Comencem amb l'extracció d'ADN de les mostres. Teniu tots els reactius i material necessaris per dur a terme la vostra tasca. L'apartat "ajuda" us facilitarà el disseny del vostre protocol. Anem per feina!

MOSTRA I MATERIAL



Mostra



Pipetes i puntes



Tubs 1,5 ml



Temporitzador

REACTIUS I DISSOLVENTS



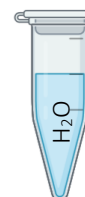
Solució de lisis amb
sals i detergents



Etanol fred (-20°C)



Solució d'acetat de
sodi (NaAc)



H₂O

Ajuda: Heu de tenir en compte que una mostra d'ADN en solució aquosa precipita si agreguem cations i alcohol. Primer, els cations neutralitzen les carregues negatives de l'ADN. Després, l'alcohol provoca una disminució en la solubilitat de l'ADN que, en presència d'altres concentracions de sals, precipita.

Ordre	Pas del protocol	Justificació

Protocol experimental

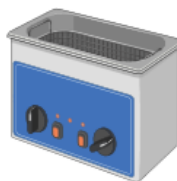
1. Afegir 1ml de "Solució de lisis" al pellet de cèl·lules i resuspendre amb la pipeta.
2. Incubar 10 min a temperatura ambient
3. Afegir a la mostra una dècima part del seu volum ($V/10$) de solució d'acetat de sodi (NaAc) i agitar per inversió.

Càlculs:

4. Precipitació amb etanol fred. Afegir 3 vegades el volum inicial ($V_i \cdot 3$) d'etanol fred. Barrejar lentament per inversió.

Càlculs:

5. Pescar l'ADN i resuspendre amb la pipeta en 1 ml d'H₂O.
6. Degut a que la molècula d'ADN obtinguda és molt llarga, és necessari incubar a 55°C durant 10 min per a una completa resuspensió en l'H₂O (ja que la temperatura augmenta la solubilitat). Utilitza el següent material:

Extracció
d'ADN

Bany d'aigua



Flotador

Preguntes i conclusions

- Al final de la pràctica, què has observat? Què és el que ha causat el resultat final?

- Què hauria passar si haguessis portat a terme l'últim pas de la precipitació amb aigua freda en comptes d'etanol?

- Si no haguessis fet el primer pas de lisis, què creus que hauria passat?

- Creus que aquest protocol funcionaria amb un cabell? I amb una cèl·lula vegetal?

- Existeix un protocol d'extracció d'ADN semblant que utilitza aigua amb sal, sabó rentavaixelles i etanol. Relaciona aquests components amb els que has utilitzat en aquesta pràctica.

- En el precipitat final, obtenim només ADN?

2.2. Un cop tenim tot l'ADN extret, el següent pas per tal de comprovar si la teràpia ha funcionat és amplificar el gen d'interès. Aquesta amplificació –és a dir, tenir moltes còpies únicament del gen que ens interessa– es fa mitjançant la tècnica de PCR (Polimerase Chain Reaction). El producte resultant de la PCR, que conté milions d'aquestes còpies, es sotmet a una electroforesi per confirmar que s'ha amplificat el fragment desitjat. Sabrem si la PCR ha sortit bé per la mida molecular del fragment amplificat, és a dir, el seu “pes”. En el nostre cas, com no tenim el material per fer una PCR, realitzarem l'electroforesi amb l'ADN genòmic que hem extret, i d'aquesta forma confirmarem que tot ha anat bé durant l'extracció. Finalment, aquest producte de PCR s'enviarà a seqüenciar. Així doncs, comencem a preparar l'electroforesi!

Mostra, material i reactius



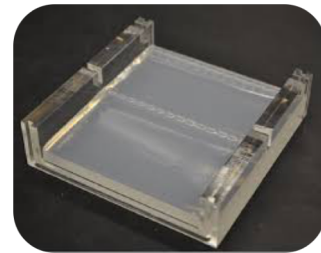
Mostra d'ADN
que hem extret
al pas anterior



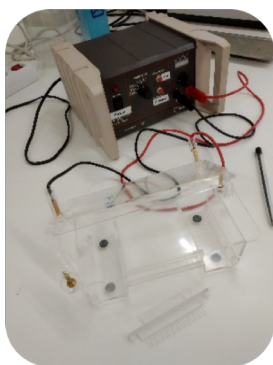
Pipetes i puntes



Tubs 1,5 ml



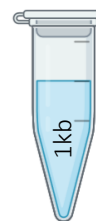
Gel d'agarosa 1% +
colorant fluorescent
SYBR green



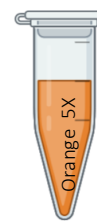
Cubeta i Font
d'electroforesi



Solució tampó
TBE



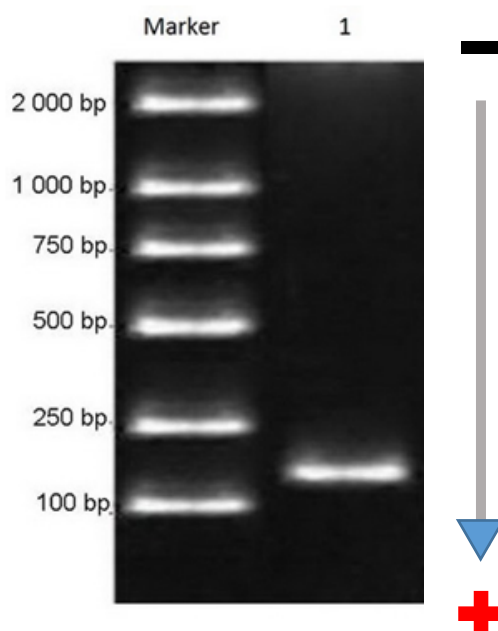
Marcador pes
molecular
1 kilobase (1kb)



Colorant
Organge G

Ajuda: L'electroforesi en gel és una tècnica utilitzada per separar fragments d'ADN (o altres macromolècules, com ARN i proteïnes) pel seu pes molecular i càrrega elèctrica. L'electroforesi consisteix a aplicar un corrent elèctric a través d'un gel que conté les molècules d'interès. Degut a que totes les molècules d'ADN tenen la mateixa quantitat de càrrega per massa (és a dir, dos cadenes d'ADN de la mateixa llargada –però seqüència diferent– tindran sempre la mateixa càrrega), l'electroforesi en gel separa els fragments d'ADN únicament per la seva mida. Per tant, l'electroforesi ens permet veure com de grans són els fragments d'una mostra. A més, si a un dels pous del gel afegim una "escala" estàndard de fragments de mida coneguda (el que s'anomena un marcador de pes molecular), podem determinar la mida absoluta dels fragments d'ADN de la nostra mostra.

A continuació, us mostrem un exemple de revelat d'un gel d'electroforesi d'una mostra d'ADN amplificada utilitzant PCR. A la columna de l'esquerra, és a dir, al primer pou, veiem com ha corregut el marcador de pes molecular ("Marker"). Els números indiquen la mida de cadascun dels fragments del marcador (2000 parells de bases, 1000 parells de bases, ...). Fixeu-vos que els fragments més pesants han "viatjat" menys. A la columna de la dreta podem veure com ha corregut la mostra... sabríeu dir, aproximadament, com de llarg és el fragment amplificat?



Protocol experimental

1. Afegir a un tub de 1.5 ml:

- X quantitat de mostra (extracció d'ADN)
- X quantitat de colorant *Orange G* 5x (tenir en compte que la concentració final ha de ser 1x)

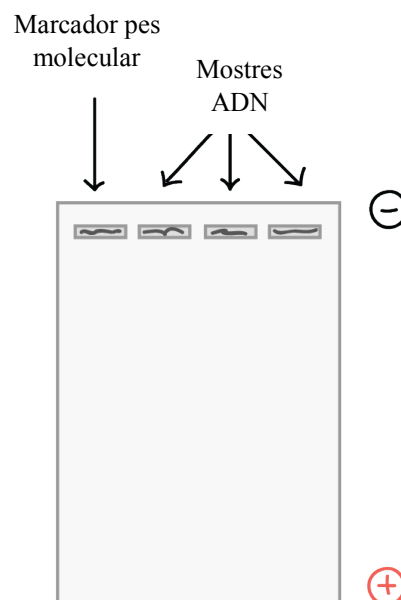
Per tenir un volum final de 30 μ l.

Càlculs:

2. Preparació de la cubeta d'electroforesi: muntatge del gel d'agarosa i incorporació de la solució tampó TBE (es realitzarà en comú amb el grup classe).

3. Carregar al primer carril del gel 3 μ l del marcador de pes molecular d'1 kb (aquest pas només el portarà a terme un dels grups).

4. Carregar al gel 20 μ l de la dissolució anterior (mostra + *Orange G*) al carril del gel que correspongui a cada grup.



5. Programar la font d'electroforesi a 100 volts durant 20 minuts.

6. Visualització del gel d'electroforesi mitjançant una làmpada de llum ultraviolada (UV).

Una vegada els fragments d'ADN s'han separat, podem examinar el gel i, agafant com a referència el marcador de pes molecular, saber el pes de les mostres que hem carregat. En el nostre cas, el gel d'agarosa està preparat amb un compost fluorescent anomenat *SYBR Green* que s'associa a les molècules d'ADN. Així, podem visualitzar les bandes d'ADN amb una làmpada de llum ultraviolada. En el nostre cas, com no disposem d'una làmpada de llum UV, el docent s'endurà el gel per tal de visualitzar-ho al laboratori i fer una fotografia dels resultats que portarà a la següent sessió. Un cop comprovat l'èxit de l'extracció d'ADN, és hora d'enviar a seqüenciar les mostres!

3.1. Per fi han arribat els resultats de la seqüenciació de les extraccions d'ADN genòmic que va enviar l'altre dia. Els arxius que us han arribat estan en format FASTA. Aquest format s'utilitza per representar seqüències de nucleòtids i d'aminoàcids; veureu que el símbol ">" s'utilitza per indicar el nom del gen o proteïna. Cada grup rebreu tres seqüències, corresponents a:

1. La seqüència completa de la proteïna *wild-type*, és a dir, la que trobem més distribuïda a la població.
2. El resultat de la seqüenciació del gen d'interès abans de la teràpia CRISPR.
3. Aquesta mateixa seqüència però després de la teràpia.

El vostre jefe us ha passat una plantilla amb tres preguntes, cridant-vos des del despatx "Vull els resultats per ahir!". Haureu de treballar amb les seqüències (alinejar les seqüències de nucleòtids, traduir-les a proteïna, interpretar els resultats...) per tal de contestar-les. Us aniria molt bé utilitzar dos recursos web molt senzills que utilitzen rutinàriament els biòlegs moleculars. Un és el software d'alineament de seqüències (podeu alinear tant nucleòtids com proteïnes, per veure si dues seqüències son idèntiques) que trobareu a la pàgina web de [MUSCLE](#), i l'altre el de traducció de nucleòtids a proteïnes que trobareu a [ExpASy](#) (amb aquesta eina podeu traduir a proteïna la pauta de lectura d'una seqüència de nucleòtids). Les tres preguntes que heu de contestar són les següents:

- Hi ha hagut alguna modificació de la seqüència de nucleòtids del gen després de la teràpia? En cas de que hi hagi hagut una modificació, ha aconseguit produir la proteïna desitjada, és a dir, la *wild-type*?
- Per tant, ha funcionat la tècnica de CRISPR? Justifica la resposta, especificant, en cas que no hagi funcionat, què ha passat i quin hauria d'haver estat el resultat esperat.

3.2. Un cop acabats els anàlisis, entregueu els resultats al director, una mica preocupats per les conseqüències legals i les repercussions ètiques que se'n puguin derivar. L'endemà, el vostre jefe sembla estar "desaparegut en combat", i no es parla de res més a l'oficina... La bomba no triga gaire a explotar. Passada una setmana, algú de l'empresa filtra a la premsa el fracàs de la majoria de les intervencions. Quin enrenou! Un company us comenta que això es veia a venir i, quan el mireu desconcertat, us passa una notícia recent.

- Llegiu la notícia, reflexioneu, i feu un petit debat al voltant de les seves implicacions ètiques.