

Sessió 1

**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 vau 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?

La tècnica d'edició genètica CRISPR/Cas9 aprofita les proteïnes que participen al sistema immunitari que utilitzen certs bacteris per protegir-se contra els virus. Es tracta d'una immunitat adquirida, o adaptativa, que integra i «recorda» les seqüències d'ADN dels virus d'infeccions anteriors i talla el seu ADN en cas d'una reinfecció.

És precisament aquesta combinació de reconeixement i tall la que utilitza la tècnica CRISPR/CAS9. En la variant més simple, s'injecta ARN en la cèl·lula que codifica una proteïna anomenada CAS9 i una seqüència de reconeixement. La maquinària de la cèl·lula tradueix l'ARN per sintetitzar la proteïna CAS9, la qual es posa a treballar juntament amb l'ARN de reconeixement afegit: CAS9 talla l'ADN de doble cadena exactament on el fragment d'ARN de reconeixement associat li indica que ho faci. Atès que és possible sintetitzar artificialment qualsevol seqüència d'ARN, tal estratègia permet tallar teòricament qualsevol genoma en qualsevol lloc.

2. Quins avantatges i inconvenients té aquesta tècnica?

Avantatges: És una eina econòmica i fàcil de manipular que s'ha utilitzat amb èxit en moltes espècies (ratolí, rata, peix zebra, primats, plantes ...), obrint la possibilitat d'editar el genoma de pràcticament qualsevol espècie. Un altre dels avantatges del sistema, és que permet editar diverses regions del genoma al mateix temps, simplement utilitzant diversos ARN de reconeixement que adrecin a la CAS9 nucleasa a diferents llocs del genoma.

Inconvenients: Tot i que és una eina molt precisa, també pot produir mutacions no desitjades, és a dir, a llocs del genoma diferents dels que es correspondrien amb l'ARN

de reconeixement. Això passa quan aquest ARN s'uneix inespecíficament a un lloc del genoma i l'enzim de tall CAS9 actua. Aquests errors són extraordinàriament difícils d'identificar a posteriori.

3. Aquesta tècnica s'ha portat a terme en humans?

- Al 2018 es va iniciar el primer assaig clínic in vivo d'un fàrmac anomenat EDIT-101, dissenyat per curar l'amaurosi congènita de Leber tipus 10, un tipus de ceguesa hereditària. Els pacients reben una injecció amb la seqüència "corregida" del gen que causa aquesta malaltia, i CRISPR s'encarrega de reemplaçar el gen directament en l'organisme. Per més informació, veure <https://www.nature.com/articles/d41587-018-00003-2>.
- Investigadors de la Universitat de Pennsilvània van iniciar les proves d'un tractament amb l'objectiu de modificar les limfòcits T, un tipus de cèl·lula clau en el sistema immunològic humà. Als pacients se'ls extreuen limfòcits T i, al laboratori, es modifiquen perquè puguin identificar cèl·lules cancerígenes (p.ex. de sarcoma o de mieloma múltiple) i atacar-les. Després, es retomen les cèl·lules T als pacients i s'espera a que actuïn. Funciona com una immunoteràpia –el tractament per al càncer que estimula les defenses naturals de el cos–, però amb el suport de CRISPR.

4. Quins dilemes ètics es poden derivar de l'ús d'aquesta tecnologia?

- La tècnica té el potencial de modificar embrions humans per a que no pateixin certes malalties hereditàries. Però, com definim els límits del concepte defecte genètic? Això podria derivar en el que coneixem per "nens a la carta".
- S'ha de tenir en compte l'equilibri entre els beneficis esperats i els riscos que assolim al recórrer a la tècnica, com la mutació no desitjada d'altres llocs del genoma.
- Els ecosistemes es poden veure amenaçats per l'alliberament no controlat d'éssers vius modificats genèticament, com mosquits o plantes. Tampoc està del tot clar quin és el risc de que el material genètic modificat salti a altres espècies.
- D'altra banda, és complicat trobar el balanç entre una cautela justificada i el bé que es pot fer amb l'ajuda de la tecnologia CRISPR/CAS9. Hi ha molta gent disposada a assumir els riscos d'una tècnica no del tot controlada, si això els obre la possibilitat de curar-se...

Sessió 2

Protocol experimental – Extracció d'ADN

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:

Si tenim 1 ml de volum inicial, $1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l}$ $1000 \mu\text{l}/10 = 100 \mu\text{l}$ que s'han d'afegir de NaAc

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

Càlculs:

Si tenim 1,1 ml de volum inicial, $1,1 \text{ ml} = 1100 \mu\text{l}$ $1100 \mu\text{l} \times 3 = 3300 \mu\text{l}$ que s'han d'afegir de EtOH fred

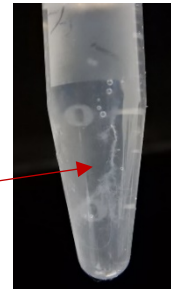
5. Pescar l'ADN i resuspendre amb la pipeta en 1 ml d'H₂O.
6. Degut a que la molècula d'ADN obtinguda és molt llarga, és necessari incubar a 55°C durant 10 min per a una completa resuspensió en l'H₂O (ja que la temperatura augmenta la solubilitat). Utilitza el següent material:

Preguntes i conclusions

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

S'ha format un precipitat (com una medusa blanca) de molècules d'ADN.

Això ha passat perquè una mostra d'ADN en solució aquosa precipita si agreguem cations (solució acetat de sodi) i alcohol (etanol fred). 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.



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

Que l'ADN no hauria precipitat ja que no hauríem aconseguit disminuir-ne la solubilitat.

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

La lisis és important per trencar les membranes cel·lulars i extreure l'ADN del nucli. Sense el primer pas de lisis, no aconseguiríem extreure ni precipitar l'ADN.

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

Si el cabell l'hem tallat, no conté ADN. Per poder extreure ADN el cabell ha de tenir el fol·licle pilós adjunt, o l'arrel. Tot i així, és necessària un protocol més sensible que el que hem dut a terme nosaltres. El nostre protocol, en canvi, sí que funcionaria per extreure l'ADN de cèl·lules vegetals com per exemple les d'una maduixa, o les d'un plàtan.

- 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.

Altes concentracions de sal comuna (NaCl) generen un mitjà hipertònic que provoca l'esclat de cèl·lules i nuclis, alliberant les fibres de cromatina. El detergent o sabó també ajuda a trencar les membranes cel·lulars i formar un complex amb les proteïnes que empaqueten el material genètic, separant-les de l'ADN. Aquests dos components farien la mateixa funció que el tampó de lisis i la solució de NaAc.

- En el precipitat final, obtenim només ADN?

No, el producte filamentós que obtenim de l'extracció no és ADN pur ja que també hi trobem fragments d'ARN.

Protocol experimental – Electroforesi

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 µl.

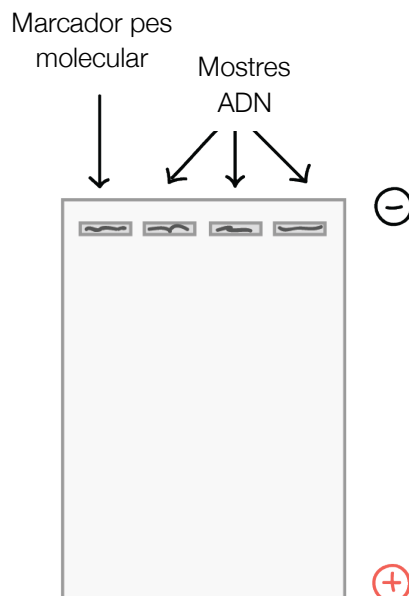
Càlculs: Els següents càlculs són per saber què hem d'afegir a cada tub de 1,5 ml.

$$30 \mu\text{l} \times \frac{\text{OrangeG } 1\text{X}}{\text{OrangeG } 5\text{X}} = 6 \mu\text{l Orange G } 5\text{X} + 24 \mu\text{l de mostra (extracció ADN obtinguda)}$$

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 µl del marcador de pes molecular d'1 kb (aquest pas només el portarà a terme un dels grups).

4. Carregar al gel 20 µl 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).

Sessió 3

Per les solucions a les preguntes d'aquesta sessió, veure els comentaris corresponents a cada cas que trobareu als annexos del guió.