
Ús del sistema CRISPR pel tractament de la fibrosi quística



[Font](#)

Fitxa estudiant

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

1. Cas clínic. La Fibrosi Quística i la teràpia gènica amb CRISPR?

Imagina que ets un/una conseller/a genètic/a de l'Hospital del Mar de Barcelona, fa unes setmanes que has començat aquesta nova feina. Entre les teves tasques diàries hi ha la revisió dels resultats de mostres de cribratge neonatal, també coneguda com la prova del taló. Entre els resultats dels diferents nadons que revises avui, trobes un nadó, de sexe masculí, positiu en una de les 24 malalties de les que es fa cribratge amb aquesta prova, la fibrosi quística. Com que el noutat pot ser portador però no patir la malaltia, decideixes demanar una segona mostra del pacient per perfilar el diagnòstic. Amb la segona mostra, es seqüencia el gen associat a la fibrosi quística, el *CFTR* (Conductància Transmembrana de la Fibrosi Quística), per veure si, efectivament, està mutat i el nadó pateix la malaltia o simplement n'és portador. La seqüenciació posa en evidència que el nadó presenta una deleció d'un segment de 601 parells de bases en l'exó 13 del gen *CFTR*. Creus que podries fer servir el sistema CRISPR com a teràpia gènica per aquest pacient?

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:

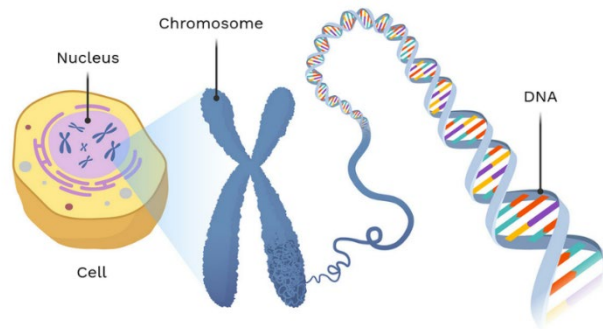
- a) Familiaritzar-se amb el cribratge neonatal.
- b) Entendre com funciona l'ADN, les mutacions i les malalties congènites.
- c) Aprendre el funcionament de l'edició gènica per CRISPR-Cas9.
- d) Aprendre a realitzar una electroforesi d'àcids nucleics en gel d'agarosa.
- e) Analitzar els resultats i extreure'n conclusions científiques.



3. Les malalties congènites i el cribratge neonatal

L'ADN i les mutacions¹

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. Quan el nostre cos no és capaç de corregir o eliminar aquestes mutacions, poden originar un mal funcionament de la cèl·lula.

Les mutacions de l'ADN poden ser de tres tipus diferents:

Mutacions gèniques Alteració de la seqüència de nucleòtids d'un gen	Pèrdua de funció El gen deixa d'expressar-se	
	Guany de funció El gen se sobreexpressa	
Mutacions cromosòmiques (o estructurals) Alteren un fragment concret del cromosoma	Delecions S'elimina una part del cromosoma	
	Duplicacions Es repeteix una part del cromosoma	
	Inversions Es canvi el sentit d'un fragment en el cromosoma	
	Translocacions Canvi de posició d'un segment del cromosoma. Pot tenir lloc en un mateix cromosoma (translocació) o entre dos cromosomes no homòlegs (translocació recíproca).	
Mutacions genòmiques (o numèriques) Alteren el nombre total de cromosomes. Els humans tenim dues còpies de cada cromosoma ($2n = 46$), però la dotació haploide és $n=23$.	Aneuploïdia Alteració en el nombre normal de cromosomes.	Nul·lisomies Monosomies Tisomies Tetrasomies
	Euploïdia Alteració en el nombre normal de dotacions haploides (jocs de cromosomes).	Monoploïdia Individus amb una única dotació cromosòmica ($n = 23$)
		Poliploïdia Individus amb més de dos jocs complets de cromosomes ($3n = 69$)

La prova del taló²

El cribratge neonatal o prova del taló és una eina per detectar, diagnosticar i tractar precoçment alguns trastorns genètics i/o endocrins molt poc freqüents que poden estar presents al naixement, encara que el nadó no en presenti símptomes. La prova del taló es fa, idòniament, 48 hores després del naixement del nadó i consisteix en una punxada superficial al taló per extreure'n unes gotes de sang que s'impregnen en un paper absorbent.

El cribratge pot detectar fins a 24 malalties en les quals una actuació ràpida canviarà el pronòstic, però també infants portadors sans de la malaltia, que tenen alguna alteració genètica relacionada i no la desenvoluparan. El cribratge es fa per la **fibrosi quística**, l'hipertiroïdisme congènit, la fenilcetonúria i cinc altres trastorns del metabolisme dels aminoàcids, vuit trastorns del metabolisme dels àcids orgànics, sis trastorns del metabolisme dels àcids grassos, la malaltia de cèl·lules falciformes i la immunodeficiència combinada greu. Actualment, només tenen cura algunes d'aquestes malalties, en la resta un tractament precoç evita o redueix els símptomes i lesions.

La majoria de vegades el resultat de la prova és normal, però en cas que no ho sigui es sol sol·licitar una segona mostra per completar el procés de detecció i aconseguir un diagnòstic

precís. És a dir, determinar si el nadó n'és només portador o si te la malaltia i, en cas de presentarla, quina és la mutació que porta associada.

La fibrosi quística

La **fibrosi quística (FQ)** és una malaltia rara, crònica, hereditària i degenerativa que afecta, principalment, els pulmons i el sistema digestiu. És més freqüent en poblacions d'origen Europeu (o caucàsic). A Espanya, trobem un cas per cada 5.000 naixements, però un de cada 35 habitants son portadors sans de la malaltia.^{2,3} A l'estat hi ha 2.500 persones afectades amb FQ, 53% homes i 47% dones.

Els individus afectats presenten un **espessiment i disminució del contingut d'aigua, sodi i clor en les secrecions i mucositats de l'aparell respiratori, digestiu i reproductor**. Això fa que els sigui molt més fàcil l'acumulació de bacteries i petits organismes que entren en els pulmons, i que provoquin infeccions i inflamació que poden arribar a destruir regions d'aquests òrgans.

La FQ és una malaltia genètica **autosòmica recessiva**. El responsable d'aquesta malaltia és la mutació del gen regulador de la conductància transmembrana de la fibrosi quística (**CFTR**), localitzat en el cromosoma 7. El gen *CFTR* codifica una proteïna que forma part dels canals de clor de les cèl·lules epitelials. Degut a la mutació, els ions de clor no poden sortir de la cèl·lula. Això afecta l'equilibri hidroelèctric a l'exterior i interior de la cèl·lula i provoca la presència i acumulació d'un moc espès que pot obstruir, entre d'altres, les vies respiratòries. Al mateix temps també pot afectar la producció de suor (pell salada) i dels fluids digestius (pes baix i problemes digestius), així com problemes de creixement, fertilitat i reducció de l'esperança de vida.

La mitjana de supervivència actual de les persones afectades de FQ és de 47,4 anys³, aquest ha augmentat significativament gràcies al cribratge neonatal i als avenços clínics. Malgrat actualment no existeix una cura per a la fibrosi quística, el tractament pot alleujar els símptomes, reduir les complicacions i millorar la qualitat de vida dels pacients. Entre ells, existeix la teràpia gènica per a corregir la mutació que causa la malaltia, així com altres medicaments per a tractar la simptomatologia de la malaltia així com la inflamació i les infeccions subjacents..

Teràpia gènica: CRISPR-Cas9¹

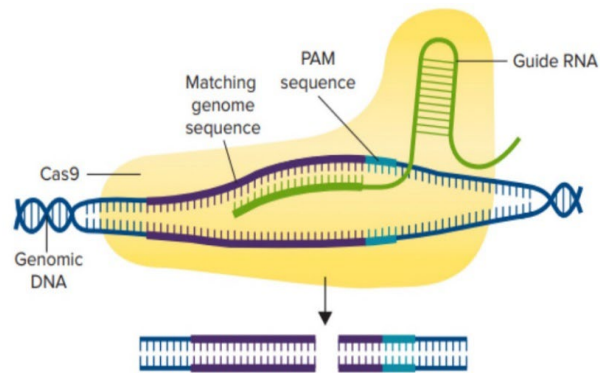
L'any 2012, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier van publicar a la revista *Science* un article demostrant com el sistema CRISPR-Cas9 podia utilitzar-se com una tècnica d'enginyeria genètica per modificar l'ADN. És a dir, amb aquest mètode es poden modificar els gens de qualsevol animal, fins i tot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

Què és el sistema CRISPR-Cas? La paraula CRISPR prové de «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats», que representen seqüències curtes palindròmiques i ben

organitzades que es van identificar en les bactèries, i contenen fragments de virus que han infectat a les bactèries prèviament, i que s'emmagatzemen en els fragments d'ADN espaiador. Alhora, disposen de gens que codifiquen per a enzims nucleases, anomenades Cas, que actuen com unes «tissors» encarregades de destruir material genètic forà. Així doncs, les bactèries usen el CRISPR/Cas com a sistema immunitari adaptatiu contra agents externs virals. Davant un nou atac víric similar, al preservar seqüències víriques d'atacs anteriors, poden identificar l'ADN del virus i un cop format el complex CRISPR/Cas, gràcies a l'acció de les Cas, destruir-lo ràpidament per evitar la seva infecció.

Com funciona la tècnica de modificació genètica CRISPR/Cas? Doudna i Charpentier van aconseguir utilitzar adaptat aquest mètode per al seu ús al laboratori, per poder detectar específicament i modificar qualsevol gen de qualsevol organisme. Per fer-ho, necessitem:

1. Un **ARN guia**: aquesta molècula conté una seqüència nucleotídica d'ARN complementària al gen que vulguem editar. D'aquesta manera, l'ARN es pot unir a l'ADN.
2. La **proteïna Cas9**: és una endonucleasa encarregada de tallar l'ADN, un cop l'ARN guia recluti la proteïna cap al lloc indicat.
3. La **seqüència PAM**: l'ARN guia necessita reconèixer la seqüència PAM, una seqüència de 3 nucleòtids concrets (NGG) en l'ADN, que es localitzi just al final de la seqüència complementària, i doncs la Cas9 efectuarà un tall de doble cadena. Sense la seqüència PAM, l'ARN guia no es podrà unir a l'ADN, i el tall no tindrà lloc.



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

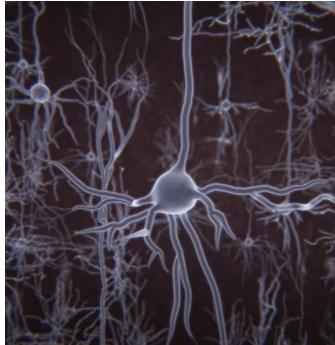
Aquest tall de doble cadena de l'ADN pot tenir diferents efectes, però en general, s'utilitza per:

- Silenciar un gen, i evitar que s'expressi.
- Modificar la seqüència gènica: Gràcies als mecanismes de reparació de l'ADN, després de fer un tall, poden inserir una altra seqüència d'ADN i expressar un nou gen.

De totes maneres, l'ARN guia pot unir-se a altres regions de l'ADN que no són la que havíem escollit. Això s'anomena "off-target effects", i poden tenir conseqüències desastroses per l'organisme. Per tant, encara no és un sistema del tot segur.

CRISPR/Cas s'ha convertit en una eina d'enginyeria genètica es pot programar per a que faci talls específics en la regió genòmica d'interès per a tractar malalties, generar models i estudiar dianes de nous fàrmacs. 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

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.

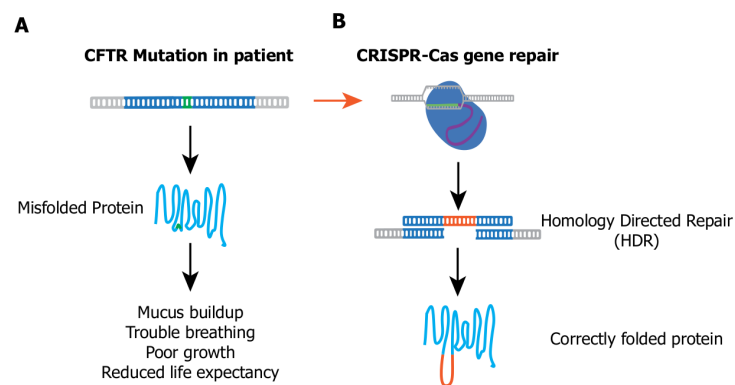


4. Disseny de l'experiment

El contingut d'aquest taller experimental s'ha creat en base al material proporcionat en el [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\)](#), from EDVOTEK

Amb el diagnòstic específic per al nostre pacient, els facultatius es plantegen dur a terme teràpia gènica amb CRISPR-Cas9 en aquest pacient amb l'objectiu de corregir la mutació que li està causant la malaltia. Però, abans de poder actuar a nivell de pacient, cal realitzar molts experiments per veure si és factible i assegurar que no causa cap efecte secundari.

En aquest experiment, ajudareu al personal de l'hospital a dur a terme les validacions necessàries per a avaluar la viabilitat de la teràpia. Concretament, es dissenyaran diferents ARN guia (gRNA) per dirigir la teràpia a la regió del gen *CFTR* on el pacient presenta la deleció, i s'avaluarà la especificitat de cadascun d'ells per tal de trobar el millor gRNA candidat.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\)](#), from EDVOTEK

Per fer-ho, hem de seguir aquests passos:

1. **Dissenyar els ARN guia.** Un dels elements més importants de la teràpia gènica amb CRISPR-Cas9 són els ARN guia. Sense aquests, no podríem dirigir la nostra teràpia al gen d'interès, que en aquest cas és el gen *CFTR* (exó 13), a una regió concreta de 4300 parells de bases (pb), on el pacient presenta la deleció de 601 pb.
2. **Dur a terme els experiments de CRISPR-Cas9.** La teràpia gènica amb CRISPR-Cas9 es farà en un laboratori extern amb cèl·lules del pacient que estan en cultiu, i aquestes seran enviades de nou al nostre laboratori.
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 grans quantitats. Això també es farà en un laboratori extern, i ens portaran l'ADN a nosaltres perquè analitzem els resultats.
4. **Preparar un gel d'electroforesi d'agarosa, córrer-lor i tenyir-lo.** L'ADN no es pot veure a simple vista. Per això, hem de preparar un gel d'agarosa, que és una matriu porosa on les mostres d'ADN poden avançar mogudes pel corrent elèctric i separar-se en funció de la seva mida. Així, les molècules més petites es mouran més ràpid i arribaran més avall del gel, mentre que les més grans quedaran més amunt. Això ens permetrà deduir en quines d'elles hem pogut tallar el gen de manera eficient basant-nos en la velocitat de migració i mida dels fragments.

Quins resultats esperes obtenir i per què?

Seguretat al laboratori

1. Cal portar guants i ulleres de protecció.
2. Treballar amb molta precaució amb els equips que impliquen l'ús conjunt de temperatura elevada i/o fusió de reactius.
3. Vigila al utilitzar qualsevol equip elèctric del laboratori.
4. Cal rentar-se sempre les mans amb sabó i aigua després de manipular reactius o materials biològics al laboratori.

És important documentar tot el que succeeix durant un experiment, incloent les condicions experimentals, els pensaments i les observacions, així com les dades recopilades i els resultats obtinguts.

- Abans de començar l'experiment: llegeix amb cura la introducció i el protocol. Utilitza aquesta informació per formar una hipòtesi per a aquest experiment.
- Durant l'experiment: enregistra les teves observacions i resultats.
- Després de l'experiment: interpreta els resultats i extreu-ne les conclusions.

Mòdul I: Disseny el gRNA per dirigir-se al gen CFTR

En aquest mòdul, dissenyareu l'ARN guia (gRNA) utilitzant les dades de seqüenciació d'ADN d'un pacient que presenta una deleció al seu gen *CFTR*. Aquesta mutació elimina un segment de 601 pb de l'exó 13, inactivant completament la proteïna CFTR.

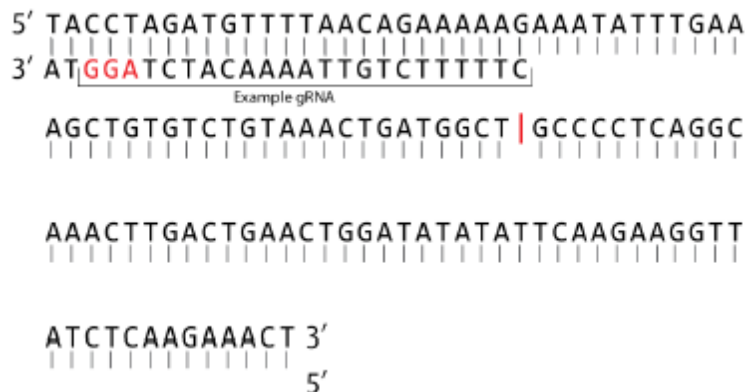
Per dissenyar el gRNA, cal identificar primer els llocs PAM en la seqüència diana. Per a aquest experiment, suposa que s'utilitza un enzim Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que fa servir un lloc PAM "NGG". En aquesta notació, la "N" pot ser qualsevol nucleòtid. Això significa que la proteïna Cas9 només es podrà unir a seqüències immediatament up-stream (en la direcció 5') d'una seqüència AGG, TGG, CGG o GGG. Com que la Cas9 pot unir-se a qualsevol de les dues cadenes d'ADN complementàries, és necessari examinar ambdues cadenes per a possibles seqüències PAM.

En el gRNA guia d'exemple, la seqüència PAM és "AGG", situada a la cadena antisentit. Per tant, la seqüència diana és la de 20 nt en la direcció 5' del lloc PAM.

1. Fixa't en els nucleòtids complementaris a la seqüència del gen *CFTR*. Algunes parts de la seqüència complementària ja s'han omplert (etiquetades com "Exemple de gRNA").

Nota: el caràcter vermell "I" indica el lloc de deleció del nostre pacient, però la seqüència d'ADN que presenta és una cadena contínua.

2. Identifica en la seqüència d'ADN 5 llocs PAM per a la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, i encercla'ls.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

3. Finalment, identifica els 20 nucleòtids *up-stream* (en la direcció 5') de cada lloc PAM. Aquesta és la seqüència diana, que caldrà escriure a la taula següent:

Nom del gRNA	Seqüència diana (5' → 3')	Seqüència PAM
Exemple	CTTTTTGTAAACATCT	AGG
gRNA#1		
gRNA#2		
gRNA#3		
gRNA#4		
gRNA#5		

Mòdul II: electroforesi en gel d'agarosa

En aquest mòdul, fareu servir l'electroforesi en gel per analitzar l'eficàcia de 5 gRNA diferents que s'han dissenyat. Es va obtenir l'ADN del pacient i se'n va amplificar un segment de **4.300 pb** mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A continuació, l'ADN amplificat es barreja amb la proteïna Cas9 i una de les 5 solucions de gRNA. Si el gRNA pot dirigir-se amb èxit al gen *CFTR*, serà tallat per l'enzim Cas9, i mitjançant l'electroforesi en gel, s'haurien de poder veure dues bandes diferents (si no talla, en canvi, només en veurem una).

Preparació del gel d'agarosa

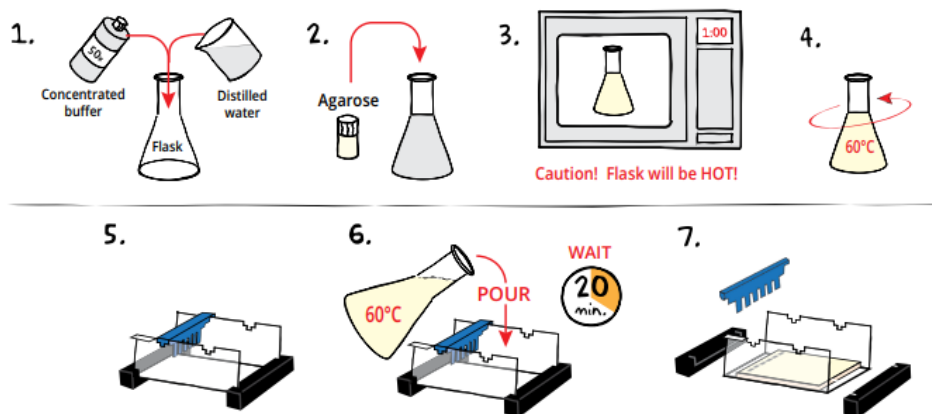
1. DILUEIX el **tampó d'electroforesi** concentrat 50X amb aigua destil·lada (volem aconseguir una concentració final 1X).

Volum Total (ml)	Tampó concentrat 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)
150 ml		

2. Per obtenir **gel d'agarosa al 0.8%** (0,8 g/100ml), MESCLA la pols d'agarosa amb la solució de tampó d'electroforesi en un matràs d'Erlenmeyer de 250 ml.

Tampó d'electroforesi 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)	Massa d'agarosa (g)	Volum TOTAL (ml)
			45 ml

3. DISSOL la pols d'agarosa escalfant la solució al microones a potència màxima durant 1 minut. Amb cura, TREU el matràs d'Erlenmeyer del microones i remena. Continua ESCALFANT a solució en intervals de 15 segons fins que l'agarosa estigui completament dissolta (la solució ha de ser clara com l'aigua).
4. REFREDA l'agarosa remenant amb cura per dissipar la calor uniformement.
5. Mentre l'agarosa es refreda, TANCA bé els extrems e la safata per col·locar el gel amb les capses de goma. COL·LOCA la pinta amb 6 pouets al lloc adequat.
6. BUIDA la solució d'agarosa refredada a la safata preparada per col·locar el gel. El gel s'ha d'endurir completament al cap de 20 minuts, i es tornarà menys transparent a mesura que es solidifiqui.
7. Amb molta cura, TREU la pinta dels pouets i els extrems de gel.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Córrer el gel

8. COL·LOCA el gel (encara a la safata) dins de la cambra d'electroforesi. COBREIX el gel amb Tampó d'Electroforesi 1X, assegura't que estigui completament submergit.

Volum Total (ml)	Tampó concentrat 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)
1.000 ml		

Recordatori: Abans de carregar les mostres, assegura't que està ben orientat dins l'aparell.

9. Després de posar una punta a la pipeta, agafa tota la mostra (35 μ L) del QuickStrip™, i CARREGA-LA al pou en l'ordre indicat a continuació:

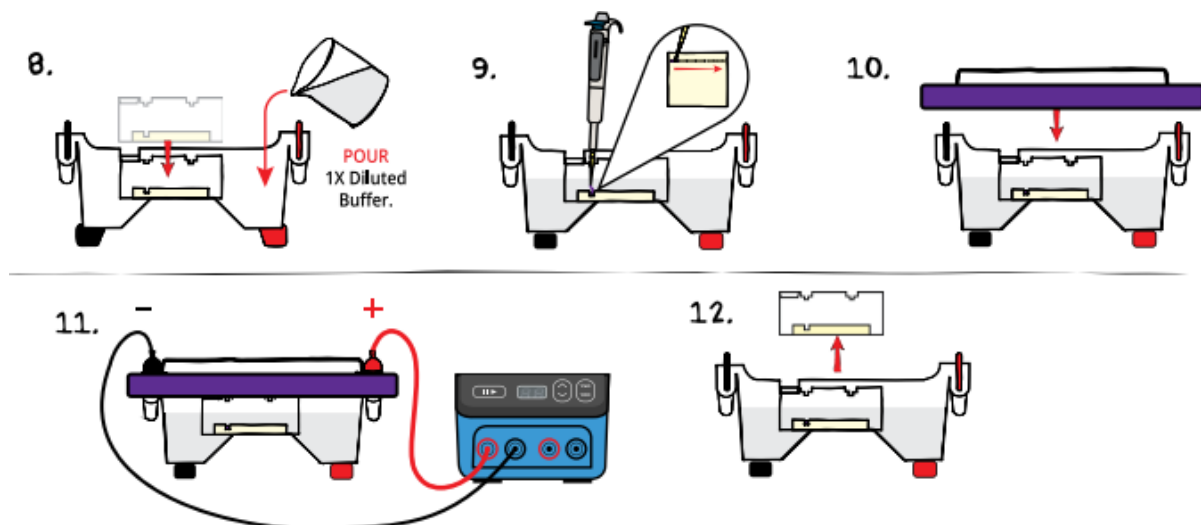
Carril 1	Tub A	Marcador de pes molecular
Carril 2	Tub B	gRNA #1
Carril 3	Tub C	gRNA #2
Carril 4	Tub D	gRNA #3
Carril 5	Tub E	gRNA#4
Carril 6	Tub F	gRNA #5

10. COL·LOCA la coberta de seguretat a la unitat i COMPROVA que el gel estigui orientat correctament.
11. CONNECTA els cables a la font d'alimentació perquè comenci l'electroforesi, i fins que el front (colorant de seguiment) migri almenys 30 cm des dels pous.

VOLTATGE: 150V | TEMPS: ~ 20/30 minuts

RECORDATORI: Les mostres d'ADN migraran cap a l'elèctrode positiu (vermell).

12. Després que l'electroforesi hagi finalitzat, TREU el gel i la safata de col·locació de l'electroforesi de la cambra.



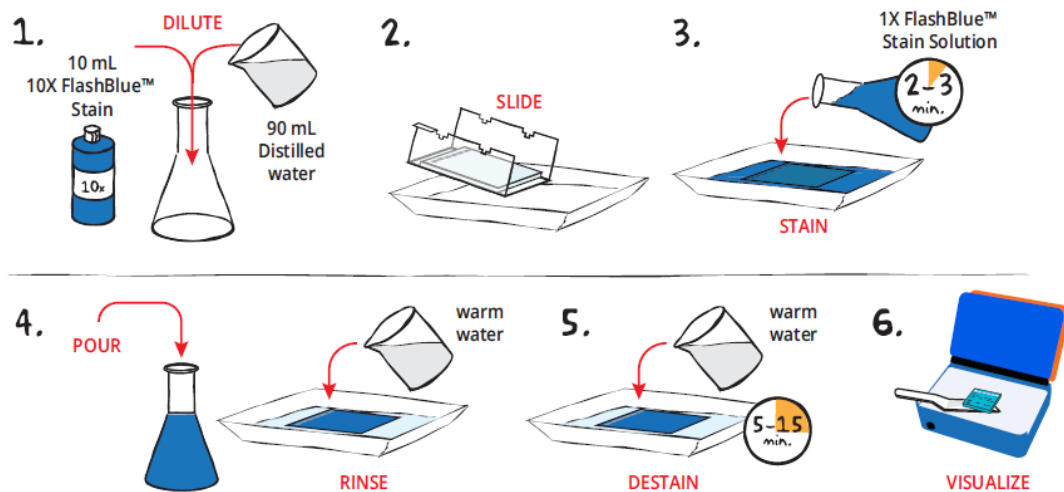
Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Mòdul III: tinció dels gels d'agarosa amb FlashBlue™

1. DILUEIX 10 ml de FlashBlue™ concentrat 10X amb 90 ml d'aigua destil·lada en un matràs d'Erlenmeyer per assolir FlashBlue™ a una concentració final 1X.
2. Treu el gel fora de la safata i col·loca'l en una safata petita i neta per tenyir gels.
3. COBREIX el gel amb la solució de tinció FlashBlue™ 1X, durant 2-3 minuts.
4. COBREIX el gel amb aigua calenta (40-45 °C), RENTA'L suaument durant 20-30 segons. Després, BUIDA l'aigua bruta.
5. COBREIX el gel amb aigua calenta (40-45 °C). DESTENYEIX durant 5-15 minuts amb agitació suau. Les bandes d'ADN començaran a aparèixer després de 5 minuts de destenyir.

NOTA: Canviar l'aigua freqüentment accelerarà el desat.

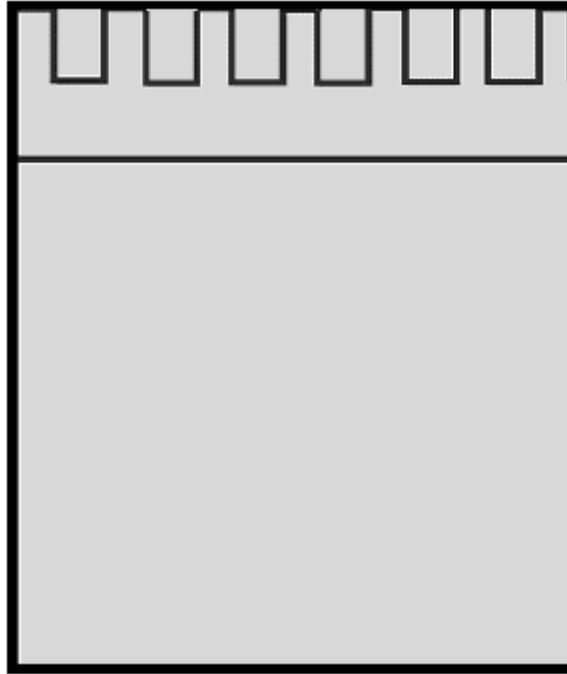
6. TREU amb cura el gel líquid de destenyir. VISUALITZA els resultats utilitzant un sistema amb llum blanca. L'ADN apareixerà com a bandes blaves fosques sobre un fons blau.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

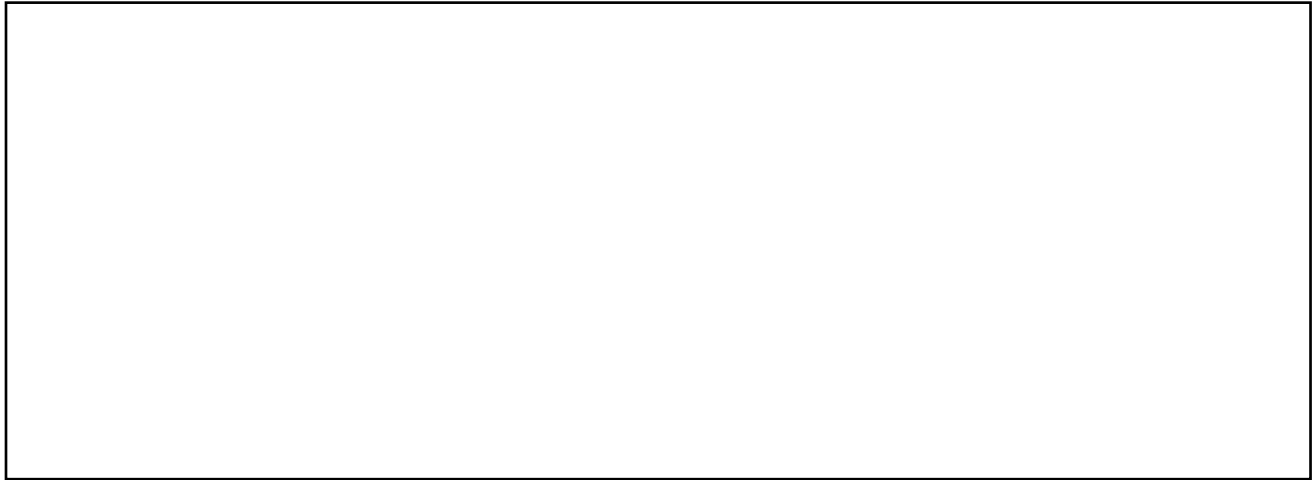
5. Resultats, anàlisi i conclusions

A continuació, completa l'esquema del gel d'electroforesi amb els resultats observats:



Carril	Mostra + gRNA	Resultat	Pes molecular (bp)
1	Marcador de pes molecular	----	----
2	gRNA #1		
3	gRNA #2		
4	gRNA #3		
5	gRNA #4		
6	gRNA #5		

- En funció d'aquests resultats, quins són els millors candidats de gRNA per dirigir-se a la regió del gen *CFTR* del pacient que conté la deleció de 601 pb en l'exó 13?

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the student to write their answer to the first question.

- Quin seria el següent pas a realitzar per part dels metges i/o de les metgesses?

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the student to write their answer to the second question.