

USO DE CRISPR PARA TRATAR LA FIBROSIS QUÍSTICA

Ref.CRIS1

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica del diseño de guías de ARN (gARN) mediante una simulación, así como la electroforesis con geles de agarosa para examinar muestras de ADN.

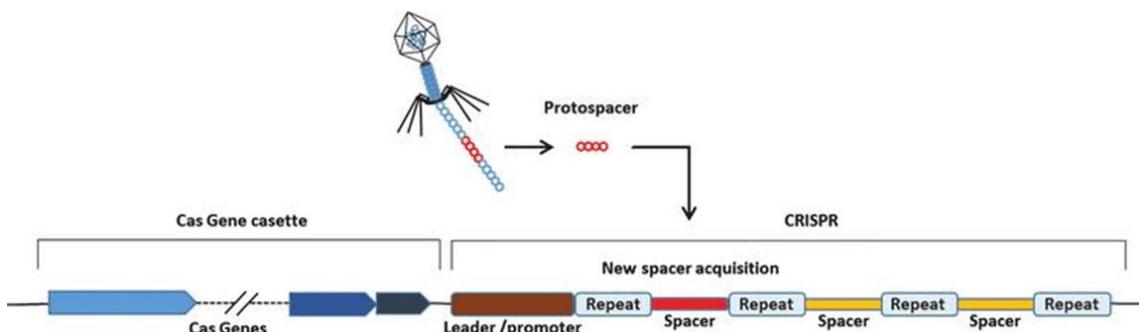
2. INTRODUCCIÓN

2.1 CRISPR

Los CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) son familias de secuencias de ADN en bacterias. Las secuencias contienen fragmentos de ADN de virus que han atacado a las bacterias. Estos fragmentos son utilizados por la bacteria para detectar y destruir el ADN de nuevos ataques de virus similares, y así poder defenderse eficazmente de ellos. Estas secuencias juegan un papel clave en los sistemas de defensa bacterianos, y forman la base de una tecnología conocida como CRISPR/Cas9.

CRISPR son locus de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Tras cada repetición se encuentran segmentos cortos de "ADN espaciador" proveniente de exposiciones previas de otros virus. Estas secuencias se encuentran en aproximadamente el 40% de los genomas bacterianos y en el 90% de los genomas secuenciados de las arqueas. Con frecuencia estos genomas están asociados con los genes Cas, que codifican para enzimas nucleasas relacionadas con los CRISPR. Estos genes Cas normalmente se encuentran seguidamente de las secuencias CRISPR.

El sistema CRISPR/Cas es un sistema inmunitario procariótico que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos. Además, provee una forma de inmunidad adquirida. Los espaciadores de los CRISPR reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas Cas para cortar y degradar esos elementos génicos exógenos de una manera análoga al ARNi en sistemas eucarióticos.



Historia del CRISPR

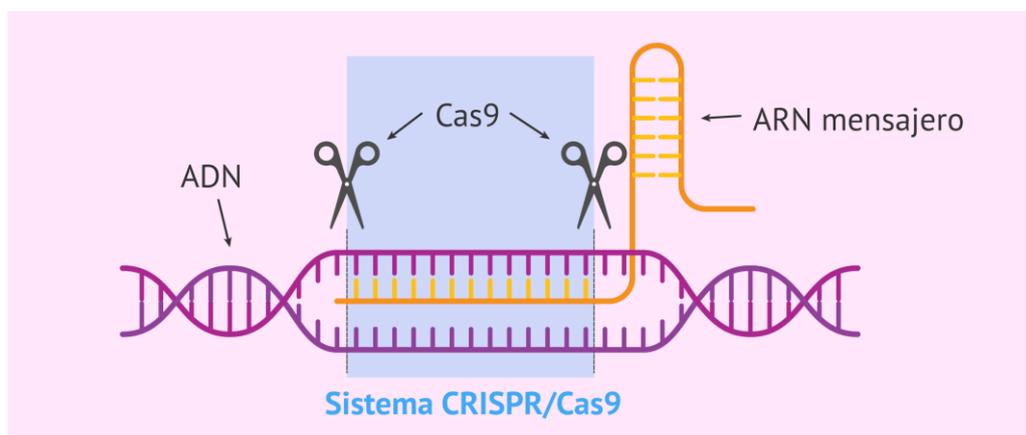
En 1987, Yoshizumi Ishino y sus colaboradores en la Universidad de Osaka, Japón, descubrieron un área dentro del genoma bacteriano que contenía 5 segmentos idénticos con 29 pares de bases. Estos segmentos estaban separados por un bloque de 32 pares de bases de ADN que los llamaron espaciadores. Cada espaciador tiene una configuración única. Estos fragmentos extraños y los espaciadores se conocieron con el nombre repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas o CRISPR. Los científicos también descubrieron al lado de estas secuencias siempre había unas secuencias que codificaban para los genes de la enzima Cas.

En 1990, se pudo secuenciar el ADN bacteriano y con él la secuenciación de CRISPR. Además, se vio que los espaciadores comparten una misma secuencia entre ellos que la llamaron PAM (motivo protoespaciador adyacente). Los PAMs sirven para que las enzimas Cas reconozcan la diana donde realizar el corte. Diferentes enzimas Cas pueden reconocer diferentes secuencias PAM, la más común es la de *Streptococcus pyogenes*, Cas9, la cual reconoce el triplete NGG, siendo N cualquiera de las bases en la secuencia PAM.

CRISPR se ha usado en distintos ámbitos, desde la lucha contra los virus hasta la fermentación láctea. Con todos estos experimentos realizados se observó que CRISPR puede ser programable, es decir, que se puede usar para cortar el ADN en la zona de interés del investigador. Convirtiéndose así en una gran herramienta de la ingeniería genética.

Esta nueva función de CRISPR permitió crear una guía de ARN de CRISPR que corta el ADN de forma específica sin alterar la función celular. Sobretudo, se ha usado para la digestión de genes, es decir, para realizar cortes de ADN y eliminar la región interesada.

¿Cómo funciona CRISPR? Primeramente, CRISPR hace un doble corte en la hebra de ADN. Seguidamente se proporciona a la célula la nueva secuencia correcta, que puede ser incorporada directamente dentro de su genoma, ya que el corte de ADN presenta homología con el segmento a insertar, usando así pues el método de corrección por homología. De esta forma el segmento correcto es incorporado dentro de la maquinaria normal de la célula. Pudiéndose corregir genes mutados, insertar nuevos genes en el organismo o bien eliminar un gen. Es una forma directa de incorporar genes en el lugar donde el investigador quiere.



Todas estas aplicaciones son grandes ventajas para la biología y la ingeniería genética, pero se ha visto en algunos estudios que estas modificaciones pueden hacer que una célula se convierta en cancerígena con el tiempo, es decir, que aumenta el riesgo de padecer cáncer. Por tanto, es necesario seguir estudiando acerca de este método para convertirlo en seguro y poderlo incluir dentro de ensayos clínicos. Hoy en día, son muchos los grupos de investigación que están trabajando con CRISPR para intentar reparar el ADN defectivo en ratones, editando genes y reescribiendo el genoma. Nuevas compañías están intentando aplicar esta tecnología para la creación de nuevos tratamientos contra el cáncer.

2.2 FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística es una enfermedad genética recesiva causada por la mutación en el gen CFTR. El gen CFTR codifica para una proteína que está involucrada en la producción de sudor, fluidos digestivos y moco. Mutaciones en CFTR provocan una malformación de la proteína y una inactividad de ellas. Los pacientes con esta mutación tienen dificultad para respirar ya que el moco es mucho más denso, problemas de fertilidad y una reducción en la esperanza de vida.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

En este experimento se simulará el uso de CRISPR-Cas9 como marcador para el descubrimiento de una mutación genética en pacientes con fibrosis quística. Usareis la técnica de CRISPR para investigar en un nuevo tratamiento para la fibrosis quística. Para ellos diseñareis un ARN guía de la región del gen mutada.

4. COMPONENTES

Muestras preparadas para electroforesis:	Conservar a 4°C
- A: marcador de peso molecular	
- B: gARN 1	
- C: gARN 2	
- D: gARN 3	
- E: gARN 4	
- F: gARN 5	
Agarosa Utraspec	Temperatura ambiente
Tampón de electroforesis 50x	Temperatura ambiente
ADN Flasblue	Temperatura ambiente

5. PRÁCTICA

Se realizarán 5 grupos de trabajo.

5.1 PREPARACIÓN DEL GEL DE ELECTROFORESIS

1. Diluir el tampón de electroforesis 50x con agua destilada según la siguiente tabla:

Gel de agarosa 0,8%				
Tamaño del gel	Tampón de electroforesis 50x	Agua destilada	Agarosa (g)	Volumen total

7 x 7 cm	0,6 ml	29,4 ml	0,23 g	30 ml
7 x 10 cm	1,0 ml	49,0 ml	0,39 g	50 ml
7 x 14 cm	1,2 ml	58,8 ml	0,46 g	60 ml

2. Preparar la cubeta donde se hará el gel de electroforesis, colocando la peineta y los bordes superior e inferior.
3. Mezclar la agarosa con el tampón de electroforesis 1x en un matraz Erlenmeyer de 250 ml
4. Disolver la agarosa hirviendo la solución. Para ello, colocar la solución dentro del microondas durante 1 min, con cuidado extraerlo del microondas y mezclar dando vueltas. Si aun se ven partículas flotando volver a calentarlo un poco más dentro del microondas.
5. Enfriar la solución con agua. Colocar el matraz Erlenmeyer debajo del agua del grifo, intentando que no entre agua por la parte superior, e ir tocando el cristal hasta que no te quemes con la mano.
6. Verter el contenido dentro del recipiente donde se hará el gel y dejarlo enfriar.
Una vez frío remover la peineta y los bordes del gel. Vigilando sobre todo al sacar la peineta de no romper ningún pocillo.
7. Colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis y cubrirlo con tampón de electroforesis 1x.
8. Pipetear cada una de las siguientes muestras en cada uno de los pocillos, intentando colocar toda la cantidad posible. La cantidad que viene en cada uno de ellos es de 35 μ l. **NOTA: no todos los geles los pocillos tienen una capacidad de 35 μ l, hay algunos que con 20 μ l es suficiente.** Cargar las muestras desde el número 1 que es el tubo A, hasta el 6 que es el tubo F.
9. Cubrir la cubeta y colocar los electrodos. Observar que salen burbujitas de los laterales, que nos indican que la corriente está circulando. Correr el gel durante 20-35 min. **NOTA: Vigilar que el frente de muestras que se verá como una línea de color azul no desaparezca por el final del gel.**
10. Cuando la electroforesis ha terminado. Remover el gel del molde y colocarlo en una cubeta para poder realizar la tinción del gel.

5.2 TINCIÓN DE UN GEL DE ELECTROFORESIS

1. Diluir 5ml de Flashblue 10x con 95ml de agua destilada y mezclar bien.
2. Coger el gel que tenemos dentro de una cubeta fuera del molde y cubrirlo con el flashblue 1x e incubar durante 5min.
3. Transferir el gel a otra cubeta y cubrirla con agua. Incubar durante 20 min y si es posible colocarla sobre una superficie en movimiento. Si no ir haciendo mezclados en forma de círculos cada cierto tiempo.
4. Eliminar el agua y visualizar las diferentes bandas que han aparecido teñidas. **NOTA: si al eliminar el agua el gel aun está muy muy azul y las bandas se ven poco, volver a colocar agua hasta cubrir el gel e incubar 10 min más.**

Las cubetas de tinción pueden ser tupper en los que quepa el gel sin estar doblado. Si solamente hay uno por grupo no hay problema, al eliminar el Flashblue se hacen varios lavados con agua hasta que veamos que en el tupper no queda sustancia azul y se deja incubando.

6. RESULTADOS

Observar las distintas bandas que aparecen teñidas en el gel.

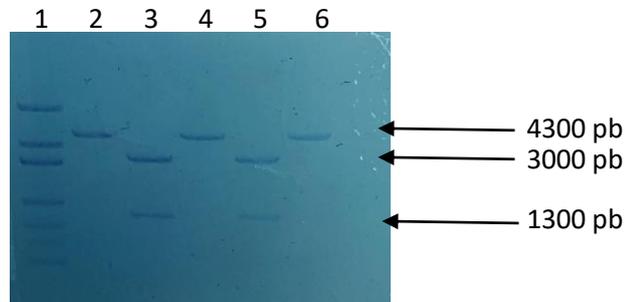


Imagen: gel de agarosa teñido

- 1: Marcador de peso molecular (tubo A)
- 2: Muestra 1 (tubo B)
- 3: Muestra 2 (tubo C)
- 4: Muestra 3 (tubo D)
- 5: Muestra 4 (tubo E)
- 6: Muestra 5 (tubo F)

En la imagen se puede ver el gel de agarosa después de realizar la tinción con el FlashBlue, en el podemos ver que en la muestra 1, 3 y 5 solo aparece una banda con un peso de 4300 pb, mientras que las muestras 2 y 4 presentan dos bandas una de 3000 pb y otra de 1300 pb. Estos resultados nos indican que las ADN guías para la cura del paciente son la 2 y la 4 ya que presentan la delección del gen, ya que se ven dos bandas, indicando que se ha eliminado el gen de interés.

7. EJERCICIOS Y PREGUNTAS SOBRE LA PRÁCTICA

A continuación, se plantea un ejercicio y distintas preguntas sobre la práctica.

EJERCICIO

Se os da una secuencia de ADN del paciente con fibrosis quística con la región mutada eliminada, se trata de complementar la región del gen eliminada y ver en que partes de esta secuencia la enzima Cas9 podría actuar cortando el ADN e incorporando esta secuencia en el genoma del paciente. Recordad que Cas9 actúa cortando sobre el triple NGG, siendo N cualquiera de las bases presentes en el genoma humano (A, G, C y T).

La secuencia es:

5' TACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTTCTGTAAACTGATGGCT

3' ATGGATCTACAAAATTGTCTTTTC

GCCCCAGGCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAAACT 3'

A continuación, escribe las 5 secuencias posibles, contando desde el PAM 20 nucleótidos corriente arriba.

Nombre	Secuencia diana (espaciador)	Secuencia PAM
Ejemplo	5' CTTTTCTGTTAAAACATCT 3'	AGG
gARN1		
gARN2		
gARN3		
gARN4		
gARN5		

PREGUNTAS

1. **¿Qué es la secuencia PAM y por qué es tan importante para la actividad de Cas9?**
2. **¿Cómo puede ser usado CRISPR para reparar mutaciones genéticas en pacientes?**
3. **¿Qué opinas acerca de esta técnica? Crees que puede ser una técnica que en el futuro se pueda aplicar a humanos y reparar cualquier mutación genética.**

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@biot-ed.es