

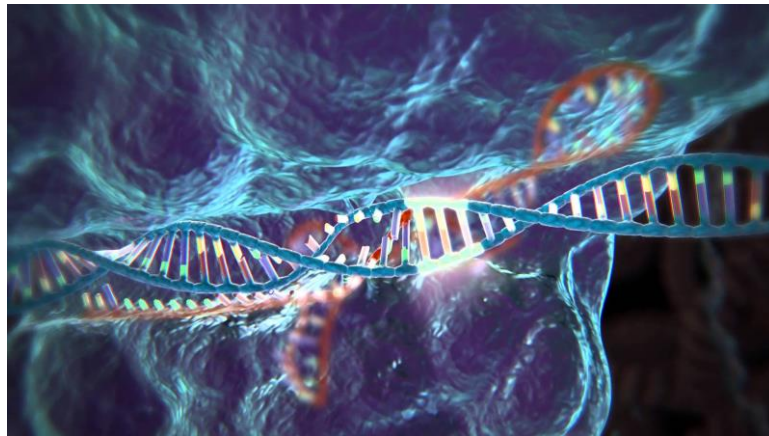
Grado en Biología

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

CRISPR/Cas9 y p53. ¿Aliados o enemigos contra el cáncer?

CRISPR/Cas9 and p53. Allies or enemies against cancer?

CRISPR/Cas9 e p53. Aliados ou inimigos contra o cancro?



Alumna: Cristina Gómez Pereira

Febrero, 2019

Directora Académica: María Ángeles Freire Picos

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	3
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
IV. RESULTADOS Y DICUSIÓN.....	6
1. P53: el guardián del genoma	6
2. La edición de genomas con la tecnología CRISPR/Cas9	11
3. CRISPR/Cas9 y p53	15
V. CONCLUSIONES.....	19
VI. BIBLIOGRAFÍA	20

Resumen

Curar el cáncer es un gran reto de la medicina actual. En las células de mamíferos, existe una proteína importante para la supresión de tumores, la proteína p53. Sin embargo, la alteración de su función tiene consecuencias que favorecen el cáncer. Por otro lado, la tecnología CRISPR/Cas9 ha demostrado ser de gran utilidad en edición de genomas por su facilidad de uso, bajo coste y versatilidad. Entonces, ¿qué es lo que puede aportar la tecnología CRISPR/Cas9 en la lucha contra el cáncer? En los casos en los que p53 esté mutado, ¿puede CRISPR/Cas9 corregir mutaciones en p53? En este trabajo intentaremos resolver estas dudas, mostrando diferentes enfoques de CRISPR/Cas9, así como ciertos inconvenientes que pueden surgir de su aplicación.

Resumo

Curar o cancro é un gran reto da medicina actual. Nas células de mamíferos, existe unha proteína importante para a supresión de tumores, a proteína p53. Con todo, a alteración da súa función ten consecuencias que favorecen o cancro. Doutra banda, a tecnoloxía CRISPR/Cas9 demostrou ser de gran utilidade en edición de genomas pola súa facilidade de uso, baixo custo e versatilidade. Entón, que é o que pode aportar a tecnoloxía CRISPR/Cas9 na loita contra o cancro? Nos casos nos que p53 estea mutado, pode CRISPR/Cas9 corrixir mutaciones en p53? Neste traballo intentaremos resolver estas dúbidas, mostrando diferentes enfoques de CRISPR/Cas9, así como certos inconvenientes que poden xurdir da súa aplicación.

Summary

Curing cancer is a great challenge for modern medicine. In mammalian cells, there is an important protein for tumor suppression, the p53 protein. However, the alteration of its function has consequences that favor the cancer. On the other hand, CRISPR/Cas9 technology has proven to be very useful in genome editing because of its ease of use, low cost and versatility. So what can CRISPR/Cas9 technology contribute to fight against cancer? In cases where p53 is mutated, can CRISPR/Cas9 correct mutations in p53? In this paperwork we will try to solve these doubts, showing different approaches of CRISPR/Cas9, as well as certain inconveniences that may arise from its application.

Palabras clave: p53, CRISPR/Cas9, edición de genomas, cáncer.

Abreviaturas

AAV: virus adenoasociados.

Cas: endonucleasas asociadas a CRISPR.

CDB: secuencia corta cercana al N-terminal de la ciclina B, llamada caja de destrucción de ciclina (*cyclin destruction box*).

CRISPR: agrupación de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas.

dCas: endonucleasa Cas9 con actividad catalítica inactiva.

DSB: doble corte en la cadena de DNA.

HDR: reparación directa por homología.

HNH: dominio nucleasa de Cas9.

Indel: inserción o delección de nucleótidos.

KRAB: caja asociada a Krupel.

NGS: *Next Generation Sequencing*, técnicas de ultrasecuenciación.

NHEJ: reparación de unión de extremos no homólogos.

NUC: lóbulo nucleasa de Cas9, que contiene los dominios RuvC y HNH.

PAM: motivo adyacente al protoespaciador.

Pi: dominio de interacción de Cas9 con la secuencia PAM.

REC: lóbulo de reconocimiento de Cas9.

RuvC: dominio con actividad nucleasa de Cas9.

ssODN: oligonucleótido monocatenario.

RNAs en edición:

crRNA: CRISPR-RNA.

gRNA: RNA guía.

tracrRNA: *noncoding trans-activating* CRISPR-RNA.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los logros de los últimos años que más ha revolucionado la biología y posteriormente otras áreas como la biomedicina es el disponer de la tecnología y la capacidad de editar genomas. Esta posibilidad hace que actualmente sea posible modificar genes *in vivo*, anulándolos o editando su secuencia. Debido a ello, se han modificado genomas de plantas, insectos y también ratones con el fin de evitar la propagación de plagas, así como luchar contra el cáncer y otras enfermedades. Sin embargo, como ocurre casi siempre, existen barreras importantes para la aplicación con éxito de ésta tecnología de edición de genomas, sobre todo en la lucha contra el cáncer, debido a la existencia de las maquinarias celulares de protección y reparación del daño genómico, en la que interviene principalmente la proteína P53, conocida también por su papel crítico como “guardián del genoma”.

A la parte puramente molecular se le suma el hecho de que la edición de genomas no es un tema conocido por la población general de modo que los aspectos éticos y legales derivados no siempre están claros, por lo que generan polémicas.

En el presente trabajo comenzaremos por tratar por separado la relevancia de p53 en la célula, así como la del sistema CRIPR/Cas9, y posteriormente veremos qué nos ofrece esta técnica cuando se aplica a la edición p53 y también a las dificultades asociadas a la aplicación de edición genómica con la actividad natural de p53.

II. OBJETIVOS

Nos planteamos los siguientes objetivos relacionados con la edición de genomas y la barrera experimental que suponen los mecanismos de reparación celular en el éxito de los proyectos.

1. Realizar búsquedas de información relacionada con los fundamentos de la edición de genomas y la maquinaria molecular implicada.
2. Analizar la información de diferentes autores relacionada con problemas encontrados al aplicar técnicas de edición de genomas con la expresión de P53.
3. Elaborar una memoria en la que se comenten los aspectos más relevantes, la problemática actual y posibles soluciones.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo es bibliográfico, por ello la metodología que incluimos a continuación es la comúnmente empleada en laboratorios que trabajan con edición génica en eucariotas.

1. Búsquedas bibliográficas: La información científica para la realización del presente trabajo se obtuvo del PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y Scopus (<https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>).

2. Requisitos para la edición con CRISPR/Cas9

2.1 Vectores para editar con CRISPR/Cas9

Para introducir en una célula u organismo de interés los componentes de CRISPR/Cas9, dependiendo de lo que queramos editar, es decir, lo que contenga el vector de entrega, se puede hacer a través de un plásmido que codifique Cas9 y el gRNA, o Cas9 con gRNA en forma de complejo. Los vectores usados para introducir los componentes CRISPR/Cas9 en las células, tomando como referencia el estudio de Lino et al. (2018), son los siguientes:

- Métodos de introducción física, en los que los más comunes son microinyección y electroporación.
- Vectores virales, entre los que se incluyen virus adenoasociados (AAV), adenovirus y lentivirus. Este tipo de vectores ha sido muy empleado.
- Vectores no virales, no son tan usados como los anteriores. Estos incluyen nanopartículas lipídicas y péptidos que penetran en las células (CPP), entre otras.

2.2 ¿Cómo analizamos la edición?

2.2.1 Análisis de fenotipos

Si la edición del gen da lugar a una característica detectable, se pueden hacer análisis de fenotipos. Se hace uso bien de resistencia a antibióticos, o de análisis de auxotrofías u otros, como aparece en la Figura 1C, los mutantes en ADE2 producen un pigmento que permite identificarlos visualmente.

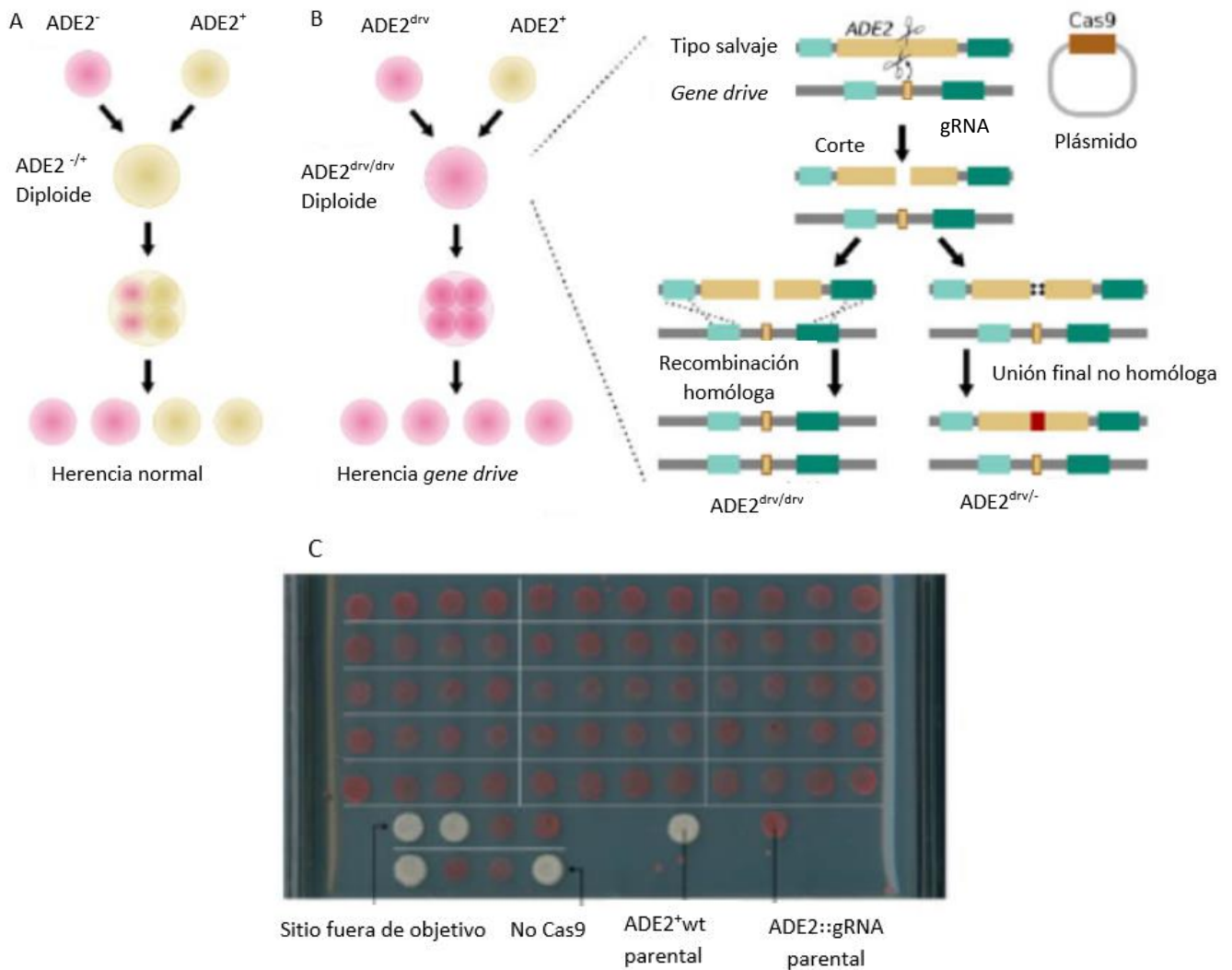


Figura 1. Explicación de un modelo de edición con un RNA guía (*gene drive*) y gracias a Cas9, que causa mutantes de ADE2, dando lugar a colonias rojizas de *S. cerevisiae*. Modificado de DiCarlo et al. (2015).

2.2.2 Secuenciación

Se pueden emplear técnicas tradicionales como el método clásico de Sanger o las nuevas técnicas conocidas como *Next Generation Sequencing* (NGS), ultrasecuenciación o tecnología de secuenciación masiva consiste en realizar múltiples secuenciaciones cortas (alrededor de 100 pb) a la vez que se producen las lecturas, con un bajo coste gracias a la inmovilización de las reacciones en una superficie sólida. Se puede secuenciar gran cantidad de genes o todo el genoma.

Son necesarios 50 ng de DNA sin contaminar, que necesita ser sometido a distintos procesos, disolución, fragmentación en cadenas de pequeño tamaño, adición de adaptadores, captura y la amplificación por PCR

(<https://unabiologaenlacocina.wordpress.com/2017/01/19/de-sanger-a-ngs-breve-historia-de-la-secuenciacion-del-dna/>).

Algunos ejemplos del uso de la ultrasecuenciación aplicado en la técnica CRISPR/Cas9 son aquellos dedicados al estudio de Cas9 fuera del objetivo y mejorar así su especificidad, con el método de BLESS-seq, que marca donde se han producido las roturas generadas por la nucleasa. También existe el GUIDE-seq, que identifica todo el genoma independientemente de DSB (Baliou et al., 2018).

IV. RESULTADOS Y DICUSIÓN

1. P53: el guardián del genoma

La proteína p53 humana es codificada por el gen TP53, localizado en el cromosoma 17. También conocida como “el guardián del genoma”, por su papel en la supresión de tumores, puesto que induce la detención del crecimiento celular, la apoptosis y la senescencia, además de bloquear la angiogénesis (Wang y Sun, 2010).

p53 fue descubierta a finales de los 70 como una proteína de 53kDa (de donde proviene su nombre) unida al antígeno T del virus SV40. Inicialmente se clasificó como un oncogén (Lane y Crawford, 1979; Linzer y Levine, 1979). En estudios posteriores, se determinó que realmente la proteína p53 codificada por el gen TP53 tiene funciones de detención del crecimiento celular de carácter oncogénico (Finlay et al., 1989). Precisamente la inactivación del gen sucede en muchos tumores humanos y en cánceres difíciles de tratar (Kasthuber y Lowe, 2017).

1.1. Estructura p53

Se trata de una fosfoproteína que se une específicamente al promotor de genes concretos regulando su transcripción. La proteína presenta cuatro dominios funcionales: en el extremo, N- terminal, se encuentran: el dominio de transactivación (TAD) y el dominio rico en prolina (PD), mientras que el dominio de oligomerización (OD), el cual permite la tetramerización de TP53 y el dominio regulador (RD), se encuentran en el C-terminal. Además del dominio de unión al DNA central (DBD) (Wang y Sun, 2010). Estos dominios se representan en la Figura 2B.

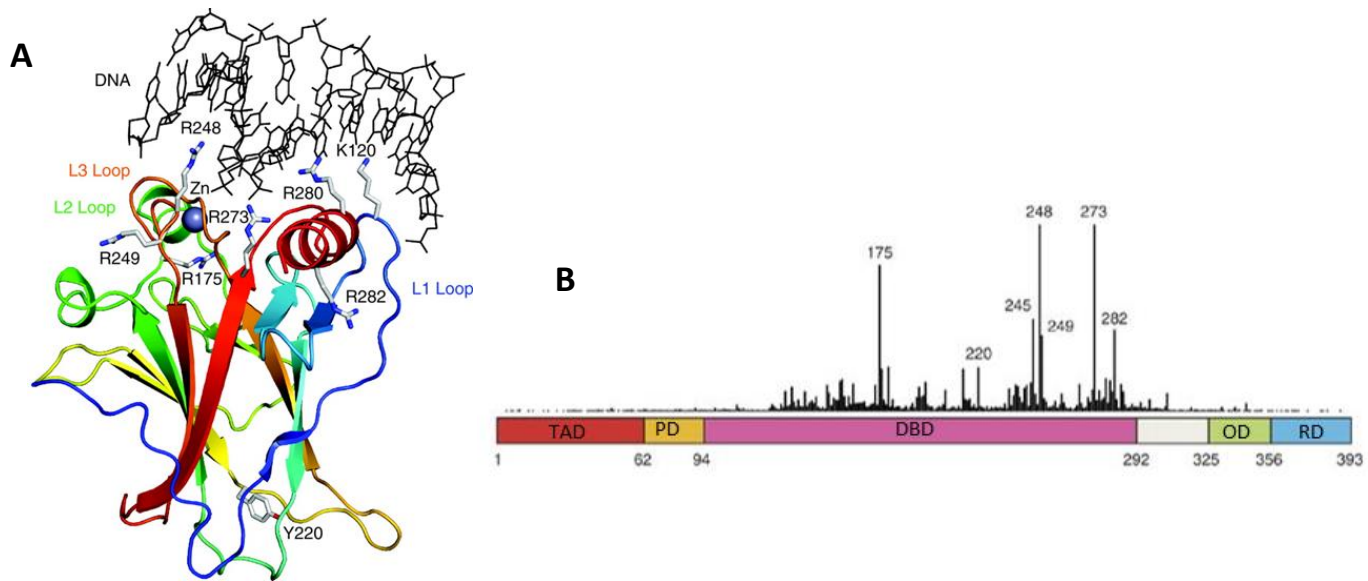


Figura 2. (A) Estructura de la proteína p53 cristalografiada con el DNA. (B) Localización de los dominios en p53. Se indican también los lugares más frecuentemente mutados. Modificado de Joerger y Fersht (2010).

1.2. Activación y regulación de p53

La proteína p53 tiene una vida media corta, por lo que su concentración celular es muy baja en condiciones normales (sin ninguna señal de estrés). Pero puede ser activada ante una gran variedad de señales de estrés extracelulares e intracelulares. Una de las más importantes es el daño en el DNA, que desencadena una cascada de señales de activación mediada por quinasas, que finalmente producen la fosforilación de p53, causando su estabilización, y el aumento de sus niveles en la célula (Yue et al., 2017) (Biegging et al., 2014). También existen señales hiperproliferativas que favorecen la estabilización de p53, ya que provocan la inhibición de MDM2 (Figura 3) (Biegging et al., 2014).

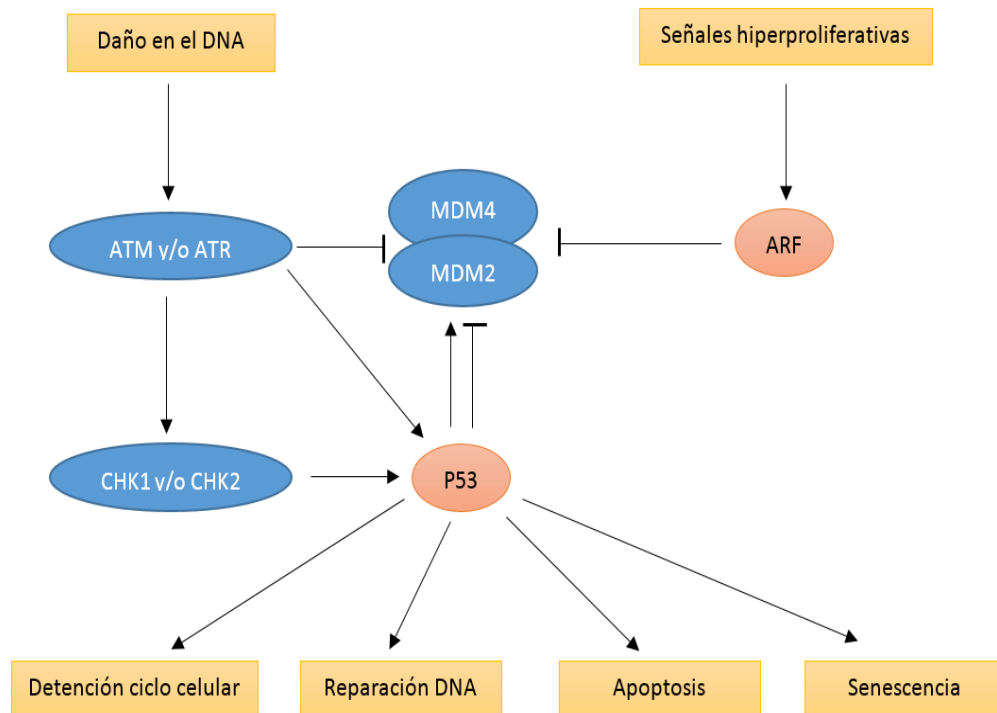


Figura 3. El daño en el DNA desencadena la actividad de las quinasas (ATM, ATR, CHK1, CHK2), las cuales fosforilan p53. Las señales hiperproliferativas activan el supresor de tumores ARF, que inhibe, como ATM/ATR los reguladores negativos de p53 MDM2 y MDM4, aumentando la estabilidad de p53, y dando lugar a las respuestas antitumorales. Basado en Bieging et al. (2014).

Una vez activada, la proteína p53 controla la activación transcripcional de numerosos genes diana que a su vez regulan procesos celulares como la supresión de tumores (Fischer, 2017). Así, p53 forma parte de una gran red interconectada de reguladores y efectores (Figura 4), produciendo múltiples respuestas en función del tipo de célula, su estado de diferenciación, las condiciones de estrés y las señales ambientales, lo cual va a condicionar la respuesta de p53 (Kastenhuber y Lowe, 2017) (Bieging et al., 2014). Las funciones de apoptosis y detención del ciclo celular son las mejor caracterizadas. P53 actúa en el punto de control de la fase G1, evitando la progresión del ciclo celular facilitando la reparación del DNA. También activa la transcripción de componentes de la maquinaria de reparación del DNA. En ciertas ocasiones p53, puede inducir la senescencia celular, deteniendo el ciclo de manera estable o permanente (Kastenhuber y Lowe, 2017). Cuando el daño en la célula es irreparable, se induce la apoptosis (Niazi et al., 2018).

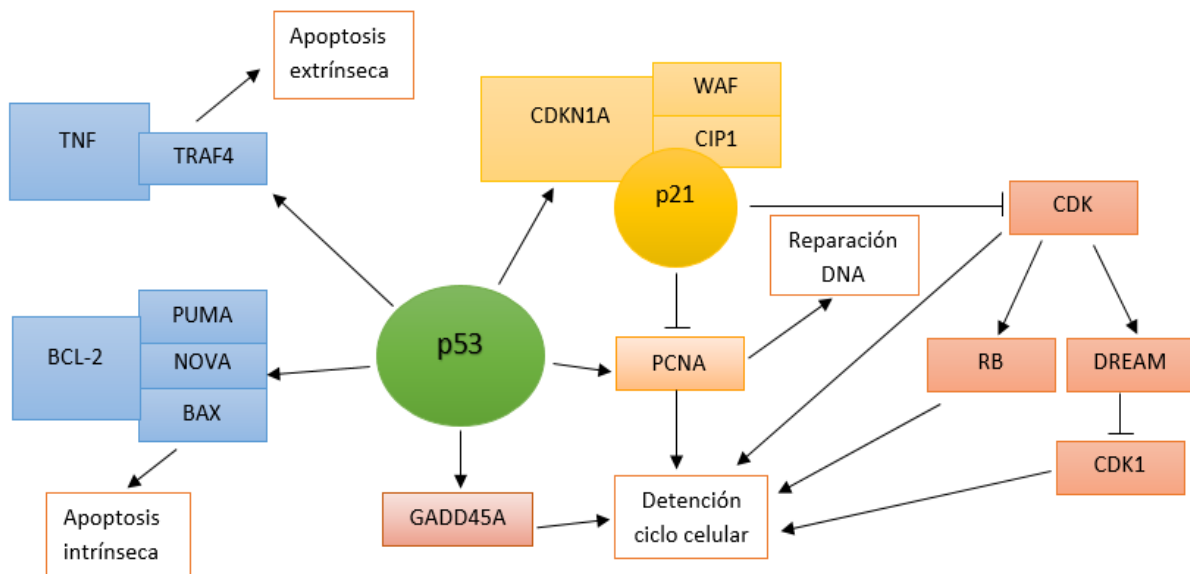


Figura 4. Esta gráfica recoge algunos de los genes y factores que intervienen en la respuesta celular de p53. Basado en Fischer (2017).

En cuanto a la regulación de p53 podemos mencionar dos principales reguladores, MDM2 y MDM4 (Figura 3), que inhiben su función de transactivación al unirse a sus dominios de activación transcripcional. Además MDM2, es una ubiquitina ligasa E3, por lo que marca y dirige la degradación de p53 por el proteasoma, actuando como un regulador negativo. Otras ubiquitinas ligasas E3 implicadas son Pirh2 y COP1 (Wang y Sun, 2010).

1.3. Consecuencias de defectos en p53

Es evidente la importante función de p53 en cuanto a la supresión de tumores, pero la pérdida de función de éste factor está relacionada con la causa del 50% de los cánceres humanos; además de los individuos con el síndrome de Síndrome de Li-Fraumeni, que heredan un alelo mutante de TP53, haciéndolos susceptibles a la aparición de cáncer, y los ratones knockout para Trp53 tienen predisposición a desarrollar tumores (Kasthuber y Lowe, 2018) (Biegging et al., 2014). Además, aquellos tumores con p53 mutado, suelen ser más malignos y difíciles de tratar en el 80% de los casos (Kandoth et al., 2013) (Duffy et al., 2017).

Las mutaciones pueden ser esporádicas o heredadas, pero en cualquier caso provocan la pérdida de heterocigosidad (ya que hay un alelo mutante y otro salvaje de TP53), dando lugar a una deficiencia de la función original. Así, la malignidad de los tumores vendría dada tanto por la pérdida de función en si del p53 salvaje, como por las propiedades oncogénicas de ganancia de función del p53 mutante (Biegging et al., 2014).

Esta ganancia de función o GOF hace referencia a las características oncogénicas que adquiere el mutante p53, como son la proliferación celular, la migración celular, la invasión celular, la supervivencia celular, el metabolismo celular, la quimiorresistencia y la arquitectura tisular, para promover la progresión tumoral independientemente del p53 de tipo salvaje. Por lo que, las células, también adquieren propiedades que promueven la progresión del tumor (Yue et al., 2017).

Además de la mutación de p53 en sí, cualquier alteración en algún elemento de esa extensa red de interacciones con p53, puede alterar su función. Dentro de los mecanismos de inactivación de la proteína los principales parecen ser los relacionados con los reguladores negativos MDM2 y MDM4 (Duffy et al., 2017) (Muller y Vousden, 2014) (Biegging et al., 2014). Así por ejemplo, MDM2 puede regular negativamente el p53 mutante, manteniendo así unos niveles bajos de la proteína en células normales, sin embargo, en células tumorales esto no ocurre (Yue et al., 2017).

Mayoritariamente las mutaciones causan la sustitución de un solo aminoácido. Estos cambios se han descrito en toda la proteína, pero tienden a agruparse en el dominio de unión al DNA, dando un “hotspot” de seis aminoácidos que son los que se sustituyen con más frecuencia (Figura 2B) (Yue et al., 2018) (Biegging et al., 2014) (Kastenhuber y Lowe, 2018). Esto provoca el cambio de conformación de la proteína salvaje de p53 o suprimen su contacto con el DNA. Las mutaciones de conformación (o estructurales) causan su desestabilización. Aun así, es posible revertir este plegamiento anormal (Duffy et al., 2017).

1.4. ¿Por qué es p53 una diana importante en terapia génica para tratar el cáncer?

Por todo lo expuesto hasta el momento, la proteína p53 desempeña muchas funciones relacionadas con la supresión tumoral y tanto si p53 falla, como si lo hace cualquier otro elemento de su compleja red de interacciones, provocará que los daños en el DNA no se reparen.

La pérdida de función de p53 ocurre en la mayoría de los cánceres, por ello p53 mutante es una diana importante en la terapia génica. La alta frecuencia de aparición de mutaciones y debido a lo importante que es en el inicio y progresión del cáncer, provoca la ganancia de actividad oncogénica (Duffy et al., 2017) (Muller y Vodsden, 2014).

2. La edición de genomas con la tecnología CRISPR/Cas9

Las siglas CRISPR provienen del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas). Lo cual define básicamente sus características estructurales. Las secuencias repetidas tienen una longitud constante y entre ellas se intercalan secuencias espaciadoras.

Estas secuencias de DNA se encuentran en la mayoría de los genomas de arqueas (87%) y en bacterias (45%), basado en la base de datos CRISPR (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>), convirtiéndose en la familia de secuencias repetidas más distribuida en procariotas (Ishino et al., 2018). Se corresponden en gran medida con segmentos de secuencias de virus y plásmidos que atacaron previamente al organismo, que ahora se encuentran en las regiones espaciadoras (Horvath y Barrangou, 2010).

Los genes *cas* codifican las correspondientes endonucleasas Cas, enzimas especializadas en cortar el DNA. Pese de existir varias, Cas9 es especialmente importante por su utilización como herramienta de edición (Ishino et al., 1987).

Las secuencias CRISPR, junto con las nucleasas Cas constituyen un sistema de defensa que proporciona a los organismos procariotas de una forma de inmunidad adquirida. Partiendo de este sistema, la comunidad científica ha conseguido desarrollar la tecnología CRISPR/Cas9 como un método edición genómico, cuyo mecanismo de acción se explicará más adelante.

Las secuencias repetidas de CRISPR fueron observadas por primera vez en 1987 por Y. Ishino y su grupo de investigación comprobando que estaban altamente conservadas en *E. coli* (Ishino et al., 1987).

En 1993, Mojica y colaboradores identificaron secuencias repetidas similares en la arquea *Haloferax mediterranei* (Mojica et al., 1993). A principios de siglo XXI, se comenzó a comprender la función de CRISPR como sistema inmunológico, al descubrir la similitud de secuencias de los espaciadores de CRISPR derivaban de DNA de bacteriófagos, lo cual fue subestimado en un principio, y publicado independientemente por tres grupos (Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005).

Los genes *cas* fueron identificados por distintos grupos de investigación (Jansen et al., 2002; Makarova et al., 2006). Los cuales se localizan adyacentes a regiones CRISPR. (Citar figura)

La función de CRISPR/Cas como un sistema inmune adquirido procariótico se demostró experimentalmente en 2007, usando la bacteria *Streptococcus thermophilus* (Barrangou et al., 2007). También se demostró en un trabajo posterior que hay un único gen *cas* necesario para la interferencia codificada por CRISPR, el gen codificante de Cas9 (Sapranaukas et al., 2011).

En el año 2012 Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, demuestran cómo utilizar CRISPR/Cas como una herramienta de edición programable. Presentando un sistema de CRISPR más simple basado en la endonucleasa Cas9, dirigida por un RNA guía (Jinek et al., 2012) (Ishino et al., 2018) (Lino et al., 2018).

Por primera vez en 2013, se hizo uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para editar el genoma en células de mamíferos, y a partir de este momento su uso ha crecido exponencialmente, en la modificación de genoma en células y organismos, y también en modificaciones epigenéticas y transcripcionales (Zhan et al., 2018) (Lino et al., 2018).

2.1 Mecanismo de inmunidad adquirida en procariotas

El sistema CRISPR/Cas permite a las bacterias y arqueas defenderse contra virus y plásmidos.

Existen varios tipos de sistemas CRISPR/Cas basándose en las nucleasas que actúan, pero aquí nos centraremos en describir el sistema CRISPR/Cas de tipo II, ya que es aquel con Cas9 como nucleasa (Ishino et al., 2018).

El mecanismo de inmunidad en procariotas involucra tres fases: adaptación, expresión e interferencia. Representadas en la Figura 5.

En la primera fase (adaptación), se produce la entrada de DNA extraño, el cual es reconocido por las endonucleasas Cas, gracias a una secuencia conocida como PAM (motivo adyacente al protoespaciador), que consiste en una secuencia de tres nucleótidos (NGG, para Cas9 de *Streptococcus pyogenes* o NAG), y estas cortan el DNA en las secuencias adyacentes al PAM. Posteriormente, el DNA patógeno será incorporado en el genoma bacteriano en forma de elemento espaciador junto al promotor de CRISPR. También se genera una copia de la secuencia repetida para que el nuevo fragmento quede flanqueado (Ishino et al., 2018) (Lino et al., 2018) (Lammoglia-Cobo et al., 2016) (Zhan et al., 2018).

En la siguiente fase (expresión) ocurre la biogénesis de crRNA, el *locus* de CRISPR es transcrito normalmente en un único pre-crRNA que más tarde se procesa para formar el crRNA maduro que contiene un único espaciador (Khan et al., 2018). El sistema CRISPR/Cas II requiere, el tracrRNA, complementario a la secuencia repetida. Al finalizar la transcripción, el tracrRNA forma un dímero con las secuencias repetidas. Una RNasa III reconoce este híbrido crRNA/tracrRNA y lo procesa para generar un transcrito maduro. Cas9 recluta el crRNA y forma el complejo CRISPR/Cas. El crRNA será quien guíe al complejo hacia su objetivo al reconocer la secuencia complementaria (Lammoglia-Cobo et al., 2016).

Por último (interferencia), gracias a la homología de la secuencia espaciadora en el crRNA con el DNA extraño, éste es reconocido y entonces actúa Cas9, cortándolo (Lammoglia-Cobo et al., 2016). Esta es la respuesta de defensa, ya que el crRNA formado en la anterior fase crea esa “memoria” para ataques posteriores.

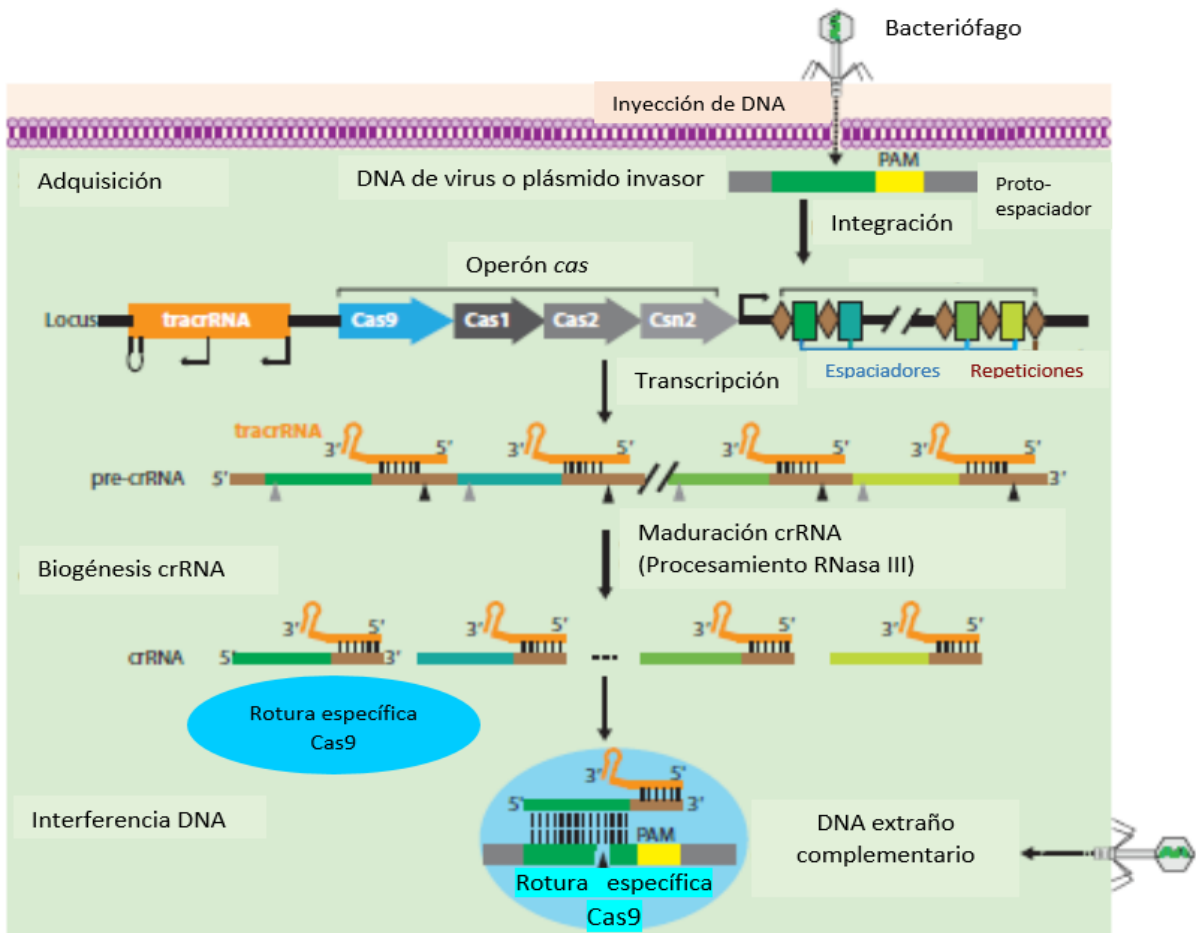


Figura 5. Mecanismo CRISPR/Cas9 en bacterias. Mostrando las tres fases. Modificado de Jiang y Doudna (2017).

2.2 Sistema CRISPR/Cas aplicado a la edición de genes eucariotas

Parte del mecanismo del sistema de inmunidad presente en los procariontes es aplicable a cuando se usa como técnica en otro organismo. Para entender el mecanismo de edición primero hay que conocer qué elementos intervienen. En las células del organismo cuyo gen/genes queremos editar tenemos que expresar la nucleasa Cas9 junto con un RNA guía (gRNA) único. Empezaremos por describir la nucleasa Cas9 (Figura 6).

Cas 9, consta de dos regiones, el lóbulo REC (reconocimiento) y el NUC (nucleasa). El primero es el encargado de reconocerla región de corte en el DNA y el segundo contiene los dominios de corte, HNH y RuvC, junto con el dominio de interacción PAM (Pi) en el extremo C-terminal. En el dominio HNH se une el RNA guía, y ambos dominios HNH y RuvC producen cortes en las 2 hebras de DNA (Ishino et al., 2018).

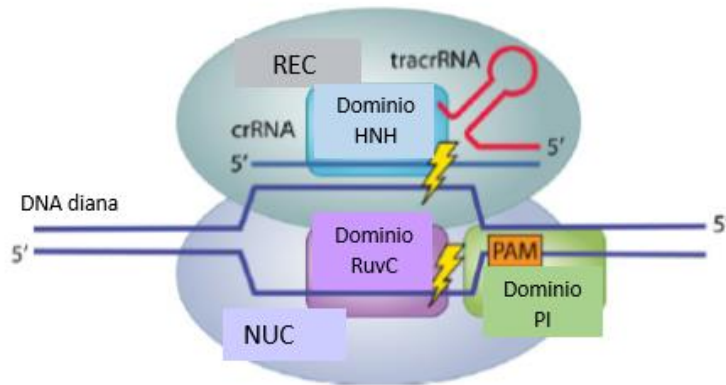


Figura 6. Complejo crRNA-tracrRNA-Cas9 produciendo la rotura (DSB) en la cadena de DNA diana. Modificado de Ishino et al. (2018).

El RNA guía (gRNA ó sgRNA), es un RNA quimérico formado por el crRNA y tracrRNA, que simplifica este sistema (Jinek et al., 2012). Como su nombre indica este gRNA, dirige a la nucleasa Cas9 hacia la región de DNA complementaria del crRNA.

Así, el complejo Cas9-crRNA-tracrRNA se une a la secuencia de DNA guiado por la especificidad de unos 10-12 nucleótidos contiguos al PAM, entonces Cas9 sufre cambios conformacionales y desenrolla el DNA. Después de esto se forma el dúplex entre el DNA y el crRNA (Ishino et al., 2018) (Lino et al., 2018) (Zhan et al., 2018). Cas9 corta el DNA y produce una doble rotura de cadena (DSB), de unos tres nucleótidos en dirección 5' del PAM. Este daño, activa la maquinaria de reparación del DNA para reparar el DSB, lo cual puede ocurrir de dos formas: por la vía de unión final no homóloga (NHEJ), que es propensa a errores y da lugar a inserciones o eliminaciones (*indels*) o la vía de reparación dirigida por homología (HDR), en la que se usa una plantilla de DNA donante (Sayin y Papagiannakopoulos, 2017) (Zhan et al., 2018).

La propensión a errores de NHEJ puede aprovecharse para introducir *indels*, *frameshifts* o codones de parada prematura, eliminando la función del gen (*knockout*), o la supresión del gen, dando una proteína truncada no funcional. La HDR puede usarse para la corrección génica y adición de genes (Lino et al., 2018). El DNA donante usado para la reparación por HDR puede ser un oligonucleótido monocatenario (ssODN) para la inserción de unas pocas mutaciones puntuales específicas o un plásmido de direccionamiento para modificaciones más extensas (Guernet y Grumolato, 2017).

2.3 Seguridad en el manejo de la tecnología CRISPR

CRISPR/Cas9 es mucho más específica que otras técnicas usadas anteriormente en la edición del genoma. Esta especificidad depende de Cas9 y gRNA, para que únicamente se dirijan y editen en el lugar de interés. Los errores en la edición fuera del gen diana implicarían la posibilidad de generar mutaciones en genes vitales o células no diana, acarreando consecuencias graves. Por ello, el vector de entrega tiene que cumplir también este criterio de especificidad (Guernet y Grumolato, 2017) (Lino et al., 2018) (Khan et al., 2018) (Pineda et al., 2018).

Otro aspecto importante es evitar la reacción inmunológica del paciente contra alguno de estos elementos. Ya que se ha detectado esta respuesta ante Cas9 y contra los vectores de entrega. Por lo que para que la edición en humanos sea segura y exitosa es necesario evitar que esta reacción no se produzca (Pineda et al., 2018).

3. CRISPR/Cas9 y p53

3.1 En investigación contra el cáncer

CRISPR/Cas9 ha sido muy útil en los últimos años en el modelado del cáncer, ya que puede crear una mutación en un gen implicado en un proceso tumoral permitiendo observar la evolución del cáncer. Estos genes pueden ser útiles para investigar medicamentos contra el cáncer. Uno de ellos puede ser TP53, sobre el que hay múltiples estudios de modelos de cáncer (Guernet y Grumolato, 2017). Interesa provocar mutaciones que causen pérdida de función por NHEJ, mutaciones de ganancia de función por HDR y reorganizaciones cromosómicas por cortes en *loci* distantes (Khan et al., 2018). La edición del propio TP53 por CRISPR/Cas9 para investigar las posibles terapias a distintos tipos de cáncer se ha explorado en varios estudios como recogen Ratan et al. (2018).

3.2 Recuperación de p53 salvaje

Es de gran interés recuperar la actividad del p53, ya que como sabemos el estado mutante favorecerá la aparición de cáncer. Existen distintos métodos para devolver la funcionalidad de p53 salvaje, como compuestos químicos y péptidos, o la inserción del tipo salvaje de p53 (terapia de adición de genes) (Chira et al., 2018).

En contraposición con la “terapia de adición de genes”, en el estudio de Sergiu Chira et al. (2018) proponen la técnica de CRISPR/Cas9 como una herramienta capaz de reemplazar completamente el TP53 mutante por una copia del gen salvaje, recuperando así la función supresora de tumores, en células cancerosas. Esto implica eliminar el locus completo del TP53 mutado, de unos 20,5 kb de longitud y se reemplaza con una copia de cDNA de TP53 funcional por medio de recombinación homóloga. Esto se basa en la capacidad de CRISPR/Cas 9 para reemplazar un fragmento de hasta 65 kb (Zhang et al., 2015). En este estudio, hacen uso de una nueva nucleasa, Cas9-HF (Kleinstiver et al., 2016), que se fusiona con una secuencia de la caja de destrucción de ciclina (CDB). Cas9-HF/CDB tiene una vida más corta, por lo que el genoma está expuesto a una menor actividad nucleasa. El vector usado es un vector híbrido de un bacteriófago y un virus adenoasociado (vector AAVP), derivado del bacteriófago filamentoso M13. Además, se administra doxicilina, un antibiótico simple, la cual induce la transcripción del TP53wt.

Esta técnica presenta la ventaja de ser muy específico para dirigirse a células tumorígenas, además de ser fácil, rápido y barato. Sin embargo, esta especificidad no es perfecta, ya que el cáncer tiene muchos fenotipos, por lo que trabajar en una mayor especificidad sigue siendo un reto. Además, es estado de evolución del tumor en la célula también podría influir (Chira et al., 2018).

3.2 P53: una barrera en la edición del genoma

Ya se ha hablado de la importancia de p53 en cuanto a la protección de los daños en el DNA, por tanto no es de extrañar que afecte negativamente en cuanto se hace uso de la técnica de edición del genoma CRISPR/ Cas9, ya que a fin de cuentas lo que produce ésta, es un daño en el DNA, como es la rotura de cadena DSB.

Estos problemas, han causado una conmoción en la comunidad científica, así como en otros sectores como es el económico provocando la bajada de acciones en la bolsa, ya que han creado un miedo al uso de esta tecnología por el supuesto riesgo a causar tumorigénesis o la ineficacia de la terapia génica

(<https://www.marketwatch.com/story/crispr-related-stocks-sink-after-report-that-gene-editing-technology-might-cause-cancer-2018-06-11>,
<https://naukas.com/2018/06/12/penultimo-problema-las-crispr-se-llama-p53/>,
<https://revistageneticamedica.com/2018/06/13/p53-y-crispr-cancer/>).

Esto ha sido informado recientemente por dos estudios publicados en la revista *Nature Medicine*, como el de Haapaniemi et al. (2018) En el que trataron de editar el genoma de células inmortalizadas epiteliales de pigmento retiniano humano (RPE1). Y el estudio de Ihry et al. (2018) que trabajaron con células madres pluripotentes humanas (hPSC), lo que supone un problema para la medicina regenerativa. En ambos estudios observaron que p53, y otros componentes relacionados, como p21 y RB, limitaban la edición del genoma (Foronda y Dow, 2018) (Carroll, 2018).

Aun así, no en todas las células se han observado estas consecuencias, ya que en muchas con el p53 salvaje han tenido éxito en su edición (Ventura y Dow, 2018) (Foronda y Dow, 2018).

Pese a los problemas que puede conllevar p53 cuando actúa CRISPR/Cas 9, no interesa suprimir esta proteína permanentemente ya que ello conllevaría la producción de células cancerosas. Por tanto, la mejor solución sería su inhibición temporal, que permita editar el genoma en ese período, permitiendo que p53 se restaure más adelante (Foronda y Dow, 2018) (Carroll, 2018).

3.3 Técnicas sin DSB basados en CRISPR

Como hemos dicho al principio, la rotura de DSB en el DNA provoca la reacción de p53, por lo que son interesantes aquellas técnicas que no los produzcan.

La clave de las siguientes técnicas que veremos, editores de base y CRISPRi, es el uso de la nucleasa Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9), que se consigue inactivando los dominios endonucleotílicos y que por tanto no produce cortes, pero si permite la unión al DNA gracias al gRNA la dirige (Lawhorn et al., 2014).

3.4.1 Editores de bases (BE)

Esta tecnología permite editar el genoma sin necesidad de inducir una rotura en el DNA, mediante la conversión directa e irreversible de una base nitrogenada. Para ello se fusiona dCas9 y una enzima citidina desaminasa.

La citidina desaminasa cataliza la desaminación de la citosina (C) a uracilo (U), dando lugar a un heterodúplex G:U, que después de la replicación o reparación de DNA puede convertirse en A:T.

En este estudio, obtuvieron como resultado la corrección de la mutación de p53 Tyr163Cys, con la enzima desaminasa BE3, en un 3,3-7,6% en las células de cáncer de mama humano, con un máximo del 0,7% de *indels* formados. Y lo compararon con los resultados de un tratamiento con la wt Cas9 y una plantilla donante de DNA, siendo menor del 0,1% las correcciones de TP53 en el mismo locus y una formación de *indels* del 6,1-8,0%. Los resultados de este estudio indican que esta técnica es mucho más eficiente que la HDR para las células humanas y con menos formaciones de *indels* (Komor et al., 2016).

Gracias a este estudio podemos observar que las modificaciones en el sistema CRISPR/Cas9 para dirigirse con más eficiencia y con menos *indels* son posibles (Kueh y Heroid, 2016).

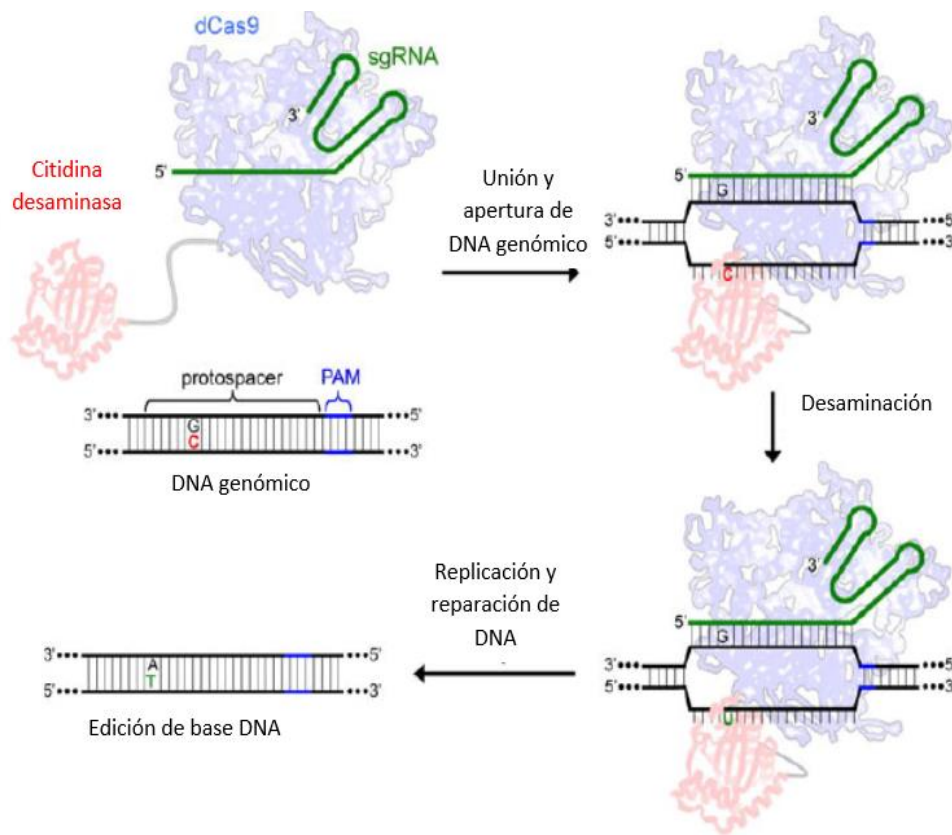


Figura 7. Esquema de la edición por parte de Cas9 en combinación con la citidina desaminasa. Modificado de Komor et al. (2016).

3.4.2 Interferencia de CRISPR (CRISPRi)

En contraposición de la activación CRISPR (CRISPRa) en el que se induce la transcripción de un gen, este método consiste en la represión de la transcripción de este, como puede ser el TP53 mutante. La mayoría de los casos se usa la nucleasa dCas9. En células de mamíferos, cuando dCas9 se usa solo tiene una represión moderada, pero cuando se fusiona con un dominio represor KRAB (caja asociada a Krupel) de Kox-1, el silenciamiento aumenta considerablemente (Khan et al., 2018).

Los resultados prueban que la represión mediada por CRISPRi es significativa en los niveles de TP53 cuando se dirige hacia secuencias de DNA cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS), obteniendo hasta un 86% de represión. También añadieron que el uso de KRAB, no marcaba una mejora en los resultados (Lawhorn et al., 2014).

Ambas tecnologías están aún por desarrollarse, especialmente a la hora de editar TP53 concretamente. Pero suponen una nueva oportunidad para conseguir los objetivos deseados.

V. CONCLUSIONES

- El trabajo bibliográfico realizado ha sido recogido en la presente memoria de trabajo de Fin de Grado. Las principales conclusiones de nuestro trabajo son las siguientes.
- Hemos comprobado que p53 es imprescindible en la supresión tumoral. Cuando pierde su función la célula es propensa a la aparición de cáncer, ya que no están presentes los mecanismos de protección. Además, el p53 mutante, causa también la actividad oncogénica, por lo que además se favorece el inicio y progresión del cáncer. P53 está mutado en un alto porcentaje de cánceres.
- Recogemos los aspectos básicos para aplicar la tecnología de edición CRISPR/Cas9. Esta tiene grandes ventajas como su relativo bajo coste y su facilidad de uso. Por lo que su utilización en tratar el cáncer se ha ido expandiendo. Tanto en el modelado del cáncer, para estudiarlo y encontrar posibles remedios y como posible método de edición del genoma para curar cáncer u otras enfermedades genéticas.
- La edición de p53 con CRISPR/Cas9 es de gran interés en los estudios del cáncer. Como hemos visto, ésta puede ser bien para editar p53 salvaje en el modelado del cáncer y observar cómo se desarrolla a causa de alterar su función, o bien para editar el p53 mutante recuperando su función y tratar así el cáncer.
- Existen inconvenientes en la edición de genomas con CRISPR/Cas9 principalmente por la actividad de p53, a causa del corte producido en el genoma por la nucleasa Cas9. Para evitar éste problema se están desarrollando técnicas que no producen estas roturas, que son prometedoras por los resultados preliminares.
- Finalmente, CRISPR/Cas9 puede llegar a ser una gran solución en la lucha contra el cáncer. Si tenemos en cuenta a p53, habría que considerar el uso de técnicas sin DSB, para tener el menor riesgo posible al fallo de la terapia. Así como usar CRISPR/Cas9 para editar p53 mutante.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, Spandidos DA, Panayiotidis M, Christodoulou I and Zoumpourlis V. CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol*. 2018. 53:443-468.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA and Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007. 315:1709-1712.
- Biegging KT, Mello SS and Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014. 14(5): 359–370.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A and Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005. 151:2551–2561.
- Carroll, D. p53 Throws CRISPR a Curve. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018. 39(9): 783-784.
- Chira S, Gulei D, Hajitou A and Berindan-Neagoe I. Restoring the p53 ‘Guardian’ Phenotype in p53-Deficient Tumor Cells with CRISPR/Cas9. *Trends in Biotechnology*. 2018. 36(7): 653-660.
- Duffy MJ, Synnott NC and Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*. 2017. 83:258-265.
- DiCarlo JE, Chavez A, Dietz SL, Esvelt KM and Church GM. Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast. *Nat Biotechnol*. 2015. 33(12):1250-1255
- Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989. 57:1083–1093.
- Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017. 36(28): 3943–3956.
- Foronda M and Dow LE. CRISPR: Stressed about p53? *Trends in Molecular Medicine*. 2018. 24(9):731-733.
- Guernet A and Grumolato L. CRISPR/Cas9 editing of the genome for cancer modeling. *Methods*. 2017. 121-122:130-137.
- Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B and Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*. 2018. 24(7):927-930.
- Horvath P and Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010. 327(5962):167-70.
- Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, Kommineni S, Chen J, Sondey M, Ye C, Randhawa R, Kulkarni T, Yang Z, McAllister G, Russ C, Reece-Hoyes J, Forrester W, Hoffman GR, Dolmetsch R and Kaykas A. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2018. 24(7):939-946.
- Ishino Y, Krupovic M and Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol*. 2018. 200(7): e00580-17.

Jansen R, Embden JD, Gastra W and Schouls LW. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002. 43:1565–1575.

Jiang F and Doudna JA. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 2017. 46:505–29.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier EA. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012. 337:816–821.

Joerger AC and Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. 2(6):a000919.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ and Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013. 502: 333-339.

Kastenhuber E and Scott Lowe S. Putting p53 in context. *Cell.* 2017. 170 (6): 1062-1078.

Khan S, Mahmood MS, Rahman S, Zafar H, Habibullah S, Khan Z and Ahmad A. CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *J. Biomed Sci.* 2018; 25: 29.

Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z and Joung JK. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016. 529(7587):490-495.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016. 533(7603):420-4.

Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, García-Sandoval CD, Avilez-Bahena CM, Trejo-Reveles V, Muñoz-Soto RB and López-Camacho C. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad.* 2016. 5:116-128

Lane DP and Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 1979. 278:261–263.

Lawhorn IEB, Ferreira JP and Wang CL. Evaluation of sgRNA Target Sites for CRISPR-Mediated Repression of TP53. *PLoS One.* 2014. 9(11): e113232.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997. 88(3):323–331.

Lino CA, Harper JC, Carney JP and Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery.* 2018. 25 (1): 1234-1257.

Linzer DI and Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979.17:43–52.

Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI and Koonin EV. A putative RNA-interferencebased immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 2006. 1:7.

- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J and Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005. 60:174–182.
- Mojica MJ, Juez G and Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993. 9:613–621.
- Muller PAJ and Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell.* 2014. 25(3): 304–317.
- Niazi S, Purohit M and Niazi JH. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review. *Eur J Med Chem.* 2018. 158:7-24.
- Olivier M, Hollstein M and Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. 2:a001008.
- Pineda M, Lear A, Collins JP and S. Kiani S. Safe CRISPR: Challenges and Possible Solutions. *Trends Biotechnol.* 2018. S0167-7799(18)30263-4.
- Pourcel C, Salvignol G and Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005. 151:653–663.
- Ratan ZA, Son YJ, Haidere MF, Mahtab BMU, Yusuf MA, Zaman SB, Kim JH, Banu LA and Youl JC. CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. *Ther Adv Med Oncol.* 2018. 10: 1758834018755089.
- Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P and Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids.* 2011. 39:9275–9282.
- Sayin and Papagiannakopoulos T. Application of CRISPR-mediated genome engineering in cancer research. *Cancer Lett.* 2017. 28; 387:10-17
- Ventura A and Dow LE. Modeling Cancer in the CRISPR Era. *Annu. Rev. Cáncer Biol.* 2018. 2:111– 131.
- Wang Z and Sun Y. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl Oncol.* 2010. 3(1): 1–12.
- Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z and Hu W. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J Mol Biol.* 2017. 429:1595-1606.
- Zhan T, Rindtorff N, Betge J, Ebert MP and Boutros M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2018. pii: S1044-579X(17)30274-2.
- Zhang L, Jia R, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y, Humphrey M, Ban L, Ji Y, Jin H, Feng X and Zheng Y. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One.* 2015. 10 (3):e0120396.

Enlaces Web:

Amparo Tolosa. El Guardián del Genoma se convierte en el nuevo obstáculo para la edición del genoma mediante CRISPR. *Genética Médica*. 2018.

<https://revistageneticamedica.com/2018/06/13/p53-y-crispr-cancer/>.

CRISPRs web server. Université Paris- Sud 11. <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>. Información recopilada en enero 2019.

Lluís Montoliu. El penúltimo problema para las CRISPR se llama p53. *Naukas*. 2018.

<https://naukas.com/2018/06/12/penultimo-problema-las-crispr-se-llama-p53/>.

Tatiana DC. De Sanger a NGS, breve historia de la secuenciación del DNA. Una bióloga en la cocina. 2017. <https://unabiologaenlacocina.wordpress.com/2017/01/19/de-sanger-a-ngs-breve-historia-de-la-secuenciacion-del-dna/>.

Tomi Kilgore. CRISPR-related stocks sink after report that gene-editing technology might cause cancer. *MarketWatch*. 2018. <https://www.marketwatch.com/story/crispr-related-stocks-sink-after-report-that-gene-editing-technology-might-cause-cancer-2018-06-11>.