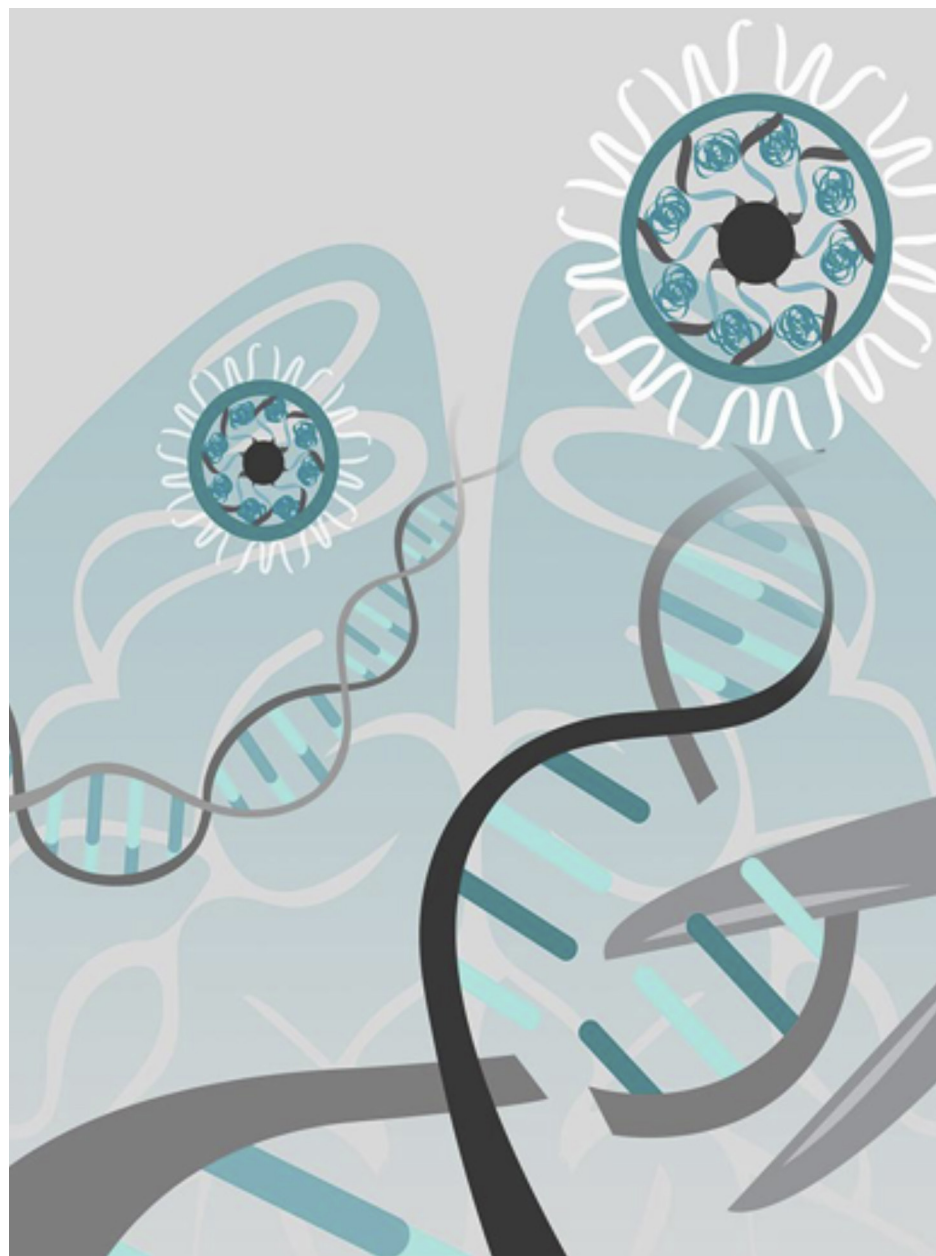


Disseny d'una eina d'edició genètica CRISPR per corregir la progèria. Disseny d'un ARN guia i uns iniciadors de PCR per aplicar aquesta tècnica

Presentació

La tecnologia CRISPR és una tècnica d'edició genètica que s'utilitza per modificar i editar el genoma de qualsevol cèl·lula inhabilitant o corregint un gen per aconseguir que la cèl·lula realitzi o deixi de realitzar una funció. Aquesta tècnica actualment és la més ràpida i precisa que existeix, tot i així de moment només es pot posar en pràctica en cèl·lules en cultiu. El realment innovador i sorprenent d'aquesta tècnica és que permet tallar l'ADN en un lloc molt concret i la mateixa cèl·lula és capaç de reparar la ruptura, aconseguint així que la cèl·lula adquireixi les propietats desitjades amb la finalitat de curar d'arrel una malaltia genètica, curar càncers o fins i tot eliminar la resistència als antibiòtics que tenen alguns bacteris. De fet, la tècnica és tan innovadora que les científiques que la van desenvolupar, Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna, l'any 2020 van guanyar el premi Nobel de Química. El principal objectiu del meu treball és justificar la correcció de la malaltia genètica de la progèria amb el disseny teòric dels elements moleculars que formen part de la tècnica CRISPR. Aquests són l'ARN guia i els iniciadors de PCR.



Metodologia

Vaig començar el treball coneixent una mica el tema de la tecnologia CRISPR per posar-me en context. Després vaig buscar la informació bàsica de l'ADN i els seus processos, ja que són la base per entendre la genètica molecular. Seguidament amb l'ajuda de la meua tutora em vaig informar i vaig entendre el CRISPR en bacteris i com a eina biotecnològica. En escollir la malaltia vaig haver de buscar-ne una amb els requisits necessaris perquè el CRISPR la pugui curar. En aquest pas vaig utilitzar molt el portal de la NCBI i la base de dades OMIM per tal de trobar tota la informació relacionada amb la malaltia i el component genètic que la provoca. El meu mentor m'ha anat ajudant en totes les etapes del procés però especialment en la d'escollir la malaltia i en dissenyar el CRISPR. En aquesta última etapa, a partir de tots els coneixements que ja tenia vaig dissenyar l'ARN guia i els iniciadors de PCR. Durant tot el procés he buscat informació en webs, vídeos i articles fiables.

Cos del treball

La tecnologia CRISPR té el seu origen en la resposta immunitària que generen els bacteris contra les invasions virals. A partir de l'estudi d'aquest sistema s'ha vist que la resposta immunitària que dona el bacteri quan entra un virus conegut es pot adaptar per utilitzar-se com a eina d'edició genètica.

La tècnica es basa en l'acció de dues molècules, l'àcid nucleic ARN guia i la proteïna Cas9, que formen el complex ARNguia-Cas9. Quan s'introdueix dins una cèl·lula, els components d'aquest complex començaran a realitzar les seves funcions, l'ARN guia complementarà amb la seqüència d'ADN diana i la proteïna Cas9 tallarà pel lloc on l'ARN ha indicat. L'impressionant d'aquesta tècnica és que en escollir una seqüència diana es pot dissenyar un ARN guia complementari que permet controlar el lloc concret del genoma on la Cas9 tallarà.

Quan es forma una ruptura en la doble cadena la cèl·lula es troba en perill i activa els mecanismes de reparació d'una ruptura en la doble cadena d'ADN. Els dos mecanismes més comuns a l'hora de reparar ruptures en l'ADN són la recombinació homòloga i recombinació no homòloga. La recombinació homòloga consisteix en la recombinació d'un segment homòleg a la cadena danyada amb la diferència que aquest té la mutació corregida, per tant quan les dues molècules s'entrecruen l'ADN quedarà corregit. Per altra banda, en la recombinació no homòloga la cèl·lula intenta reparar la ruptura afegint nucleòtids aleatoris per ajuntar la cadena. Aquest mecanisme normalment crea mutacions que fan disfuncional el gen.

La malaltia escollida per aplicar la tècnica CRISPR ha sigut la síndrome de la progèria de Hutchinson-Gilford. Aquesta malaltia provoca l'envelliment brusc i prematur de les persones que la pateixen. Això és degut a una mutació al gen LMNA que sintetitza la proteïna Lamina A. Aquesta és responsable de mantenir l'estructura

del nucli cel·lular estable, i la seva malformació deforma la cèl·lula provocant que aquesta es vagi danyant progressivament.

La part de recerca del treball és dissenyar els elements moleculars de la tècnica CRISPR per curar la malaltia de la progèria en cèl·lules en cultiu. El procediment que s'ha seguit per aconseguir aquest objectiu consta de dues parts. La primera part és la construcció del complex ARNg/Cas9. Per fer això es necessita la proteïna Cas9, i un ARN guia dissenyat especialment per a la mutació de la progèria. Aquest procés de disseny és molt important per al funcionament de la tècnica ja que l'ARN guia és la molècula que indica el lloc exacte de l'ADN per on ha de tallar la Cas9.

El segon pas és la selecció d'un segment d'ADN que serveixi com a plantilla per a la cèl·lula en el moment de reparar el dany que s'ha produït en el genoma. Per tal de disposar de moltes còpies del fragment i augmentar la probabilitat que alguna entri dins les cèl·lules i es recombinï amb l'ADN danyat, s'haurà de realitzar el procés de PCR. Per fer-lo es dissenyaran uns iniciadors de PCR per començar la síntesi. Els iniciadors també són els encarregats d'indicar la regió de l'ADN que s'amplificarà, per això estan dissenyats de manera específica, per determinar l'amplificació del segment d'ADN homòleg.

Conclusions

Amb aquest treball s'ha aconseguit descriure de manera sintetitzada les bases de la tecnologia CRISPR, com una tècnica que prové de la reacció natural del sistema immunitari bacterià i que la biotecnologia ha adaptat per tal que es pugui utilitzar per editar el genoma de qualsevol cèl·lula.

S'ha trobat una malaltia amb les característiques necessàries perquè sigui possible la seva correcció amb el CRISPR, és a dir, una malaltia monogènica i de substitució de pocs nucleòtids. La malaltia seleccionada ha sigut la progèria, una malaltia molt greu que provoca l'envelliment brusc i prematur dels infants que la pateixen.

S'ha posat en pràctica de manera simplificada i sobre la base dels fonaments teòrics del CRISPR una simulació de cura de la progèria que requereix una correcció d'una mutació gènica de substitució d'una citosina per una timina en el gen LMNA. La cura de la progèria s'ha aconseguit dissenyant un ARN guia de 23 nucleòtids. També s'han dissenyat els iniciadors de PCR *Forward* i *Reverse*, per dur a terme l'amplificació del fragment d'ADN homòleg a la cadena danyada.

S'ha comprovat que és possible el disseny de l'ARN guia específic per a la mutació de la progèria i també el disseny dels iniciadors de PCR per amplificar el segment homòleg del gen LMNA. Això significa que també és possible la correcció de la mutació que provoca la progèria de manera teòrica. Si se sintetitzessin els elements anteriors reals podria ser possible la cura de la progèria en cèl·lules en cultiu.

Les eines que s'han utilitzat per realitzar aquest treball han sigut totes gratuïtes i

d'ús públic, com la base de dades OMIM i el portal de la NCBI. Per tant, el disseny d'un ARN guia i uns iniciadors de PCR per corregir de manera teòrica una malaltia humana està a l'abast de tothom.

Bibliografia i bibliografia web

WEBS: *Anatomy of a Gene*. Learn.genetics. Recuperat 2020, <<https://learn.genetics.utah.edu/content/basics/geneanatomy/>> – Andersen, P. (2016). *What is CRISPR?*. Recuperat 2020, <<https://www.youtube.com/watch?v=MnYppmstxIs>> – Antama, Francis. «Aplicaciones y regulación del CRISPR». *Fundacion Antama*, 27 Aug. 2018, <<https://fundacion-antama.org/aplicaciones-y-regulacion-del-crispr-por-francis-mojica/>> – Álvarez Gómez, E. (2016). *¿Cómo funciona la PCR?*. Empíreo Diagnóstico Molecular. Recuperat 2020, <<https://www.empireo.es/como-funciona-pcr/>> – Coll-Bonfill, N. (2020). «Investigo para curar la progeria, el envejecimiento prematuro». *La Vanguardia*. Recuperat 2020, <<https://www.lavanguardia.com/lacontra/20200229/473829374947/investigo-para-curar-la-progeria-el-envejecimiento-prematuro.html>> – *CRISPR: Gene editing and beyond*. Nature. (2017). Recuperat 2020, <<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o>> – *Eukaryotic pre-mRNA processing | RNA splicing*. Khan Academy. Recuperat 2020, <<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/eukaryotic-pre-mrna-processing>> – Garrido Ramos, M. *Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)*. Universidad de Granada. Recuperat 2020, <<http://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>> – *Gene Structure*. California State Polytechnic University, Pomona. (2014). Recuperat 2020, <<https://elearning.cpp.edu/learning-objects/gene-structure/>> – *Genome Editing with CRISPR-Cas9*. McGovern Institute. (2014). Recuperat 2020, <<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8>> – *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome; HGPS*. OMIM. (2018). Recuperat 2020, <<https://omim.org/entry/176670>> – *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Medlineplus. (2020). Recuperat 2020, <<https://medlineplus.gov/genetics/condition/hutchinson-gilford-progeria-syndrome/>> – *Lamin*. Wikipedia. (2020). Recuperat 2020, <<https://en.wikipedia.org/wiki/Lamin>> – *Les mutacions*. Recuperat 2020, <http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO1erBAT/Genetica_molecular/Unitat_11_Les_mutacions1.pdf> – *Les proteïnes*. Xtec. Recuperat 2020, <<http://www.xtec.cat/ieslabisbal/salut/lesproteines.htm>> – Lo, E. (2017). *What is the PAM?*. Innovative Genomics Institute. Recuperat 2020, <https://www.youtube.com/watch?v=iSEEW4Vs_B4> – Menesini, M. (2015). *What happens when your DNA is damaged?*. Ted-Ed. Recuperat 2020, <https://www.youtube.com/watch?v=vP8-5Bhd2ag&feature=emb_title> – Morán, A. (2015). *¿Qué es la tecnología CRISPR/Cas9 y cómo nos cambiará la vida?*. Dciencia. Recuperat 2020, <<https://www.dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/>> – *Nucleic acids*. Khan Academy. Recuperat 2020, <

ne-expression-and-regulation/dna-and-rna-structure/a/nucleic-acids> - *Online Mendelian Inheritance in Man*. Wikipedia. (2020). Recuperat 2020, <https://en.wikipedia.org/wiki/Online_Mendelian_Inheritance_in_Man> - *Primary transcript*. Wikipedia. (2020). Recuperat 2020, <https://en.wikipedia.org/wiki/Primary_transcript> - *What are genome editing and CRISPR-Cas9?*. Medlineplus. (2020). Recuperat 2020, <<https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/genomeediting/>> - *What is PCR (polymerase chain reaction)?*. Yourgenome.org. (2016). Recuperat 2020, <<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>>

BASES DE DADES: - Portal NCBI: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> - Base de dades OMIM: <<https://omim.org/>> ARTICLES: - Paschal, B. M., Kelley, J. B. in *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second Edition), 2013, secció Lamin Genes <<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/lamin>> - Dittmer, T. A., Misteli, T. «The lamin protein family». *Genome Biol.*, 12, 222 (2011). <<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>> - Eriksson, M., Brown, W., Gordon, L. *et al.* «Recurrent *de novo* point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome». *Nature*, 423, 293-298 (2003). Extret de OMIM, inheritance i molecular genetics. - González Morán, M. (2013). *Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford. Causas, investigación y tratamientos farmacológicos*. Recuperat 2020, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X14700631>> - Hennekam R. C. M. 2006. «Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype». *Am J Med Genet Part A* 140A:2603-2624. Extret de OMIM, descripció. DOCUMENTS DE DOCÈNCIA: - Estudi de l'ADN i edició genètica. A. Fontarnau. Desembre 2019. - Document de la maduració de la progerina i la lamin A de l'Agustí Fontarnau.
