

Aplicaciones de CRISPR en la generación y síntesis de nuevos fármacos

Álvaro Quílez Borrachero

Resumen—CRISPR-Cas es una herramienta de edición genómica fundamentada en un mecanismo de defensa de bacterias frente a material genético exógeno. Esta herramienta, cuyos pilares son la enzima Cas9 u otras relacionadas y una cadena de ARN guía, permite la obtención en semanas o meses de resultados que con las herramientas de edición genética tradicionales podían tomar años. A esto hay que sumar que ofrece la posibilidad de realizar edición génica en contextos en los que antes era inviable. Es por ello que su uso ha favorecido el desarrollo de modelos de enfermedades, tanto en células como en animales, de gran utilidad en ensayos preclínicos, así como la identificación y validación de dianas de fármacos. Además, resulta de utilidad en la síntesis de proteínas recombinantes con acción terapéutica. No obstante, presenta algunas limitaciones, por lo que en ciertos casos no ha desplazado a otros métodos ya asentados.

Palabras Claves—CRISPR-Cas, Screening, Modelos celulares, Modelos animales, Factorías celulares, SWITCH.

1. INTRODUCCIÓN

CRISPR-Cas es una herramienta de edición genómica basada en un sistema de defensa de procariontes. Uno de los eventos clave en su desarrollo fue el descubrimiento de secuencias palindrómicas de 30 pares de bases, repetidas y separadas por espaciadores de 36 pares de bases en la arquea *Haloferax mediterranei* por el investigador Francisco J. M. Mojica en 1993. Años después, estas secuencias palindrómicas, repetidas en el genoma de bacterias, arqueas y mitocondrias, fueron nombradas como CRISPR (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Además, se observó que las secuencias espaciadoras provenían de material genético no perteneciente al organismo, sino de fuentes externas, como virus bacteriófagos. Estas secuencias forman parte del transcrito que guía a nucleasas asociadas a CRISPR como Cas9, permitiéndoles identificar y cortar el ADN de organismos invasores. A raíz de CRISPR y Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna presentaron en 2012 el sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica. Paralelamente, el equipo de Feng Zhang había estado trabajando en el uso de este sistema en células eucariotas, y fue en Enero de 2013 cuando se publicó su uso en la edición genómica de células de mamífero [1].

Desde entonces, la tecnología basada en CRISPR-Cas ha seguido en constante desarrollo y optimización. Su ortogonalidad, eficacia y rapidez, sumadas a su bajo coste en comparación con otras técnicas, ha supuesto una revolución en la edición genómica. La técnica se basa en el corte de la doble hebra de ADN diana por la endonucleasa Cas9 (u otra enzima) de forma específica. Esa especificidad la marca un ARN guía (sgRNA) diseñado en función de la secuencia diana. El corte es reparado por los mecanismos de reparación de la célula. Esta reparación puede darse por distintas vías (reflejadas en la figura 1): la unión

de extremos sin homología (estrategia seguida, por ejemplo, cuando se busca interrumpir un gen) o la reparación dirigida por homología (de gran utilidad a la hora de insertar secuencias en un locus específico) [2], [3].

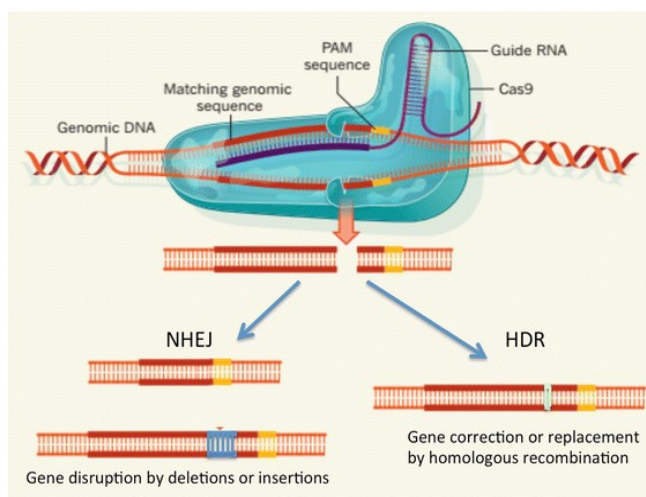


Fig. 1. Elementos del sistema CRISPR-Cas9 [4]. Siglas: NHEJ, unión de extremos sin homología. HDR, reparación dirigida por homología. PAM, Motivo Adyacente de Protoespaciador.

Además, existen variantes de Cas9 cuyo uso permite regular la expresión de un gen, bien sea inhibiéndola (CRISPRi) o aumentándola (CRISPRa), como puede observarse en la tabla 1 [3].

La versatilidad de esta tecnología hace que haya sido adoptada en diversidad de aplicaciones biotecnológicas, entre las que se encuentra la generación de fármacos. En esta revisión veremos ejemplos de su aplicación en la generación de plataformas de cribado de fármacos, la identificación de genes esenciales en patógenos que puedan servir como diana de antibióticos, y la generación y optimización de factorías celulares, útiles en la síntesis de algunos fármacos.

TABLA 1
COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DERIVADAS DE CRISPR

Característica	CRISPRn	CRISPRi	CRISPRa
Efecto	Knockout	Knockdown	Activación
Mecanismo	Delección o inserción causante de mutación	Interferencia transcripcional	Activación transcripcional
Diana	Cualquier región del genoma con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM

Siglas: CRISPRn, CRISPR nucleasa. CRISPRi, CRISPR inhibidor. CRISPRa, CRISPR activador. PAM, Motivo Adyacente de Protoespaciador.
Tabla Modificada De La Referencia [3].

2. GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES

Los cultivos de células humanas pueden dar lugar a modelos de enfermedades que sirvan como plataformas para realizar cribados de fármacos. La obtención de células pluripotentes a partir de células somáticas humanas adultas y su posterior diferenciación, publicada por primera vez por el equipo de Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka en 2007 ha sido uno de los grandes pasos en la generación de este tipo de modelos, ya que no presenta las limitaciones técnicas y la controversia ética del uso de células madres embrionarias. Otro de los avances importantes ha sido el desarrollo de CRISPR-Cas, que ofrece la posibilidad de generar modelos celulares de enfermedades a partir de células madre de una forma más sencilla que con otro tipo de métodos como las nucleasas con dedos de zinc o la recombinación homóloga [5].

Un ejemplo del empleo de modelos celulares generados con CRISPR para el cribado de fármacos ha sido la generación de una línea celular modelo de la enfermedad de Fabry, cuya causa es un defecto en el gen de la α -galactosidasa A (*GLA*). Para ello, se generaron knockouts para el gen *GLA* a partir de células HEK-293-T, lo que permitió el estudio de la farmacocinética de la α -galactosidasa A humana recombinante (*rha-GLA*) in vitro. También permitió la observación de que la coadministración de MG132, un inhibidor del proteasoma, junto con *rha-GLA* podía mejorar la eficacia del tratamiento [6].

Sin embargo, existen ciertos casos en los que el uso de CRISPR presenta limitaciones. Si bien la generación de knockouts se puede realizar en prácticamente cualquier célula, la generación de mutantes mediante reparación directa por homología es limitada en células humanas no mitóticas como las neuronas. Otra de las limitaciones aparece cuando se intentan generar interrupciones en genes que se encuentran en un gran número de copias, ya que la gran cantidad de roturas generadas puede dar lugar a una parada del ciclo celular [3].

3. GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES

Con CRISPR, es posible alterar varios genes en un solo paso, por lo que ratones mutantes en varios genes pueden ser rápidamente generados evitándose la necesidad

de la realización de cruzamientos. Por otro lado, al existir la posibilidad de editar directamente el cigoto, no es necesario la derivación y el cultivo de células madre embrionarias, el cual, hasta ahora, ha sido uno de los pasos limitantes en la generación de mutantes en ciertas especies. También evita la necesidad de realizar retrocruzamientos para añadir mutaciones adicionales a modelos de enfermedad preexistentes. La generación de modelos aplicando CRISPR puede ser llevada a cabo en meses o semanas, mientras que por otros métodos puede llevar años [3].

Además, es posible generar mutaciones somáticas en algunos tejidos de animales adultos mediante el uso de CRISPR-Cas. Por ejemplo, en un experimento se inyectó un plásmido con las secuencias de Cas9 y del sgRNA de los genes supresores de tumores *Pten* y *p53* para generar modelos de cáncer de hígado, obteniéndose un fenotipo similar al obtenido delecionando estos genes mediante la técnica Cre-LoxP [7].

4. IDENTIFICACIÓN DE DIANAS EN ORGANISMOS PATÓGENOS

El desarrollo de resistencia a antibióticos es un problema de gran importancia hoy día. Es por ello, que el descubrimiento de nuevos genes esenciales en organismos patógenos mediante estudios genómicos es de gran ayuda a la hora de encontrar dianas que puedan servir para el desarrollo de nuevos antibióticos. *Streptococcus pneumoniae* es una causa de mortalidad importante a nivel mundial, y los principales antibióticos utilizados contra esta son de la clase betalactámicos, que actúan sobre las proteínas de anclaje de penicilinas, esenciales para la síntesis de peptidoglicano y el mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, la resistencia a este tipo de antibióticos es muy frecuente [8].

Mediante el uso de CRISPRi, ha sido posible encontrar nuevos genes esenciales para la síntesis de peptidoglicano (MurT y GatD), así como genes responsables de la polimerización del ácido teicoico (TarP y TarQ), un ácido que se encuentra anclado a la membrana celular o unido covalentemente a peptidoglicano y es esencial para el mantenimiento de la forma de la célula. Muchos de los genes identificados como esenciales en los estudios genómicos presentan una función desconocida o hipotética, y se piensa que parte de estos genes están implicados en la síntesis de la pared celular.

En un estudio, se generó una genoteca con 348 genes previamente identificados como esenciales, se reprimió su función con CRISPRi y se observaron alteraciones en el crecimiento. Se utilizó la variante catalíticamente inactiva dCas9, que al unirse al extremo 5' del gen diana bloquea la transcripción. Para ello, se integraron en *S. pneumoniae* cepa D39 las secuencias que codificaban para el sgRNA de las dianas bajo el promotor constitutivo P3, y la secuencia de dCas9 bajo el promotor inducible *P_{lac}*. Se observaron alteraciones en el crecimiento y/o una mayor tasa de lisis tras la represión génica inducida en 254 de los casos. Al observar la morfología celular causada por la represión de algunos de los genes estudiados, se observaron similitudes con la morfología causada al reprimir

genes esenciales de función conocida por el mismo método. Con estos datos, junto a un análisis bioinformático, se pudieron identificar genes implicados en la síntesis de peptidoglicano y en la polimerización de ácido teicoico, además de validar la función de genes en los que previamente estaba catalogada como hipotética [8].

Estudios de fenotipado de alto rendimiento basados en CRISPRi han sido también realizados en *Bacillus subtilis* [9]. También se han identificado genes esenciales para parásitos apicomplejos con estudios realizados aplicando CRISPR-Cas9 en *Toxoplasma gondii* [10]. Se puede concluir que se trata de una valiosa herramienta para identificar la función de genes esenciales y por lo tanto de posibles dianas para antibióticos.

5. GENERACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE FACTORÍAS CELULARES

La fermentación llevada a cabo por levaduras o bacterias es una fuente de metabolitos, enzimas y diversas proteínas terapéuticas. Sin embargo, aunque su existencia no es algo nuevo, el desarrollo y la optimización de cepas es un proceso laborioso y que requiere mucho tiempo. Es por ello que el desarrollo de métodos que aceleren este proceso es de gran interés para industrias como la biotecnológica o la farmacéutica.

Tecnologías basadas en CRISPR-Cas pueden lograr este desarrollo de forma más rápida que los métodos tradicionales. Esto se debe a que la enzima Cas9 es capaz de modificar o introducir múltiples genes en un solo experimento de forma muy eficiente, y a las opciones de regulación que permiten variantes como dCas9 [11], [12].

Investigadores de la Technical University of Denmark han desarrollado el sistema SWITCH. Este método está basado en Cas9/dCas9, y con él se han generado factorías de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de producir naringerina, un flavonoide con capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolemiante [13] y antiviral [14], [15]. Además, la técnica ha permitido optimizar el proceso reduciendo la expresión del gen esencial TSC13, responsable de la formación de un subproducto cuya vía biosintética compite con la de la naringerina. SWITCH se basa en ciclos de cuatro pasos que implican: (1) la integración de genes *cas* en loci específicos, (2) la ingeniería genética catalizada por Cas, (3) el reemplazo de *cas* por *dcas* y (4) alteración de la expresión mediada por dCas [11]. Este prometedor método podría aplicarse a cepas de levadura ya utilizadas para producción de compuestos, así como a otras especies.

6. CONCLUSIONES

La tecnología basada en CRISPR puede suponer una revolución para la edición genética. Entre sus muchas aplicaciones, cabe destacar su papel en la investigación farmacéutica y el desarrollo de fármacos. Esto se debe a que puede acelerar el descubrimiento, la validación y el testeo de nuevos fármacos al optimizar la generación de nuevos modelos animales y celulares, así como la identificación de nuevas posibles dianas en organismos patógenos co-

mo *S. pneumoniae* o *T. gondii*. Además, resulta de gran utilidad en la síntesis de compuestos terapéuticos al permitir la generación y optimización de factorías celulares con sistemas como SWITCH.

Sin embargo, esta tecnología no está exenta de limitaciones y para determinadas aplicaciones aún no ha desplazado a otras técnicas, por lo que aún existe margen de mejora para su optimización.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. S. Lander, "The Heroes of CRISPR," *Cell*, vol. 164, no. 1–2, pp. 18–28, 2016, doi:10.1016/j.cell.2015.12.041.
- [2] S. Shen, T. J. Loh, H. Shen, X. Zheng, and H. Shen, "CRISPR as a Strong Gene Editing Tool," *BMB Rep.*, vol. 50, no. 1, pp. 20–24, 2017, doi:10.5483/BMBRep.2017.50.1.128.
- [3] C. Fellmann, B. G. Gowen, P.-C. Lin, J. A. Doudna, and J. E. Corn, "Cornerstones of CRISPR–Cas in Drug Discovery and Therapy," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 2, pp. 89–100, 2016, doi:10.1038/nrd.2016.238.
- [4] Z. Tu, W. Yang, S. Yan, X. Guo, and X.-J. Li, "CRISPR/Cas9: a Powerful Genetic Engineering Tool for Establishing Large Animal Models of Neurodegenerative Diseases," *Mol. Neurodegener.*, vol. 10, no. 1, p. 35, Dec. 2015, doi:10.1186/s13024-015-0031-x.
- [5] J. L. Freiermuth, I. J. Powell-Castilla, and G. I. Gallicano, "Towards a CRISPR picture: Use of CRISPR/Cas9 to Model Diseases in Human Stem Cells in Vitro," *J. Cell. Biochem.*, no. May 2017, 2017, doi:10.1002/jcb.26162.
- [6] H.-Y. Song et al., "Using CRISPR/Cas9-Mediated GLA Gene Knockout as an In Vitro Drug Screening Model for Fabry Disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 12, Dec. 2016, doi:10.3390/ijms17122089.
- [7] W. Xue et al., "CRISPR-mediated Direct Mutation of Cancer Genes in the Mouse Liver," *Nature*, vol. 514, no. 7522, pp. 380–4, Oct. 2014, doi:10.1038/nature13589.
- [8] X. Liu et al., "High-throughput CRISPRi Phenotyping in *Streptococcus pneumoniae* Identifies New Essential Genes Involved in Cell Wall Synthesis and Competence Development," *Mol. Syst. Biol.*, pp. 1–18, 2017, doi:10.15252/msb.20167449.
- [9] J. M. Peters et al., "A Comprehensive, CRISPR-based Functional Analysis of Essential Genes in Bacteria," *Cell*, vol. 165, no. 6, pp. 1493–1506, Jun. 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.05.003.
- [10] S. M. Sidik et al., "A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes," *Cell*, vol. 166, no. 6, pp. 1423–1435.e12, 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.08.019.
- [11] K. G. Vanegas, B. J. Lehka, and U. H. Mortensen, "SWITCH: a dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, p. 25, 2017, doi:10.1186/s12934-017-0632-x.
- [12] A. A. Dominguez, W. A. Lim, and L. S. Qi, "Beyond Editing: Repurposing CRISPR–Cas9 for Precision Genome Regulation and Interrogation," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 5–15, Dec. 2015, doi:10.1038/nrm.2015.2.
- [13] O. Benavente-García and J. Castillo, "Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 15, pp. 6185–6205, Aug. 2008, doi:10.1021/jf8006568.
- [14] J. Goldwasser et al., "Naringenin Inhibits the Assembly and

Long-term Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles through a PPAR-mediated Mechanism," *J. Hepatol.*, vol. 55, no. 5, pp. 963–971, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.011.

- [15] S. Frabasile et al., "The Citrus Flavanone Naringenin Impairs Dengue Virus Replication in Human Cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 41864, Feb. 2017, doi:10.1038/srep41864.



Álvaro Quílez Borrachero recibió el título de Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2013. Actualmente es estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.