



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL
DESARROLLO DE TRATAMIENTOS BASADOS EN LA
TERAPIA GÉNICA**

Autor: María Tarilonte Fernández

Tutor: Óscar Escribano

Convocatoria: Junio 2017

RESUMEN

La alta prevalencia de enfermedades de origen genético nos está obligando a estudiar y desarrollar técnicas de escisión del genoma cada vez más específicas y seguras. Así como vectores que sean capaces de contener el transgén por el cual se va a sustituir el gen defectuoso que sean capaces de llegar a su lugar de acción y no producir problemas de inmunogenicidad. Estas técnicas de edición del genoma se están utilizando sobre todo en enfermedades monogénicas. En el cáncer, al ser una enfermedad poligénica este tipo de técnicas han encontrado una mayor dificultad.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

¿Qué es la terapia génica?

La terapia génica se trata de una modalidad terapéutica mediante la cual se inserta, se elimina o se sustituye un determinado gen en las células de un paciente para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. La terapia génica se puede llevar a cabo tanto *in vivo* como *ex vivo*. [1]

Las terapias *ex vivo* se basan en la capacidad para aislar células diferenciadas, progenitores o células madre de un paciente para generar un injerto estable en el mismo. Una de las posibilidades que nos ofrece este tipo de terapias es el poder manipular las células *in vitro* para su corrección génica. [1]

Este tipo de terapias se han visto favorecidas respecto a las terapias *in vivo* porque los protocolos para llevarlas a cabo son más eficaces y seguros debido a que no hay que exponer al paciente directamente al vector que contiene el transgén y además que las células que contienen el vector pueden ser seleccionadas, expandidas y/o diferenciadas antes o después que se realice la transferencia génica. [1]

Tipos de terapia génica (Según el tipo de enfermedad a tratar se selecciona un tipo de terapia génica u otro):

- **Adición génica:** consiste en la introducción de una copia correcta del gen funcional para conseguir la expresión de la proteína deficiente en el paciente en un tejido específico. La expresión de la proteína debe alcanzar un nivel adecuado para restaurar el fenotipo sano en el paciente.

- **Supresión génica:** en este caso, se elimina (modelo knockout) o reduce (modelo knockdown) por ejemplo, utilizando ARNs de interferencia, la expresión de un determinado gen endógeno o exógeno. Su aplicación es útil, por ejemplo en algunos tipos de cánceres, en los cuáles se sobreexpresan ciertas proteínas.
- **Reparación génica:** se basa en la sustitución completa o parcial del gen alterado por el gen correcto. La restauración del fenotipo se puede llevar a cabo o bien sustituyendo completamente el gen endógeno defectuoso por una copia funcional mediante recombinación homóloga, un proceso que de manera natural ocurre con baja eficiencia en las células; o bien mediante el intercambio de nucleótidos mutados de la secuencia del gen por los nucleótidos correctos para así generar una copia funcional del gen. Esta última aproximación sólo es útil para la corrección de enfermedades monogénicas. Este tipo de terapia génica es lo que realmente se conoce como procesos de edición del genoma. [1]

¿Qué es la edición del genoma?

En la actualidad las técnicas de ingeniería genética más populares aplican enzimas/complejos (endonucleasas) de corte de ADN que generan cortes de doble hebra dirigidos, es decir, en sitios específicos. Posteriormente estos cortes son reparados por las células huésped, bien sea por NHEJ (reparación por unión de extremos no homólogos) o por la ruta de reparación de doble hebra basada en la recombinación homóloga (RH) utilizando como molde el transgén.

- **Reparación por unión de extremos no homólogos NHEJ:**
Se trata de un método rápido y eficiente de reparación de DSBs (double strand break o cortes de doble hebra) que implica la ligación de los dos extremos de ADN formados tras la DSB y representa la ruta predominante de reparación de DSBs en mamíferos, ocurriendo en una relación de 1000:1 frente a la RH. La maquinaria proteica de la ruta de NHEJ permite que los extremos se ligan enzimáticamente para completar el proceso de reparación.
A pesar de ser un mecanismo de reparación eficaz, el NHEJ innato no utiliza la secuencia homóloga para restaurar la DSBs, por lo que, con frecuencia se introducen errores consistentes en deleciones o inserciones de nucleótidos. Este hecho hace que cuando se induce una DSB mediante el uso de nucleasas se

pueden generar INDELS (Small insertions and deletions) que alteren el marco de lectura del gen diana, y, por tanto, de lugar a una proteína truncada.

La principal aplicación que tiene la reparación por NHEJ es la eliminación de genes o generación de knockouts (interrupción del gen diana).

- **Recombinación homóloga (RH):**

La recombinación homóloga (RH) es uno de los mecanismos de reparación que se enmarcan dentro de la reparación por homología directa (RHD) junto con el SSA (single-strand annealing) y BIR (break-induced replication) pero, mientras que estos dos últimos mecanismos son mutagénicos, la RH es una reparación conservativa de la DSB. A diferencia de NHEJ, la reparación de dobles roturas mediada por RH implica el uso de un molde de ADN con homología.

La principal aplicación de la RH es la adición génica dirigida y reparación génica. Antes de la existencia de la tecnología de las nucleasas ya se utilizaba la RH para introducir un fragmento en un sitio específico del genoma. Sin embargo, este proceso es altamente ineficiente. La introducción de DSBs en un sitio específico del genoma aumentó de 100 a 10.000 veces la frecuencia de integración de ADN en un gen diana determinado. De este modo el uso de nucleasas de diseño ha permitido la generación de DSBs y la corrección específica del genoma cuando éstas son reparadas por RH favorecida gracias a la introducción adicional de ADN molde (transgén introducido gracias a un vector). [1]

CARACTERÍSTICAS DE LAS NUCLEASAS Y TIPOS:

La aplicación más frecuente de las endonucleasas es conocer la función de los genes a través de la inactivación del gen diana. Además se puede aprovechar la ruptura del DNA de doble cadena para repararlo a través de la recombinación homóloga. Estos nuevos métodos de ingeniería genética a través de nucleasas tienen un gran potencial para la cura de enfermedades monogénicas. [2]

Entre las herramientas de escisión del genoma más importantes se incluyen las meganucleasas (MNs), las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), TALENs (transcription activator-like effector nuclease) y CRISPR/Cas9. Todos ellos pueden lograr

modificaciones precisas mediante la producción de roturas del ADN de doble hebra (DSB). Dependiendo de la fase del ciclo celular, así como la presencia o ausencia de una plantilla de reparación de regiones terminales homólogas, el DSB puede ser reparado por NHEJ o RH. NHEJ puede dar lugar a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura que suelen conducir a la interrupción del gen o knockout de genes y/o la producción de proteínas no funcionales. Por el contrario, cuando se introducen plantillas de DNA de una o dos cadenas con secuencias homólogas que corresponden a secuencias que flanquean el sitio de rotura en la región de ADN a reparar, la lesión se puede reparar usando la maquinaria de RH. [3] [4] [5] [6] [7]

Es muy importante a la hora de usar estas herramientas de escisión del genoma la posibilidad de escisión del genoma en sitios no dirigidos. Este tipo de sucesos pueden ser letales o bien generar mutaciones indeseadas, para evitar estos problemas se ha de hacer un cribado extensivo para identificar las células en las cuales se van a producir las modificaciones específicas y en el sitio deseado. Se realizan pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* de estos reactivos incorporando interruptores reguladores que puedan reducir la actividad de los reactivos fuera de su destino y/o permitir que los reactivos se “enciendan o apaguen”. [8] [9] [10] [11] [12]

Los reactivos de escisión del genoma requieren componentes para reconocer un sitio diana del ADN donde llevar a cabo su acción de manera específica.

En general las herramientas de edición del genoma que generan fragmentos en la doble hélice del DNA y que posteriormente son reparados por el sistema de recombinación homóloga se dividen en dos grupos según su mecanismo de acción:

- El primer grupo está compuesto por MNs, ZFNs y TALENs, cuyo mecanismo de unión a la secuencia de DNA específico es a través de interacciones proteína-DNA.
- El segundo grupo está compuesto por dos subgrupos: CRISPR / Cas9 y targetrons, que son sistemas guiados por ARN. [2]

OBJETIVOS

Realizar una revisión sobre los tipos de nucleasas usadas para la escisión del genoma, centrándonos en sus principales características, innovaciones en su composición y mecanismo de acción y usos actuales. Además también profundizaré en dos tipos de vectores con mucho potencial terapéutico que son los liposomas (vector no viral) y los virus adenoasociados (AAVs).

METODOLOGÍA

Para este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de distintos artículos encontrados en bases de datos entre las que se encuentran Pubmed, Science direct y ResearchGate entre otras, así como dos tesis doctorales. Algunas de las palabras clave utilizadas para ello fueron; terapia génica dirigida, meganucleasas, ZFN, CRISPR/Cas9, TALENs, adeno associated virus, lipoplexes, terapia génica dirigida, liposomas, vectores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MEGANUCLEASAS

Las meganucleasas (MNs) o endonucleasas homing son endonucleasas naturales de dsDNA que reconocen un sitio altamente específico y largas secuencias de ADN de 12-45 bp. Originalmente son codificadas por intrones o inteínas, actuando dentro de la propia célula que las sintetizan. [13]

La mayor limitación en el uso de meganucleasas es que sólo pueden ser diseñadas frente a algunas regiones que deben contener en el locus diana el sitio específico de corte del ADN. [1]

A pesar de que se han identificado varios cientos de MNs naturales, los sitios que reconocen el ADN no cubren ni con mucho todo el genoma humano, por lo que es prácticamente imposible encontrar un sitio de corte de MGN natural en una región genómica predeterminada. [1]

Uno de los objetivos para expandir el uso de las meganucleasas es su reestructuración para que sean capaces de reconocer otros sitios específicos del DNA. Esta reestructuración se puede llevar a cabo usando varias estrategias tales como el diseño de la estructura mediante ordenador, intercambio de dominio, combinado con la

visualización de la superficie de la levadura para la detección eficiente de HEases con especificidades de secuencia deseadas. [14]

Las MNs se han subdividido en 5 familias diferentes una de las mejor estudiadas y utilizada como herramienta de edición del genoma ha sido la familia LADLIDADG.

Un inconveniente esencial para esta clase de enzima es su configuración no modular. Las funciones de reconocimiento y escisión del ADN pueden estar, en parte, en un único dominio proteico. Por lo tanto, la ingeniería de MNs ha sido un reto y ha dado lugar al desarrollo de otras herramientas de edición. [15]

Recientes estudios sugieren que hay múltiples puntos de la proteína LADLIDADG que pueden estar involucrados en la retención de iones metálicos en posiciones adecuadas que facilitan la escisión. Este hallazgo junto con otros como la superficie de levadura de visualización-SELEX, nos permitirán en un futuro diseñar MNs más eficientes. [16]

Se ha diseñado una meganucleasa modular de una sola cadena, conocida como megaTAL, en la que la región de unión al DNA es un factor activador de la transcripción (TAL) que se unirá a un sitio específico del DNA y producirá la escisión del genoma. [17]

En una versión sintética mejorada de una MNs se ha separado la actividad endonucleasa y las actividades de unión al ADN. Las aplicaciones terapéuticas que exigen precisión con respecto a la actividad de modificación genética pueden ser abordadas gracias al diseño de este tipo de MNs manipuladas, ya que son consideradas como “tijeras moleculares”. [18]

Recientemente se ha diseñado una meganucleasa conocida como “MegaTev” en la que se han fusionado dos dominios de diferentes meganucleasas generándose una meganucleasa dual. Uno de los dominios es el de unión al ADN y corte que proviene de una meganucleasa (Mega, I-OnuI) el otro dominio nucleasa derivada de GIY-YIG HEase (Tev, I-TevI). Esta proteína fue diseñada para posicionar los dos dominios de corte ~ 30 pb separados en el sustrato de ADN y generar dos DSBs para una interrupción del gen más eficiente. [19]

Similar al concepto de MegaTev, Wolfs et al. han diseñado otra nucleasa dual, en la que el dominio de la endonucleasa Tev está unido al dominio de nucleasa Cas9, conocido como TevCas9. Se ha demostrado que esta nucleasa híbrida, cuando se introduce dentro de células de riñón embrionarias humanas (HEK293) junto con ARN guía apropiado, suprime de 33 a 36 pb del sitio diana, creando así dos roturas de ADN no compatibles a frecuencias moderadamente más altas (40%),

Por lo tanto, esta endonucleasa doblemente diseñada también promete favorecer los eventos de edición del genoma (es decir, introducir mutaciones) evitando la creación de extremos "pegajosos" compatibles que conducen a un intento fallido de edición del genoma. [20]

ZFNs

Los últimos avances en las herramientas de edición del genoma intentan ser más flexibles a la hora de reconocer sitios específicos del DNA mediante un diseño modular que está compuesto por un dominio de corte de DNA (que puede ser no específico) distinto al dominio de unión al DNA. De ahí surgieron los ZFNs. [21]

Las ZFNs son endonucleasas artificiales que se han sintetizado combinando un dominio de unión / reconocimiento de ADN (Cys2His2) que se trata de un dedo de cinc pequeño (ZF: ~ 30 aminoácidos) a un dominio de escisión de ADN inespecífico del tipo IIS de la enzima de restricción FokI (acción endonucleasa). [21]

Los dedos de Zinc pueden ser modificados para que reconozcan una secuencia específica del DNA de un genoma completo. Una vez reconocida la secuencia, actuaría el dominio de escisión inespecífico compuesto por la enzima FokI. Para poder ejercer su acción de escisión del genoma FokI requiere dimerización, por lo tanto son necesarias un par de ZFNs para que reconozcan sitios de ADN no palindrómicos. [21]

Como cada módulo ZF reconoce 3 pb, se necesitan varios dedos de zinc en cada monómero ZFN para reconocer y unirse a secuencias más largas del DNA. [21]

En el pasado, utilizando el diseño basado en la estructura, se diseñaron dos variantes de ZFN capaces de escindir el DNA de una manera eficiente sólo cuando se apareaban como un heterodímero, potenciando así la especificidad y la capacidad de usar las ZFNs como herramientas de edición génica. [22]

En un estudio diferente pero también basado en el diseño estructural, utilizando modelos de proteínas en 3D y cálculos de energía a través de programas informáticos, los investigadores han identificado residuos dentro de FokI potencialmente responsables de la dimerización ZFN. Estos ZFN recién diseñados se consideran significativamente menos genotóxicos (es decir, escisión en los sitios de destino) en los estudios llevados a cabo en células, ya que la homodimerización podría prevenirse disminuyendo la energía de dimerización, evitando así la activación de FokI dímérico. [23]

Aparte del uso que tienen las ZFNs como herramientas de edición del genoma, en la actualidad se están utilizando como una potente terapia antiviral en la inactivación de co-receptores específicos, por lo tanto, protegen las células de la entrada viral con el fin de establecer la infección. A pesar de que ZFNs han mostrado resultados impresionantes en la modificación de la proteína de superficie del co-receptor CCR5 del VIH en los linfocitos T CD4 autólogos de las personas infectadas con VIH, todavía existe el riesgo de escisión en sitios ectópicos debido a la arquitectura modular de ZFNs y la naturaleza no-específica de FokI. [24] [25] [26]

Se ha diseñado un híbrido entre la proteína artificial de dedo de zinc (AZP) y una nucleasa de estafilococo (SNP) dando lugar al híbrido (AZP-SNase) para potenciales terapias antivirales. Esta nucleasa artificial puede unirse y escindir de manera específica una secuencia implicada en la replicación del virus del papiloma humano tipo 18 (HPV-18), inhibiendo así la replicación viral en células de mamíferos. Sin embargo, una desventaja de esta nucleasa híbrida es que se ha demostrado que la nucleasa estafilocócica escinde tanto el ARN de cadena sencilla como de doble cadena, así como el ADN del huésped (simple o bicatenario). Otra modificación que implicó la conmutación del resto SNase en la AZP-SNase al dímero FokI de cadena sencilla (scFokI) dio lugar a la escisión únicamente del ADN viral. Por lo tanto, se espera que este nuevo híbrido ZFN sirva como un nuevo reactivo antiviral para inactivar los virus de ADN humano con menos efectos secundarios. [27] [28]

Una de las modificaciones que se ha llevado a cabo ha sido unir AZP-SNase al dímero FokI de cadena sencilla (scFokI) siendo capaz de escindir únicamente el DNA viral. Por lo tanto, se espera que este nuevo híbrido ZFN sirva como un nuevo reactivo antiviral para inactivar los virus de ADN humano con menos efectos secundarios. [28]

TALENs

TALENs son endonucleasas artificiales formadas mediante la fusión del dominio de unión al DNA (compuesto por múltiples repeticiones de secuencias de 34 aminoácidos obtenidos de la proteína TAL (transcripción activadora-como) efector (TALE) al dominio de escisión de la endonucleasa FokI. Cada repetición TALE reconoce de manera independiente su correspondiente nucleótido a través de dos residuos variables [denominados los di-residuos de repetición variable (RVD)] de manera que las repeticiones representan linealmente la secuencia de nucleótidos del sitio de unión. [29]

A pesar de los desajustes que se producen por los TALENs in vitro, parecen tener una mayor capacidad de edición del genoma y ser menos tóxicos que los ZFNs. [30]

Los TALENs pueden ser rediseñados para unirse a secuencias definidas por el usuario simplemente uniendo unidades de repetición apropiadas. Al igual que los ZFN, los TALENs son de naturaleza dimérica; esto requiere el diseño de dos módulos independientes de unión al ADN para dirigirse a una única secuencia. Una ventaja que presentan los TALENs es que para dimerizarse tienen una especificidad mejorada, lo que nos permite que únicamente se dimericen para las secuencias específicas a las que se tienen que unir y así poder llevar a cabo su mecanismo de acción sin producir escisiones del genoma que no les correspondían siendo así menos genotóxicos. [30]

A pesar de que la enzima FokI es útil por su gran flexibilidad a la hora de escindir distintos sitios diana, esto también supone una desventaja ya que aumenta la probabilidad de escisión del genoma en sitios a la que no iba dirigida. [31]

Como alternativa al uso de FokI, se crearon nucleasas Tev-TALE monoméricas (Tev-mTALENs). Aquí, el dominio de la nucleasa monomérica específica de la secuencia de la HEasa I-TevI se fusiona con TALEs. Por tanto, sólo se necesita un único módulo de unión al ADN para dirigir una secuencia para la escisión. Sin embargo, el uso de un dominio con requisitos de reconocimiento predeterminados, como TevI, limita significativamente la gama de objetivos genómicos. [32]

CRISPR/Cas9

Los componentes derivados del sistema de "inmunidad" bacteriana, el locus CRISPR y la endonucleasa inespecífica Cas9 (CRISPR / Cas9), forman una nueva endonucleasa guiada por ARN para la orientación de genes precisa y eficiente. La singularidad de esta

estructura se basa simplemente en el diseño de ARN guía (gRNAs) esencialmente sirviendo como ARN CRISPR (CRRNAs) que están unidos por la nucleasa Cas9. [33]

Los CRISPR son loci de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Tras cada repetición siguen segmentos cortos de "ADN espaciador" proveniente de exposiciones previas a un virus. Se encuentran en aproximadamente el 40% de los genomas bacterianos y en el 90% de los genomas secuenciados de las arqueas. Con frecuencia se hallan asociados con los genes Cas, que codifican para proteínas nucleasas relacionadas con los CRISPR. El sistema CRISPR/Cas es un sistema inmune procariótico que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos y 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. [33]

El sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes (agregando, interrumpiendo o cambiando las secuencias de genes específicos). Al administrar la proteína Cas9 y los ARN guía apropiados a una célula, el genoma de esta puede cortarse en los lugares deseados, cuyas secuencias serán complementarias a las de los ARN guía utilizados. [34]

Inicialmente, los gRNAs se expresaron por separado como ARN CRISPR transactivante (tracrRNA) y la secuencia de crRNA "diseñada por el usuario", ambos sintetizados químicamente para el direccionamiento eficaz y la escisión de una secuencia dentro del gen de interés. Por razones de simplicidad, tanto el crRNA y tracrRNA se expresan como una única construcción conocida como guía simple de ARN (sgRNA). Cas, sin embargo, no necesita de ninguna modificación para poder llevar a cabo su función de escisión del genoma. El emparejamiento de bases complementarias permite que un segmento de la secuencia de gRNA (~ 18-20 nt) se hibride con la secuencia de ADN diana y por lo tanto acoplamiento de la nucleasa Cas9 en ese lugar. [35]

Mediante el diseño de diversos gRNAs, este sistema puede utilizarse para la mutagénesis dirigida induciendo la vía NHEJ o puede aplicarse para reparar o reemplazar alelos utilizando el mecanismo celular de reparación de HR con la presencia de una plantilla de corrección de ADN proporcionada por el investigador. [35]

Una versión modificada de la Cas9 ARN-guiado se ha desarrollado orientada a las secuencias reguladoras del genoma para permitir la manipulación de la expresión génica de una forma más eficiente. Para este propósito, una versión deficiente de la nucleasa de la proteína Cas9 se ha generado por la mutación de las posiciones H840A en el dominio H-N-H y D10A en el dominio RuvC. Esta variante se conoce como "dead" Cas9 o dCas9. La unión al ADN no se ve afectada por esta proteína modificada. Por lo tanto, el silenciamiento de genes (conocido como CRISPR interferencia o CRISPRi) o la activación de genes puede ser posible mediante la fusión de dCas9 con diversos dominios efectores. [36]

En un estudio reciente, se monitorizaron las señales de fluorescencia producidas por GCaMP (un GFP sensible al calcio modificado) en células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs) para determinar si CRISPRi, basado en el dCas9 guiado por ARN que se dirigía a unirse a una secuencia promotora específica, puede ser inhibido cuando se añade doxiciclina. La expresión de los componentes CRISPRi está bajo el control del elemento Tet-respuesta (TRE), por lo que la doxiciclina actúa como un inductor para la proteína reguladora que interactúa con el TRE. Los investigadores encontraron que la expresión de GCaMP se inhibía en un 98% después de la adición de doxiciclina durante 7 días. Sin embargo, la expresión se restauró completamente después de eliminar la doxiciclina durante 14 días. Este estudio demostró que la interacción con el RNA es reversible con las versiones modificadas de "dCas9" siendo una importante alternativa frente al RNAi, que puede ser aplicado para inhibir la expresión de un gen pero no puede ser revertida su acción. [37]

dCas9 también se ha utilizado como un bloque de construcción para ARN-guiado FokI nucleasas, por lo tanto dCas9 también tiene aplicaciones en la edición del genoma. Aquí, el dCas9 y su sgRNA que se combina con FokI, que sirve como el componente nucleasa. Este reactivo requiere una dimerización que es provocada por las proteínas de fusión FokI-dCas9 que son reclutadas a secuencias adyacentes al sitio diana por dos gRNAs. [38]

La edición múltiple del genoma es posible con CRISPR/Cas9 y los requerimientos PAM de Cas9 no suponen una gran limitación a la hora de elegir la secuencia de escisión ya que PAM son secuencias bastante cortas. Sin embargo existe la posibilidad de que se produzcan escisiones de secuencias que no entran dentro de los objetivos. Para evitarlo se han construido cas9 Casosas y modificaciones de gRNA, como gRNA

truncado (tru-gRNA), y han mostrado resultados prometedores con respecto a la reducción de las actividades fuera de destino. [39]

Otra innovación reciente ha sido el aislamiento de una nueva proteína CRISP, Cpf1, que es una nucleasa CRISP, pero no Cas9.

Se ha visto que Cpf1 genera rupturas escalonadas de doble hebra, dando lugar a 'extremos pegajosos' en sitios específicos, característica que no posee Cas9. La producción de 'extremos pegajosos' y la programación del sistema CRISPR/Cpf1 endonucleasa hacen que este reactivo sea adecuado para desarrollar estrategias de ensamblaje de DNA. Cpf1 necesita una secuencia T-rich PAM, haciendo este reactivo adecuado para segmentar secuencias T-rich dentro de los genomas. Además parece ser que Cpf1 tiene una mayor especificidad inherente que las formas que están por ahora disponibles de Cas9. [40]

Una variante de Cas9, que ha sido descubierta en *Staphylococcus aureus*, es considerablemente más pequeña que otras Cas9 bacteriana. Esto representa una mejora ya que permite el diseño de vectores más compactos que se acomodan más fácilmente dentro de los sistemas de administración basados en virus más eficaces para aplicaciones in vivo o ex vivo. [41]

El desarrollo de la "especificidad mejorada" SpCas9 (eSpCas9) mediante ingeniería genética de proteínas con secuencias que se dirigen a un sitio específico ha mostrado una disminución en la inserción-delección de pares de bases fuera del sitio específico, contribuyendo así a una mejora significativa sobre la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). En este estudio se diseñaron SpCas9 mutantes sustituyendo 32 residuos positivos, responsables del reconocimiento de la ranura de los nucleótidos con un residuo individual de alanina. A continuación, después de utilizar una secuencia guía previamente validada, estos mutantes eSpCas9 de aminoácidos individuales se ensayaron en cuanto a su especificidad dirigiéndolos al sitio diana EMX1 en células de riñón embrionario humano (HEK). Con estas versiones mejoradas, se ha demostrado que la especificidad de la formación de INDELS en los sitios diana se mejora en un factor de 2 a 5. [42]

AAVs

- **Introducción:**

El virus adeno-asociado (AAV) ha surgido como un vector de administración de genes altamente prometedor debido a su baja inmunogenicidad y capacidad para mediar la expresión génica persistente en células no divisorias. Se ha visto el potencial de AAVs en varios ensayos clínicos como el de la hemofilia B, la amaurosis congénita tipo II, VII, VIII de Leber, corionemia y la deficiencia de lipoproteína lipasa, la última de las cuales obtuvo la aprobación regulatoria en la Unión Europea en 2012. Además de su creciente potencial terapéutico como vehículo para la liberación génica, AAV puede servir como molde donante para la recombinación homóloga (RH). De hecho, el genoma del vector de AAV está dotado de la sorprendente capacidad de estimular RH con eficacias que exceden los sistemas donadores de plásmidos convencionales u otros vectores virales. Hasta la fecha, este método, denominado orientación genética mediada por AAV, ha permitido la introducción de una amplia gama de modificaciones genómicas en células de mamíferos, tanto in vitro como in vivo. Junto con nucleasas dirigidas, que pueden mejorar aún más la eficiencia de la RH mediante la generación de DSBs. [43]

Los virus adeno-asociados (AAV) están ampliamente extendidos por toda la población humana, sin embargo, no se ha asociado ninguna patología con la infección. Este hecho, junto con la disponibilidad de técnicas moleculares simples para alterar el genoma viral, ha convertido a AAV en un serio competidor como vehículo para su uso en terapia génica. [43]

- **Biología:**

Los AAV son virus de ADN de cadena sencilla, no recubiertos y que únicamente se replican en presencia de un virus auxiliar, como el adenovirus o virus del herpes simple. El genoma viral del AAV es de aproximadamente 4,7 kilobases (kb) de longitud y contiene dos repeticiones terminales invertidas que flanquean dos genes, rep y cap, que codifican proteínas que facilitan la replicación viral y el ensamblaje de la cápside, respectivamente. [44]

AAV infecta las células uniéndose a receptores específicos de la superficie celular primaria, como los proteoglicanos de sulfato de heparina para AAV219 o ácido siálico

para AAV5,20 y luego a un receptor secundario que media la captación endocítica. Esta elección de receptores primarios y secundarios contribuye fuertemente a la infección viral. Una vez internalizado, el AAV circula a través de la vía endocítica, escapa del endosoma con la ayuda de un dominio de fosfolipasa que posee en la cápside y se transporta al núcleo donde se libera el genoma viral y se convierte de ADN monocatenario a ADN de doble cadena gracias a polimerasas del huésped. En presencia de virus auxiliar, el AAV de tipo salvaje inicia una infección viral productiva, mientras que en ausencia de auxiliar, el AAV puede establecer latencia en el genoma humano mediante la integración mediada por Rep. [44]

- **Combinación de nucleasas con AAV:**

Aunque la orientación de genes mediada por AAV es altamente versátil y puede mediar la introducción de una variedad de modificaciones, su eficacia in vivo es demasiado baja para la mayoría de las aplicaciones clínicas, y hasta la fecha, los resultados positivos se han centrado principalmente en el hígado. Sin embargo, la inducción de DSBs puede aumentar la frecuencia de orientación génica mediada por AAV hasta 100 veces en células humanas. En los últimos años, las nucleasas con un diseño específico, entre las que se encuentran las ZFN, TALENs y CRISPR / Cas9 han surgido y dotado a los investigadores la capacidad para generar DSB en sitios específicos. Tanto ZFNs como CRISPR / Cas9,82 en particular, se han combinado con AAV para inducir alteraciones de genes dirigidas y deleciones cromosómicas en cultivo celular incluyendo, por ejemplo, la inactivación del virus de la hepatitis B esencial. [45]

La combinación de nucleasas dirigidas a sitios específicos con AAV ha incrementado las posibilidades de poder llevar a cabo terapias “in vivo” de edición del genoma. La prueba de esto la tenemos en que se ha llevado a cabo la administración sistémica de AAV usado como vector (contiene la plantilla de reparación) y ZFN dirigidos a realizar un corte específico sobre el gen defectuoso F9. Su administración condujo a una reparación permanente y ha incrementado los niveles de producción de F9 en células de ratón que padecía de Hemofilia B, demostrando la capacidad que tiene esta combinación para la posible cura de trastornos genéticos hereditarios. [46]

Un experimento más reciente que combinó el sistema CRISPR / Cas9 con AAV para facilitar la edición del genoma en células de hígado y cerebro. Específicamente se utilizó *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) y su único ARN guía (sgRNA) para

interrumpir la expresión de múltiples genes en el cerebro de ratón después de la inyección estereotáctica, y aún más recientemente se utilizó Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) para modificar el gen PCSK9 en el hígado de ratón, lo que condujo a un descenso del 95% en los niveles de proteína Pcsk9 ya una reducción del 40% en el colesterol total una semana después de la inyección sistémica (en este caso el sistema CRISP/Cas9 también iba combinado con AAV). [47]

Además, la entrega mediada por AAV de factores de transcripción basados en ZFN y TALE ha permitido la represión de la proteína huntingtina mutante en un modelo de ratón de la enfermedad y el control optogenético de la expresión génica en el cerebro del ratón respectivamente. Demostrando así el gran potencial de combinar AAV con herramientas capaces de controlar la expresión génica. [48]

LIPOSOMAS

Una terapia génica eficiente depende principalmente de la capacidad de transferencia génica de los vectores. Los vectores no virales como los liposomas se han convertido en objeto de investigación y desarrollo en terapia génica debido a su mayor seguridad frente a los vectores virales.

Los liposomas son nanopartículas esféricas en las que la separación del medio interno del medio externo consiste en una bicapa lipídica. Al presentar una fracción acuosa y otra lipídica, pueden alojar sustancias hidrofílicas y lipofílicas. Esta naturaleza anfifílica de los lípidos y su capacidad para formar vesículas y membranas hacen de los lípidos una posible forma de vehiculizar el material genético para la terapia génica.

La bicapa lipídica de los liposomas tiene la capacidad de fusionarse con cualquier célula. Esto es una ventaja si estamos trabajando *in vitro* con células aisladas previamente, sin embargo para una posible terapia *in vivo* sería una desventaja porque afectarían a todas las células sin ningún tipo de especificidad.

Felgner et al. [89] fueron los primeros en demostrar que la administración de material genético vehiculizado en liposomas era posible. Para ello utilizaron un liposoma compuesto por un lípido catiónico (\pm)-N,N,N-trimethyl-2,3-bis(z-octadec-9-enyloxy)-1-propanaminium chloride (DOTMA) para vehiculizar un plásmido de ADN en células eucariotas. Se pueden usar tanto lípidos aniónicos, catiónicos y neutros para vehiculizar

material genético, sin embargo los lípidos catiónicos son los más aptos debido a su capacidad para adsorberse de manera eficiente sobre la membrana celular aniónica. [49]

* Lipoplexes

Los lipoplexes son liposomas diseñados para vehicular material genético, compuestos por un lípido catiónico y un lípido neutro (o lípido helper). Estos lípidos neutros se añaden a la estructura del liposoma porque ayudan a construir la bicapa lipídica. Algunos de los lípidos helper más utilizados son el colesterol o la Dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE). Khatri et al. diseñaron un liposoma compuesto de dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC), DOPE, colesterol y un lípido PEGilado (DSPE-mPEG) para administrar siRNA conocido como CPE liposoma y complejo con fosfato de calcio. Estos cationes de calcio fueron capaces de complejarse con el siRNA, además el liposoma fue capaz de proteger al siRNA de la degradación. Este liposoma fue modificado nuevamente añadiendo arginina cíclica-glicina-ácido aspártico (cRGD) para dirigir este complejo liposómico hacia las células A549 implicadas en el cáncer de pulmón. Los liposomas cRGD-CPE fueron más eficaces en la inhibición de RRM1 (reducción del 76% en RRM1 expresión), que el CPE-liposomas (70% de reducción) y desnudo siRNA (16% de reducción) [50]

Kullberg et al. diseñó un sistema de liberación de dos componentes que utilizaba liposomas neutros para proporcionar ADN plasmídico que codifica para la luciferasa reporter. El ADN plasmídico se condensó primero con una Poli-lisina catiónica pegilada para formar PL / ADN. A continuación, el liposoma se conjugó con Listeriolisina O (LLO), una proteína formadora de poros, para dirigir el liposoma al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2) en las células de cáncer de mama [94]. Se seleccionaron las líneas celulares isogénicas MCF-7 y MCF-7 / Her18, en esta última se sobrepresa el receptor de superficie celular Her-2. El liposoma conjugado con la Listeriolisina (LLO) junto con el PL/ ADN demostró que es capaz de reconocer en un 68% las células MCF-7 / Her18, mientras que solo un 0,7% de las células MCF-7 fueron reconocidas. Esto demuestra la capacidad de LLO para orientar los liposomas hacia las células con el receptor Her-2. Además también se observó una expresión de luciferasa 268 veces mayor en las células MCF-7 / Her18 Versus células MCF-7, lo que demuestra la eficiencia y la especificidad de los dos componentes del sistema. [50]

CONCLUSIONES

Las herramientas de edición del genoma están siendo investigadas para la cura de enfermedades monogénicas, una de las cosas en las que se está haciendo un mayor hincapié es en la mejora de la toxicidad para que no actúen sobre sitios fuera del destino específico y así no causar efectos secundarios. De momento la mayoría de los ensayos se están llevando a cabo in vitro pero ya se han visto avances en enfermedades como el HIV-1, virus del papiloma humano, hepatitis B... entre muchas otras.

Este tipo de técnicas nos dan la posibilidad de curar las enfermedades monogénicas que antes sólo podían ser tratadas a través de fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rocío Baños García. Nuevas aproximaciones para el estudio y terapia génica de la anemia de Fanconi. 2014
- [2] Guha TK, Wai A, Hausner G. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017 Jan 12;15:146-160. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.006. eCollection 2017.
- [3] Moore J.K., Haber J.E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996;16(5):2164–2173.
- [4] Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:181–211. [PubMed]
- [5] Choulika A., Perrin A., Dujon B., Nicolas J.F. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995;15:1968–1973. [PubMed]
- [6] Li X., Heyer W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008;18(1):99–113. [PubMed]
- [7] Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Jouvenot Y., DeKaveler R.C. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:3055–3060. [PubMed]
- [8] Sander J.D., Joung J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–355. [PubMed]
- [9] Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262–1278. [PubMed]
- [10] Enyeart P.J., Mohr G., Ellington A.D., Lambowitz A.M. Biotechnological applications of mobile group II introns and their reverse transcriptases: gene targeting, RNA-seq, and non-coding RNA analysis. *Mob DNA*. 2014;5:21. [PubMed]
- [11] Cox D.B.T., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121–131. [PubMed]
- [12] Porteus M.H. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biol*. 2015;16:286. [PubMed]
- [13] Grizot S., Epinat J.-C., Thomas S., Duclert A., Rolland S. Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):2006–2018. [PubMed]
- [14] Moure C.M., Gimble F.S., Quijcho F.A. Crystal structure of the intein homing

- endonuclease PI-SceI bound to its recognition sequence. *Nat Struct Biol.* 2002;9(10):764–770. [PubMed]
- [15] Jacoby K., Lambert A.R., Scharenberg A.M. Characterization of homing endonuclease binding and cleavage specificities using yeast surface display SELEX (YSD-SELEX) *Nucleic Acids Res.* 2016
- [16] Ashworth J., Taylor G.K., Havranek J.J., Quadri S.A., Stoddard B.L. Computational reprogramming of homing endonuclease specificity at multiple adjacent base pairs. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):5601–5608. [PubMed]
- [17] Stoddard B.L. Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mob DNA.* 2014;5:7.
- [18] Wolfs J.M., DaSilva M., Meister S.E., Wang X., Schild-Poulter C. MegaTevs: single-chain dual nucleases for efficient gene disruption. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(13):8816–8829.
- [19] Kanchiswamy C.N., Maffei M., Malnoy M., Velasco R., Kim J.-S. Fine-tuning next-generation genome editing tools. *Trends Biotechnol.* 2016;34:7. [PubMed]
- [20] Wolfs J.M., Hamilton T.A., Lant J.L., Laforet M., Zhang J. Biasing genome-editing events toward precise length deletions with an RNA-guided TevCas9 dual nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016
- [21] Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636–646.
- [22] Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.-L. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2007;25:778–785.
- [23] Szczepek M., Brondani V., Büchel J., Serrano L., Segal D.J. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2007;25:786–793.
- [24] Didigu C.A., Wilen C.B., Wang J., Duong J., Secreto A.J. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood.* 2014;123(1):61–69.
- [25] Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014;370(10):901–910. [PubMed]
- [26] Pattanayak V., Ramirez C.L., Joung J.K., Liu D.R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods.* 2011;8:765–770. [PubMed]
- [27] Mino T., Mori T., Aoyama Y., Sera T. Gene- and protein-delivered zinc finger staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus. *PLoS One.* 2013;8(2) [PMC free article] [PubMed]
- [28] Mino T., Mori T., Aoyama Y., Sera T. Inhibition of DNA replication of human papillomavirus by using zinc finger-single-chain FokI dimer hybrid. *Mol Biotechnol.* 2014;56(8):731–737. [PubMed]
- [29] Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* 2011;29:143–148. [PubMed]
- [30] Kim Y., Kweon J., Kim J.S. TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nat Methods.* 2013;10:185. [PubMed]
- [31] Doyle E.L., Booher N.J., Standage D.S., Voytas D.F., Brendel V.P. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W117–W122. [PubMed]
- [32] Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C.S., Gao Q. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol.* 2011;29:731–734. [PubMed]
- [33] Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;4(3):267–278. [PubMed]

- [34] Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8:2281–2308. [PubMed]
- [35] McCaffrey J., Sibert J., Zhang B., Zhang Y., Hu W. CRISPR-CAS9 D10A nickase target-specific fluorescent labeling of double strand DNA for whole genome mapping and structural variation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2) [PMC free article] [PubMed]
- [36] Dickinson D.J., Goldstein B. CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics.* 2016;202(3):885–901. [PubMed]
- [37] Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol.* 2013;10(5):841–851. [PubMed]
- [38] Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.F. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(39):15644–15649. [PubMed]
- [39] Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* 2015;523(7561):481–485. [PubMed]
- [40] Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013;152(5):1173–1183. [PubMed]
- [41] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579-E2586. [PMC free article] [PubMed]
- [42] Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y., Ho Q.H. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013;10(10):977–979. [PubMed]
- [43] Kotterman, MA and Schaffer, DV (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* 15: 445–451.
- [44] Weitzman, MD, Kyöstiö, SR, Kotin, RM and Owens, RA (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5808–5812.
- [45] Weber, ND, Stone, D, Sedlak, RH, De Silva Felixge, HS, Roychoudhury, P, Schiffer, JT et al. (2014). AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One* 9: e97579.
- [46] Li, H, Haurigot, V, Doyon, Y, Li, T, Wong, SY, Bhagwat, AS et al. (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475: 217–221
- [47] Ran, FA, Cong, L, Yan, WX, Scott, DA, Gootenberg, JS, Kriz, AJ et al. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520: 186–191
- [48] Garriga-Canut, M, Agustín-Pavón, C, Herrmann, F, Sánchez, A, Dierssen, M, Fillat, C et al. (2012). Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3136–E3145
- [49] De Ilarduya, C.T.; Sun, Y.; Düzgüneş, N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010, 40, 159–170.
- [50] Knapp, C.M.; He, J.; Lister, J.; Whitehead, K.A. Lipidoid nanoparticle mediated silencing of Mcl-1 induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Exp. Biol. Med.* 2016, 241, 1007–1013.