

8.2 CRISPR-Cas: De la biología a la herramienta

Diapositiva 1.

CRISPR-Cas es considerada la tecnología que va a cambiar las reglas del juego en biología molecular al igual que lo hizo en su momento la PCR. En esta presentación, mostraré cómo este sistema inmune adaptativo bacteriano forma la base para el desarrollo de una nueva y potente herramienta molecular para editar, regular y dirigir los genomas. Hoy en día, la tecnología CRISPR tiene aplicaciones en todos los campos de la ingeniería del genoma. El éxito de esta tecnología se debe a su simplicidad, eficiencia y versatilidad.

Diapositiva 2.

La tecnología CRISPR se basa en la ingeniería de nucleasas dirigidas por ARN que escinden el ADN de una manera dependiente de secuencia. El modo de acción consiste en tres pasos distintos. En la primera etapa, la etapa de adquisición, los ácidos nucleicos extraños se integran como nuevos espaciadores en el conjunto CRISPR que está separado por secuencias repetidas. En el siguiente paso, la etapa de expresión, se generan crRNAs maduros que contienen secuencias espaciadoras parciales unidas a repeticiones parciales. Además, se expresa tracrRNA que tiene complementariedad con las regiones repetidas de los transcritos de CRRNA, así como con las proteínas Cas. En la etapa de interferencia, se forma un híbrido de CRRNA-tracrRNA a través de la unión de la región de repetición complementaria. Este híbrido de ARN guía la nucleasa de Cas hacia la secuencia de ADN complementaria, que conduce a la escisión del elemento genético invasor.

Diapositiva 3.

Fue la combinación del CRRNA y tracrRNA en un sgRNA lo que constituyó el paso crucial en el desarrollo de la tecnología CRISPR. El sistema más utilizado en la ingeniería del genoma es el sistema CRISPR /Cas de tipo II de *Streptococcus pyogenes*. Al igual que otros sistemas de clase 2, sólo necesita una única endonucleasa, Cas9, para escindir el ADN dirigido.

Diapositiva 4.

CRISPR-Cas9 se utiliza hoy en día para modificar los genomas de múltiples células y organismos, incluyendo bacterias, parásitos, pez cebra, ratones y células humanas. La co-expresión de la nucleasa Cas9 con sgRNAs que contienen la secuencia complementaria, da lugar a rupturas de ADN de doble hebra que se reparan posteriormente mediante unión no homóloga o recombinación homóloga.

Los pares de bases aleatorios de unión final no homólogas se insertan o eliminan, causando el 'knockout' de genes por interrupción. Por otra parte, la recombinación homóloga con un ADN donante puede usarse para modificar un gen mediante la introducción de mutaciones precisas o introducir un gen completamente nuevo en el genoma.

Diapositiva 5.

La capacidad de programar Cas9 para enlazar cualquier secuencia deseada puede ser explotada para otras aplicaciones, tales como el control de la transcripción, la modificación de epigenomas y la obtención de imágenes de cromosomas.

Para la obtención de imágenes en células vivas, se construyó una proteína Cas9 modificada, denominada dCas9. En esta proteína los dominios de nucleasa se desactivan, dando como resultado una proteína de unión al ADN específica de la secuencia. La proteína modificada se fusiona a una etiqueta fluorescente, como eGFP, y junto con un sgRNA de ingeniería, se utiliza para visualizar el genoma en células individuales. Esta capacidad mejora las tecnologías actuales para estudiar la dinámica conformacional de los cromosomas nativos en células vivas.

Por otro lado, la proteína modificada dCas9 también puede usarse para la regulación génica a escala genómica. En un proceso conocido como CRISPRi, la unión de la ARN polimerasa al ADN es bloqueado por dCas9, dando como resultado la represión de la transcripción. Además, mediante la generación de versiones quiméricas de dCas9 que se fusionan con dominios reguladores, tales como la subunidad ω de la ARN polimerasa, la expresión génica puede activarse eficazmente.

Diapositiva 6.

El descubrimiento y desarrollo de la tecnología CRISPR es el trabajo de muchos científicos de todo el mundo. Aunque la tecnología es un descubrimiento relativamente reciente, los primeros informes se remontan a 1987. Científicos de la universidad de Japón descubrieron un segmento inusual del ADN colindante que consistía en repeticiones cortas flanqueadas por secuencias únicas y cortas. Señalaron que "la importancia biológica de estas secuencias es desconocida". Casi tres décadas después, en 2002, estas repeticiones se denominaron CRISPR y sus proteínas asociadas se llamaron Cas. En 2005, los espaciadores CRISPR fueron emparejados con ADN foráneo.

Diapositiva 7.

En los dos años posteriores, CRISPR se describió como un sistema inmune adaptativo que las bacterias utilizan para evitar la infección por fagos. En 2011, los científicos descubrieron que para este mecanismo de resistencia a los fagos se necesitan dos moléculas de ARN, llamadas crRNA y tracrRNA. En 2012, las caracterizaciones bioquímicas del sistema CRISPR mostraron que Cas9 puede ser guiado por estos crRNAs para escindir el ADN diana *in vitro*. Por otra parte, el CRRNAs se fusionó a tracrRNAs para formar sgRNAs, reduciendo el sistema de tres a dos componentes. A partir de este punto, CRISPR /Cas9 se utilizó como nueva herramienta de edición de genes.

Diapositiva 8.

En años posteriores, muchos estudios mostraron el potencial de esta nueva técnica para la ingeniería de genomas. En 2013, el sistema CRISPR/Cas9 se utilizó para editar genes específicos en células humanas y de ratón utilizando CRRNAs diseñados. Un año más tarde, investigadores en China diseñaron los primeros monos con mutaciones específicas, un gran paso en la elaboración de modelos de investigación más realistas de las enfermedades humanas. Además, se realizaron los primeros intentos de editar el genoma en embriones humanos para eliminar enfermedades genéticas. Sin embargo, los investigadores no pudieron reparar eficazmente el trastorno genético y se observaron muchas escisiones a parte del objetivo.

Diapositiva 9.

En 2016, el primer ensayo humano para usar la edición de genes CRISPR obtuvo la aprobación en los Estados Unidos. Este primer ensayo es pequeño y sólo está diseñado para probar si CRISPR es seguro para su uso en personas. Más tarde, la técnica podría ser utilizada para tratar el cáncer.

Como la línea de tiempo muestra que la tecnología CRISPR es una tecnología innovadora en biología molecular, muchos nuevos estudios y aplicaciones seguirán existiendo en los próximos años.

Diapositiva 10.

Podéis encontrar todas las referencias utilizadas en esta presentación en la siguiente lista.