

## 8.1 Fundamentos del sistema CRISPR

### Diapositiva 1:

CRISPR es un sistema microbiano que sirve de defensa frente a virus. La proteína Cas9 de sistema CRISPR ha sido ampliamente utilizada como una herramienta de edición de genomas. En esta sesión se explican los fundamentos del sistema CRISPR como mecanismo antiviral. Se muestra cómo CRISPR puede adaptarse frente a nuevas infecciones virales y combatir adecuadamente los virus. En la última parte de esta sesión discutiremos cómo se puede evitar la autoinmunidad.

### Diapositiva 2:

Los virus son las entidades más abundantes del planeta y superan en número, por lo menos en 10 veces a su hospedador. En consecuencia, en su entorno natural los microbios están bajo constante peligro de infección viral. Para defenderse contra el posible impacto negativo de la infección viral, las bacterias y las arqueas, al igual que los seres humanos, han desarrollado una serie de diferentes estrategias de defensa. Esta diapositiva resume las estrategias de defensa viral conocidas: 1) bloqueo de adsorción, 2) infección abortiva, 3) bloqueo de absorción, 4) sistemas de modificación/restricción y 5) sistema CRISPR.

El sistema CRISPR está presente en aproximadamente la mitad de las bacterias y la mayoría de las arqueas. Existen muchos tipos diferentes de CRISPR de los cuales el sistema basado en Cas9 es el más famoso. El mecanismo básico de defensa es en gran medida similar para todas las familias. Las diferencias se basan en los diferentes genes Cas asociados al sistema CRISPR que son utilizados para clasificar diferentes familias. Algunos sistemas tienen como diana el ADN foráneo, otros el ARN.

### Diapositiva 3:

El descubrimiento del sistema CRISPR comenzó con la descripción de “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas” o “Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats” en los genomas de bacterias y arqueas. Durante mucho tiempo, estas repeticiones fueron vistas como regiones genómicas poco interesantes, hasta que en 2005 varios grupos informaron al mismo tiempo que los espaciadores de ~30 pb localizados entre estas repeticiones palindrómicas, contenían secuencias que coincidían exactamente con las de los genomas virales. En ese momento se propuso que estas matrices CRISPR podrían ser parte de un sistema de defensa antiviral. Esta diapositiva representa el conjunto CRISPR típico. Los conjuntos CRISPR pueden contener entre 2 y varios cientos de repeticiones. Dependiendo de la familia CRISPR, el tamaño de los espaciadores y las repeticiones varía un poco. Varios tipos diferentes de conjuntos CRISPR pueden estar presentes en un único genoma bacteriano o arcaico. Cada espaciador es único y coincide con un virus individual o elemento extracromosómico. Los genes Cas son a menudo codificados próximos a estos conjuntos CRISPR.

### Diapositiva 4:

La primera prueba de que el sistema CRISPR funciona como un sistema de defensa antiviral procedía de la investigación sobre cepas bacterianas resistentes a fagos en la industria láctea. Los investigadores demostraron que la única diferencia entre una cepa sensible a un virus y una resistente al virus era la presencia de un espaciador adicional en la conjunto CRISPR de las bacterias resistentes, que se muestra en rojo en esta diapositiva. Este espaciador coincide al 100% con una región del genoma viral en la

cepa que ha ganado resistencia. Esta región se llama 'protospacer'. El papel de la "PAM" se explicará en la última diapositiva.

Al añadir nuevos espaciadores que coinciden con un determinado virus, la cepa se hará resistente a las infecciones futuras por dicho virus. Como estas adaptaciones en el sistema CRISPR se hacen en el genoma, esta resistencia también será heredada por la descendencia de la cepa. Como tal, el sistema CRISPR funciona como un sistema de defensa adaptable y heredable.

#### Diapositiva 5:

En esta diapositiva se muestra la primera fase del mecanismo de defensa CRISPR con el ejemplo de Cas9. La primera etapa de la defensa mediada por CRISPR se define como la fase de "adaptación". Después de la infección por un virus, el ADN extraño es reconocido y escindido por las proteínas Cas. Una pequeña porción del genoma se incorpora como un nuevo espaciador en la conjunto CRISPR. Los nuevos espaciadores se añaden generalmente en la conjunto CRISPR, cerca de la secuencia líder, que se muestra en gris en esta diapositiva. Como tal, el conjunto CRISPR da una visión general de las infecciones víricas sufridas por la cepa. Los espaciadores pueden eliminarse ocasionalmente de la conjunto CRISPR por eventos de recombinación que pueden ocurrir en el centro o hacia el final del conjunto.

#### Diapositiva 6:

En la segunda fase del mecanismo de defensa CRISPR, el conjunto CRISPR se transcribe como una molécula larga de ARN. Cas9 puede procesar el "ARN pre-CRISPR". En otros tipos de familias CRISPR, este procesamiento de ARN se produce por diferentes proteínas Cas. La escisión del ARN pre-CRISPR se produce con la ayuda de un CRISPR-ARN trans-activante (tracrRNA). Este tracrRNA se hibrida específicamente con las repeticiones en el ARN pre-CRISPR que está unido por Cas9. Para ello, se utiliza una ARNasa codificada por el hospedador, que procesa el pre-CRRNA en pequeñas secuencias guía. En otros tipos de sistema CRISPR esta escisión también puede ocurrir por una proteína Cas. La secuencia de ARN guía permanece unida a la proteína Cas.

En la tercera fase del mecanismo CRISPR, el genoma del virus es reconocido y eliminado. El complejo de ARN guía/Cas9 explora el ADN celular usando su crRNA que contiene un único espaciador como guía. Tan pronto encuentra una coincidencia de ADN, este será escindido y como tal, la infección viral se detiene. Las secuencias de ~30 pb proporcionan suficiente especificidad para no dirigirse al propio genoma bacteriano o de las arqueas. Sin embargo, en teoría hay una posición con una coincidencia perfecta a ese crRNA en el genoma bacteriano. Esta está en el conjunto CRISPR. La orientación de esta región podría conducir a la autoinmunidad. Para evitar la autoinmunidad, la secuencia "PAM" es importante.

#### Diapositiva 7:

En esta diapositiva se explica el mecanismo "PAM". PAM proviene del inglés "protospacer adjacent motive" o motive adyacente al protospacer. Por lo general, contiene sólo unos pocos pares de bases. Se encuentra adyacente al protospacer en el genoma viral (mostrado en rojo). Como regla general, no está presente adyacente a los espaciadores en el conjunto CRISPR. La escisión de ADN llevada a cabo por el complejo de crRNA del Cas, solo ocurre cuando hay una región AM presente. Por lo tanto, el PAM representa un mecanismo efectivo para evitar la autoinmunidad.