

Transferencia



NÚMERO 12 | DICIEMBRE DE 2016

The background of the cover features a 3D rendering of a blue DNA double helix. A pair of silver, metallic-looking scissors is positioned to cut through the DNA strands, symbolizing genetic editing. The scissors are oriented vertically, with the blades pointing downwards.

CRISPR: UNA HERRAMIENTA DE EDICIÓN GÉNICA POTENTE Y PRECISA

CRISPR: una herramienta de edición génica potente y precisa

En los años 90 el investigador de la Universidad de Alicante, Francis Mojica, descubrió que una serie de secuencias que había hallado en un organismo que habita en las salinas de Santa Pola, codificaban un eficaz sistema inmune de las bacterias. Este trabajo fue el origen del de otros investigadores que consiguieron encontrar una aplicación como una potente y precisa herramienta de edición génica a partir de 2012. Desde entonces las aplicaciones de esta tecnología, conocida como CRISPR, no han dejado de crecer y recientemente han llegado incluso a la clínica.

El sistema inmune de las bacterias

Pocos hallazgos recientes han tenido un impacto en el campo de la biología y la microbiología como CRISPR, es una potente herramienta de edición génica. Hace apenas cuatro años que comenzó a implantarse esta técnica en los laboratorios debido a su elevada eficacia como herramienta para la edición génica dirigida con alta precisión. Desde entonces el número de trabajos publicados en revistas científicas y sus aplicaciones prácticas ha crecido de forma exponencial. En un tiempo record la tecnología ya ha enfilado el camino hacia el desarrollo de nuevas terapias ya que en 2016 se han iniciado dos ensayos clínicos con terapias basadas en CRISPR.

CRISPR es la abreviatura de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o *Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas* en español. Estas secuencias, asociadas a un sistema más complejo, desempeñan una función inmunológica en diversas bacterias. En esencia el sistema genera una “enzima de restricción”, es decir, una proteína capaz de cortar la cadena del ADN en un determinado lugar. Las CRISPR flanquean unos ‘espaciadores’ donde se encuentran secuencias idénticas a las que se encuentran en organismos con capacidad de infectar las bacterias como plásmidos (moléculas de ADN de forma circular capaces de introducirse en la bacteria) o bacteriófagos (virus que infectan bacterias). **Estas secuencias contenidas en los espaciadores constituyen una verdadera memoria de infecciones que sufrió en el pasado una determinada cepa de bacterias.** Adyacentes a las secuencias CRISPR se encuentran otras que codifican unas proteínas conocidas como “Cas” (por CRISPR Associated). Algunas de estas proteínas Cas, como la Cas 9, sintetizan una ‘*nucleasa*’, una proteína capaz de cortar la cadena de ADN. Otras como las Cas 1, Cas 2 o Csn2 desempeñan una función en la adquisición de la inmunidad incorporando nuevas secuencias a la memoria de la bacteria. El sistema se completa con la secuencia tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*) que es fundamental para el procesamiento del ARN transcrito a partir de las proteínas del sistema CRISPR.

Cuando una bacteria sufre la agresión de un invasor, responde activando la transcripción del sistema CRISPR-Cas *nucleasa*, como la Cas9, que corta la secuencia del ADN del invasor en un lugar muy preciso dirigido por la secuencia incluida

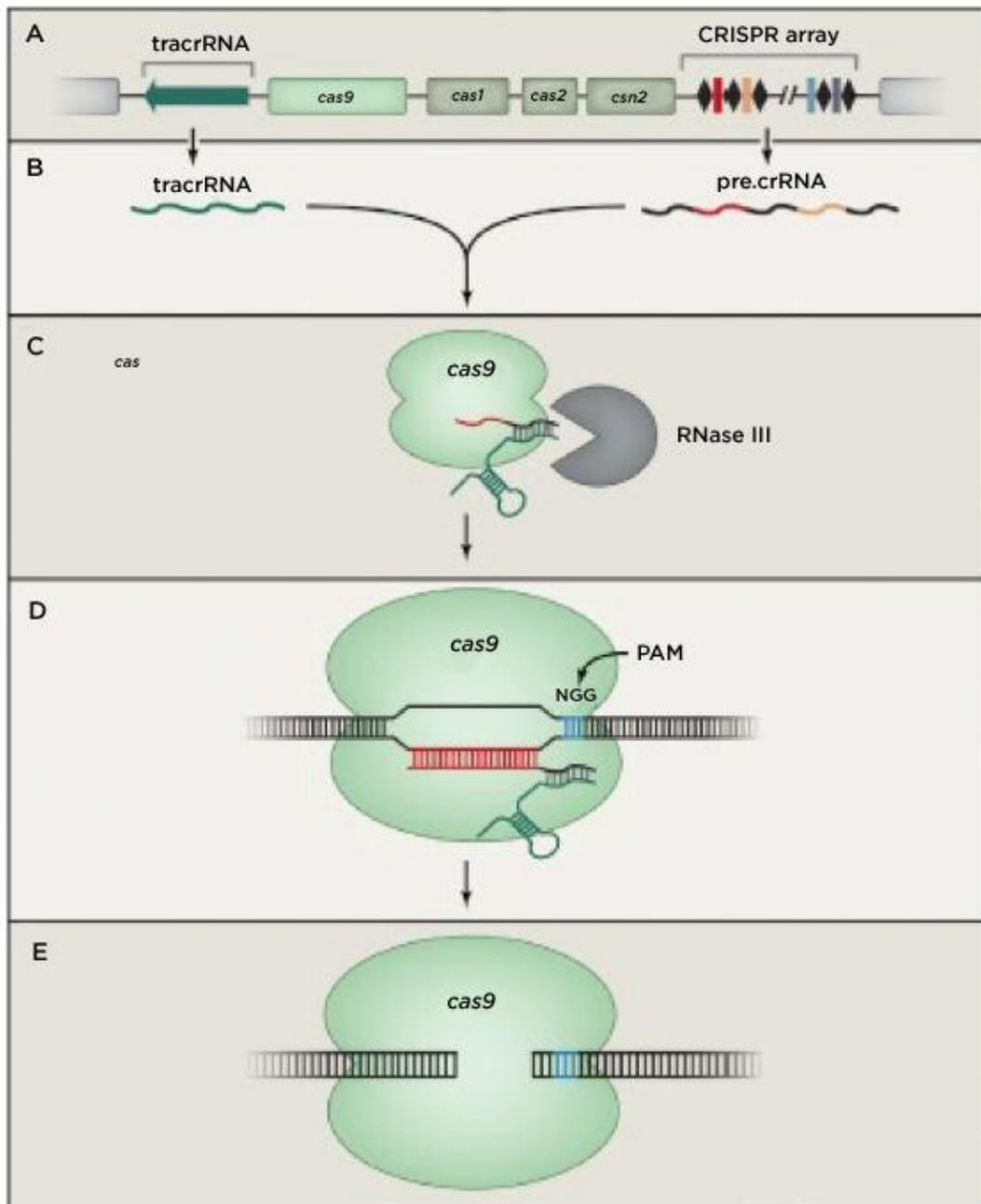


Ilustración 1. Descripción del Sistema CRISPR-Cas9 de Tipo II procedente de *Streptococcus Thermophilus* (tomado de (Lander, 2016) con el permiso de la revista *Cell* y del autor).

(A) El segmento de ADN bacteriana que contiene varios CRISPR alineados, cuatro genes codificantes de proteínas (*cas9*, *CAS1*, *CAS2*, y *SNC2*) y el *tracrRNA*. La formación de CRISPR contiene regiones en que se encuentra secuencias de ADN repetidas (diamantes negros) separados por regiones espaciadoras (rectángulos coloreados) derivados de virus y otros elementos genéticos invasores. El gen *cas9* codifica una nucleasa que confiere inmunidad mediante el corte del ADN invasor que coincide con los espaciadores existentes, mientras que los genes *cas1*, *cas2*, y *SNC2* codifican proteínas cuya función es adquirir nuevos espaciadores de ADN invasor.

(B) La formación CRISPR y el *tracrRNA* se transcriben, dando lugar a un pre-crRNA largo y un *tracrRNA*.

(C) Estos dos ARN se hibridan mediante secuencias complementarias y son procesadas a formas más cortas por Cas9 y RNasa III.

(D) El complejo resultante (Cas9 + tracrRNA + crRNA), entonces comienza la búsqueda de las secuencias de ADN que coinciden con la secuencia espaciadora (mostrada en rojo). La unión al sitio de destino también requiere la presencia del motivo adyacente protoespaciador (PAM), que funciona como un mango molecular al que se puede asir Cas9.

(E) Una vez que Cas9 se une a un sitio diana con una coincidencia entre el crRNA y el ADN diana, secciona el ADN en un lugar tres pares de bases por encima del sitio PAM. Cas9 contiene dos dominios endonucleasa, HNH y RuvC, que escinden, respectivamente, las cadenas complementaria y no complementarias del ADN diana, creando sendos extremos romos.

entre las secuencias CRISPR. Si un virus invade una bacteria que contiene en su “memoria” una secuencia que coincide con la del invasor, el sistema podrá cortar la molécula de ADN y por tanto inhabilitarla. Lo más sorprendente del sistema CRISPR-Cas es la precisión y eficiencia con la que corta la cadena de ADN. La ilustración 1 describe esquemáticamente el funcionamiento de uno de los sistemas CRISPR-Cas más empleados en los laboratorios.

Gracias a estas propiedades varios investigadores han conseguido diseñar sistemas CRISPR a medida de sus necesidades de edición génica. **La edición de un genoma, un proceso que hasta hace unos años era difícil de dirigir con precisión y podía ser muy engorroso, se ha vuelto mucho más sencillo. Se había descubierto en 2005 la utilidad de la llamada nucleasa Zinc-finger para editar el genoma ya que conseguía separar las dos hebras de ADN para intercalar, suprimir o alterar pares de bases. Sin embargo aún resultaba muy difícil diseñar estas nucleasas para que se dirigieran al lugar deseado. Las secuencias intercaladas entre las CRISPR permiten precisamente resolver el problema con gran eficacia porque permiten dirigir una nucleasa como la Cas9 a un lugar deseado.** En 2011 Virginijus Siksnys pudo demostrar que el sistema CRISPR de la bacteria *S. thermophilus* podía transferirse a *E. coli*, un microbio filogenéticamente muy alejado. En 2012, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna adaptaron el sistema II CRISPR de tipo obtenido de *Streptococcus pyogenes* para editar el genoma in vitro. También en ese año el investigador chino afincado en EEUU, Feng Zhang, y el investigador de Harvard, George Church, habían desarrollado sistemas optimizados capaces de editar el genoma en células de mamífero manipulando las secuencias de los espaciadores.

Aplicaciones en organismos genéticamente modificados

Desde 2013 ha habido un verdadero estallido en el número de trabajos y publicaciones sobre los sistemas CRISPR. Las aplicaciones de los sistemas CRISPR se han demostrado virtualmente inagotables convirtiéndolos en una herramienta biotecnológica indispensable. El sistema más empleado actualmente es el CRISPR-Cas 9 ya citado, pero existen múltiples sistemas que se han hallado en diversas bacterias y probablemente muchos más que aún no se han caracterizado, lo cual está ampliando el juego de herramientas de los investigadores.

Gracias a este sistema se pueden introducir, modificar o eliminar secuencias del genoma de cualquier organismo. Entre las múltiples aplicaciones podemos citar la facilidad con la que permite la mutación del ADN de organismos y animales de laboratorio para el desarrollo de modelos experimentales. Se han desarrollado modelos de patologías humanas en pez cebra o ratón, especies muy utilizadas para el estudio de enfermedades humanas. Por ejemplo en España, el grupo de Lluís Montoliu en el Centro Nacional de Biotecnología está utilizando este sistema

para el estudio del albinismo. Su grupo ha creado además una herramienta on line para el diseño de sistemas de edición genética (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>).

La tecnología se está empleando también para generar organismos genéticamente modificados de interés comercial. En Uruguay, el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAUy), del Instituto Pasteur de Montevideo y del francés Inserm UMR 1064, ha creado una oveja que combina propiedades deseables de dos variedades, la excelente producción lanera de la merina cuya carne es de baja calidad, y la Texel que produce lana de baja calidad pero tiene un elevado rendimiento cárnico (Orfila, 2015). En España la empresa Bio-IDEN (<http://www.idenbiotechnology.com>) está explorando las aplicaciones en el desarrollo de nuevas variedades de cultivos.

De la poyata a la clínica

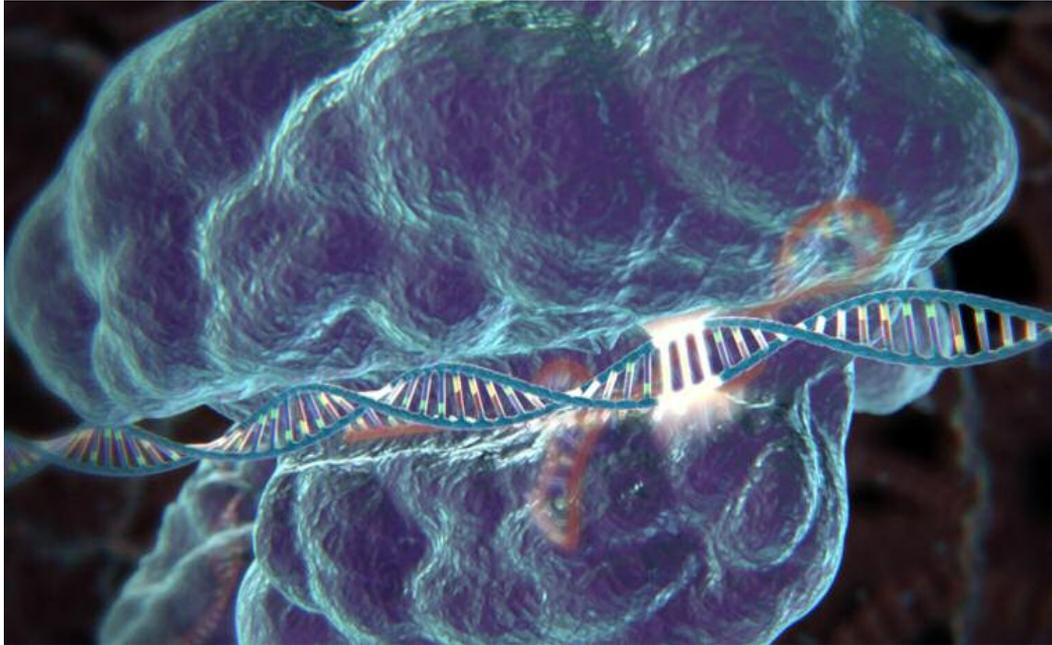
En el campo de la terapia humana empiezan a explorarse los primeros tratamientos para enfermedades hereditarias y cáncer. Un grupo chino dirigido por el Dr. Wu, de los Institutos de Ciencias Biológicas de Shanghái, ha conseguido introducir la secuencia correcta en embriones de ratones afectados de una mutación que causa cataratas. Otro estudio ha conseguido editar el genoma del embrión de un ratón para corregir el gen causante de la enfermedad de la distrofia muscular de Duchenne ligada al cromosoma X. El grupo de Liang et al ha demostrado que es posible editar el genoma humano en un experimento sobre embriones en el que se modificó el gen de la hemoglobina beta responsable de la b-talasemia aunque se observaron también modificaciones en lugares imprevisos. (Savić & Schwank, 2015 Volume 168).

Diversos estudios preclínicos han demostrado la utilidad de CRISPR. Se ha modificado genéticamente embriones para tratar la distrofia muscular de Duchenne. También se ha conseguido tratar esta enfermedad en ratones adultos así como la tirosinemia hereditaria de tipo I o la infección por virus de hepatitis B.

También existe el potencial de aplicar terapias de edición génica en animales maduros, lo que se conoce como *'edición somática in vivo'*. Hao Yin y Wen Xue, del Massachusetts Institute of Technology, han conseguido corregir una deficiencia de la enzima fumarilacetato hidrolasa (FAH) causante de la tirosinemia hereditaria de tipo I que causa acumulación de metabolitos citotóxicos y muerte de las células del hígado. Inyectando vectores que codifican el sistema Cas9 han conseguido la introducción de la secuencia génica correcta en el núcleo de las células del hígado. Aunque solo consiguió corregir un porcentaje mínimo de células fue suficiente como para corregir la hepatotoxicidad y estabilizar a los animales. También un grupo de la Universidad Nacional de Taiwán ha demostrado la posibilidad de curar la infección del virus de hepatitis B.

CRISPR se ha utilizado también en la edición somática *ex vivo*. Investigadores de la Universidad de California han conseguido establecer células madre de pluripotencia inducida a partir de fibroblastos de un paciente que padecía b-talasemia transfectándolas con vectores

virales basados en CRISPR-Cas9. También un grupo suizo dirigido por Hans Clevers ha conseguido utilizar células madre intestinales para corregir un alelo causante de fibrosis quística. Asimismo dos grupos han demostrado la utilidad de



utilizar las células madre multipotentes modificadas para tratar la distrofia muscular de Duchenne (Savić & Schwank, 2015 Volume 168).

Estos estudios demuestran que es posible desarrollar vectores virales (por ejemplo basados en lentivirus o adenovirus) que contienen un sistema CRISPR-Cas9). En España la empresa ViveBiotech (www.vivebiotech.com) ya desarrolla vectores virales modificados utilizando el sistema CRISPR-Cas 9. Estos vectores pueden ser utilizados en terapias génicas.

Estos experimentos no han estado exentos de polémica por las implicaciones éticas de modificar el genoma humano y la manipulación de embriones, sin embargo el potencial para resolver enfermedades genéticas devastadoras justificará la continuidad de las investigaciones. La tecnología ha llegado este año a la clínica. En junio de este año el comité asesor de los National Institutes of Health (NIH) de los EE.UU. aprobó el uso de CRISPR-Cas9 para estimular el reclutamiento de células T, un tipo de célula inmunitaria, en el tratamiento de un cáncer (Reardon, 2016). Casi simultáneamente un equipo chino liderado por el oncólogo Lu You, del Hospital de China Occidental en Chengdu, adscrito a la Universidad de Sichuan, anunció en julio su intención de iniciar un ensayo clínico en afectados de cáncer de pulmón (Cyranoski, 2016).

Cómo se apuntaba al principio del artículo CRISPR tiene una historia que se remonta a veinte años atrás y tiene un origen español. En su descubrimiento tuvo un papel relevante el investigador español, Francis Mojica ([enlace a la entrevista aquí](#)). Lo que resulta sorprendente es que su trabajo pasó absolutamente desapercibido para la sociedad española e incluso para gran parte de la comunidad científica durante años. Sin embargo hasta que las aplicaciones prácticas empezaron a entrar en los laboratorios no se había oído el acrónimo CRISPR frecuentemente. Un reciente artículo publicado en la revista Cell, *The Heroes of CRISPR*,

Un reciente artículo publicado en la revista *Cell*, *The Heroes of CRISPR*, ha contribuido a sacar a la luz el trabajo de Mojica y otros que contribuyeron con distintos descubrimientos al desarrollo de CRISPR. Tras describir su existencia en diversas especies de procariontas Mojica dedicó más de 10 años a comprender la función del sistema CRISPR. En 2003 tuvo su momento “eureka” cuando se dio cuenta de que el sistema CRISPR-Cas tenía una función inmunitaria.

ha contribuido a sacar a la luz el trabajo de Mojica y otros que contribuyeron con distintos descubrimientos al desarrollo de la técnica. El papel del investigador alicantino es destacable porque dedicó más de 10 años a comprender la función del sistema CRISPR tras describir su existencia en diversas especies de procariontas. Finalmente en 2003 tuvo su momento “eureka” cuando, tras una búsqueda laboriosa en bases de datos, encontró que las secuencias en los espaciadores correspondían a las de un bacteriófago. En ese momento se dio cuenta de que el sistema CRISPR-Cas tenía una función inmunitaria. Y sin embargo ninguna de las grandes revistas como Nature o PNAS consideraron que el trabajo de Mojica tuviese relevancia para ser publicado (Lester 2016) y finalmente salió publicado en otra de menor factor de impacto. **Esta historia revela el tremendo valor que tiene para un ecosistema científico saludable la existencia de una investigación básica, que no persigue ninguna aplicación práctica inicial.**

Referencias

- Cyranoski, D. (21 de julio de 2016). *Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial*. Obtenido de Nature: <http://www.nature.com/news/chinese-scientists-to-pioneer-first-human-crispr-trial-1.20302>
- Lander, E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 18-28.
- Orfila, M. (9 de noviembre de 2015). Los corderos del futuro son uruguayos. *Cromo*. Obtenido de <http://www.cromo.com.uy/los-corderos-del-futuro-son-uruguayos-n690565>
- Reardon, S. (22 de junio de 2016). *First CRISPR clinical trial gets green light from US panel*. Obtenido de Nature: <http://www.nature.com/news/first-crispr-clinical-trial-gets-green-light-from-us-panel-1.20137>
- Savić, N., & Schwank, G. (2015 Volume 168). Advances in therapeutic CRISPR / Cas9. *Journal of Translational Research*, 15-21.