

Entrevista Francisco Martínez Mojica

El Dr. Francisco Martínez Mojica, que suele firmar sus trabajos como Francis Mojica, fue uno de los investigadores que contribuyó al descubrimiento del sistema CRISPR. Un reciente artículo de la revista Cell lo ha incluido entre los “héroes del CRISPR”.¹ Cuando estaba trabajando en su tesis doctoral, descubrió estas secuencias de ADN repetidas y regularmente espaciadas en arqueas halófilas. Posteriormente, a finales de los años 90, Mojica y colaboradores encontraron repeticiones equivalentes en una gran diversidad de grupos procariotas, describiendo una nueva familia de secuencias repetidas, que más tarde denominaría con el acrónimo CRISPR. Poco después desveló que las CRISPR y las proteínas Cas asociadas constituyen un sistema (CRISPR-Cas) de inmunidad adquirida. En los últimos años se ha centrado en la caracterización del mecanismo de inmunización CRISPR, que permite a la célula “vacunarse” frente a elementos genéticos invasores. El descubrimiento y demostración de que algunas bacterias poseen un sistema CRISPR/anti-Cas es el logro más reciente de su equipo de investigación.

Francisco M. Mojica (Elche, 1963) es licenciado en Biología, en la especialidad de Bioquímica, por la Universidad de Valencia. Realizó su tesis doctoral (Universidad de Alicante) sobre los mecanismos de regulación génica que permiten a las arqueas halófilas extremas adaptarse a cambios ambientales, tales como variaciones en salinidad y temperatura. En 1997, fundó el grupo de Microbiología Molecular de la Universidad de Alicante, cuyo objeto principal de investigación son los sistemas CRISPR (siglas de “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”). Desde el año 2004 es Profesor Titular de Microbiología y en la actualidad es miembro del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología y del Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio “Ramón Margalef”, de la Universidad de Alicante.

FMB: ¿Cuál es el origen de este descubrimiento del sistema CRISPR y cuál fue el papel que desempeñó en el hallazgo?

¹Lander, E.S. The Heroes of CRISPR. Cell 164, January 14, 2016

Francis Mojica (FM): Mi involucración en este hallazgo se remonta a los años 90. En 1987 un grupo japonés encontró unas secuencias de ADN repetidas y regularmente espaciadas en una bacteria intestinal, *Escherichia coli*. Cuando empecé mi tesis estábamos estudiando los mecanismos génicos de adaptación de otros microorganismos que se llaman *archaeas* que también son procariotas, como las bacterias, pero que habitan en ambientes hipersalinos. Conseguimos las primeras secuenciaciones que se hicieron en la Universidad de Alicante precisamente en estos microorganismos y encontramos estas secuencias regularmente espaciadas en regiones que esperábamos que estuvieran relacionadas con la adaptación a la sal. Entonces no conocíamos el trabajo del grupo japonés.



Buscando en la bibliografía encontramos el trabajo del grupo japonés sobre *E. coli*. Esto nos sorprendió porque las secuencias se encontraban en archeas y *E. coli*, que

Decidimos ponernos de acuerdo en utilizar el mismo nombre y les propuse CRISPR. Se utilizó por primera vez en un artículo publicado por el grupo holandés en 2002 donde se describían unas proteínas asociadas a estas secuencias que se han llamado CRISPR Associated (Cas).

filogenéticamente están muy distantes. Estas secuencias tenían que ser algo común en las procariotas y tenía que cumplir alguna función pero nunca se había descrito nada sobre esto. En el año 1993 vimos que estas regiones se transcribían. Tenían una actividad y además daban lugar a transcritos que se procesaban mucho, lo cual era muy raro. Nos pusimos a indagar su función y vimos que tenían un efecto muy grande. Cuando aumentábamos el número de copias de estas secuencias las células se morían. Con estos resultados concluimos que había una incompatibilidad o interferencia debida a estas repeticiones y allí nos quedamos. No encontramos ninguna hipótesis que se pudiera comprobar.

A finales de los 90 ya se habían secuenciado unos 20 genomas de bacterias. Vimos que estas repeticiones eran una característica presente en la mayoría de procariotas. En base a las características comunes las denominamos *Short Regularly Spaced Repeats* (SRSR). Luego contacté con un grupo holandés que había trabajado con *Mycobacterium tuberculosis* y dijeron que habían enviado un artículo en el que describían, una vez más, estas repeticiones, renombrándolas SPIDR. Decidimos ponernos de acuerdo en utilizar el mismo nombre y les propuse CRISPR. Les encantó el nombre y se utilizó por primera vez en un artículo publicado por estos mismos autores en 2002 donde se describían unas proteínas asociadas a estas secuencias que se han llamado CRISPR

Associated (Cas). Son muchas proteínas diferentes —hay unas 45 familias— que normalmente están asociadas con funciones de corte de ADN o ARN.

En 2003 estábamos secuenciando una cepa de bacteria *E. coli* y nos encontramos que una de ellas, entre dos espaciadores, era idéntica a la de un virus y además sabíamos que esta cepa era resistente precisamente a ese virus. Exploramos todos los genomas que había publicados y vimos que, en un porcentaje alto, los espaciadores ubicados entre las secuencias CRISPR coincidían con elementos móviles que se transfieren entre bacterias. Estos eran virus o plásmidos que se

transmitían en la misma especie en la que habíamos encontrado el espaciador. Esto nos decía que se derivaban de secuencias de esos elementos invasores que en algún momento habían estado en contacto con la bacteria.

FMB: Desde sus primeras publicaciones sobre CRISPR en los años 90, ¿nos puede explicar el proceso de desarrollo que ha permitido alcanzar una gran expansión de esta tecnología en la actualidad?

FM: Hacia 2005 se sabía que era un sistema inmune y muchos grupos intentaban entender el sistema. Pero en 2011 hubo un boom de publicaciones. Un grupo de Lituania dirigido por Virginijus Siksnys demostró que podías transferir un sistema CRISPR-Cas a otras especies muy alejadas evolutivamente. Lo cual significa que el sistema se podía transferir de unos organismos a otros muy distintos. En 2012 Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, en estudios *in vitro* empezaron a mezclar componentes de estos sistemas CRISPR-Cas para averiguar cuáles eran los componentes mínimos para llegar a una restricción programable —es decir, cómo cortar cualquier secuencia de ADN con estos elementos. Tuvieron la genial idea de decir que se podría utilizar para editar genomas. Gracias al sistema de reparación de las células eucariotas podías dirigir esa

reparación para introducir secuencias de ADN, eliminarlas o editarlas.

FMB: ¿Siendo este sistema identificado en bacterias, como puede trasladarse su aplicación a estudios genéticos en mamíferos?

FM: En febrero de 2013, dos grupos de investigación, el de Feng Zhang y el de George Church demostraron que efectivamente con esos componentes se podía editar el genoma de células de mamíferos y que funcionaba sorprendentemente bien.

- **2011, un grupo de Lituania, dirigido por Virginijus Siksnys, demostró que se podía transferir un sistema CRISPR-Cas a otras especies muy alejadas evolutivamente. Esto significa que el sistema se podía transferir de unos organismos a otros muy distintos.**

- **2012, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna propusieron utilizar este sistema para editar genomas en células eucariotas e identificaron los componentes mínimos para hacerlo.**

- **2013, dos grupos de investigación, el de Feng Zhang y el de George Church demostraron que con esos componentes se podía editar el genoma de células de mamíferos.**

FMB: Una de las aplicaciones sería el desarrollo de nuevos métodos antimicrobianos. ¿Qué trabajos conoce en este sentido en salud humana? ¿Qué otras aplicaciones potenciales se están explorando?

FM: Resulta que, a diferencia de las células de los mamíferos y de las plantas, la mayoría de las bacterias no tienen sistemas muy eficaces de reparación de las roturas de ADN. Eso quiere decir que puedes programar un sistema CRISPR-Cas dirigido contra una secuencia del genoma de una bacteria. Puedes programarlo para que vaya contra la región responsable, por ejemplo, de producir una toxina. Una vez que llega al intestino, el sistema sería inocuo para las bacterias beneficiosas, pero mataría las bacterias que contienen la información para producir esa toxina. Por tanto, puedes diseñar antimicrobianos específicos que solo matan al patógeno y respetan la microbiota. Eso es una gran ventaja respecto los antibióticos que son menos específicos.

FMB: ¿Reconoció la trascendencia de sus hallazgos en ese momento? ¿Se inició alguna acción de transferencia o desarrollo de esta tecnología, o su protección por patente?

FM: Cuando hicimos el hallazgo a mediados de los 2000, llevaba desde el 1993 tratando de averiguar para qué podía servir aquello. No se puede imaginar lo que es darse cuenta después de 10 años: inmediatamente me percaté de la enorme repercusión que tenía dentro del campo de la microbiología y en biología en general. Pero nunca me imaginé que se podría utilizar para lo que se usa ahora. Recuerdo que fui a casa y le dije a mi mujer que acababa de descubrir algo por lo que, en algún momento, le darían a alguien —no sé a quién— un premio Nobel. Fue un momento maravilloso.

Se puede programar un sistema CRISPR-Cas dirigido contra una determinada secuencia del genoma de una bacteria. Por ejemplo, se podría administrar un sistema CRISPR-Cas que fuera inocuo para las bacterias beneficiosas, pero mataría las bacterias patógenas, respetando la microbiota. Ésta sería una terapia mucho más específica que la basada en antibióticos.

En el 2003 intentamos patentarlo, pero no conseguimos resultados experimentales y nos ganó la partida otro grupo.

FMB: ¿Cuál es el futuro de las aplicaciones de CRISPR con relevancia para la salud humana?

FM: En animales de laboratorio se han inyectado CRISPR-Cas dirigidos con virus, por ejemplo al hígado, y se consigue modificar un porcentaje importante de las células hepáticas. Por ejemplo, en un experimento se trató a ratones afectados por distrofia muscular que no se podían mover. Se observó que ganaban movilidad y calidad de vida. Ya se han aprobado dos ensayos clínicos, uno en EE.UU. y otro en China, para probar terapias contra el cáncer en humanos.

FMB: ¿Sigue investigando en este campo?

FM: Hacemos investigación básica para conocer este sistema en sus hospedadores naturales. Es importante para nosotros conocer cómo se adquiere esa infor-

mación en forma de espaciadores. Hay muchas preguntas y una de ellas es saber cómo es capaz de diferenciar lo propio de lo extraño. Si reconociera material propio y se inmunizara contra él adquiriría una autoinmunidad como nos pasa de hecho a los humanos pero el mecanismo que lo evita todavía no se entiende. **Aca-bamos de publicar un artículo en *Nature Biotechnology* relacionado con esta línea de trabajo en el que demostramos que hay sistemas que no tienen Cas. Sólo tienen agrupaciones CRISPR y curiosamente los utilizan para destruir esos Cas cuando entran en la célula.** Hay bacterias que ni tienen ni quieren tener este sistema de defensa y han utilizado algunos de sus componentes para evitar que se instaure un sistema inmune completo. A algunas bacterias no les compensa tener el sistema inmunológico.

FMB: ¿Cómo influyó el sistema nacional de I+D en el desarrollo de este avance?

FM: Curiosamente pedimos proyectos para trabajar con estos organismos y los evaluadores nos lo denegaban porque no tenían ninguna utilidad aparente. Esto revela la importancia de contar con un sistema de investigación básica. A veces un proyecto dirigido a investigación básica consigue un resultado con aplicaciones espectaculares como en este caso. Incluso los fracasos, que no se suelen, publicar pueden ser más importantes que los éxitos.

FMB Recientemente se ha barajado su nombre como candidato al premio Nobel. Si se lo hubiesen dado ¿qué impacto cree que habría tenido? ¿Cómo cree que se podría animar la investigación en España?

Sin ninguna duda habría tenido un impacto muy positivo para la investigación en este país, un toque para animar la inversión en ciencia y, lo que es casi tan importante, un aliciente para los jóvenes investigadores.