

## EL PROMISORIO CAMINO DE LA TECNOLOGÍA CRISPR-CAS9 EN LA EDICIÓN GENÓMICA

Reyes, A.  
Olivera, L.  
Guerra, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

CRISPR, grupo de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), es un sistema de defensa viral encontrado en el genoma de bacterias y arqueas. La transcripción de estas secuencias CRISPR, que portan ADN viral asimilado previamente (*espaciadores*), produce crARNs que, en complejo con complejos multiproteicos asociados a CRISPR, Cas (*CRISPR associated*), catalizan la degradación de material genético invasor que porte secuencias complementarias a los crARNs (*protoespaciadores*). En *Streptococcus pyogenes*, Cas9 es la única proteína encargada de efectuar los cortes de doble hebra en el ADN extraño, proporcionando un sistema *in vitro* e *in vivo* rápido, simple y barato para introducir cortes y mutaciones en cualquier región deseada, en tanto Cas9 sea programada con un crARN específico, llamado específicamente gARN, sgARN o chiARN. La tecnología CRISPR-Cas9 puede aplicarse eficientemente a una gran variedad de organismos procariontes y eucariotes, es decir, constituye una herramienta de inestimable poder en la edición genómica y estudio de la función de los genes.

**Palabras Claves:** CRISPR, espaciador, protoespaciador, PAM, nicasa, edición genómica

### ABSTRACT

CRISPR group of regularly spaced short palindromic repeats (*clustered Regularly interspaced short palindromic repeat*), it is a viral defense system found in the genome of bacteria and archaea. The transcription of these CRISPR sequences which carry viral DNA previously assimilated (*spacers*), produces crARNs that in complex multiprotein complexes associated with CRISPR, Cas

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma. E-mail: alcides.guerras@urp.pe

(CRISPR Associated), catalyze the degradation of invading genetic material bearing complementary sequences to crARNs (protoespacers). In *Streptococcus pyogenes*, Cas9 the only protein responsible for making the cuts double-stranded foreign DNA, providing a fast, simple and inexpensive method to introduce cuts and mutations in any desired region *in vitro* and *in vivo* system, while Cas9 be programmed with a specific crARN, specifically called gARN, sgARN or chiARN. The CRISPR-Cas9 technology can efficiently be applied to a wide variety of prokaryotic and eukaryotic organisms and is an invaluable tool in genomics to study the issue and the key role genes

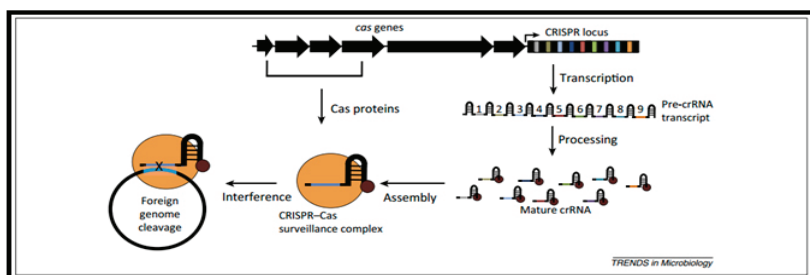
**Keywords:** CRISPR, spacer, protospacer, PAM, nicase, genomic edition

## INTRODUCCIÓN

Desde que Arber descubrió las enzimas de restricción, motivo por el cual fue laureado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1978, se pensó que éste era el mecanismo principal usado por la mayor parte de organismos procariontas para defenderse de la invasión de virus, catalizando, junto con otras nucleasas citoplasmáticas, la ruptura neutralizadora del material genético viral en sitios específicos. Sin embargo, no fue sino hasta hace algunos años (Barrangou *et al.*, 2007) que un grupo de investigadores comprobó que una cepa silvestre de *Streptococcus thermophilus*, tras un encuentro con bacteriófagos, se tornó resistente como consecuencia de la asimilación de ciertas secuencias virales dentro de una región genómica bacteriana denominada CRISPR. Dicha región, y las nucleasas asociadas a ella (Cas), constituyen un sistema inmunitario adaptativo microbiano capaz de cortar cualquier secuencia de ADN en cuanto tales secuencias hayan sido previamente asimiladas en la región CRISPR. En otras palabras, el sistema CRISPR-Cas es una ‘enzima de restricción personalizable’ con capacidad para cortar todo tipo de secuencias de interés. Las emocionantes posibilidades que encierra dentro de sí esta nueva tecnología prometen grandes cambios en la edición genómica: no en vano se la ha llamado ‘el más grande descubrimiento en biotecnología del siglo.’

Por las siglas de su nombre, la secuencia CRISPR es un grupo de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas, vale decir, una serie de secuencias de ADN de origen externo asimiladas por la bacteria para la detección e interferencia por complementariedad de los genomas invasores. Por esta razón, las bacterias antes de ser capaces de protegerse de ciertos virus tienen que asimilar en dichas secuencias CRISPR partes

del genoma del patógeno, de la misma manera en que se desarrolla y desenvuelve la inmunidad adquirida de los organismos eucariotas superiores. La transcripción de esta secuencia genera un pre-crARN que, después de su procesamiento, se divide en crARNs maduros. Los crARNs forman complejos con las nucleasas Cas con el objetivo de cortar toda molécula de ADN que presente *complementariedad* con el crARN (Fig. 1).



**Figura 1.** Un esquema genérico del sistema Tipo I CRISPR-Cas. Los genes cas se encuentran corriente arriba del locus CRISPR. Las proteínas Cas (círculos anaranjados y marrones) están involucradas en la interferencia, ensamblaje y procesamiento de los crARN, además de participar en la asimilación de los espaciadores. Tomado de Bondy-Denomy & Davidson (2014).

En *Streptococcus pyogenes*, Cas9 es la única proteína responsable del silenciamiento guiado por crARN del ADN extraño (Jinek *et al.*, 2012). Por su simplicidad, esta nucleasa ha sido elegida para los ensayos *in vitro* de manipulación genética. Después de las demostraciones iniciales en el 2012 de que Cas9 puede ser programada para cortar varias secuencias de ADN *in vitro*, una ráfaga de artículos publicados en el 2013 mostraron que esta tecnología también funciona eficientemente en una variedad de células y organismos. Estudios de prueba iniciales demostraron que Cas9 puede ser dirigida a genes endógenos en bacterias, líneas celulares carcinogénicas humanas y células madres humanas en cultivo, así como en un organismo completo, el pez zebra. Posteriormente, la nucleasa Cas9 ha sido usada para alterar genes en la levadura, tabaco, *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, sorgo, ratón, rata, conejo, sapo, *D. melanogaster*, gusano de seda y en la lombriz intestinal (Sander & Joung, 2014). Por ejemplo, el gen *CFTR*, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), es un transportador ABC de iones cloruro de las membranas celulares

eucariotas de organismos vertebrados, cuya mutación desencadena la fibrosis quística. Recientemente, se usó CRISPR-Cas9 para corregir el gen CFTR en células madre del intestino derivadas de ratones con fibrosis quística, con resultados positivos (Schwank *et al.*, 2013).

Esta tecnología aún está en desarrollo y necesita superar algunos defectos muy notorios, como el corte en sitios no deseados del genoma editado (*off-target sites*). Los datos más importantes sobre la estructura de las secuencias y de la proteína, así como las principales aplicaciones son presentados en esta pequeña revisión.

### **La secuencia CRISPR es la base de datos de virus de las bacterias y arqueas**

Los bacteriófagos (o virus de bacterias) son los organismos más abundantes de la biosfera. Infectan a la bacteria a fin de reproducirse, con lo cual usualmente matan a la célula hospedera cuando la replicación termina (Gasiunas *et al.*, 2014). Ante tal peligro las bacterias han desarrollado, entre otros, un mecanismo muy específico que permite escindir el material genético viral de sólo aquellos fagos cuyas secuencias de ADN (parte de ellas) hayan sido integradas al genoma de la bacteria con anterioridad, específicamente en una región llamada CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). Los loci CRISPR generalmente están compuestos de múltiples secuencias repetidas cuya longitud varía entre 21 y 48 pb., separadas por otras secuencias de ADN foráneo de longitud variable (26 a 72 pb.) denominadas *espaciadores* (de colores en la Fig. 1) (Bondy-Denomy & Davidson, 2014). Es en los espaciadores donde la bacteria acumula la memoria adaptativa para luchar frente a los bacteriófagos. Puesto que el genoma del microorganismo no está intrínsecamente protegido de su propio sistema CRISPR-Cas (como la metilación en el caso de las enzimas de restricción), una forma que tiene el genoma de autodefenderse consiste en no presentar secuencias complementarias a los espaciadores CRISPR, lo que de hecho ha sido observado (Bondy-Denomy & Davidson, 2014). Últimos hallazgos afirman que la adquisición de espaciadores ocurre de manera dependiente de la replicación, en colaboración con la proteína RecBCD, que degrada ADN a partir de cortes de doble hebra (*double strand break*, DSB) hasta detenerse en sitios Chi del genoma bacteriano. Como los fagos presentan muchos menos sitios Chi, la degradación de sus secuencias, y su posterior asimila-

ción en la región CRISPR, ocurre en mayor medida, diferenciándose así el ADN propio del extraño (Levy *et al.*, 2015).

Los productos de los genes *cas* ayudan a la maduración de los crARNs (productos de la transcripción de CRISPR), con los que forman complejos ribonucleoproteicos de acción nucleasa para destruir las moléculas de ADN ajenas que presenten homología con los espaciadores crARN. Análisis comparativos iniciales de los loci CRISPR revelaron que hay grandes diferencias en las secuencias repetidas, en las secuencias de los genes *cas* y en la arquitectura de los operones *cas*. En base a estas diferencias, los sistemas CRISPR-Cas han sido clasificados en tres tipos y varios subtipos. Cada tipo con una proteína Cas particular: los sistemas tipo I contienen a la nucleasa-helicasa Cas3 (*E. coli*), los de tipo II se caracterizan por la nucleasa Cas9 (*Streptococcus pyogenes*) y el tipo III (más propio de arqueas) presenta a la Cas10, una gran proteína de función desconocida (van der Oost, *et al.*, 2014).

La secuencia en el genoma extraño del cual deriva el espaciador se conoce como protoespaciador (azul en la Fig. 1) (Richter *et al.*, 2012). Por consiguiente, cada espaciador se aparea con el protoespaciador que fue asimilado por la bacteria inicialmente (advértase el prefijo proto- del griego *proto*, primero). Corriente abajo del protoespaciador, en el ADN invasor, existe una secuencia de 2 a 5 nucleótidos (*protospacer adjacent motif*, PAM, motivo adyacente al protoespaciador) necesaria para la determinación del sitio de corte de la nucleasa. Se ha demostrado que la presencia de este pequeño motivo es necesaria para que la nucleasa Cas9 inicie la ruptura del protoespaciador (Jinek *et al.*, 2012). Como PAM sólo se encuentra en el ADN invasor, y no en la región CRISPR, dicho motivo evita una respuesta autoinmune dentro de la célula, pues los espaciadores CRISPR son, por naturaleza, complementarios a los crARN que codifica (sistema CRISPR-Cas cortando la propia región CRISPR).

En resumen, el mecanismo de defensa CRISPR-Cas comprende tres etapas. La resistencia primero debe ser adquirida mediante la integración de espaciadores en la región CRISPR. Luego, esta secuencia es transcrita y procesada en pequeños crARNs. Finalmente, un complejo ribonucleoprotéico crARN-Cas detecta ácidos nucleicos invasores para su degradación. Se ha observado que las proteínas Cas cumplen papeles importantes en cada una de estas etapas (Zhang *et al.*, 2014).

Resulta evidente que de la misma manera en que el sistema CRISPR-Cas previene el ingreso de material genético dañino al interior de la célula, degradándolo, es capaz también de impedir la adquisición de secuencias benignas para la bacteria (genes de resistencia a antibióticos) producto de la transferencia genética horizontal (*horizontal genetic transfer*, HGT). En este sentido, el mantenimiento genómico del sistema CRISPR depende de una fuerte presión selectiva, sin olvidar que ya representa un costo energético (nada pequeño) para el microorganismo. Se ha descubierto que la presencia del sistema CRISPR-Cas tipo II tiene una correlación inversa con la presencia de genes de resistencia a antibióticos procedentes de HGT, lo cual sugiere que los sistemas CRISPR-Cas podrían funcionar de una manera no beneficiosa, perjudicando la adquisición de genes útiles (Bondy-Denomy & Davidson, 2014).

Esto implica que el sistema CRISPR-Cas presenta una regulación muy estricta. Tal vez la regulación de la inmunidad CRISPR en el nivel transcripcional podría suministrar un control ‘*on-off*’ para la tolerancia de elementos genéticos extraños en procariotas (Barrangou & Marraffini, 2014).

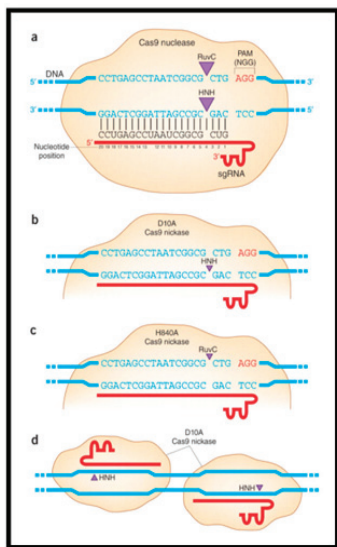
### **La nucleasa Cas9 de *S. pyogenes* es la única enzima encargada de degradar el ADN intruso**

Mientras que los sistemas CRISPR-Cas tipo I y III dependen de complejos multiprotéicos guiados por ARN para detectar y escindir el material genético viral, los sistemas tipo II utilizan una única nucleasa guiada por ARN, Cas9, que requiere para actuar tanto un crARN maduro como un crARN trans-activador (tracrARN) (Jinek *et al.*, 2014).

El locus CRISPR tipo II de *S. pyogenes* consiste en cuatro genes, incluyendo al gen de la Cas9, así como los ARNs no codificantes crARN y tracrARN (Cong *et al.*, 2013). Este sistema cataliza el DSB en pasos sucesivos. Primero, el pre-crARN completo y el tracrARN son transcritos del locus CRISPR. Segundo, el tracrARN se hibrida a las repeticiones directas del pre-crARN y se asocia directamente con Cas9 como un dúplex, lo que favorece la maduración del pre-crARN (dependiente de RNasa III). Tercero, el dúplex crARN:tracrARN dirige a Cas9 a su ADN- objetivo, cuyo protoespaciador adyacente a un PAM es finalmente cortado (Fig. 2).



cias específicas en el sitio de corte, siempre y cuando una molécula de ADN exógeno sea suministrado (Wu *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Sistemas basados en CRISPR-Cas9 para alterar la secuencia de genes. a. Nucleasa Cas9:gARN putativa. b y c. Derivados mutantes de Cas9, nicasas. Advértase que siempre se necesita el PAM. d. Sistema de corte más específico para obtención de extremos romos por BER. Tomado de Sander & Joung (2014).

Como se mencionó anteriormente, uno de las desventajas de CRISPR-Cas9 es el corte *off-target site*, que consiste en el corte de secuencias no deseadas del genoma que también presentan homología con el gARN. Una solución muy práctica a este problema es el uso de nicasas. La nicasa Cas9 (Cas9n, de *nick*, corte de una sola hebra de ADN) generada por mutación en uno de los dominios de la nucleasa (RuvC<sup>-</sup> HNH<sup>+</sup>: D10A; RuvC<sup>+</sup> HNH<sup>-</sup>: H840A. Sander & Joung, 2014) (Fig. 4b, c) puede realizar un corte en una sola de las hebras del ADN. Si dos nicasas actúan cortando por separado hebras distintas de secuencias cercanas del genoma objetivo (Fig. 4d), la especificidad del sistema aumenta, puesto que es menos probable encontrar dos secuencias complementarias a los gARNs separadas a una distancia determinada (Wu *et al.*, 2014). Además, puesto que los extremos sobresalientes (*overhangs*) resultantes son reparados mediante reparación por escisión de bases (*base excision repair*; BER), un sistema muy preciso, la inserción de secuencias por NHEJ y HR (recombinación homóloga) mejora.

## Aplicaciones

Los usos del sistema CRISPR-Cas9 están dirigidos a mejorar o ser nuevas opciones para la solución de diversos problemas, como la terapia génica humana, mejora de cultivos y ganados, disfunción dirigida de genes virales y patógenicos, control de los niveles de expresión con el corte de moléculas de ARN, represión o activación de secuencias codificantes, biología sintética, etc.



Los genetistas de ratones, quienes han sido precursores de muchos de los mayores descubrimientos en terapia génica de mamíferos destinada a humanos, vieron en CRISPR-Cas9 una herramienta sencilla y rápida para crear ratones transgénicos con fenotipos observables. Wu *et al.* (2013) fue uno de los primeros grupos en demostrar que era posible corregir enfermedades genéticas *in vivo*, cuando ellos rescataron un fenotipo con cataratas corrigiendo un gen *Crygc* mutado.

Además del gran número de modelos en ratones que están siendo creados con la tecnología CRISPR-Cas9, otros organismos han mostrado una respuesta positiva a este método de manipulación, incluyendo animales-modelo tradicionales: *D. melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Danio rerio*; y también animales no tradicionales como modelos genéticos, como cabras y cerdos, en los cuales resulta importante el manejo tanto para el desarrollo e investigación médica como la agrícola (Riordan *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

La habilidad de usar endonucleasas guiadas por ARN (Cas9) para cortar virtualmente cualquier región del genoma de un organismo ha traído consigo grandes mejoras en la capacidad varios aspectos del genoma, incluyendo la importancia y función de los genes en sí, además de los componentes regulatorios que los controlan. Actualmente, el número de técnicas relacionadas con CRISPR-Cas9 y las aplicaciones derivadas de ellas continúa en aumento. Aunque esta nueva y revolucionaria forma de realizar ingeniería genética parezca haber desplazado a las tecnologías que la precedieron (ZNFs, TALENs), aún el sistema CRISPR-Cas9 tiene un largo camino por delante, y para perfeccionarse debe ayudarse de otras tecnologías cuyo desarrollo ha sido consolidado con los años, como RNAi.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrangou, R. *et al.* 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709–1712.
- Barrangou, R. Marraffini, L. 2014. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol. Cell.* 54(2): 234–244.
- Bondy-Denomy, J. Davidson, A. 2014. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR-Cas systems. *Trends in Microbiology.* 22(4): 218-225.
- Cong, L. *et al.* 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* 339: 819-823.
- Gasiunas, G. Sinkunas, T. Siksnys, V. 2014. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 71: 449–465.
- Gratz, M. Wildonger, J. Harrison, M. O'Connor-Giles, K. 2013. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Landes Bioscience. Fly* 7(4): 249-255.
- Heler, R. *et al.* 2015. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. *Nature.* 519: 199–202.
- Hsu, P. Lander, E. Zhang, F. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell.* 157(6): 1262–1278.
- Jinek, M. Chylinski, K. Fonfara, I. Hauer, M. Doudna, J. Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337: 816-821.
- Jinek, M. *et al.* 2014. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science.* 343(6176): 1247997–1247997.
- Levy, A. *et al.* 2015. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature.* 520: 505–510.
- Mali, P. Esvelt, K. Church, G. 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *10(10):* 957–963.

- Nishimasu, H. *et al.*, 2014. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 156(5): 935–949.
- Oost, John van der. *et al.* 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(7): 479–492.
- Richter, C. Chang, J. Fineran, P. 2012. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses*. 4(10): 2291–2311.
- Riordan, S. Heruth, D. Zhang, L. Ye, SQ. 2015. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell. Biosci.* 5: 33.
- Sander, J. Joung, K. 2014. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat. Biotechnol.* 32(4): 347-355.
- Schwank, G. *et al.* 2013. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Press*. 13(6): 653-658.
- Wu, Y. *et al.* 2013. Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 13(6):659–662.
- Wu, X. Kriz, A. Sharp, P. 2014. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant. Biol.* 2(2): 59–70.
- Zhang, Q. Doak, T. Ye, Y. 2014. Expanding the catalog of cas genes with metagenomes. *Nucleic Acids Research*. 42(4): 2448–2459.