

# EL DES

MICROBIOLOGÍA

# CUBRIMIENTO DEL SISTEMA CRISPR-Cas

Décadas de investigación  
básica sobre la biología  
de los procariotas han propiciado  
el hallazgo de un mecanismo  
microbiano de inmunidad  
adquirida. Sus aplicaciones como  
herramienta de edición genética  
parecen no tener límite

*Francisco J. M. Mojica y Cristóbal Almendros*

**Francisco J. M. Mojica** es profesor del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, donde dirige un grupo de investigación especializado en el estudio de los sistemas CRISPR-Cas. Es considerado el promotor de la investigación en este campo por sus trabajos pioneros y la repercusión fundamental de sus contribuciones.



**Cristóbal Almendros** es investigador del grupo de Mojica. Actualmente realiza una estancia posdoctoral en la Universidad Tecnológica de Delft. Su tesis doctoral fue la primera en España centrada íntegramente en los sistemas CRISPR-Cas.



**L**OS VIRUS SUPONEN UNA AMENAZA PERMANENTE. LAS células de todos los seres vivos son vulnerables a su ataque. Destacan por su simplicidad estructural, al hallarse constituidos por tan solo un genoma (de ADN o ARN) y una cápside que les proporciona protección y la capacidad de reconocer e invadir a hospedadores potenciales.

Pero, al contrario de lo que se podría pensar, la mayor parte de los  $10^{31}$  virus que moran en la Tierra no atacan a organismos pluricelulares de gran tamaño, sino que se propagan de un organismo microscópico a otro. La incidencia de dicha infección es especialmente elevada en los procariotas, seres unicelulares que, a diferencia de los eucariotas, se hallan desprovistos de núcleo y suponen, después de los virus, la segunda entidad biológica más abundante de nuestro planeta. Su cifra asciende a unos  $5 \cdot 10^{30}$  individuos y comprenden dos grandes grupos: las bacterias y las arqueas.

La invasión de un procariota por una partícula vírica puede tener consecuencias nefastas para él, ya que normalmente le provoca la muerte. El proceso infeccioso se inicia tras la unión del virus a un componente de la envoltura celular del procariota, que va seguida de la introducción de su material genético en el citoplasma. Una vez en su interior, tiene la posibilidad de replicarse gracias al empleo de los componentes celulares del procariota, con la consiguiente alteración de la actividad de la célula. Tras haber finalizado la replicación, se generan nuevas partículas víricas completas que finalmente se liberarán, por regla general, mediante un proceso denominado lisis, que provoca la destrucción de la célula por rotura de su envoltura.

No resulta, pues, sorprendente que los procariotas, tanto bacterias como arqueas, cuenten con mecanismos para zafarse de esos elementos genéticos invasores. A pesar de ello, los virus

logran destruir cada día hasta el 40 por ciento de las bacterias de los océanos, donde el número de partículas víricas ( $3,5 \cdot 10^{29}$ ) supera en diez veces el de las formas de vida celular. El impacto de la

infección vírica sobre el control de las poblaciones procariotas y, por tanto, sobre la vida en el planeta, es formidable.

Desde hace algunas décadas, varios investigadores de la Universidad de Alicante hemos dedicado buena parte de nuestro trabajo a desentrañar los mecanismos moleculares que conforman la respuesta de los procariotas frente a la infección vírica. A inicios de los años noventa logramos dar los primeros pasos en la descripción de este sistema de defensa fundamental de las bacterias y las arqueas contra los virus, que más tarde denominamos CRISPR-Cas. Los importantes avances a los que hemos contribuido junto a otros grupos en este tema han dado lugar al desarrollo de una potente herramienta de edición genética cuyas aplicaciones no parecen tener límite. El camino recorrido hasta llegar a esta técnica ha supuesto años de investigación básica en microbiología, en los que se han ido sucediendo, uno tras otro, los hallazgos sobre el mecanismo de inmunidad microbiana.

#### INMUNIDAD INNATA E INMUNIDAD ADQUIRIDA

En los años cincuenta, dos equipos de investigadores de la Universidad de Illinois formados por Salvador E. Luria y Mary L. Human, por un lado, y por Giuseppe Bertani y Jean-Jacques Weigle, por otro, observaron que la eficacia infectiva de un virus que atacaba a la bacteria *Escherichia coli* variaba de forma sustancial de unas cepas a otras de la bacteria. Inexplicablemente,

#### EN SÍNTESIS

**Los virus** ponen en riesgo a todas las formas de vida. Para defenderse, incluso los organismos más simples, los procariotas, poseen instrumentos que limitan su proliferación. Pero no siempre consiguen su objetivo, manteniéndose así el equilibrio necesario entre ambos en las comunidades biológicas.

**Los sistemas CRISPR-Cas** constituyen el único mecanismo de defensa procariótico con capacidad adaptativa y que se transmite a la descendencia. Al conllevar un registro de infecciones en el genoma, permite reconocer y, eventualmente, destruir el material genético de invasores reincidentes.

**El descubrimiento** de este sistema de inmunidad adquirida ha supuesto un gran avance del conocimiento. En base a él se han desarrollado herramientas moleculares de edición genética que están facilitando de manera inusitada la investigación científica y proveyendo infinidad de aplicaciones.



EN LA SALINA SOLAR BRAS DEL PORT, en Santa Pola (Alicante), se aisló la arquea *Haloferax mediterranei*, el microorganismo con el que Mojica y sus colaboradores llevaron a cabo los primeros experimentos sobre los sistemas CRISPR-Cas.

la vulnerabilidad a la infección dependía en gran medida de la cepa bacteriana a la que había infectado antes el virus.

Una década más tarde, los laboratorios de Werner Arber, de la Universidad de Ginebra, y Matthew Meselson, de la Universidad Harvard, desvelaron la causa de ese fenómeno. Las bacterias en cuestión contaban con una estrategia de defensa innata denominada sistema de restricción-modificación (R-M) que les permitía reconocer e inactivar a los virus invasores. Tales sistemas se basan en la intervención de una enzima endonucleasa, también denominada restrictasa, que corta y digiere la molécula del ADN vírico en cierta secuencia correspondiente a unos pocos pares de bases. Al mismo tiempo, una enzima metilasa evita la degradación de la misma secuencia presente en el propio ADN bacteriano, lo que se produce gracias a la modificación previa de dicha secuencia por la adición en ella de grupos metilo. De esta manera, cuando un virus de ADN infecta a un procarionte, las restrictasas residentes podrán degradarlo y abortar así la infección.

En contraposición con la inmunidad adquirida, en la que se elabora una respuesta específica frente a diversos patógenos, adaptada a ellos, los R-M se consideran sistemas de inmunidad innata debido a su inespecificidad y carencia de adaptabilidad. Como consecuencia, los R-M son incapaces de redirigir su inmunidad frente a los invasores resistentes o de adaptarse a ellos.

Pero en la carrera armamentística que tiene lugar en la naturaleza entre los virus y sus hospedadores, algunos virus han adquirido diversos mecanismos que inactivan o hacen ineficaces los sistemas R-M. Entre ellos cabe citar los virus que modifican su propio ADN para protegerlo de la restricción (o degradación) llevada a cabo por la bacteria.

Por su parte, los procariotas poseen varias barreras genéticas que son alternativas o complementarias a los sistemas R-M. Entre estas herramientas de defensa figuran los sistemas CRISPR-Cas. Las CRISPR, siglas inglesas de «repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas», corresponden a secuencias repetidas en el ADN procariota entre las que se localiza información sobre determinados virus, lo que permite identificarlos. Por otro lado, las proteínas Cas (por las siglas en inglés de «asociadas a CRISPR») comprenden endonucleasas que actúan sobre la molécula genética del virus. Al producir un corte en ella, impiden la proliferación vírica.

De forma similar al sistema R-M, el mecanismo CRISPR-Cas proporciona protección frente a los elementos genéticos invasores mediante la digestión de secuencias genéticas víricas específicas. Sin embargo, la capacidad de reconocer y actuar sobre esas secuencias viene determinada por unas moléculas de ARN, las cuales guían a una proteína Cas, con actividad endonucleasa, hasta las secuencias que esta debe cortar y degradar. Los ARN guía contienen secuencias que son copia de fragmentos de

ADN de origen exógeno, los cuales, a su vez, proceden del material genético de virus u otros elementos genéticos invasores previamente incorporados en la región del genoma de la célula donde se localizan las unidades repetidas CRISPR.

Las regiones CRISPR actúan, por tanto, como un registro de entrada de dichos elementos, dirigiendo una respuesta específica frente a ellos y dotando de capacidad adaptativa a este sistema de inmunidad. CRISPR-Cas representa la única forma de inmunidad adquirida descrita hasta la fecha en procariontes.

### UN HALLAZGO FORTUITO

Los primeros elementos identificados de lo que más adelante se conocería como sistema CRISPR-Cas fueron las secuencias repetidas en cuestión (las denominadas CRISPR). A finales de los años ochenta, el grupo de investigación de Atsuo Nakata, en la Universidad de Osaka, descubrió en el cromosoma de *Escherichia coli* una secuencia de 29 pares de bases que se repetía varias veces con una misma orientación (repetición directa). Esa repetición contenía una región simétrica (palindrómica) que correspondía a la duplicación de una secuencia de 7 pares de bases orientada en sentido inverso una con respecto a la otra (repetición invertida).

Aunque ya se conocían repeticiones palindrómicas en *E. coli*, la secuencia recién descubierta era notablemente distinta. Además, las repeticiones presentaban la singularidad de que la distancia entre ellas dentro de una agrupación era muy seme-

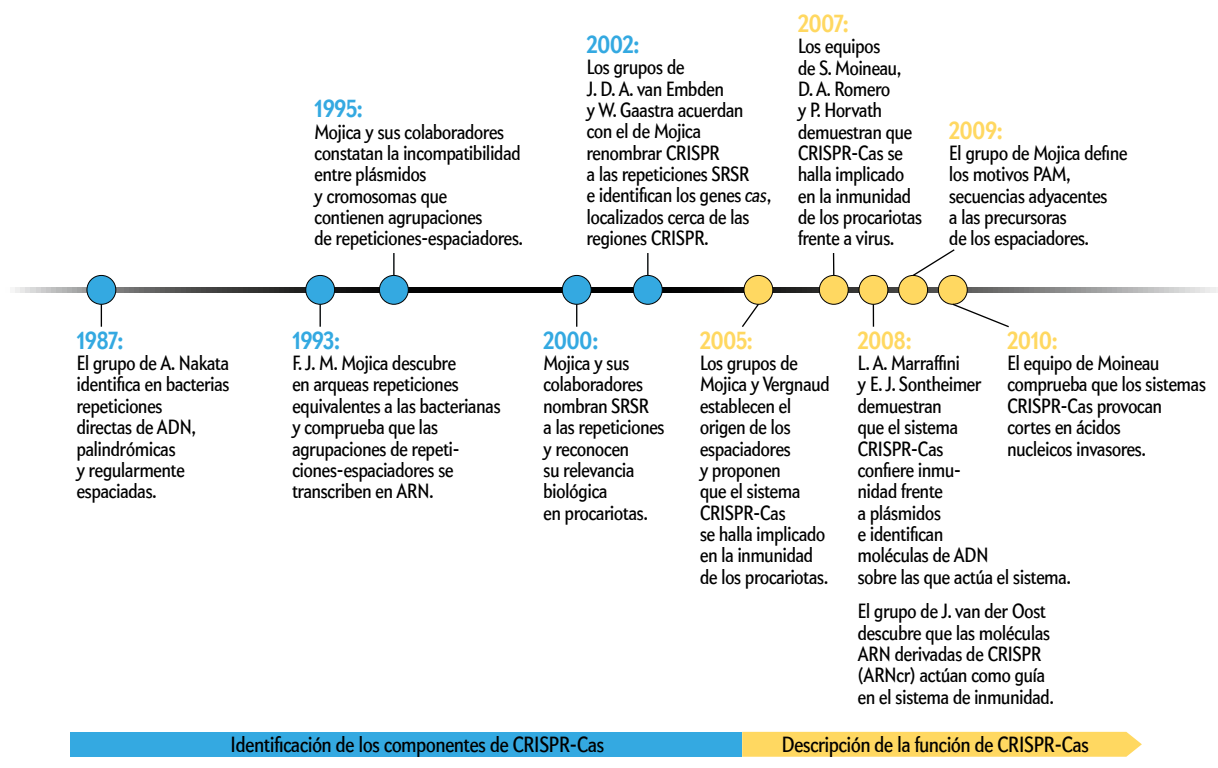
jante: 32 pares de bases o, excepcionalmente, 33. Se trataba, por tanto, de repeticiones regularmente espaciadas por regiones de secuencia variable, denominadas espaciadores. Mientras que la función desempeñada por estas repeticiones constituía un enigma, Nakata y sus colaboradores plantearon la posibilidad de que participaran en la regulación de la expresión de genes localizados en las inmediaciones.

En 1991, miembros del laboratorio dirigido por Jan D. A. van Embden, en el Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda, al analizar una región del cromosoma de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT, denominación dada a un grupo de especies de micobacterias), hallaron una agrupación de repeticiones directas de 36 pares de bases, separadas por espaciadores de entre 35 y 41 pares de bases. Constataron la presencia de esas repeticiones en diferentes especies del CMT. Observaron, asimismo, que existía una diversidad notable tanto en el tamaño de la región de las repeticiones como en cuanto a la secuencia de los espaciadores, no solo entre especies sino incluso entre distintos aislados (cultivos microbianos puros) de la misma especie. Aunque no llegaron a establecer una relación entre esas repeticiones directas con las de *E. coli*, coincidieron con la propuesta del equipo de Nakata sobre su posible implicación en la regulación génica. Si bien la función desempeñada por las repeticiones en *E. coli* o CMT no fue abordada experimentalmente durante los años posteriores, las regiones que las contienen se han utilizado desde principios

## LOS HALLAZGOS

# El largo camino de la investigación básica

La técnica de edición genética CRISPR-Cas, que está revolucionando la biotecnología, hunde sus raíces en decenios de investigación básica. El trabajo de varios grupos de investigación, con aportaciones fundamentales del grupo de Mojica, ha permitido describir el sistema de inmunidad microbiana sobre el que se basa la técnica. Los descubrimientos se sucedieron del siguiente modo:



de los años noventa como marcadores para diferenciar entre cepas del CMT.

Mientras se producían estos avances, en el laboratorio de Francisco E. Rodríguez Valera, en la Universidad de Alicante, estábamos trabajando con un microorganismo peculiar que habitaba en las salinas de Santa Pola, no muy lejos de la universidad. Se trata de *Haloferox mediterranei*, una especie del grupo de las arqueas halófilas extremas, las cuales medran en ambientes hipersalinos. Uno de nosotros (Mojica) llevaba a cabo la tesis doctoral bajo la supervisión de Valera y Guadalupe Juez, de la misma universidad. El objetivo inicial de la tesis consistía en identificar los mecanismos moleculares implicados en la adaptación de arqueas halófilas a cambios en la concentración de las sales. Pero, de modo fortuito, al secuenciar parte del genoma de *H. mediterranei*, descubrimos una agrupación de repeticiones en las inmediaciones de regiones relacionadas con la respuesta a la salinidad, aunque no parecían intervenir en tal respuesta. Se trataba de secuencias reiteradas y parcialmente palindrómicas, con una disposición equivalente a la previamente descrita en las bacterias por los grupos de Nakata y van Embden. Publicamos nuestros hallazgos en 1993 en la revista *Molecular Microbiology*.

Las marcadas diferencias entre las condiciones que soportan el crecimiento de bacterias como *E. coli* (habitante del intestino) y el de halófilos extremos (de entornos con una salinidad diez veces superior a la del agua de mar) nos indicaban que la función desempeñada por estas secuencias no tenía que ver con una adaptación a un ambiente particular. En lugar de ello, su misión debería de estar implicada en algún aspecto muy general de la biología de los procariotas. Por otra parte, aunque el tamaño y la estructura celular de bacterias y arqueas es similar, ambos grupos han evolucionado de manera independiente durante miles de millones de años y difieren en aspectos bioquímicos fundamentales. Bajo la premisa de que se trataba de secuencias repetidas con un mismo origen, la enorme distancia evolutiva entre ambos grupos nos hacía pensar que tales repeticiones constituían un rasgo ancestral, y que probablemente estarían presentes en una gran variedad de procariotas.

### OBSERVACIÓN DE ARN Y GENES CAS

Las primeras pruebas de la actividad de esas secuencias (más tarde denominadas CRISPR) fueron obtenidas precisamente en arqueas halófilas, en el marco de la tesis doctoral de Mojica. Al buscar cuál sería la función de las repeticiones, nos dimos cuenta de que, aunque se localizaban en regiones no codificantes (carecían de las características requeridas para la producción de proteínas), una de las agrupaciones de *H. mediterranei* se transcribía y daba lugar a una población de moléculas de ARN de pequeño tamaño. También observamos que otra especie del mismo género, *H. volcanii*, incluía en su genoma repeticiones muy semejantes a las de *H. mediterranei*.

Sorprendentemente, cuando introdujimos en *H. volcanii* un plásmido (molécula de ADN capaz de replicarse de forma autó-

no) que contenía un fragmento con repeticiones y espaciadores, descubrimos que tal manipulación provocaba la pérdida del genoma de la arquea. Este efecto ponía de manifiesto que se producía un fenómeno de interferencia relacionado de algún modo con las repeticiones, el cual se atribuyó a una incompatibilidad entre moléculas portadoras de dichas secuencias dentro de una misma célula. Sin embargo, los experimentos posteriores que llevamos a cabo en *E. coli* y *Haloferox* (resultados no publicados) no nos permitieron esclarecer la naturaleza de dicha interferencia. Mientras tanto, la lista de procariotas que contenían repeticiones regularmente espaciadas se fue ampliando, gracias a la secuenciación de genomas completos por parte de otros grupos de investigación.

En 1997, tras un período de estancias posdoctorales en otros centros, Mojica regresó a la Universidad de Alicante y creó su propio equipo de investigación, con el objetivo de centrarse en esas secuencias. Al equipo se incorporaría más tarde el otro autor de este artículo (Almendros).

A finales de los noventa, nuestro grupo identificó, en un total de ocho genomas de arqueas y bacterias, repeticiones con un tamaño y una organización semejantes a las descritas previamente. El análisis comparativo de dichas regiones nos permitió definir las características distintivas de esta nueva familia de repeticiones, que denominamos SRSR (siglas inglesas de «repeticiones cortas regularmente espaciadas»). En ella se incluirían repeticiones identificadas por otros autores, muchas de las cuales no se habían relacionado antes entre sí. Ese

estudio puso de manifiesto la gran incidencia de las SRSR, puesto que representaban la familia de repeticiones más ampliamente distribuida en el genoma de los procariotas. Los datos nos hacían pensar que debían de desempeñar un papel relevante en estos microorganismos.

La familia de repeticiones SRSR sería renombrada posteriormente como SPIDR (acrónimo inglés de «repeticiones directas intercaladas por espaciadores») por Jan D. A. van Embden y Leo M. Schouls, del Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda, y por Wim Gaastra y Ruud Jansen, de la Universidad de Utrecht. Finalmente, estos mismos autores acordaron con nuestro grupo utilizar las siglas CRISPR, tan solo unos meses antes de que publicaran un artículo (encabezado por Jansen) donde identificaban cuatro familias de genes que denominaron genéricamente *cas*, seguido de un número (del 1 al 4).

Los genes *cas* estaban localizados invariablemente junto a las regiones CRISPR, lo que sugería que existía una relación funcional entre ambos elementos. La similitud de la secuencia genética responsable de algunas de las proteínas Cas con la de otras implicadas en el metabolismo del ADN o en la expresión génica llevó a Jansen y sus colaboradores a plantear que podrían intervenir en esas mismas funciones. Años más tarde, el grupo de Karen E. Nelson, en el Instituto de Investigación Genómica de Estados Unidos, describiría hasta 45 familias de proteínas Cas, y definiría varios subtipos de sistemas CRISPR-Cas, los cuales se



CULTIVO BACTERIANO infectado por un virus. El crecimiento de la bacteria sobre un sustrato sólido da lugar a una masa densa de células que confiere turbidez al medio. La infección vírica genera zonas con menor densidad celular (círculos oscuros).

podían distinguir claramente a partir de la identificación de los genes situados cerca de las regiones CRISPR-Cas.

### LA FUNCIÓN DE CRISPR, IDENTIFICADA

Sin duda, la determinación de los genes asociados a las CRISPR, junto con la predicción de que las proteínas Cas presentarían una actividad relacionada con los ácidos nucleicos, aportaron una nueva fuente de inspiración para plantear y evaluar hipótesis sobre la función que desempeñarían estos sistemas.

No obstante, la clave que permitió desvelar esa incógnita vino de la mano del análisis de las agrupaciones CRISPR. En el año 2003, nuestro grupo constató, en procariotas muy dispares, que algunos de los espaciadores de las CRISPR tenían un origen exógeno. Fundamentalmente, procedían de ciertos virus y, en un menor porcentaje, de plásmidos. Según la bibliografía que consultamos, estos virus y plásmidos contenían unas secuencias, denominadas protoespaciadores, que eran idénticas a los espaciadores descritos en los procariotas y que resultaban ineficaces a la hora de infectar hospedadores potenciales que contenían el espaciador correspondiente en una región CRISPR.

Las parejas espaciador-protoespaciador resultaban incompatibles cuando se hallaban en una misma célula. En base a estas y otras consideraciones, llegamos a la conclusión de que las CRISPR, y probablemente las proteínas Cas, formarían parte de un sistema de inmunidad adquirida y heredable. Propusimos que los espaciadores, previamente adquiridos a partir de los elementos genéticos transmisibles de virus o plásmidos durante su paso por la célula, interferían de manera específica con la futura propagación de los propios virus o plásmidos. Esta «vacunación genética» era después transmitida a la descendencia y proporcionaba protección a las poblaciones de procariotas durante generaciones. Posteriormente, investigadores del laboratorio de Gilles Vergnaud, en la Universidad París XI, llegaron a conclusiones análogas tras el análisis de los espaciadores de una serie de aislados de la bacteria *Yersinia pestis*.

Medio siglo después del descubrimiento de los sistemas de restricción-modificación y de demostrar su implicación en la inmunidad innata de los procariotas, tras una década de investigaciones infructuosas, nuestro grupo disponía de datos sobre la existencia en bacterias y arqueas de un sistema ancestral de inmunidad adquirida, supuestamente guiado por moléculas de ARN transcritas a partir de las regiones CRISPR (por entonces no disponíamos de resultados experimentales que demostraran este último aspecto; lo dedujimos porque sabíamos que las agrupaciones CRISPR se transcribían y que los espaciadores determinaban la identidad de la secuencia rechazada). Corría el año 2003 y la sorprendente novedad del hallazgo, además de la falta de un trabajo experimental que respaldara la hipótesis, se topó reiteradamente con el rechazo de su publicación en revistas científicas de gran prestigio. Finalmente, a principios de 2005, presentamos nuestro trabajo sobre el sistema de inmunidad adquirida en un artículo en *Journal of Molecular Evolution*.

Las implicaciones biológicas y aplicadas del descubrimiento dentro del ámbito de la microbiología, así como su repercusión en otros campos (especialmente en el contexto de la salud, porque se vislumbró su potencial en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas) incentivaron la investigación sobre los sistemas CRISPR-Cas y pronto se comprobaron las conclusiones derivadas de ese artículo.

En 2007, investigadores de los laboratorios dirigidos por Sylvain Moineau, de la Universidad Laval, Dennis A. Romero, de la compañía Danisco en Estados Unidos, y Philippe Horvath,

de Danisco en Francia, colaboraron en el trabajo que definitivamente demostró que al menos algunas de las proteínas Cas estaban funcionalmente asociadas con las CRISPR, y que ambos elementos conferían protección frente a virus a la bacteria láctica *Streptococcus thermophilus*.

Un año después, Luciano A. Marraffini y Erik J. Sontheimer, de la Universidad del Noroeste en Evanston (EE.UU.), comprobaron que las CRISPR de un aislado clínico de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* interferían con la transferencia de plásmidos. También en 2008, un grupo liderado por John van der Oost, de la Universidad de Wageningen, evidenció que unas moléculas de ARN generadas a partir de las regiones CRISPR de *E. coli* actuaban como guías para reconocer las dianas (las moléculas invasoras).

Finalmente, la acción responsable de la inmunidad fue establecida en 2010 por el grupo de Moineau al estudiar uno de los sistemas CRISPR-Cas de *S. thermophilus*. Los investigadores observaron que las secuencias diana sufrían un corte muy preciso, a una distancia fija de un motivo de secuencia conservada yuxtapuesto a los protoespaciadores. Tanto la secuencia como el tamaño (entre 2 y 5 pares de bases) de este motivo, designado motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) por nuestro grupo, podían variar entre sistemas CRISPR-Cas, incluso entre aquellos pertenecientes al mismo tipo.

### LOS DETALLES DEL MECANISMO

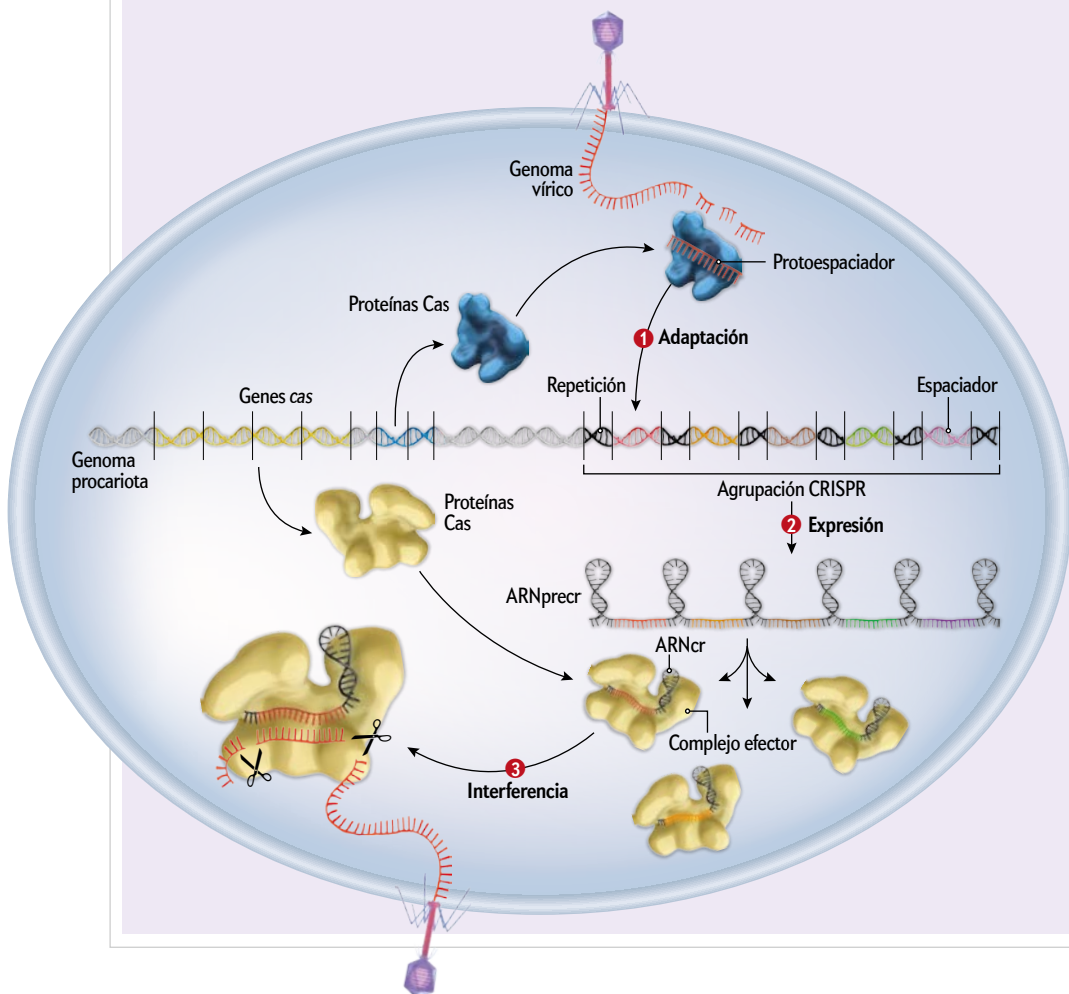
A pesar de la diversidad de sistemas CRISPR-Cas en cuanto a la identidad de los genes y de otras secuencias asociadas (CRISPR, PAM, espaciadores-protoespaciadores), y aun habiéndose establecido los aspectos arriba mencionados para microorganismos y sistemas dispares, con toda la información disponible se pudo esbozar un mecanismo general de acción. Este fue descrito en 2011 en una publicación encabezada por Kira S. Makarova, del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, en Bethesda (Maryland), y en el que participaron unos diez grupos de investigación, entre ellos el nuestro. El mecanismo en cuestión comprende tres etapas, denominadas adaptación, expresión e interferencia, en las que intervienen de forma conjunta las CRISPR y las proteínas Cas.

La adaptación es el proceso inicial mediante el cual se insertan nuevos espaciadores en una región CRISPR, adquiridos a partir de fragmentos de un elemento genético (virus o plásmido) durante su paso por la célula. La agrupación repetición-espaciador se transcribe en la etapa de expresión, lo que genera un ARN preliminar derivado de CRISPR (ARNprecr). Este es luego sometido a digestión en puntos concretos a nivel de cada repetición y da lugar a los ARN derivados de CRISPR (ARNcr). Cada ARNcr alberga la secuencia de un solo espaciador flanqueada por fragmentos de repeticiones. En la etapa de interferencia, los ARNcr forman sendos complejos con proteínas Cas. Estos complejos ARNcr-Cas localizan secuencias de ácidos nucleicos concurrentes con la del espaciador (secuencias diana en el elemento invasor) a través del ARNcr, y mediante una proteína Cas con actividad endonucleasa producen un corte en la diana (el elemento invasor).

Existen, sin embargo, numerosos detalles de este mecanismo que varían según el tipo de sistema CRISPR-Cas concreto, tales como la naturaleza del ácido nucleico diana (ARN, ADN o ambos), el requerimiento de motivos PAM específicos o la clase de corte (de doble cadena, de cadena sencilla, único o múltiple) y la proteína Cas implicada. En al menos algunos sistemas, el corte inicial promueve la adquisición de espaciadores precedentes

## Así funciona CRISPR-Cas

En su estrategia defensiva, el procarionta (bacteria o arquea) incorpora primero en su genoma material genético del virus que le ataca. Ello funciona como una suerte de inmunización, o «vacunación», que le permitirá responder y neutralizar futuras invasiones del mismo virus. El procarionta va acumulando en las agrupaciones CRISPR un registro de los sucesivos virus que le atacan. Contra ellos podrá defenderse más tarde, lo que constituye una inmunidad adquirida que podrá transmitir también a su descendencia. Abajo se detallan las fases del sistema general de defensa:



**1 Adaptación.** Cuando un virus ataca por primera vez a un procarionta, un complejo de proteínas Cas (azul) de esta transfiere un fragmento (protoespaciador) del ácido nucleico vírico a un extremo de la agrupación CRISPR. En este proceso, que implica la duplicación de la repetición adyacente, se genera un nuevo espaciador.

**2 Expresión.** La agrupación CRISPR se transcribe y da lugar a un ARN precursor (ARNprec). Este es procesado en moléculas de ARN derivadas de CRISPR (ARNcr), constituidas por la secuencia de un solo espaciador (varios colores) y fragmentos de las repeticiones adyacentes (negro), las cuales se unen a otras proteínas Cas (amarillo) para formar complejos efectores.

**3 Interferencia.** En un ataque futuro del mismo virus, un complejo efector se une, a través del espaciador, a una secuencia vírica complementaria. Ello provoca que la proteína Cas asociada corte el ácido nucleico del virus, con lo que se impide su proliferación.

de la molécula dañada, con lo que se inicia un nuevo ciclo de inmunización. El resultado final es la inactivación del elemento genético portador de la diana, a menos que los cortes infligidos sean reparados por algún mecanismo ajeno a CRISPR-Cas. De esta manera, la actividad CRISPR puede dar lugar a la destrucción de un plásmido o del genoma de un virus invasor.

### LOS INCONVENIENTES DE LA INMUNIDAD

Tal y como ocurre con el sistema de inmunidad adquirida de los vertebrados, la acción de CRISPR causa efectos indeseados. Además de sobre el material genético exógeno, los CRISPR-Cas pueden actuar sobre el genoma residente, con unas consecuencias que van desde la generación de mutaciones hasta la muerte celular.

Por otro lado, crear barreras a la entrada de material genético conlleva sus desventajas, ya que los procariontas se benefician en numerosas ocasiones de la incorporación de ADN importado del exterior. Por ejemplo, los plásmidos albergan con frecuencia información que confiere a las bacterias resistencia a los

antimicrobianos o les permite utilizar fuentes alternativas de nutrientes.

Incluso la infección por algunos virus puede resultarle ventajosa al hospedador. Antes de la formación y liberación de las partículas víricas, el genoma de determinados virus puede permanecer en la célula durante generaciones, sin causar un perjuicio aparente a los portadores. Durante ese período, se expresa parte de la información genética del virus, pudiendo afectar a las características y capacidades de la célula procarionta a distintos niveles. Un ejemplo notable de las repercusiones de esta infección vírica latente puede tener lugar en las bacterias patógenas: la producción de factores codificados por el virus incrementa la probabilidad de supervivencia de la bacteria y, como consecuencia, de su capacidad patológica.

Los inconvenientes de la acción de CRISPR explican que algunas bacterias posean un mecanismo encargado de evitar que un sistema CRISPR-Cas procedente del exterior se instaure en la célula, que un elevado porcentaje de procariontas carezca de



dichos sistemas, y que su actividad suele estar sometida a una regulación muy estricta que, generalmente, permanece reprimida.

El silenciamiento de los CRISPR-Cas es una de las razones por las que estos sistemas pasaron inadvertidos para los microbiólogos hasta que un cúmulo de observaciones permitió inferir su papel biológico, sin haber podido constatar actividad alguna.

### UN SINFÍN DE APLICACIONES

La existencia en procariotas de un sistema de inmunidad adquirida tiene una enorme importancia biológica debido a sus consecuencias directas sobre la supervivencia de estos microorganismos, la cual, a su vez, repercute de manera fundamental en la del resto de los seres vivos.

El análisis del conjunto de los espaciadores de comunidades procariotas ha proporcionado a los investigadores una nueva herramienta para abordar multitud de incógnitas relacionadas con la ecología, evolución y dinámica de las poblaciones naturales de estos microorganismos, así como de las interacciones entre sí y con sus virus. La identidad de los espaciadores, y su variación entre aislados de una misma especie, se utiliza además en la identificación de bacterias, principalmente las patógenas, por ejemplo, para establecer el origen de brotes epidémicos.

Por otro lado, la sencillez molecular del mecanismo de inmunidad CRISPR permite su fácil manipulación en los hospedadores naturales con diversos fines, tales como su reprogramación para dirigirlos contra elementos genéticos concretos. Esto puede conseguirse con tan solo proporcionarle a la célula espaciadores que coincidan con una secuencia del elemento genético elegido.

De esta manera, los investigadores han modificado bacterias que se utilizan rutinariamente para la elaboración industrial de alimentos, como yogures o quesos. Con ello consiguen hacerlas resistentes a la infección por virus que con frecuencia las atacan durante el proceso de producción. Se ha planteado incluso la posibilidad de diseñar CRISPR contra plásmidos que contienen genes de resistencia frente a antibióticos, lo cual permitiría interferir con la diseminación de dichas resistencias en poblaciones bacterianas. Además, se han transferido sistemas CRISPR-Cas completos a procariotas carentes de ellos, con lo que se los ha dotado de una inmunidad eficaz. Por último, se ha comprobado la eficacia de emplear componentes CRISPR programados para actuar contra secuencias exclusivas del genoma de cepas patógenas. Al administrarlos a poblaciones bacterianas mixtas, destruyen de manera específica a las patógenas, portadoras de dichas dianas. Este uso abre la posibilidad de desarrollar una nueva generación de antimicrobianos selectivos que no afecten a los procariotas que habitan en nuestro organismo y que nos confieren multitud de beneficios.

Aparte de su empleo en bacterias, los componentes de los sistemas CRISPR-Cas han dado lugar a la implementación de un arsenal de estrategias de biología molecular capaces de actuar sobre material genético purificado (in vitro) o en el interior de células eucariotas, tanto aisladas (ex vivo) como aquellas que forman parte de un organismo (in vivo).

La así denominada técnica CRISPR permite modificar (eliminar, corregir, reemplazar, relocalizar) la información genética, controlar la expresión de los genes o detectar y visualizar regiones concretas de un genoma, todo ello con una facilidad y precisión sin precedentes.

El impulso que han proporcionado estas herramientas a la investigación biológica en sus diversos campos es extraordinario, ya que facilitan la tarea de identificación de la función de ele-

SI TE INTERESA ESTE TEMA...


Descubre *Edición genética: CRISPR*, nuestro monográfico digital (en PDF) que recoge los artículos sobre el origen de esta técnica revolucionaria, sus múltiples aplicaciones y el debate ético que genera su uso.



[www.investigacionyciencia.es/revistas/especial](http://www.investigacionyciencia.es/revistas/especial)

mentos genéticos y su implicación en el desarrollo del organismo, la diferenciación celular, el envejecimiento, la vulnerabilidad a las infecciones o el origen y evolución de las enfermedades, tanto en plantas como en animales, incluidos los humanos. El uso de estas técnicas está generando grandes expectativas para la prevención y tratamiento de enfermedades de diversa índole, que van desde la infección por virus hasta procesos cancerígenos o trastornos neurodegenerativos.

El descubrimiento del sistema de inmunidad innata R-M de los procariotas nos proporcionó las enzimas de restricción, una herramienta que permite construir combinaciones precisas de material genético y que supusieron una revolución en biología molecular, el inicio de la ingeniería genética. Después, el descubrimiento de la inmunidad adaptativa mediante CRISPR-Cas ha dado lugar a una nueva generación de técnicas de laboratorio tremendamente versátiles. Están contribuyendo al conocimiento de los seres vivos como ningún otro y, con ello, a solucionar problemas anteriormente inabordables.

Los sistemas CRISPR-Cas son un ejemplo remarcable de la enorme recompensa de la investigación básica en general y, en particular, del estudio de los organismos microscópicos, omnipresentes, imprescindibles, sorprendentes; los primeros en habitar la Tierra y, si se diera el caso, los últimos en despoblarla. Conocerlos, aprender de ellos, ha beneficiado y seguirá beneficiando de manera notable a la humanidad. 

#### PARA SABER MÁS

**Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites.** Francisco J. M. Mojica, Guadalupe Juez y Francisco E. Rodríguez-Valera en *Molecular Microbiology*, n.º 9, págs. 613-621, 1993.

**CRISPR-Cas systems. RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea.** Dirigido por Rodolphe Barrangou y John van der Oost. Springer Verlag, Berlín-Heidelberg, 2013.

**An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems.** Kira S. Makarova et al. en *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, n.º 11, págs. 722-736, noviembre de 2015.

**The heroes of CRISPR.** Eric S. Lander en *Cell*, vol. 164, n.º 1-2, págs. 18-28, enero de 2016.

**On the origin of CRISPR-Cas technology: From prokaryotes to mammals.** Francisco J. M. Mojica y Lluís Montoliu en *Trends in Microbiology*, vol. 24, n.º 10, págs. 811-820, octubre de 2016.

#### EN NUESTRO ARCHIVO

**La edición genética, más precisa.** Margaret Knox en *lyC*, febrero de 2015.

**CRISPR llega a los cultivos.** Stephen S. Hall en *lyC*, septiembre de 2016.

**Modificar nuestra herencia.** Stephen S. Hall en *lyC*, noviembre de 2016.