

ESPECIAL



Edición genética **CRISPR**

SCIENTIFIC
AMERICAN™

INVESTIGACIÓN
Y CIENCIA

ESPECIAL

Edición genética: CRISPR



CONTENIDO

Nuestra selección de artículos sobre el origen de esta **técnica revolucionaria**, sus **múltiples aplicaciones** y el **debate ético** que genera su uso.

El descubrimiento de CRISPR

Francisco J. M. Mojica y Cristóbal Almendros
Investigación y Ciencia, octubre 2017

La edición genética, más precisa

Margaret Knox
Investigación y Ciencia, febrero 2015

Modificar nuestra herencia

Stephen S. Hall
Investigación y Ciencia, noviembre 2016

Edición de embriones humanos

Nerges Winblad y Fredrik Lanner
Investigación y Ciencia, octubre 2017

Órganos humanos fabricados dentro de animales

Juan Carlos Izpisua Belmonte
Investigación y Ciencia, enero 2017

CRISPR llega a los cultivos

Stephen S. Hall
Investigación y Ciencia, septiembre 2016

INCLUYE EL ARTÍCULO

¿Cómo regulará Europa las técnicas de edición genética en la agricultura?

Pere Puigdomènech

La técnica CRISPR permite obtener cultivos resistentes a la contaminación radiactiva

Manuel Nieves-Cordones
Investigación y Ciencia, septiembre 2017

Interruptores para desactivar organismos modificados genéticamente

Jennifer Abbasi
Investigación y Ciencia, febrero 2016

Resurrección genética

David Biello
Investigación y Ciencia, agosto 2016

La edición genética en los cerdos

Monique Brouillette
Investigación y Ciencia, marzo 2016

Riesgos de la edición genética

Jeantine Lunshof
Investigación y Ciencia, agosto 2015

La cumbre sobre edición genética en humanos concluye con opiniones divergentes

Sara Reardon
Investigación y Ciencia, febrero 2016

EDITA

Prensa Científica, S.A.
Muntaner, 339 pral. 1ª, 08021 Barcelona (España)
precisa@investigacionyciencia.es
www.investigacionyciencia.es

Copyright © Prensa Científica, S.A. y Scientific American, una división de Nature America, Inc.

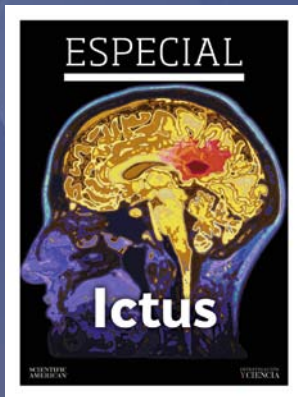
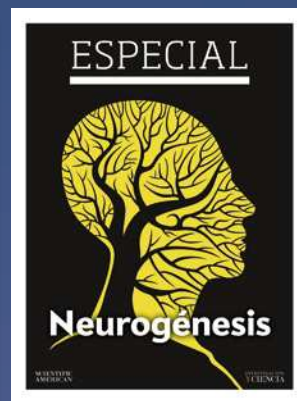
ESPECIAL n.º 30 ISSN: 2385-5657

En portada: iStock / vchal | Imagen superior: iStock / isak55

ESPECIAL

MONOGRÁFICOS DIGITALES

Descubre los monográficos digitales que reúnen nuestros mejores artículos (en pdf) sobre temas de actualidad



www.investigacionyciencia.es/revistas/especial



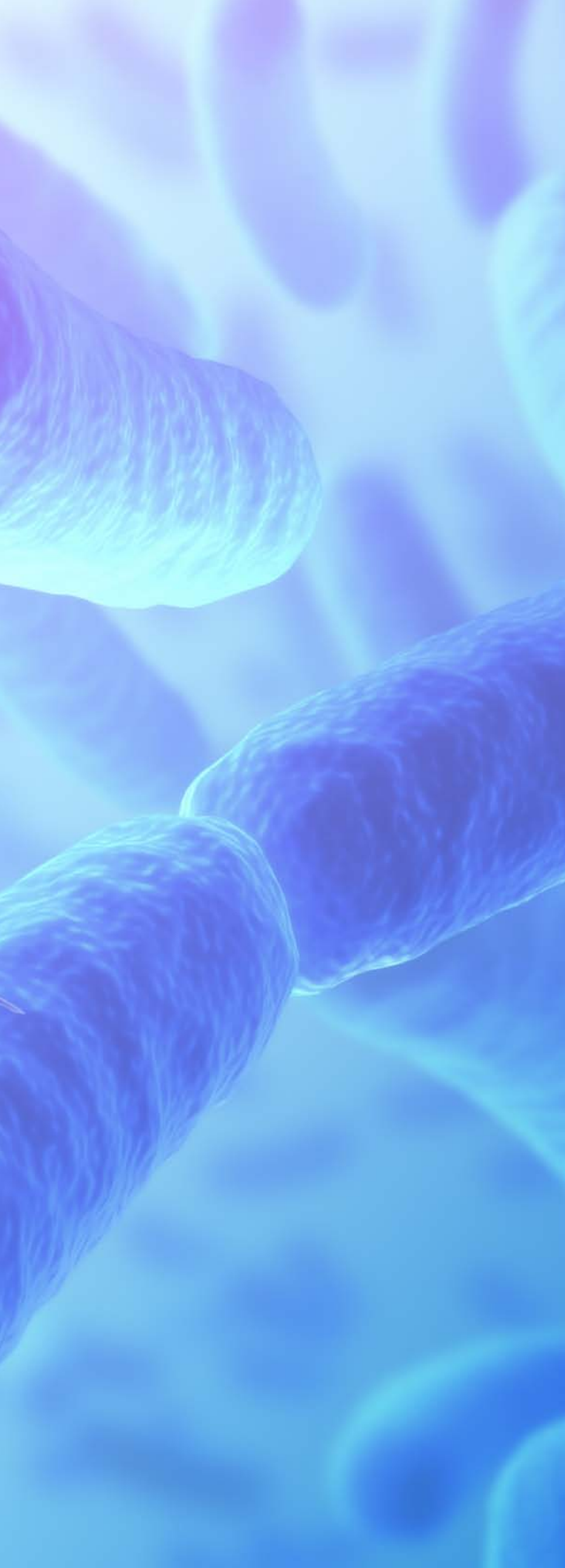
Prensa Científica, S.A.

MICROBIOLOGÍA

EL DESCUBRIMIENTO 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



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

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.



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 procarionta, 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 procariontas 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 procarionta 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 procariontas.

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 semejante: 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

EN SÍNTESIS

Los virus ponen en riesgo a todas las formas de vida. Para defenderse, incluso los organismos más simples, los procariontas, 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 procariontario 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.

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 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 habita en las salinas de Santa Pola, no muy lejos de la universidad. Se trata de *Haloferax 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 autónoma) 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 incompati-