



# EL SISTEMA INMUNE BACTERIANO (CRISPR), UNA HERRAMIENTA UNIVERSAL EN LA EDICIÓN DE GENOMAS

Realizado por Ana San Félix García-Obregón, DNI 51501774-J. Facultad de Farmacia. Convocatoria 21 de junio 2017

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del sistema CRISPR/Cas ha supuesto un gran avance en el mundo de la edición genómica. Originalmente, constituye el sistema inmunitario adaptativo de los organismos procariontes mediado por un grupo de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interspaciadas (CRISPR) que les confiere resistencia a diferentes virus y plásmidos. Esta técnica permite manipular el genoma celular de formas nunca vistas hasta el momento empleando nucleasas guiadas por RNA, como es el caso de la nucleasa Cas9; de una forma sencilla, rápida y específica actuando directamente sobre genes endógenos de interés en múltiples organismos diferentes que hasta el momento habían sido imposibles de manipular genéticamente.

## OBJETIVOS

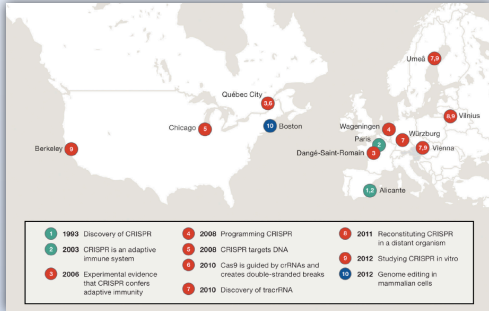
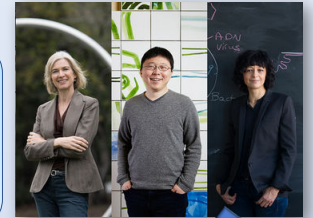
Este trabajo se ha realizado con el fin de dar a conocer una de las técnicas pioneras en edición genómica que ha evolucionado enormemente en los últimos años, introduciendo su historia, mecanismo molecular y posibles aplicaciones.

## METODOLOGÍA

Se ha recopilado información de diferentes artículos adquiridos en las bases de datos de PubMed, Bucea y Google Scholar. Estos artículos se han seleccionado empleando las palabras clave: CRISPR, genome edition, Gene Drive, Cas9, dCas9, crRNA, tracrRNA, immunity system, applications.

## BREVE HISTORIA DEL CRISPR

La primera descripción conocida del sistema CRISPR fue en 1987 tras la secuenciación del gen *iap* de *Escherichia coli*. Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando el español Francisco Mojica describió una serie de secuencias palindrómicas repetidas con estructura similar en diferentes especies procariontes y planteó su posible función en la resistencia a fagos de estos microorganismos. Desde ese momento las aportaciones al desarrollo del sistema CRISPR han sido innumerables, llegando a demostrar en agosto de 2012 por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier el potencial del sistema CRISPR-Cas9 para "cortar y pegar" genes con elevada eficacia. Además, en 2013, Feng Zhang consiguió adaptar el sistema CRISPR/Cas para emplearlo en la edición del genoma humano en células vivas<sup>1</sup>.

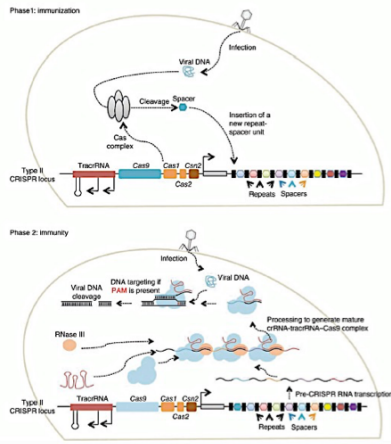


## FUNCIONAMIENTO BÁSICO: SISTEMA CRISPR/Cas TIPO II

El locus CRISPR está constituido por un conjunto de repeticiones palindrómicas cortas de DNA (cajas negras) separadas por espaciadores provenientes de un fago o plásmido (cajas coloreadas). Este conjunto de repeticiones-espaciadores está flanqueado por un operón de genes asociados a CRISPR denominados genes Cas (Cas9 en azul, Cas1 y Cas2 en naranja) que codifican la maquinaria de inmunización<sup>2,6</sup>.

### Fases de la inmunidad CRISPR-Cas.

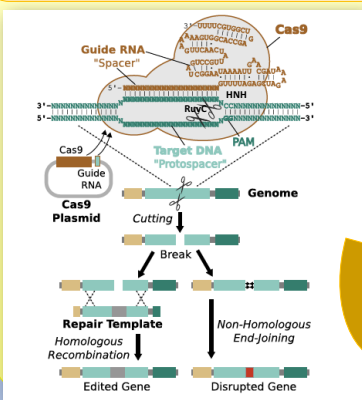
- **Fase 1 de inmunización:** las secuencias espaciadoras similares a las del DNA del fago o plásmido invasor son integradas en la primera posición de la región CRISPR, de manera que se obtenga resistencia a invasiones futuras<sup>2,6</sup>.
- **Fase 2 de inmunidad:** los espaciadores son empleados para detectar el DNA invasor con una secuencia similar. El pre-crRNA es procesado para obtener los crRNAs maduros que servirán como guía. Primero, el tracrRNA hibrida con las secuencias repetidas del pre-crRNA. Después, la RNasa III endógena corta liberando los crRNAs maduros que permanecen asociados con el tracrRNA y Cas9. El complejo corta en los protoespaciadores del DNA invasor con secuencias similares al crRNA<sup>2,6</sup>.



## APLICACIONES

### EDICIÓN GENÓMICA

La expresión celular de Cas9 y de sgRNA permite actuar sobre secuencias específicas del genoma provocando la pérdida o ganancia de la función de un gen, además de mutaciones o correcciones de diferentes genes. Esto permitirá la modulación de las enfermedades así como el desarrollo de técnicas diagnósticas y terapéuticas de las mismas<sup>3</sup>.



## CONCLUSIONES

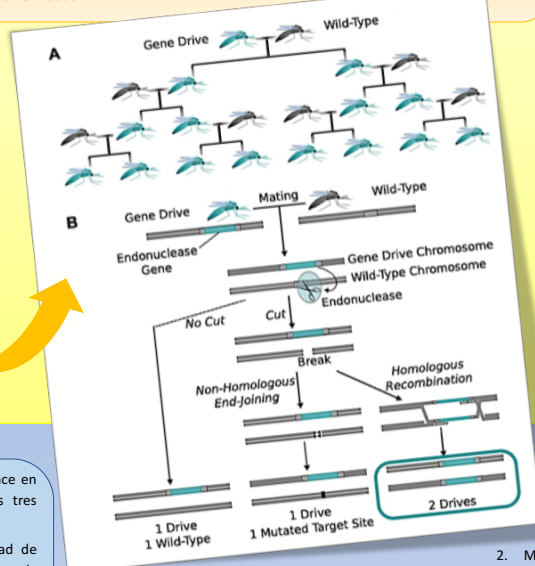
El descubrimiento del sistema CRISPR/Cas ha supuesto un gran avance en ingeniería biológica al combinar en el mismo espacio-tiempo las tres moléculas más importantes: DNA, RNA y proteínas.

Permite el estudio y la manipulación del genoma de gran variedad de organismos, incluyendo el genoma humano, obteniendo resultados más exactos de forma más rápida y sencilla, lo que lleva a que cada vez sean más sus posibles aplicaciones.

Por otro lado, todavía quedan por discutir las posibles repercusiones ambientales y éticas que podría tener la manipulación de secuencias génicas en diferentes especies.

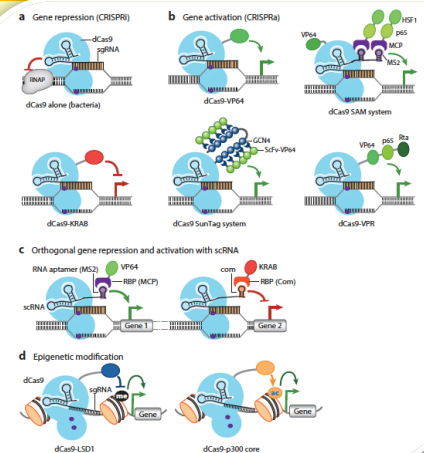
### CONTROL DE POBLACIONES: GENE DRIVE

La técnica Gene Drive para el control de plagas se basa en genes de endonucleasas "homing" capaces de cortar en lugares específicos del cromosoma e introducir la secuencia de un gen por recombinación homóloga de forma que sea transmitido a la descendencia. El objetivo es reducir el número de miembros de la población diana causando letalidad o infertilidad. Además, posee un gran interés en la profilaxis de la malaria, ya que permite eliminar o sustituir los genes responsables de la transmisión de la enfermedad<sup>5</sup>.



### MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y EDICIÓN EPIGENÓMICA

Se emplea Cas9 sin la actividad endonucleasa (dCas9). De esta manera se consigue la inhibición de la transcripción génica por impedimento estérico, o su activación empleando un activador transcripcional; permitiendo controlar la transcripción de genes endógenos. Además, fusionando dCas9 con una enzima que actúe sobre marcadores epigenéticos, se puede modificar el epigenoma y, así, controlar la expresión génica<sup>4</sup>.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Lander ES. The Heroes of CRISPR. Vol. 164, Cell. 2016. p. 18–28.
2. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature. 2015;526(7571):55–61.
3. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. Annu Rev Biochem. 2016;85(1):227–64.
4. Wang X, Huang X, Fang X, Zhang Y, Wang W. CRISPR-Cas9 System as a Versatile Tool for Genome Engineering in Human Cells. Mol Ther Acids. 2016;5(11):e388.
5. Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. Elife. 2014;3:e03401.
6. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nat Methods. 2013;10(10):957–63.