

El sistema molecular CRISPR/Cas: una fascinante historia de descubrimientos científicos

The CRISPR/Cas molecular system: a fascinating history of scientific discoveries

Juan C. Castro¹ y Marianela Cobos²

Recibido: junio 2016

Aceptado: junio 2016

RESUMEN

En este artículo de revisión se describe paso a paso como se ha construido el conocimiento científico sobre el sistema molecular CRISPR/Cas. Este sistema inmunológico único de algunas bacterias y arqueobacterias fue esclarecido a nivel molecular por una serie de investigaciones realizadas en aproximadamente treinta años. Primero un grupo de investigadores japoneses descubrieron un patrón de secuencias repetidas en tándem en el extremo de un gen. Los científicos de esa época no pudieron atribuir una función biológica a este peculiar patrón de secuencias repetidas en tándem. Estos hallazgos fueron corroborados algunos años después por investigadores españoles. Posteriormente, a inicios de la década 2000-2010, los científicos acordaron denominar a estas secuencias con el acrónimo CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, por sus siglas en inglés). En ese mismo periodo de tiempo fueron identificados los genes asociados a CRISPR, a los que denominaron genes *cas*; estos genes codifican enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos. Consecuentemente, los investigadores hipotizaron que CRISPR/Cas podría conferir a las bacterias y arqueobacterias resistencia inmune contra ADN foráneo. Efectivamente, en recientes años la validez de esta hipótesis fue demostrada experimentalmente. En conclusión, es evidente que los grandes descubrimientos son el resultado de investigaciones científicas, muchas veces fortuitas y luego orientadas sobre la base de hipótesis adecuadamente planteadas. Pero estos avances significativos en el conocimiento se logran gracias a la disposición de las publicaciones científicas.

Palabras claves: biología molecular, edición de genomas, inmunología molecular, mejoramiento genético.

ABSTRACT

In this review article we describe step by step how scientific knowledge about the CRISPR/Cas molecular system has been constructed. This unique immune system of some bacteria and archaeobacteria was clarified at the molecular level by a series of investigations carried out in approximately thirty years. First, a group of Japanese researchers discovered a pattern of sequences in tandem at the end of a gene. The scientists of that time could not attribute a biological function to this peculiar pattern of tandem sequence distribution. These findings were corroborated some years later by Spanish researchers. Further, at the beginning of the decade 2000-2010, the scientists agreed to name these sequences with the acronym CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). In the same period, the genes associated with CRISPR were identified, which they called *cas* genes, these genes code enzymes involved in nucleic acids metabolism. Consequently, the researchers hypothesized that CRISPR/Cas could provide to bacteria and archaeobacteria immune resistance against foreign DNA. Certainly, in recent years the validity of this hypothesis was experimentally demonstrated. In conclusion, it is clear that great discoveries are the result of scientific research, often fortuitous and then hypothesis-oriented properly formulated. But these significant advances in knowledge are achieved thanks to the availability of scientific publications.

Key words: molecular biology, genome edition, molecular immunology, genetic improvement.

¹ Unidad Especializada de Biotecnología. Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. juan.castro@unapiquitos.edu.pe

² Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética, Universidad Científica del Perú (UCP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

INTRODUCCIÓN

Una peculiaridad que definitivamente caracteriza a los hombres y mujeres de ciencia, es que son apasionadamente curiosos, tal como lo manifestó Albert Einstein “*I have no special talents. I am only passionately curious*”. Gracias a esta característica, sumado a la capacidad de formular hipótesis precisas y diseñar los experimentos requeridos para probar sus hipótesis con las herramientas adecuadas, es que los científicos generan los conocimientos básicos y aplicados, que ayudan a resolver problemas de diversa índole. Por cierto, para que los científicos formulen y demuestren la validez de sus hipótesis no solo requieren de una sólida formación científica, sino también de una excepcional capacidad de imaginación.

Debido a ello, varios científicos han aportado con sus descubrimientos, muchos de estos por casualidad y otros más dirigidos, que han permitido resolver algunos enigmas. Por ejemplo, el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas (Ishino *et al.*, 1987; Mojica *et al.*, 1993, 2000), que es una maquinaria molecular que se encarga de reconocer y eliminar el ADN de agentes invasores como los bacteriófagos, fue fundamental para el desarrollo de nuevas tecnologías de edición de genomas en microorganismos, animales y plantas (Belhaj *et al.*, 2013; Bortesi y Fischer, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kushalappa *et al.*, 2016). La edición de genomas, además de permitir comprender mejor diversos procesos biológicos básicos, también está siendo empleada para el mejoramiento genético y diversas aplicaciones biotecnológicas para generar bienes y servicios (Chu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Dada la gran relevancia de estas novedosas herramientas moleculares con múltiples aplicaciones prácticas, en este artículo de revisión describimos paso a paso los descubrimientos científicos que han conducido a dilucidar cómo

funciona el sistema CRISPR/Cas. Cabe resaltar, que las publicaciones científicas han cumplido un rol clave en este excitante camino de descubrimientos, porque ha motivado a científicos de varios países ha involucrase en resolver el enigma en torno de este sistema molecular.

1. El descubrimiento de CRISPR

Los hallazgos científicos históricos que han conducido al descubrimiento y desarrollo de la nueva herramienta de edición de genomas (CRISPR-Cas) empezaron hace aproximadamente treinta años. En diciembre de 1987, un grupo de científicos japoneses de la Universidad de Osaka publicaron sus investigaciones sobre la secuencia nucleotídica del gen *iap* de *Escherichia coli*, cuyo producto génico (enzima *iap*) es responsable de la conversión isoenzimática de la fosfatasa alcalina. Estos investigadores encontraron estructuras repetitivas inusuales, nunca antes reportadas, en el extremo flanqueante 3' de la región codante del gen mencionado. Estas estructuras están constituidas por cinco secuencias altamente homólogas de 29 nucleótidos (consenso: CGGTTTATCCCCGCTRRCGGGGAA CTC) arreglados como repeticiones directas con 32 nucleótidos de espaciado entre ellas. Los científicos mencionan al final de la discusión del artículo que la significancia biológica de estas secuencias es desconocida (Ishino *et al.*, 1987).

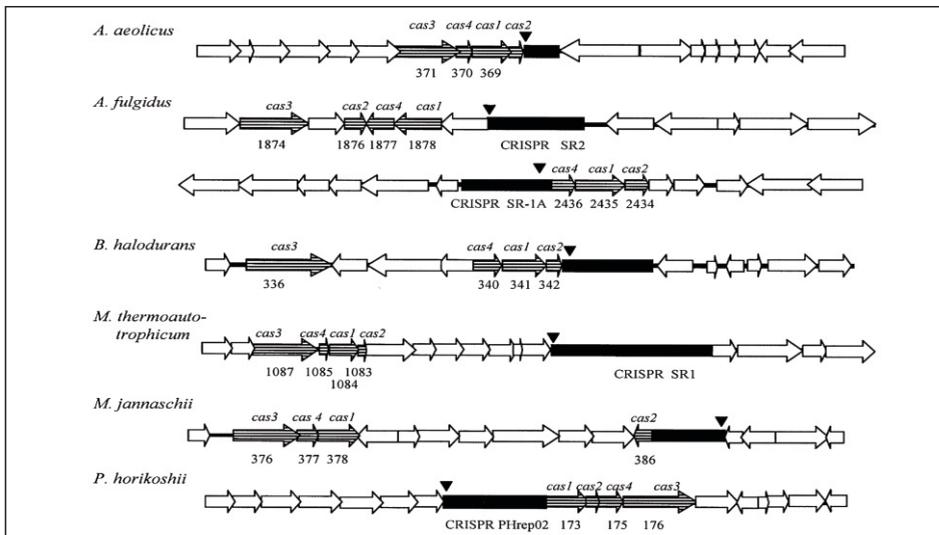
Posteriormente, en agosto de 1993 y julio de 1995, investigadores españoles liderados por el doctor Francisco Mojica de la Universidad de Alicante hacen público sus hallazgos sobre el análisis de secuencias genómicas de las arqueobacterias *Haloferax mediterranei* y *H. volcanii*, donde indican que estos organismos poseen secuencias de 30 pb con simetría en diada (incluyendo repeticiones invertidas de 5 pb) repetidas en tándem e intercaladas por secuencias únicas de 33 a 39 pb (Mojica *et al.*, 1995, 1993). Cinco años después, en abril de 2000, el grupo del doctor Mojica empleando herramientas bio-

informáticas identificó estas secuencias peculiares en los genomas de nueve especies de arqueobacterias y doce especies de bacterias (Mojica *et al.*, 2000), indicando que son elementos cortos repetidos generalmente en tándem, pero su principal peculiaridad es la disposición: siempre están espaciados regularmente por secuencias intermedias de longitud constante, por lo que inicialmente esta particular familia de repeticiones fue denominada repeticiones cortas regularmente espaciadas (*Short Regularly Spaced Repeats* - SRSRs, por sus siglas en inglés)(Mojica *et al.*, 2000). Después, en marzo de 2002, los grupos de investigación del doctor Mojica y del doctor Ruud Jansen, este último de la Universidad de Utrecht de los Países Bajos, acordaron emplear el acrónimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, por sus siglas en inglés) (Jansen *et al.*, 2002; Mojica y Garrett, 2013).

2. El descubrimiento de los genes asociados a CRISPR (*cas*)

En marzo de 2002, el grupo del doctor Ruus Jansen también publicó los resultados de la

exploración *in silico* de bases de datos biológicas (p. ej., EMBL y GenBank) con el algoritmo PATSCAN en busca de posibles loci CRISPRs en secuencias de los genomas de virus, procariontas y eucariotas. Estos investigadores demostraron que los motivos CRISPRs están ausentes en los genomas virales o de eucariotas. En contraste, de los 72 genomas procariontas explorados, aproximadamente el 56% (40 especies) presentaron los loci CRISPRs (Jansen *et al.*, 2002). Pero, quizás el aporte más importante de este grupo de investigadores, es que en todas las especies de procariontas portadoras de los loci CRISPRs también identificaron cuatro genes asociados (CRISPR-associated genes, [*cas*]). Estos genes *cas* están localizados invariablemente de manera adyacente a un locus CRISPR (figura 1). Interesantemente indicando que los genes *cas* y los loci CRISPRs tienen una relación funcional, los genes *cas* como *cas3* y *cas4* codifican para enzimas con motivos característicos de helicasas y RecB exonucleasas, respectivamente; sugiriendo que estos genes están involucrados en el metabolismo del ADN o expresión de genes (Jansen *et al.*, 2002).



Fuente: modificado de Jansen et al. (2002).

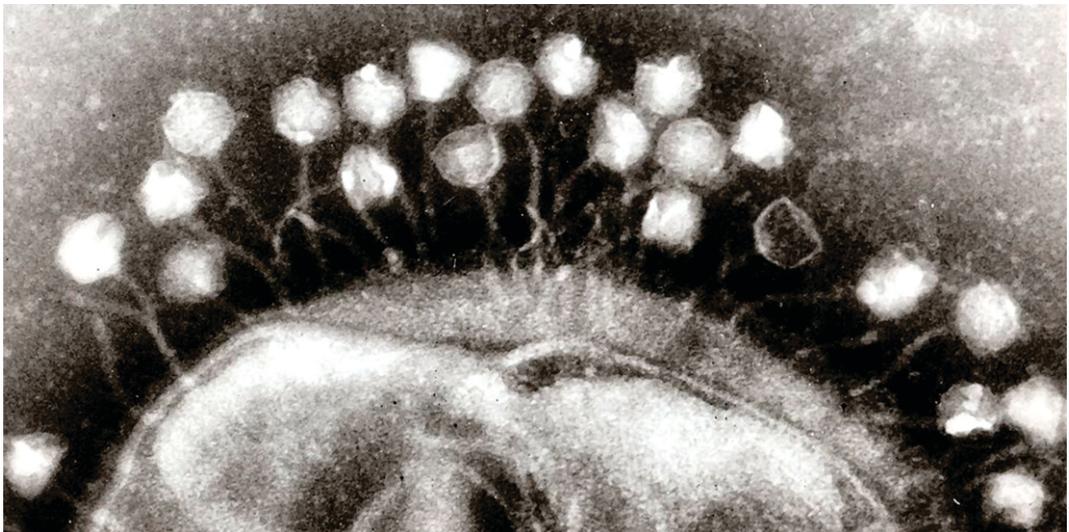
Figura 1. Organización genética del locus CRISPR y genes asociados *cas* en algunas especies bacterianas.

3. Hipótesis que CRISPR/Cas es un sistema inmune adaptativo

Hasta este punto no se tenía claro cuáles eran los roles de los loci CRISPRs y los genes *cas*, hasta que en el 2005 tres publicaciones claves marcaron el punto de inflexión y brindaron más evidencias sobre la función biológica de estos elementos. El primero, reportado en febrero por el grupo del doctor Mojica muestra que las secuencias espaciadoras CRISPRs derivan de secuencias genéticas preexistentes, ya sean de origen cromosómico (35%) o de elementos genéticos transmisibles tales como bacteriófagos (figura 2) y plásmidos conjugativos (65%). Muchas de estas secuencias genéticas presentes en los loci CRISPRs están directamente involucradas en procesos claves tales como transferencia de plásmidos, replicación del ADN, ensamblado del virión, protección del ADN contra restricción, integración/escisión de fagos, etc. Por tanto, la inhibición de cualquiera de estos procesos podría dificultar la infectividad. Asimismo, como la ocurrencia preferencial de los espaciadores CRISPR derivan de elementos genéticos (p. ej. bacteriófagos) que son incapaces

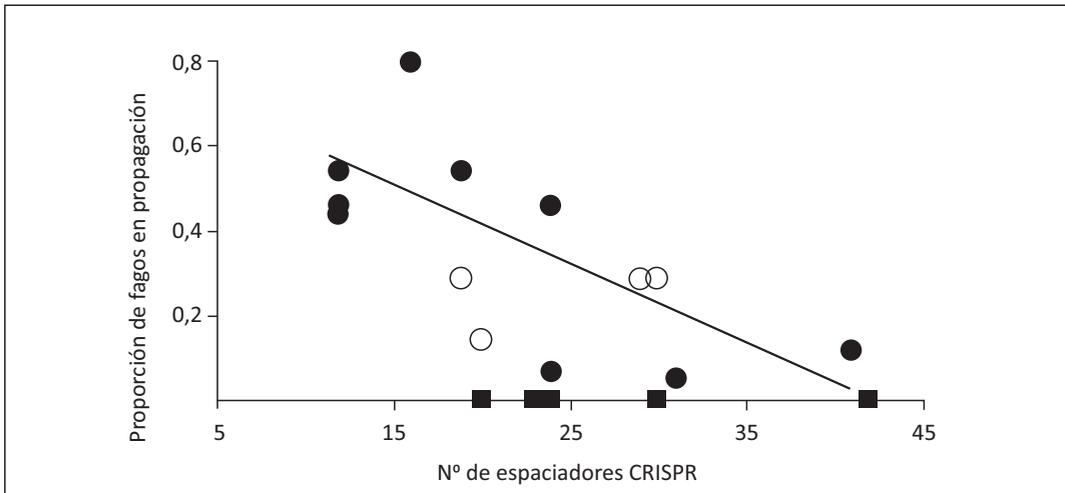
de infectar las cepas bacterianas portadoras de los espaciadores correspondientes, pero no de aquellos que se propagan exitosamente en la población, los investigadores hipotetizaron que CRISPR podrían estar involucrados en conferir resistencia inmune a las bacterias contra ADN foráneo (Mojica *et al.*, 2005).

El segundo reporte fue publicado en marzo por Pourcel *et al.* (2005) de la Universidad de París XI, quienes también demuestran con gran sorpresa que en *Yersinia pestis* los loci CRISPR adquieren nuevos espaciadores por captación preferencial de ADN de bacteriófagos. Asimismo, cuando analizaron las secuencias de genomas publicados, particularmente en el caso de la cepa M1 GAS de *Streptococcus pyogenes*, encuentran una relación entre la presencia de un espaciador CRISPR y la ausencia de un particular profago. Por lo que indican que una posible explicación para este hallazgo es que CRISPRs son estructuras capaces de “tomar” piezas de ADN foráneo como parte de un mecanismo de defensa y plantean la hipótesis que CRISPRs pueden representar una memoria de “agresiones genéticas” pasadas.



Fuente: <http://phenomena.nationalgeographic.com/2013/02/27/the-virus-that-learns/>.

Figura 2. Imagen que muestra el ataque de los fagos a una bacteria susceptible.



Fuente: modificado de Bolotin *et al.* (2005).

Figura 3. Correlación entre la resistencia a fagos y el número de espaciadores en el locus CRISPR de *S. thermophilus*. Cepas parcialmente resistentes (●) y cepas completamente resistentes a fagos (■).

Por último, en agosto, otro grupo de investigadores franceses liderado por el doctor Alexander Bolotin del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, proporcionaron mayores evidencias (Bolotin *et al.*, 2005). Primero, mediante análisis *in silico* identificaron en *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus vestibularis* más genes *cas*, los cuales fueron denominados *cas1B*, *cas5* y *cas6*. También, como en las dos investigaciones previas, revelaron que un cierto número de espaciadores presentan homología con genes existentes, frecuentemente derivados de fagos, pero también derivados de otros elementos extracromosómicos. Asimismo, demostraron experimentalmente, que la sensibilidad de las cepas de *S. thermophilus* a infecciones causadas por bacteriófagos, está negativamente correlacionada (figura 3) con el número de espaciadores que posee la cepa bacteriana en el locus CRISPR ($y = -0,02x + 0,77$, $R^2 = 0,51$).

Consecuentemente, los autores sugirieron que los elementos espaciadores son trazas de invasiones genéticas pasadas causadas por

elementos extracromosómicos. La presencia de estos fragmentos genéticos en las estructuras CRISPR y los motivos estructurales típicos de nucleasas en los genes *cas* sugiere que la formación de CRISPR involucra una etapa de degradación de ADN. Por tanto, plantearon la hipótesis que los espaciadores proporcionan inmunidad celular contra infecciones causadas por fagos y más generalmente la expresión de ADN foráneo, mediante la codificación de un ARN antisentido. Finalmente, estos investigadores propusieron un probable mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas, que consistiría de dos etapas:

1. Formación de segmentos de ADN de un tamaño definido que se convertirían en los espaciadores, debido a la actividad nucleolítica de las enzimas Cas4 y Cas5, toda vez que estas enzimas poseen motivos de exonucleasa (tipo RecB) y endonucleasa (tipo HNH), respectivamente. Por tanto, los segmentos de ADN se formarían por dos posibles mecanismos. En el primer mecanismo, un complejo enzimático constituido por la exonucleasa Cas4 y la helicasa Cas3

generaría los oligonucleótidos. En el segundo mecanismo, la endonucleasa Cas5 podría cortar los segmentos por escisión interna del ADN, posiblemente dirigida por las secuencias pentanucleotídicas conservadas (consenso: RYAAH) presentes en los elementos extracromosómicos donadores. Estas secuencias se encuentran en una posición constante (a 3 nucleótidos) relativa a la región de pareo del espaciador.

2. Unión covalente de los espaciadores al locus CRISPR. En este caso las enzimas Cas1, codificadas por dos genes relacionados (cas1A y cas1B) podrían estar involucrados en la unión de los segmentos de ADN a las repeticiones.

Adicionalmente, a las hipótesis formuladas por los investigadores mencionados, otra hipótesis, sustentada en análisis *in silico* de los genes *cas*, es planteada en marzo de 2006 por científicos de la Universidad de Texas y del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Makarova *et al.*, 2006). Estos científicos proponen que el sistema CRISPR/Cas es un sistema de defensa inmune procariótico que funciona sobre la base del principio del ARN de interferencia. Más específicamente, parece probable que los insertos son transcritos y silencian los genes del fago cognato o genes de plásmidos mediante la formación de un dúplex entre el ARN procariótico interferente pequeño (Prokaryotic small interfering RNA - psiRNA, por sus siglas en inglés) y el ARNm blanco seguido por escisión del dúplex o inhibición de la traducción.

4. Experimentos que demuestran el rol inmunológico de CRISPR/Cas

En marzo de 2007, el doctor Philippe Horvath y su equipo de investigadores de la empresa de alimentos Danisco y de la Universidad de Laval, publicaron las primeras evidencias experimen-

tales sólidas demostrando la hipótesis que CRISPR/Cas es un sistema inmune adaptativo basado en ácidos nucleicos, donde la especificidad es determinada por el contenido de los espaciadores CRISPR, mientras que la resistencia es proporcionada por la maquinaria enzimática Cas. Asimismo, hipotetizaron que algunos de los genes *cas* no están involucrados directamente en la resistencia, más bien estarían participando en la inserción de espaciadores y repeticiones CRISPR adicionales, como parte de la respuesta de un sistema inmune adaptativo (Barrangou *et al.*, 2007). Para llegar a estas conclusiones, estos investigadores hicieron un buen y elegante diseño experimental, pero primero analizaron las secuencias CRISPR de varias cepas de *Streptococcus thermophilus*, una bacteria Gram-positiva ácido láctica empleada en sistemas de cultivos para la producción de yogurt y queso, y encontraron diferencias en el número y tipo de espaciadores en el locus CRISPR1.

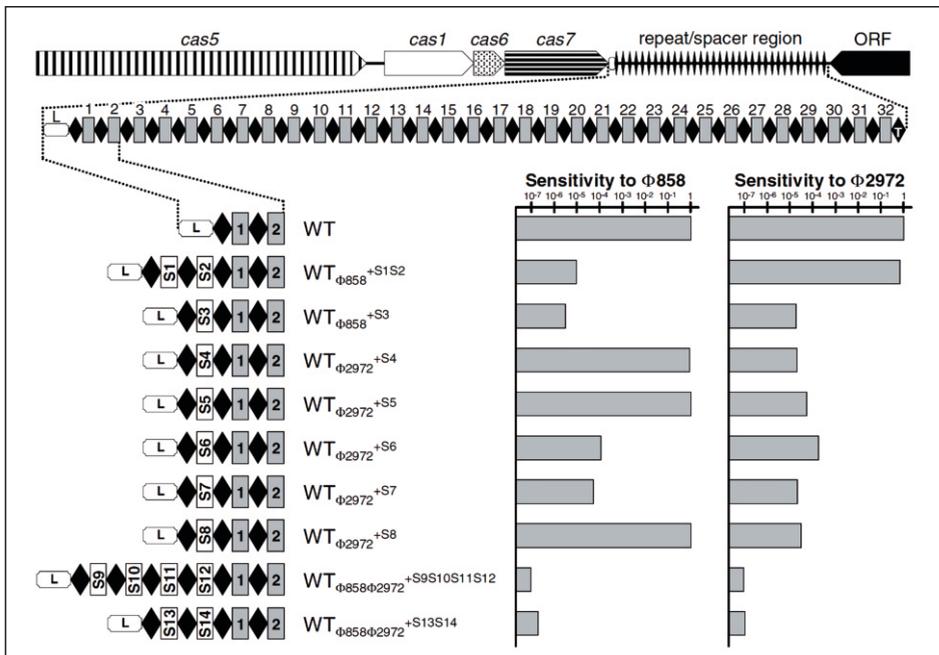
Entonces estos científicos se percataron que la sensibilidad de las bacterias a ser infectadas por los fagos parecía estar correlacionada con el contenido de espaciadores del CRISPR. Específicamente, el contenido de espaciadores fue casi idéntica entre cepas parentales y derivados resistentes a los fagos, excepto por la presencia de espaciadores adicionales presentes en el último. Estos hallazgos sugirieron a los investigadores que existe una potencial relación entre la presencia de espaciadores adicionales y las diferencias observadas en la sensibilidad a los fagos de una determinada cepa bacteriana.

Por tanto, los investigadores se propusieron indagar sobre el origen y función de los espaciadores adicionales presentes en cepas bacterianas mutantes que son resistentes a fagos. Para ello plantearon como hipótesis de trabajo que los loci CRISPR son alterados durante la generación natural de bacterias

mutantes resistentes a fagos. Diseñaron un modelo experimental conformado por un sistema de fago-huésped bacteriano susceptible. En sus experimentos la cepa silvestre susceptible DGCC7710 de *S. thermophilus* fue infectada con los fagos virulentos $\Phi 858$, $\Phi 2972$ o simultáneamente con ambos ($\Phi 858 + \Phi 2972$) y obtuvieron nueve mutantes resistentes a fagos (figura 4). Al analizar las secuencias de los loci CRISPR de estas cepas bacterianas mutantes, observaron que estos habían añadido de 1 a 4 espaciadores de manera polarizada entre los espaciadores preexistentes (p. ej., 1, 2, 3, 4) y la secuencia líder (L). Interesantemente, estos nuevos espaciadores revelaron una gran similitud con secuencias presentes en los genomas de los fagos empleados en los experimentos. Estos resultados, en conjunto revelan que las bacterias que se hicieron resistentes a los bacteriófagos, modificaron su locus CRISPR1 mediante la integración de nuevos espaciadores, aparente-

mente derivados del ADN de los fagos (Barrangou *et al.*, 2007).

Estos hallazgos indican que los locus CRISPR1 están sujetos a cambios dinámicos y evolutivos rápidos impulsados por la exposición a los fagos. En conjunto, estos resultados muestran que los loci CRISPR son alterados durante la generación de cepas bacterianas mutantes resistentes a fagos y también establecen un nexo entre el contenido de CRISPR y la sensibilidad a los fagos. Asimismo, demuestran que la incorporación de más espaciadores CRISPR idénticos a secuencias de fagos, proporcionan resistencia *de novo* contra los fagos que tienen esta secuencia particular. Adicionalmente, los investigadores probaron la hipótesis si es que los genes *cas* están involucrados en la inmunidad mediada por CRISPR. Cuando inactivaron el gen *cas5* observaron que las cepas bacterianas perdieron la resistencia a los fagos, por lo que propusieron que el producto génico de



Fuente: Barrangou *et al.* (2007).

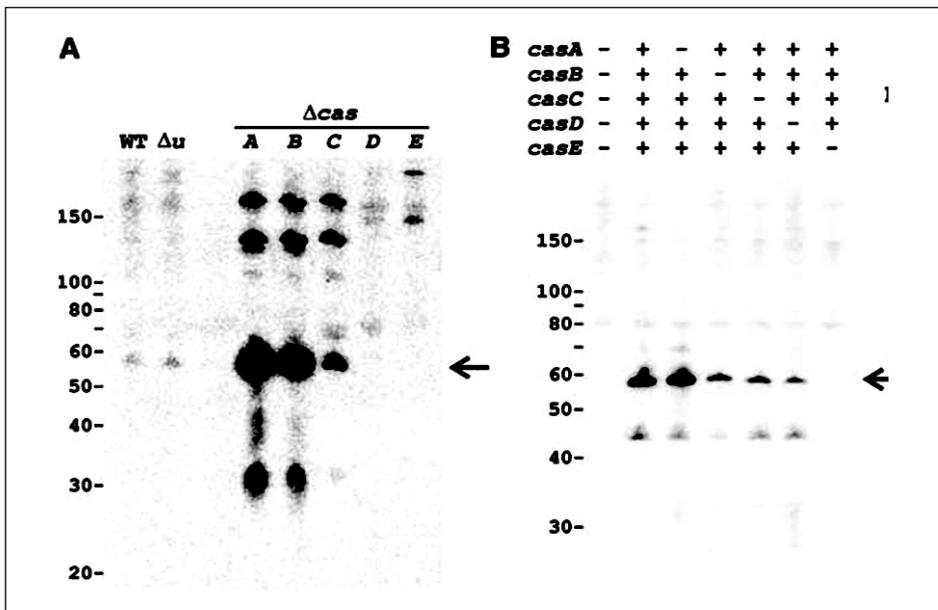
Figura 4. Descripción general del locus CRISPR1 de *S. thermophilus*, donde se muestra nuevos espaciadores adquiridos en bacterias mutantes resistentes a fagos y la correspondiente evaluación de la susceptibilidad a los fagos.

cas5 podría actuar directamente en la respuesta inmune basada en ácidos nucleicos, dado que la enzima Cas5 actúa como una hidrolasa de ácidos nucleicos foráneos, pues la enzima posee el dominio de nucleasa tipo HNH. En contraste, cuando inactivaron el gen *cas7* observaron que la resistencia al fago Φ 858 no fue afectada, pero las cepas bacterianas que tenían este gen noqueado eran incapaces de incorporar nuevas secuencias espaciadoras CRISPR y por ende fueron susceptibles a reinfecciones de otros fagos. Sobre la base de estos resultados los investigadores sugirieron que la enzima Cas7 estaría involucrada en la síntesis y/o inserción de nuevas secuencias espaciadoras y repeticiones adicionales (Barrangou *et al.*, 2007).

5. Mecanismos moleculares de interferencia del sistema CRISPR/Cas

En agosto de 2008 un equipo de investigadores de la Universidad de Wageningen, Universidad de Sheffield y del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus

siglas en inglés) dirigidos por el doctor John van der Oost, publicaron los primeros descubrimientos que ayudan a explicar parcialmente los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antiviral del sistema CRISPR/Cas (Brouns *et al.*, 2008). Primero demostraron que el locus CRISPR se transcribe y produce un ARN pre-CRISPR (pre-crRNA); este transcrito primario es procesado para generar productos pequeños de ~57 nucleótidos conocidos como crRNA. El crRNA contiene una secuencia espaciadora (homóloga a las secuencias genómicas de fagos) flanqueada por dos secuencias conservadas. El proceso de maduración es realizado por un complejo enzimático denominado Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense, por sus siglas en inglés), el que está constituido por las proteínas CasA, CasB, CasC, CasD y CasE. Con diversos experimentos realizados, los científicos demostraron que de las cinco proteínas que forman Cascade, solo la subunidad CasE es esencial para la conversión de pre-crRNA a crRNA (figura 5).



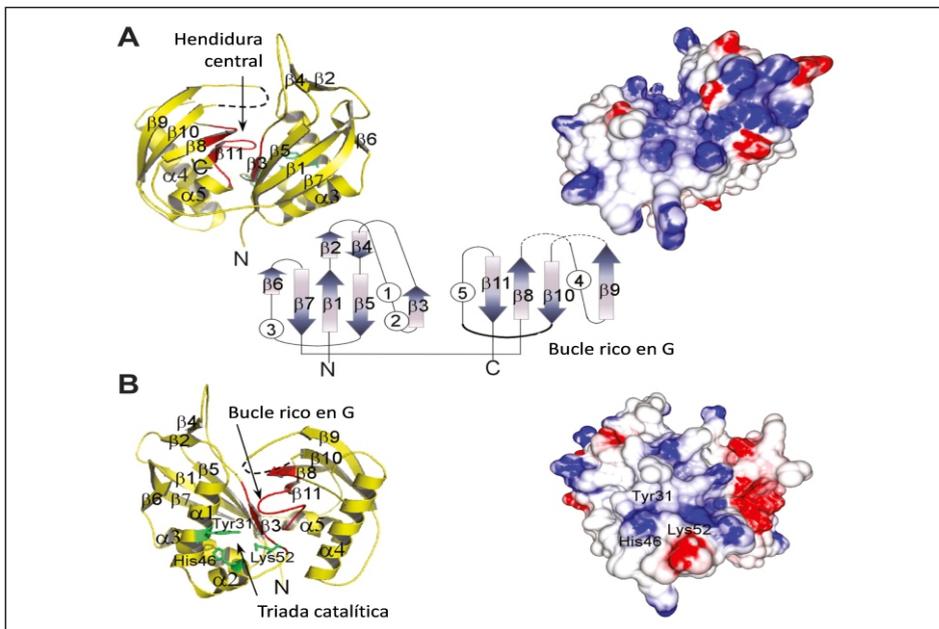
Fuente: Brouns *et al.* (2008).

Figura 5. El complejo proteico Cascade es el responsable de realizar la maduración del pre-crRNA (ARN transcritos > 100 nucleótidos) a crRNA (ARN maduro de ~57 nucleótidos). Las figuras A y B muestran el análisis Northern Blot, indicando que CasE es esencial para este proceso de maduración.

Asimismo, mostraron que Cascade forma un complejo con crRNA, por lo que especularon que este pequeño ARN podría funcionar como guía para dirigir el complejo enzimático hacia ácidos nucleicos virales y en una acción combinada con Cas3 se hidrolizarían estos ácidos nucleicos foráneos y así mediar la respuesta inmune antiviral. Sobre la base de las evidencias obtenidas, estos investigadores concluyen que la transcripción de los loci CRISPRs y la escisión del pre-crRNA por las proteínas Cas para obtener el crRNA maduro es la base molecular de la etapa de defensa antiviral del sistema CRISPR/Cas, el cual capacita a los procariontes para prevenir de manera efectiva la predación por fagos.

También, en diciembre de 2008, Luciano A. Marraffini y Erik J. Sontheimer demostraron que el sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus epidermidis* evita que ocurra la conjugación y transformación por plásmidos por un mecanis-

mo que estaría atacando directamente al ADN foráneo (Marraffini y Sontheimer, 2008). Sin embargo, en octubre del mismo año, un equipo de investigadores de la Universidad de Georgia y de la Universidad del Estado de Florida dirigidos por el doctor Michael P. Terns identificaron y caracterizaron funcional y estructuralmente la enzima Cas6 de la arqueobacteria *Pyrococcus furiosus* (figura 6). Estos investigadores demostraron que Cas6 es una nueva endorribonucleasa que escinde los ARN CRISPR a nivel de las secuencias repetidas para liberar ARNs individuales que tienen como diana los ARNs de invasores. La enzima interactúa con un motivo de secuencia específico en la región 5' del elemento de repetición CRISPR y se escinde en un sitio definido dentro de la región 3' de la repetición. La estructura tridimensional de la enzima obtenida con una resolución de 1,8 angstrom revela dos pliegues similares a la ferredoxina (figura 6), dominios que también se encuentran en otras proteínas que interac-



Fuente: Carte *et al.* (2008).

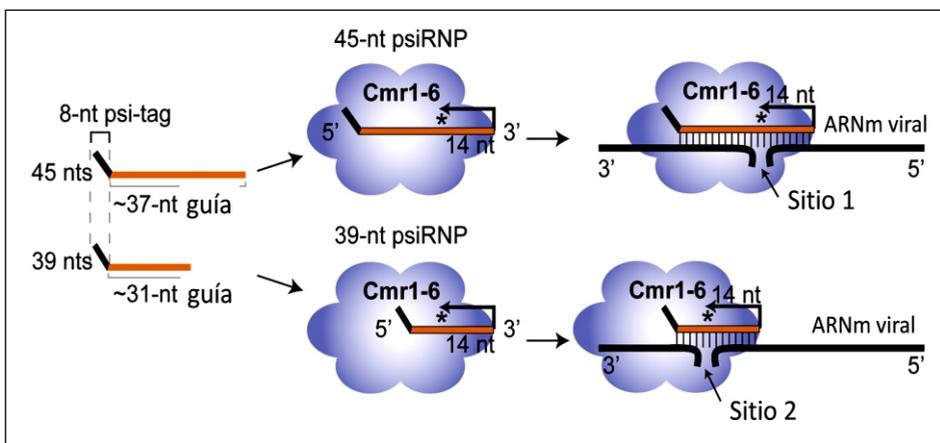
Figura 6. Características estructurales de la enzima Cas6 de *P. furiosus*. Vistas frontal (A) y posterior (B) de la estructura de PfCas6 representada en diagramas de cinta (izquierda) y potencial electrostático de superficie coloreado (derecha). En el centro, se ilustra la topología de plegamiento con flechas (hojas beta) y círculos (hélices alfa). En los diagramas de cintas, el bucle rico en glicinas (G) característico de las proteínas RAMP (Repeat-Associated Mysterious Proteins, por sus siglas en inglés) se muestra en rojo y los residuos de aminoácidos de la triada catalítica se muestran en verde.

túan con ARN. El sitio activo predicho de la enzima es similar al de las endonucleasas de empalme de tRNA y de forma concordante, la actividad de Cas6 no requiere de iones metálicos como cofactores. Por lo que concluyen que la enzima Cas6 es responsable de la generación de ARN guías derivados de CRISPR en numerosas bacterias y arqueas (Carte *et al.*, 2008).

Adicionalmente, en noviembre de 2009, el mismo equipo de investigadores del doctor Michael P. Terns, aislaron de la arqueobacteria *Pyrococcus furiosus* dos complejos enzimáticos efectores CRISPR/Cas que denominaron cmr (cas módulo RAMP) formado de cuatro a siete proteínas Cas (Cmr1-1, Cmr1-2, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 y Cmr6) y ARNs pequeños de 39 o 45 nucleótidos derivados de los loci CRISPR llamados ARN de silenciamiento procariontico (psiRNA [prokaryotic silencing RNA], por sus siglas en inglés) que tienen como dianas los ARNs de los patógenos. Los complejos ribonucleoproteicos psiRNA-Cmr hidrolizan los enlaces fosfodiéster de los ARNs diana complementarios a una distancia fija (14 nucleótidos) desde el extremo 3' de los psiRNAs integrales. En *Pyrococcus furiosus*, los complejos psiRNA-Cmr presentan dos isoformas de tamaños diferentes que comparten una etiqueta de se-

cuencia común en el extremo 5' del psiRNA, pero tienen extremos 3' diferentes que dirigen la escisión del ARN diana en dos sitios distintos (figura 7). Sobre la base de sus evidencias experimentales, estos investigadores concluyen que los procariontes poseen un sistema único de silenciamiento de ARN que funciona por escisión dependiente de la homología entre el psiRNA y los ARNs del invasor (Hale *et al.*, 2009).

Aportes importantes también fueron realizados en noviembre de 2010 por un equipo de investigadores de la Universidad Laval y de la empresa Danisco bajo la dirección del doctor Sylvain Moineau, quienes mostraron que el sistema CRISPR1/Cas de *Streptococcus thermophilus* inactiva plásmidos y bacteriófagos *in vivo*. Esto es posible gracias a la escisión específica del ADN doble hebra de ambos elementos foráneos por el producto génico de *cas5* (también denominado *cas9*). La escisión ocurre en la región denominada protoespaciador, que es la secuencia presente en el plásmido o genoma del fago homóloga a la secuencia del espaciador. El sitio específico de corte de la endonucleasa Cas5 es después del nucleótido número 27, 3 bases previas al motivo adyacente del protoespaciador (Proto-spacer Adjacent Motif - PAM, por sus siglas en inglés) cuya secuencia



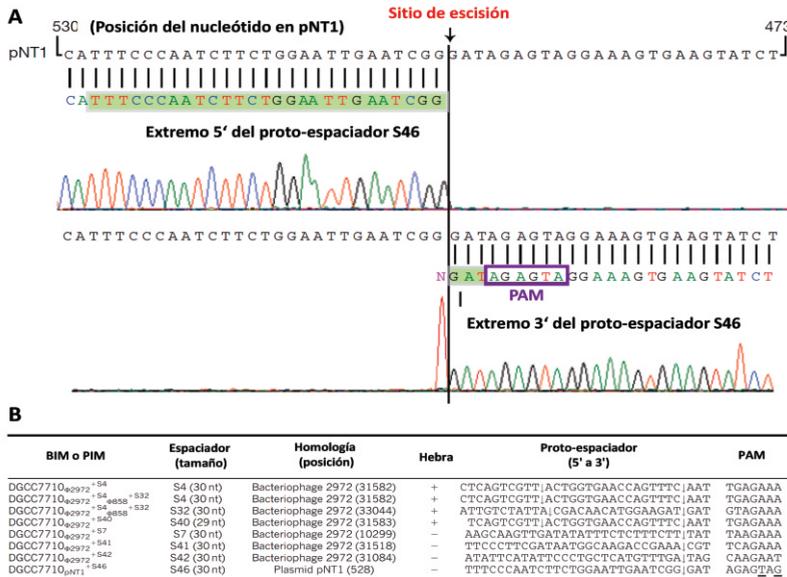
Fuente: modificado de Hale *et al.* (2009).

Figura 7. Modelo que muestra el mecanismo molecular de acción de los complejos psiRNA-Cmr de *P. furiosus* para silenciar los invasores moleculares.

consenso es **NNAGAAW** (figura 8), por lo que los investigadores concluyen que la actividad de la endonucleasa Cas5 reconoce y corta de manera específica las secuencias del protoespaciador y es dependiente de la orientación del mismo (Garneau *et al.*, 2010).

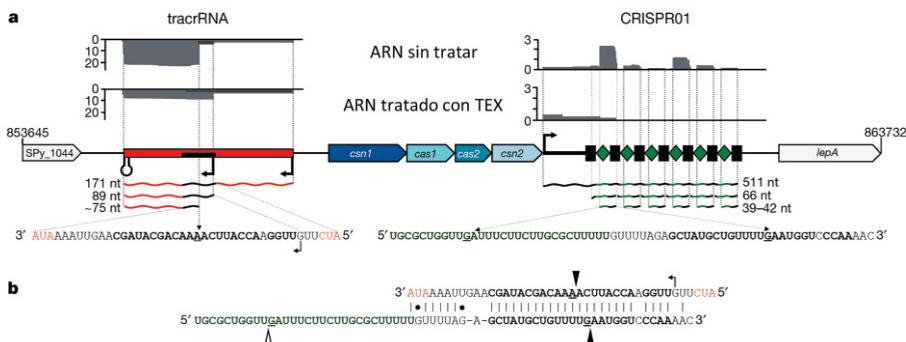
Posteriormente, en marzo de 2011, otro equipo de investigadores de la Universidad de Umeá, de la Universidad de Viena y de la

Universidad de Würzburg, con el liderazgo de la doctora Emmanuelle Charpentier (Deltcheva *et al.*, 2011) descubrieron en *Streptococcus pyogenes* un componente no codante clave del sistema CRISPR tipo II en la biogénesis y procesamiento del crRNA. Este componente molecular es un ARN pequeño (transn-activating CRISPR RNA -tracrRNA, por sus siglas en inglés) que aparentemente se expresa de manera constitutiva (figura 9).



Fuente: modificado de Garneau *et al.* (2010).

Figura 8. El sistema CRISPR1/Cas en *Streptococcus thermophilus* escinde (I), de manera específica, *in vivo* el ADN foráneo de origen plasmídico (A) y de bacteriófagos (B) dentro de la secuencia del protoespaciador a tres nucleótidos de la secuencia consenso PAM.



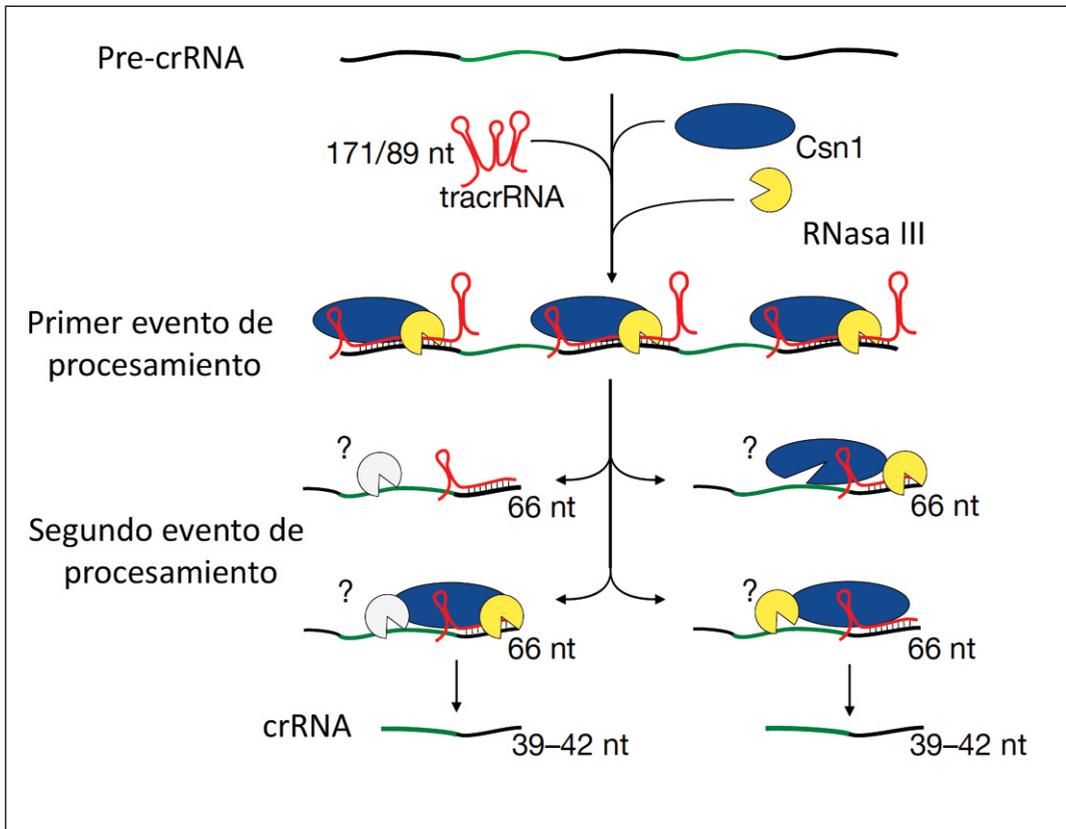
Fuente: Deltcheva *et al.* (2011).

Figura 9. Organización genómica de los loci tracrRNA y CRISPR1 (*csn1 - cas1 - cas2 - csn2*). Tanto tracrRNA como los loci CRISPR se expresan constitutivamente (a) y se muestra que tracrRNA tiene una región complementaria con las regiones repetidas de CRISPR1 (b). Asimismo, en la figura los sitios de corte en el proceso de maduración de pre-crRNA.

Los investigadores también demostraron que el transcrito primario de tracrRNA tiene longitudes de 89 y 171 nucleótidos, mientras que el transcrito más corto (~75 nucleótidos) resulta del procesamiento de los tracrRNA largos. Los tracrRNA tienen una región de 24 nucleótidos complementaria a las regiones repetidas del transcrito pre-crRNA y se encarga de dirigir su maduración a crRNA con el auxilio de la RNasa III y la proteína Csn1 (también conocida como Cas9) asociada a CRISPR (figura 10). Estos hallazgos revelan una nueva función de un ARN no codante bacteriano tal que un ARN pequeño codificado en trans (tracrRNA) dirige la maduración de otro ARN no codante

(pre-crRNA) para producir las especies activas (crRNAs) (Deltcheva *et al.*, 2011).

Posteriormente, en septiembre de 2012, un equipo de investigadores liderados por el doctor Virginijus Siksnys de la Universidad Vilnius y de la empresa DuPont Nutrition and Health, demostraron mediante experimentos *in vitro*, que el complejo Cas9-crRNA del sistema CRISPR3/Cas de *Streptococcus thermophilus* escinde en sitios específicos en las dos hebras de ADN que contienen secuencias complementarias al crRNA. La escisión ocurre, como previamente fue demostrado, en la región del protoespaciador,

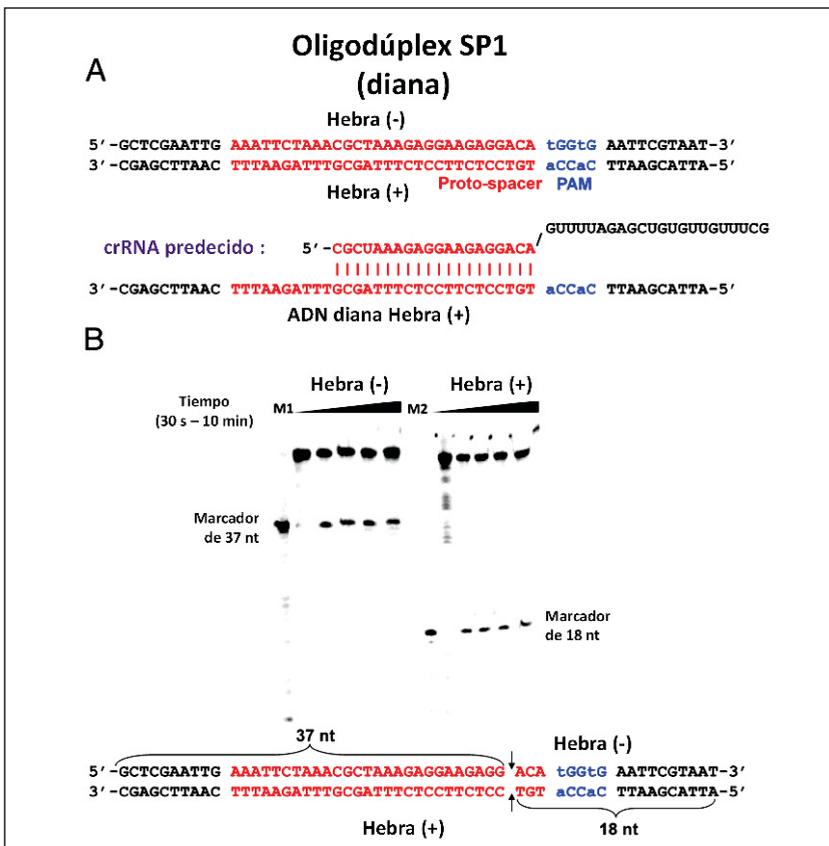


Fuente: Deltcheva *et al.* (2011).

Figura 10. Modelo de la maduración de crRNA mediada por tracrRNA con la participación del complejo proteico microprocesador constituido por RNasa III y Csn1.

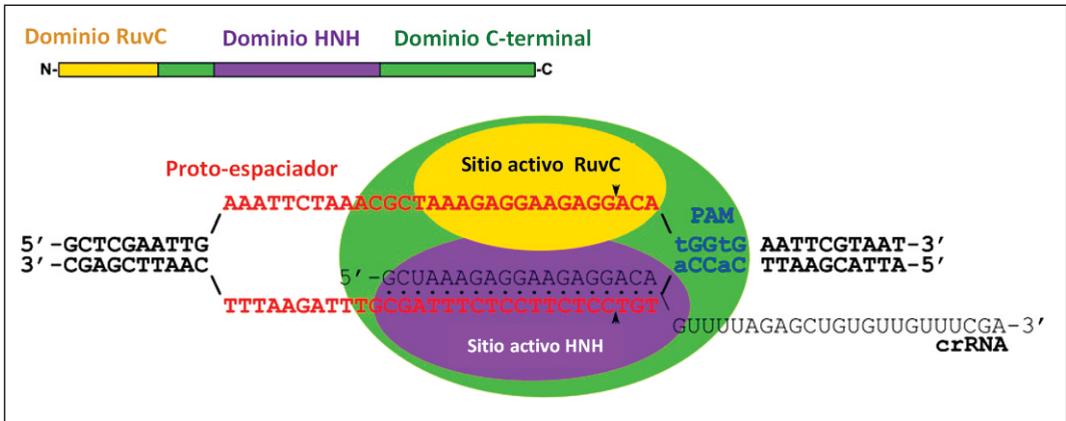
a 3 nucleótidos del extremo terminal del protoespaciador adyacente a PAM, produciendo extremos romos (figuras 11 y 12). Esta escisión es ejecutada por la enzima Cas9, que usa dos sitios activos diferentes, RuvC y HNH, para generar cortes sitio específicos en las hebras opuestas del ADN diana (figura 13). Por tanto, sus resultados demuestran fehacientemente que el complejo Cas9-crRNA funciona como una endonucleasa guiada por ARN, con reconocimiento de la secuencia diana (ADN foráneo) dirigido por ARN (crRNA) y escisión del ADN diana mediada por una proteína (Cas9). Asimismo, es preciso señalar que este grupo de investigadores proporcionaron datos

fundamentales, tales como: (1) el crRNA guía es absolutamente necesario para que Cas9 pueda escindir el ADN diana a nivel del protoespaciador, (2) Cas9 puede ser programado con crRNA cognatos para reconocer cualquier secuencia complementaria de ADN diana, (3) los 10 nucleótidos en el extremo 5' de los protoespaciadores, los cuales no son complementarios al crRNA maduro, no son necesarios para la interferencia mediada por el sistema CRISPR3/Cas, (4) PAM es requerido para la escisión de ADN doble hebra por el complejo Cas9-crRNA y (5) la interacción de Cas9 con el ADN doble hebra requiere de PAM y crRNA complementario a la diana.



Fuente: modificado de Gasiunas *et al.* (2012).

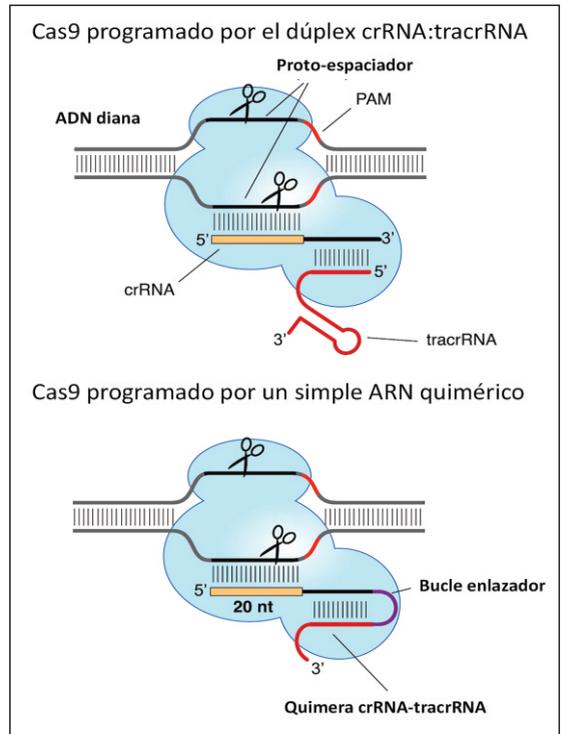
Figura 11. El complejo Cas9-crRNA escinde el ADN doble hebra diana en la región del protoespaciador. A) El sustrato oligodúplex contiene el protoespaciador (rojo) y la región PAM (azul). El crRNA se hibrida complementariamente con 20 nucleótidos del protoespaciador. B) Las flechas indican los sitios de escisión en el protoespaciador por el complejo Cas9-crRNA. Estos sitios de cortes romos están ubicados a 3 nucleótidos de la región PAM.



Fuente: modificado de Gasiunas *et al.* (2012).

Figura 12. Disposición esquemática y mecanismo de escisión por el complejo Cas9-crRNA del ADN diana dirigido por crRNA.

En agosto del mismo año, el equipo de investigadores de la doctora Emmanuelle Charpentier llegó a conclusiones similares a los proporcionados por el equipo del doctor Virginijus Siksnys. Primero, demuestran que el mecanismo de interferencia de ADN requiere de una estructura de ARN binaria (tracrRNA:crRNA) que dirige a una endonucleasa Cas9 para escindir ambas hebras del ADN diana. Segundo, la proteína Cas9 guiada por tracrRNA:crRNA hace uso de dos dominios endonucleasa distintos (HNH y RuVc) para escindir las dos hebras en el ADN diana. Tercero, el reconocimiento del ADN diana por Cas9 requiere de una secuencia semilla en el crRNA y una secuencia PAM que contenga el dinucleótido **GG** adyacente a la región de unión de crRNA en el ADN diana. Asimismo, la doctora Charpentier y su equipo demostraron que la endonucleasa Cas9 puede ser programada con un ARN guía diseñado como un simple transcrito para reconocer y escindir cualquier secuencia de ADN doble hebra de interés (figura 13). Por tanto, manifiestan que el sistema es eficiente, versátil y programable, porque solo se necesita realizar cambios en la secuencia del ARN quimérico que se une al ADN diana. Finalmente, indican que este sistema representa una nueva metodología que se basa en Cas9 programado



Fuente: modificado de Jinek *et al.* (2012).

Figura 13. Esquema donde se muestra que en el sistema CRISPR/Cas del tipo II, Cas9, es guiado por una estructura de ARN dúplex formada por el activador tracrRNA y el crRNA guía para escindir de manera sitio-específica el ADN diana de doble hebra con Cas9. Asimismo, permitiendo la interacción de Cas9 con un ARN quimérico generado por la fusión del extremo 3' de crRNA al extremo 5' de tracrRNA se logró el mismo efecto interferente.

por ARN y podría ofrecer considerable potencial para aplicaciones en la edición de genes y genomas (Jinek *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Es evidente que los grandes descubrimientos son el resultado de investigaciones científicas, muchas veces fortuitas y luego orientadas sobre la base de hipótesis adecuadamente planteadas. Pero estos avances significativos en el conocimiento se logran gracias a la disposición de las publicaciones científicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9, 39.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561.
- Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41-52.
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Markarova KS, Koonin EV, Oost J van der. 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 321, 960-964.
- Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP. 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22, 3489-3496.
- Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 543.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67-71.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2579-E2586.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. 2009. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 139, 945-956.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429-5433.
- Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in

- prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565-1575.
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 233.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816-821.
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Sarkar K, Kage U, Karre S. 2016. Gene discovery and genome editing to develop cisgenic crops with improved resistance against pathogen infection. *Can. J. Plant Pathol.* 38, 279-295.
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, *et al.* 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol. Plant* 8, 1274-1284.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 1, 7.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2008. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* 322, 1843-1845.
- Mojica FJM, Garrett RA. 2013. Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. In *CRISPR-Cas Systems*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 1-31.
- Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* 17, 85-93.
- Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* 9, 613-621.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36, 244-246.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174-182.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653-663.
- Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J. 2014. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* 7, 5.
- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, *et al.* 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.* 12, 797-807.