

## **GENOME EDITING: EL GRAN TSUNAMI**

En la tecnología Genome Editing intervienen básicamente una secuencia de RNA localizadora de la región diana, llamada CRISPR, y una proteína capaz de romper el enlace fosfodiéster que une la secuencia de nucleótidos en el DNA, la nucleasa CAS 9; en particular CAS 9 realiza una ruptura en ambas cadenas del DNA. Si el proceso parara aquí, el propio organismo repararía la secuencia del DNA con un riesgo inherente e inevitable de mutaciones, sin embargo, si en el medio aparece una secuencia del DNA complementaria, esta se combinará con los extremos del DNA cortado, y posteriormente otra proteína presente en todas las células llamada DNA polimerasa, sintetizará la otra cadena con lo cual se habrá eliminado la región dañada y sustituida por una secuencia correcta.

El sistema CRISPR-CAS fue descubierto en 1980 en la bacteria *Escherichia coli* pero su función no fue demostrada hasta el año 2007, cuando el equipo de Rodolphe Barrangou demostró que la bacteria *S. thermophilus* adquiría resistencia contra un bacteriófago por integración de un fragmento del genoma viral en el locus de CRISPR. El nombre de CRISPR es el acrónimo en inglés de “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente e interespaciadas” (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) y CAS hace referencia a una familia de proteínas en su mayoría nucleasas. En el ADN de las bacterias existen secuencias palindrómicas a lo largo de todo el genoma, y entre ellas existe otras secuencias denominadas espaciadoras que son muy similares a las secuencias de los virus. Las secuencias CRISPR están formadas por las cadenas espaciadoras y las repeticiones, y cerca de ellas existe una familia de genes, denominados CAS que codifican para las nucleasas. Cuando el virus infecta una bacteria inserta el material genético en el genoma de la bacteria, sin embargo, algunos de estas secuencias del virus pueden ser reconocidos por unas proteínas unidas a RNA que se encuentran en el citoplasma de las bacterias. Estos RNA proceden de los transcritos de las secuencias CRISPR que han sido degradados en pequeñas moléculas por la nucleasa 9 (crRNA maduros). A su vez, estos crRNA formarán un complejo con las proteínas CAS 9, de tal modo que la secuencia del DNA del virus será

reconocido por complementariedad con las pequeñas secuencias crRNA, lo que provocará la fragmentación del genoma vírico. Pero lo que resulta más interesante es que las proteínas CAS pueden introducir los fragmentos del genoma vírico como secuencias espaciadoras en el DNA bacteriano, facilitando la creación de complejos CRISPR-CAS9, homólogos a la secuencia vírica, dotando de inmunidad a la bacteria frente a estos virus.

Este proceso biológico ha sido aprovechado como tecnología para insertar fragmentos de DNA en cualquier organismo de una manera muy precisa. La proteína CAS 9 está formada por un dominio de unión al crRNA maduro, dos sitios activos que permite la liberación de la doble hélice del DNA, y una secuencia PAM que se conoce como "motivo adyacente proespaciador". Cuando este complejo CRISPR-CAS es introducido en una célula busca una secuencia PAM complementaria, la cual puede ser sintetizada de modo artificial, y también complementario a la secuencia de crRNA maduro que forma el complejo, de este modo se forma un heterodúplex que permite la activación de los sitios catalíticos de CAS 9 degradando la doble hélice del DNA. Posteriormente podremos insertar cualquier marcador en la célula en forma de plásmido para que sea reparado bien por recombinación homóloga o reparación no homóloga.

1. 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". *Journal of bacteriology* 169 (12): 5429–5433. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213968/>)
2. Rodolphe Barrangou, Christophe Fremaux, H el ene Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, Philippe Horvath. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007 Mar; 315: 1709-1712. (<http://science.sciencemag.org/content/315/5819/1709>).

3. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262-78. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906146?dopt=Abstract&holding=npg>)
4. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430774?dopt=Abstract&holding=npg>)
5. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014 Jun;32(6):551-3. doi: 10.1038/nbt.2884. Epub 2014 Mar 30. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681508?dopt=Abstract&holding=npg>)
6. Sara Reardon. Leukaemia success heralds wave of gene-editing therapies. *Nature*. 2015 Nov; 527, 146–147 (<http://www.nature.com/news/leukaemia-success-heralds-wave-of-gene-editing-therapies-1.18737>)