



*Ensayo: El funcionamiento y la aplicación de  
la técnica CRISPR-Cas9*

Universidad Del Sureste

Biología Molecular en la Clínica

Docente: Dr. Jose Miguel Culebro Ricaldi

Alumna: Johary G. Ramos Aquino

8vo. Semestre

### Introducción:

Las llamadas secuencias CRISPR, presentes en el material genético de las bacterias, se conocen desde la década de 1980. El microbiólogo Francisco J. M. Mojica, de la Universidad de Alicante, contribuyó en una parte fundamental a su descubrimiento y denominación. La abreviatura significa «repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas», es decir, secuencias palindrómicas cortas repetidas que están separadas por otro material genético y que con frecuencia aparecen en el genoma en ubicaciones específicas.

Algunas bacterias y la mayoría de arqueas poseen un sistema de defensa adaptativo que utiliza nucleasas guiadas por ARN (Cas), llamado repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) y protegen a las bacterias de virus y plásmidos. Esta inmunidad la consiguen al introducir pequeñas secuencias de ADN, que provienen de virus o plásmidos, en el locus de CRISPR generando un registro de infecciones.

### Desarrollo:

La técnica de edición genética CRISPR/Cas9 se basa en un complejo sistema inmunitario de las bacterias que les protege contra los virus. Se trata de una inmunidad adquirida, o adaptativa, que «recuerda» las secuencias de ADN de los patógenos de ataques anteriores y corta su ADN en caso de una nueva infección.

Se han identificado diferentes tipos (I – III) de sistemas CRISPR, cada uno tiene asociado un clúster de genes que codifican para las Cas, ARN no codificable y elementos repetitivos.

La inmunidad mediada por CRISPR-Cas9 funciona en tres fases:

- **Fase adaptativa:** en la que los enzimas asociados a CRISPR adquieren los protospacer del ADN exógeno y lo integran en el locus CRISPR dentro del genoma procariota seguido de la síntesis de una nueva repetición. Esta fase otorga memoria genética para poder realizar las dos siguientes fases.
- **Fase de expresión:** se transcribe la secuencia de repeticiones-spacer (locus CRISPR) y, luego las Cas lo escinden en pequeños fragmentos (crRNA), cada tipo de CRISPR actúa de forma distinta para generar estos fragmentos.
- **Fase de interferencia:** el crRNA guía a la maquinaria al DNA complementario que está flanqueado por la secuencia PAM para que corte el DNA exógeno en una zona concreta, cada tipo de CRISPR efectúa el corte con un complejo distinto. En esta fase se impide la infección.

Existen tres tipos de sistemas CRISPR-Cas (I, II y III), todos ellos pueden coexistir en un mismo organismo:

- **El tipo I** es reconocido por la presencia de Cas3, una proteína con los dominios helicasa y DNasa que son los responsables de la degradación. Actualmente, se conocen seis subtipos del Tipo I-A al Tipo I-F que tienen un número variable de genes Cas.
- **En el tipo II** la maduración del crRNA se produce por un trans-activador (tracrRNA) que es complementario a las repeticiones en el pre-crRNA; lo más importante es que sólo una endonucleasa (Cas9) es la responsable del corte después del guiado al DNA exógeno por el crRNA-tracrRNA. Hay dos subtipos, II-A y II-B.
- **El sistema tipo III** se asocia a la proteína Cas10 con una función poco clara. También utiliza la Cas6 para el procesado del pre-crRNA. Las proteínas Cas se destinan a los complejos Csm o Cmr, que son similares a las proteínas Cascada del tipo I.

Lo más significativo es que en los tipos I y III, utilizan endonucleasas Cas especializadas para procesar el pre-crRNA, y luego el crRNA maduro se asocia a un complejo multi-Cas, el cual

reconocerá y cortará el DNA exógeno. Y en los tipos II la maduración del crRNA se produce por tracrRNA y solo necesita Cas9 para el corte del DNA objetivo.

### **Tipos de mutaciones realizadas con CRISPR:**

- **Knockouts**

Los DSB introducidos por la nucleasa Cas9 en el DNA diana pueden ser reparados por uno de los sistemas de reparación que posee la célula, el NHEJ, que es el mecanismo de reparación más activo. Esta reparación resulta en la introducción de inserciones o deleciones aleatorias (InDels), produciendo la interrupción del marco de lectura de un gen o de los sitios de unión de factores de activación en promotores o potenciadores.

- **Inserciones o correcciones específicas**

el HDR permite la introducción nucleótidos específicos o largas inserciones. Para ello, es necesaria la introducción de una secuencia con los cambios que se quieren introducir, junto con el sgRNA y la Cas9. La secuencia específica debe contener, además de los cambios que se quieran introducir, la secuencia homóloga aguas arriba y aguas abajo del objetivo; puede ser un oligonucleótido monocatenario, un oligonucleótido bicatenario o un plásmido de ADN bicatenario según la aplicación.

- **Inversiones y translocaciones**

las translocaciones cromosómicas, técnica muy útil para estudiar ciertos cánceres. Se seleccionan dos sgRNAs para generar DSBs en dos locus de cromosomas no homólogos, seguido de la reparación por NHEJ. Es un proceso que puede realizarse in vivo.

También pueden realizarse inversiones que a diferencia de las translocaciones se generan dos DBS en el mismo cromosoma y al repararse por NHEJ se generará una inversión del fragmento generado por los dos cortes o una larga deleción

- **Represión transcripcional (CRISPRi)**

Se ha demostrado que la fusión de dCas9 con el dominio represor modificador de la cromatina, Krüppel-associated box (KRAB), permite silenciar genes eficazmente en células de mamíferos. Este sistema reprime genes con una eficiencia comparable al silenciamiento con RNA de interferencia (RNAi), pero con menor impacto en genes no diana.

- **Activación transcripcional (CRISPRa)**

De la misma forma que en la represión, se puede fusionar la dCas9 a un efector de activación para activar la expresión de un gen. Se ha comprobado que la fusión de dCas9 con VP64 (dominio de activación transcripcional), permite la activación del gen objetivo en bacterias y en células de mamíferos.

- **Activación y represión multiplexadas**

Esta técnica permite hacer objetivo diversos genes para un estudio transcripcional y admite que sean unos activados y otros reprimidos en un mismo experimento. Se generan diversos sgRNAs con diferentes motivos de reconocimiento de RNA, pueden ser MS2, PP7 o com, y los correspondientes dominios de unión (MCP, PCP y Com) se fusionan con diferentes efectores transcripcionales (KRAB o VP64).

- **Imagen**

Para dilucidar los mecanismos que relacionan la función de elementos genómicos con su organización espaciotemporal, es indispensable un método para el visualizado de secuencias de ADN específicas

en células vivas. Antes de CRISPR-Cas9, tales estudios se han basado principalmente en marcado del ADN con proteínas fluorescentes.

- **Alterar el estado epigenético**

Las técnicas para activar o reprimir genes con CRISPR son muy útiles pero no sirven para testear el rol específico de marcas epigenéticas ni sirven para alterar el estado epigenético. Para ello, existe un método específico, el CRISPR-Cas9 basado en la acetiltransferasa. Se ha fusionado la dCas9 con el núcleo catalítico de la acetiltransferasa p300 humana. Este complejo cataliza la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 en los sitios diana, dando como resultado la activación transcripcional robusta de los genes diana de promotores y potenciadores próximos y distales.

En cuanto a las aplicaciones futuras del CRISPR/Cas9 ha alcanzado una excelente posición como herramienta de ingeniería genética. Pero, sobre todo, CRISPR/Cas9 se utiliza en la actualidad para crear de forma muy eficaz organismos modificados genéticamente, aquellos en los que un determinado gen se ha modificado, insertado o inactivado a través de una mutación. gracias a la tecnología CRISPR se podrá desarrollar la terapia génica en la que además de identificar los genes responsables de alteraciones genéticas, estos genes podrán ser reemplazados, corregidos y eliminados en el paciente, permitiendo el tratamiento y prevención de enfermedades hereditarias. Algo que ya se está haciendo a nivel de ensayos en animales de laboratorio y células humanas, pero que en pocos años podrá aplicarse directamente sobre las propias personas. Las primeras aplicaciones de esta tecnología en los seres humanos se realizarán en las células de la sangre donde es relativamente más fácil transferir información dentro de las células, en comparación con los tejidos sólidos, aunque posteriormente se podrá aplicar a cualquier tipo de célula. Una aplicación concreta la encontramos en el estudio de procesos cancerígenos, ya que el sistema permite identificar, mejor que con ninguna otra herramienta disponible actualmente, los genes implicados en este tipo de procesos genéticos complejos. Del mismo modo en las enfermedades neurológicas, como algunos casos de párkinson o alzhéimer, cuando sean debidas a trastornos genéticos o a la producción de alguna proteína tóxica, se puede llegar a conseguir su eliminación. De esta forma toda alteración que tenga un componente genético se puede abordar con la tecnología CRISPR para buscar una solución.

- **otras aplicaciones interesantes de la tecnología CRISPR en el ámbito de la salud:**

mosquitos modificados genéticamente para que no puedan transmitir la malaria, eliminar genes dañinos de cerdos, convertir a las superbacterias o bacterias resistentes a los antibióticos en armas contra sí mismas, antimicrobianos selectivos, reducir el uso de productos químicos como los fertilizantes y fitosanitarios usados en agricultura, además de evitar el uso de medicamentos

**Conclusión:**

El sistema CRISPR-Cas9 ha supuesto una revolución en la Genómica por su sencillez, versatilidad, y aplicabilidad sobre cualquier tipo de célula.

La manipulación de la función génica es una herramienta básica en la obtención de cultivares mejorados. Esta ha sido utilizada por los programas de mejoramiento genético tradicional a través de la incorporación de mutaciones naturales o inducidas en genotipos elites. A pesar de ser exitoso en la obtención de numerosas variedades, este enfoque es impreciso, trabajoso y azaroso. El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN unido al aumento de la capacidad de procesamiento de los sistemas informáticos ha favorecido la disponibilidad de los genomas y transcriptomas de un número siempre creciente de organismos.

En cuanto a la terapia génica, CRISPR-Cas, promete ser el punto de inflexión para desarrollar nuevas técnicas; como se ha visto ya se ha podido eliminar los provirus del HIV-1 en modelos de ratones. El siguiente paso es dirigir estas terapias a humanos, sin descuidar los problemas éticos que supone aplicar este sistema, ya que cualquier error será imborrable en posteriores generaciones y las consecuencias son impredecibles.

**Bibliografías:**

- Fischer, L. (2019, 19 julio). Las 5 preguntas más importantes sobre CRISPR/Cas9. Recuperado de <https://www.investigacionyciencia.es/noticias/las-5-preguntas-ms-importantes-sobre-crispr-cas9-17711>
- Concepción-Hernández, M. (2018, 10 julio). CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas | Concepción-Hernández | Biotecnología Vegetal. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/585/html>
- Canet.D. (2017). CRISPR-Cas9: Técnicas y aplicaciones. España: universidad oberta de catalunya.
- F. (2018, 28 diciembre). Qué es CRISPR y por qué es tan importante para nuestro futuro. Recuperado de <https://futurizable.com/crispr/>
- Hinojar.P. (junio ). EDICIÓN GENÓMICA: LA TECNOLOGÍA CRISPR/Cas9 Y SU APLICACIÓN EN ENFERMEDADES HUMANAS.. España : FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Mendez, J. (2017, 28 noviembre). El editor genético CRISPR explicado para principiantes. Recuperado de <https://www.agenciasinc.es/Reportajes/El-editor-genetico-CRISPR-explicado-para-principiantes>