

<http://en.wikipedia.org/wiki/Phage#mediaviewer/File:Phage.jpg>

## De producir un yogurt a editar un genoma. La historia de CRISPR.

Agustín B. Ávila Casanueva

Las bacterias, como las personas, se enferman. Normalmente esto nos tiene sin cuidado y la mayoría de las veces ni siquiera nos enteramos, pero para las bacterias afectadas es algo bastante grave, su vida depende de ello y entender cómo las bacterias se defienden de los virus puede ayudar a eliminar muchas enfermedades humanas.

### Bacterias sanas para un buen yogurt

El mundo está lleno de bacterias, si pesáramos todos estos seres microscópicos juntos, su peso sería mayor que el de todas las plantas y animales del mundo; tan sólo en [nuestro cuerpo](#) habitan cien mil millones de bacterias y cada dos días, la mitad de las bacterias del mundo muere a causa de los virus. Los virus específicos de las bacterias se conocen como bacteriófagos o fagos. Para el científico Philippe Horvath que las bacterias se enfermen es un gran problema, su trabajo en Danisco, una empresa belga con sucursales en diferentes partes del mundo, consiste en mantener sanas y en las mejores condiciones posibles grandes poblaciones de bacterias. Allí, entre otras cosas, cultivan cepas de bacterias importantes para la industria alimentaria, como *Streptococcus thermophilus*, indispensable para la elaboración del queso y del yogurt.

Pero Philippe ha llevado su trabajo más allá de cuidar a las bacterias, se ha preocupado por saber cómo se defienden de un ataque de los fagos. Philippe expuso sus bacterias a dos tipos de fagos que suelen encontrarse en el yogurt; después del tiempo de incubación requerido, los virus hicieron de las suyas e infectaron a casi todas. Philippe y su equipo encontraron pocas sobrevivientes y se preguntaron ¿qué las hacía diferentes de sus hermanas fallecidas? Como sus hijas eran también resistentes a los fagos, pensaron que el ADN debía estar jugando un papel importante. Sabían además que hay tres lugares en el

genoma de *S. thermophilus* que varían mucho de una bacteria a otra; dos de estas zonas están bastante estudiadas y se relacionan con el buen mantenimiento de la célula. La tercera se conoce desde hace más de dos décadas y sólo había una cuantas ideas acerca de cuál era su función, por lo tanto era un buen lugar para iniciar la búsqueda.

### **No sé qué es, pero ahí está otra vez**

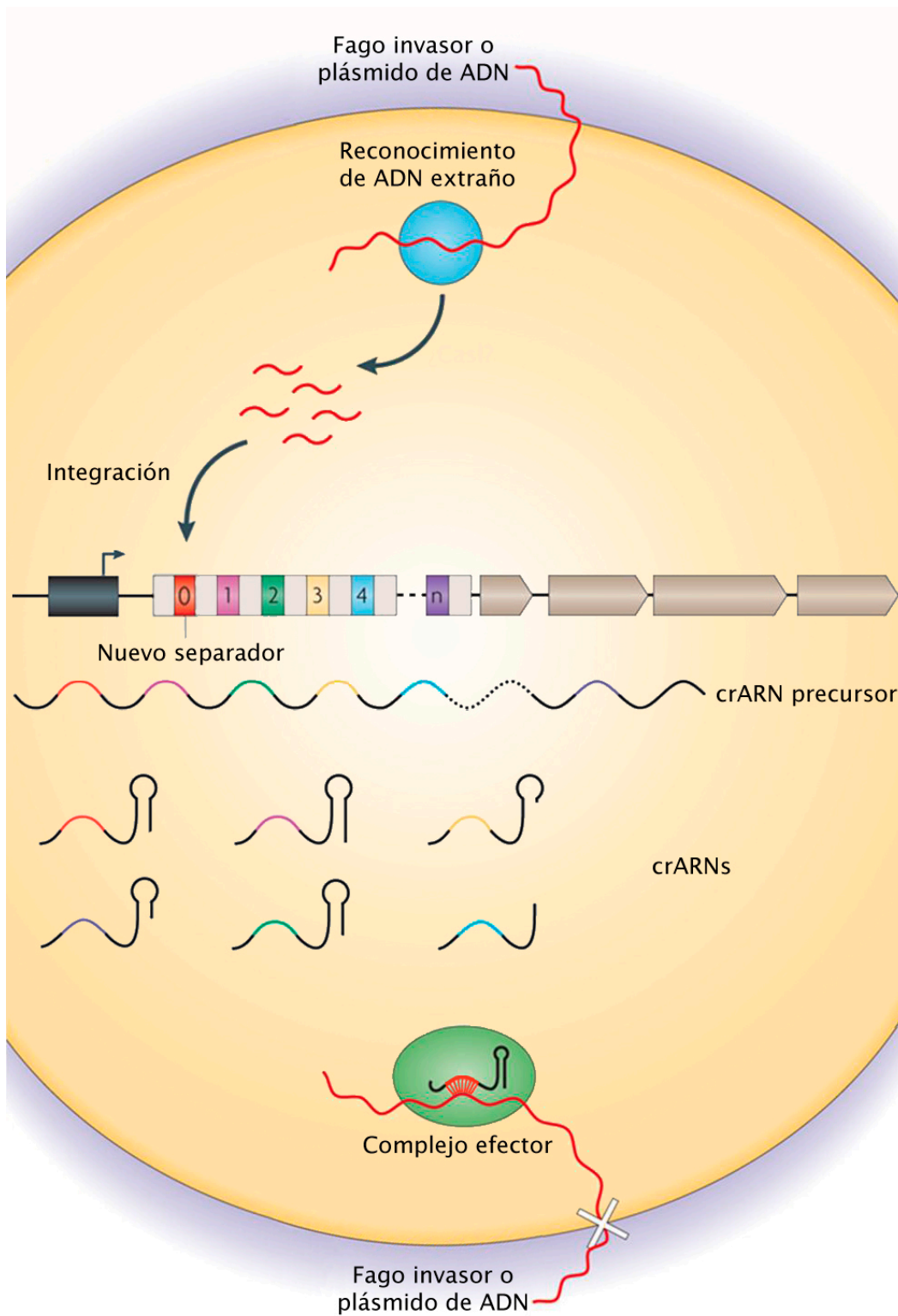
En 1987 científicos japoneses del Instituto de Investigación de Enfermedades Microbianas, en Osaka, estudiaban la secuencia de los aminoácidos de un grupo de enzimas en la bacteria *Escherichiacoli*, uno de los tantos huéspedes de nuestro intestino. Al final de la secuenciación de las enzimas de interés, encontraron un par de secuencias pequeñas que se repetían pero “cuyo significado biológico es desconocido”.

El tiempo pasó y este tipo de secuencias de enzimas y de algunos microorganismos se fueron acumulando en las bases de datos, sin que nadie supiera aún cuál era su función. Al analizar los genomas secuenciados de distintos microorganismos, encontraron que el 60% de las bacterias y el 90% de las arqueas, otro grupo de microorganismos procariontes, tienen este tipo de secuencias. Era raro que su significado biológico continuara siendo un misterio si estaban tan presentes.

Estas secuencias son hebras de ADN con una conformación especial, se inician con una secuencia pequeña palindrómica –es decir, que se lee igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda–, seguida de otra sin ninguna estructura especial, llamada secuencia separadora, y de nuevo aparece otra secuencia palindrómica. Esta estructura de palíndromo-separador-palíndromo se puede repetir decenas de veces, una detrás de la otra, en una sola bacteria, y es esto lo que le da el nombre de CRISPR (*Clustered regulary interspaced short palindromic repeats*, por sus siglas en inglés).

Diferentes grupos bioinformáticos analizaron todas las secuencias CRISPR conocidas y encontraron que muchas de ellas eran idénticas a las de algunos virus. En 2005, Eugene Koonin y sus colegas del Centro Nacional de Información Bioinformática de Estados Unidos, propusieron que bacterias y arqueas, cuando eran infectadas por algún virus, incorporaban de alguna manera una parte específica del genoma del virus a su propio genoma formando las secuencias separadoras, y que esto servía para reconocer los virus y atacarlos en cuanto entran a su sistema para defenderse de la infección. Lo que proponían era la existencia de un sistema inmune microbiano.

Pero fue hasta el 2007 que Philippe Horvath y su equipo comprobaron esta hipótesis, además de demostrar cuán específico es el proceso. Encontraron que cuando cambiaban una sola letra de las treinta que formaban la secuencia separadora, el fago podía volver a infectar a la célula sin mayor resistencia.



Este diagrama muestra la manera en que funciona CRISPR en una célula bacteriana. Imagen modificada por Silvia Zenteno, basada en imágenes utilizadas con permiso de [Nature Publishing Group](https://www.nature.com/).

## De una defensa férrea a una cirugía precisa

Cuando los virus infectan una célula microbiana, empiezan por inyectar su ADN. CRISPR entra en acción desde este primer paso. El mecanismo que utiliza no se ha comprendido del todo, pero hay dos proteínas que trabajan en conjunto con las secuencias CRISPR, llamadas Cas1 y Cas2 –por lo que muchas veces, el sistema inmune CRISPR, también es llamado el complejo CRISPR/Cas–. Cas1 reconoce de alguna manera el ADN ajeno a la célula y lo corta en trozos de 80 nucleótidos –las unidades que forman el ADN– a manera de una primera defensa general, no específica. Posteriormente Cas2 vuelve a cortar uno o más de los trozos de ADN en cachitos de 34 nucleótidos, y éstos se convierten en los separadores de las secuencias CRISPR. Es aquí dónde empieza la formación del sistema inmune, una defensa rápida y específica contra el invasor. Estos pequeños separadores son la base para crear algo parecido a anticuerpos contra los invasores. Los microbios que contienen estas secuencias de ADN, están constantemente creando *anticuerpos* para su defensa. Primero traducen todos los espaciadores de ADN a ARN, una molécula muy parecida al ADN pero de una sola cadena. Después las proteínas Cas vuelven a participar y cortan la larga cadena de ARN en secuencias palindrómicas, obteniendo pedazos individuales para cada separador llamados crARN. Éstos son, al igual que los anticuerpos, específicos para cada virus que ha atacado al microbio, y están listos para defender su célula.

Al unirse los crARN a un complejo efector llamado Cas9 –una enzima cuya función específica es aún desconocida–, pueden reconocer y localizar el ADN de los virus con mucho mayor rapidez y eficacia que Cas1, lo cual es indispensable para sobrevivir una infección, ya que como se ve en la fotografía de la portada, los virus suelen ser montoneros y se necesita una defensa rápida y numerosa. Al reconocer el ADN ajeno, los crARN lo cortan con ayuda de este complejo efector y lo vuelven inocuo para el microbio.

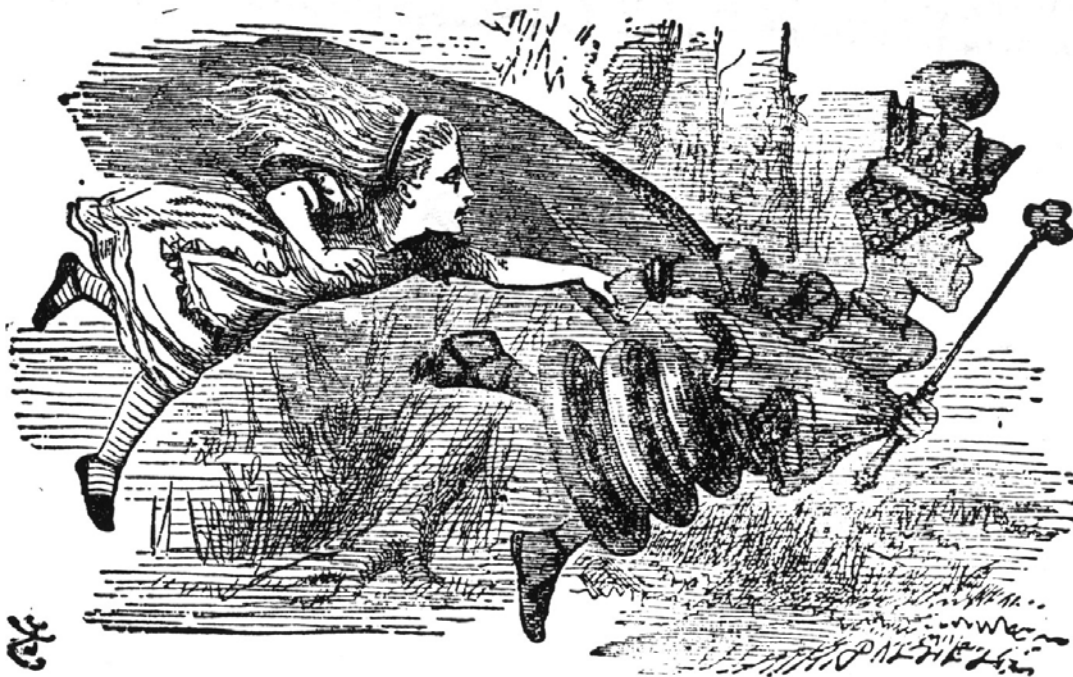
El funcionamiento de CRISPR/Cas es bastante eficiente, puede encontrar una sola secuencia de ADN entre tres mil millones de ellas y no requiere de muchos elementos para hacerlo. Teniendo esto en cuenta, equipos de investigadores de la Universidad de California en Estados Unidos, y de la Universidad Médica de Hannover en Alemania, lograron replicar esta maquinaria en el laboratorio; es decir, separarla del microbio y que funcione sola. Además, modificaron Cas9 para que sólo encontrara el ADN de interés o solamente un corte en él.

Lo que lograron estos investigadores es construir un escalpelo molecular, una cuchilla que permite hacer modificaciones, cortes o inserciones dentro del ADN de prácticamente cualquier organismo, y con una precisión de uno entre tres mil millones. Con esta tecnología se han modificado genes de arroz, de ratón, e incluso de humanos. Procesos que normalmente tardarían hasta un año para eliminar un gen de un organismo –la manera

tradicional de estudiar la función de uno o varios genes— ahora tardan solamente un par de semanas, además de ser más baratos.

El equipo de trabajo de George M. Church de la Universidad de Harvard, construyó bibliotecas de estos crARN con los cuales se podría manipular el 90% de los genes humanos, ya sea para estudiar su funcionamiento en líneas celulares específicas como las del riñón o el hígado, o para empezar a tratar enfermedades de carácter hereditario dentro de otros modelos animales.

Un equipo de investigadores del Instituto de Tecnología de Massachusetts, en Estados Unidos, dirigidos por Daniel G Anderson, nos da un ejemplo de lo que se puede llegar a lograr con esta tecnología. La tirosinemia es una enfermedad con base genética, causada por una mutación que impide la producción de la enzima que degrada la tirosina, un aminoácido que sintetizamos y también consumimos con nuestra comida. Sin esta enzima, la tirosina alcanza niveles tóxicos dentro de la sangre y causa una falla renal. Los investigadores diseñaron un sistema CRISPR/Cas para insertar una copia funcional del gen dentro de hígados de ratones que sufrían este padecimiento. Con la primera aplicación de este sistema sólo se arregló una de cada 250 células del hígado. En los siguientes treinta días, esas pocas células sanas empezaron a proliferar y a suplantar a las células muertas por el exceso de tirosina, hasta llegar a sumar un tercio de las células del hígado. Esto fue suficiente para que los ratones ya no presentaran ningún síntoma de tirosinemia y se consideraran curados.



## Corriendo como la Reina Roja

*Aquí, como ves, se ha de correr a toda marcha simplemente para llegar al mismo sitio.*

Lewis Carroll, *Alicia a través del espejo*.

En la novela *Alicia a través del espejo* de Lewis Carroll, la secuela de *Alicia en el país de las maravillas*, la joven Alicia atraviesa el espejo para encontrarse con flores parlantes y con la ya conocida Reina Roja, quien la reta a recorrer todas las casillas de un enorme tablero de ajedrez para poder convertirla en reina. Pero conforme Alicia y la Reina empiezan a correr, Alicia nota que todo a su alrededor, los árboles, las piedras, las flores, parecen moverse junto a ellas, o acaso, como le explica la Reina Roja, tienen que *correr a toda marcha simplemente para llegar al mismo sitio*.

A los evolucionistas les gusta bastante este texto de Alicia, y es que explica las relaciones entre un parásito y su hospedero. Ambos tienen que correr todo el tiempo para sencillamente mantenerse en el mismo lugar. Uno desarrolla un nuevo ataque, mientras otro desarrolla una nueva defensa, y cuando uno ha vencido la trampa del otro vuelven a encontrarse con otro más, así ambos tienen que perseguirse sólo para terminar en el mismo lugar. A esta situación se le conoce como carrera de la Reina Roja. La relación entre los fagos y los microbios no es la excepción, CRISPR ha sido una muy buena defensa en favor de los microbios, tan buena que los virus han logrado utilizarla a su favor. En 2013 investigadores de Boston, en Estados Unidos, encontraron un fago que tiene su propio sistema CRISPR y lo utiliza para evadir la inmunidad del microbio al que ataca. Estos investigadores, dirigidos por Andrew Camilli, estudiaban la bacteria *Vibrio cholerae*, la causante del cólera en humanos, y cómo se veía afectada por los ataques de un virus específico llamado ICP1. Los científicos aislaron en Bangladesh once tipos de virus relacionados con ICP1, de los cuales cinco contenían un sistema CRISPR. Pero obviamente el virus no iba a tener un sistema que defendiera a la bacteria del virus. ¿Qué hace entonces el sistema CRISPR? Ayuda al virus a vencer las defensas de la bacteria, en este caso un sistema de defensa llamado isla de patogenicidad.

Estas islas son segmentos de ADN que después de la inserción del virus en la bacteria, se separan del lugar genómico donde se encuentran para formar una nueva molécula y activar así los genes que se encargan de hacer cápsides (capas de proteína que sirven de caparazón para los virus) más pequeñas de lo normal y que además de llenarlas con ADN de la propia bacteria evitan que la infección se esparza, pues los virus producidos por la bacteria infectada no son funcionales. Después le toca el turno al fago. Las secuencias que se encuentran en el separador del CRISPR del virus, son específicas para la

isla de patogenicidad de *V. cholerae*, así los crRNA se pegan a los genes de esta isla e impiden que entren en acción, infectando la célula a placer.

CRISPR está modificando la manera en que se lleva a cabo la biología molecular, y probablemente haya aplicaciones para tratar enfermedades en pacientes humanos, o mejorar la resistencia a patógenos de diferentes cultivos de plantas. Qué bueno que a Philippe Horvath le importó producir un buen yogurt.

### **Bibliografía**

1. Elizabeth Pennisi, “The CRISPR Craze”, *Science*, vol. 341, 23 de agosto de 2013.
2. Rodolphe Barrangouet *et al.*, “CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes”, *Science*, vol 315, 23 de marzo de 2007.
3. Kimberley D. Seed, et al., “A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity”, *Nature*, vol. 494, 23 de febrero de 2013.
4. Yoshizumi Ishino et al., “Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product”, *The Journal of Bacteriology*, vol. 169, núm. 12, diciembre de 1987.
5. Luciano A. Marraffini et al., “CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea”, *Nature Reviews Genetics*. 11(3): 181–190, marzo, 2010.

### **Bibliografía no especializada**

1. Retocar los genes para curar enfermedades. En [Historias científicas](#). 7 de abril del 2014.