

# LAS TIJERAS GENÉTICAS: PREMIO NOBEL DE QUÍMICA DEL 2020



*Genetic Scissors: 2020 Nobel Prize in Chemistry*

LUIS DE STEFANO-BELTRÁN<sup>1</sup>

## RESUMEN

El autor nos presenta a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna ganadoras del Premio Nobel de Química 2020 por haber desarrollado una de las técnicas más precisas de edición genética conocida como CRISPR/Cas9 o *tijeras genéticas*.

Palabras claves: Premio Nobel, química, genética, genoma.

## ABSTRACT

The author introduces us to Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna who won the 2020 Nobel Prize in Chemistry for having developed one of the most accurate genetic editing techniques known as CRISPR/Cas9 or *genetic scissors*.

Keywords: Nobel Prize, chemistry, genetics, genome.



Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna.  
Fuente: <https://www.quo.es/ciencia/>

El pasado 22 de febrero del presente año los cables anunciaron un desarrollo tecnológico que hasta hace solo unos años habría parecido como sacado de una revista popular de ciencia ficción. Científicos del Cold Spring Harbor Laboratory, uno de

los centros de investigación más prestigiosos en el mundo, anunciaron en *Nature Plants* que habían logrado editar el genoma del maíz con el objetivo de aumentar el número de granos por choclo así como el tamaños de los mismos con la promesa de, en muy corto tiempo, obtener variedades con 50% más de rendimiento que las actuales.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> PhD. en bioquímica. Laboratorio de Genómica Funcional, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Hace solo una semana un grupo del Innovation Academy for Seed Design en la Chinese Academy of Sciences reportó en la revista *Cell* la domesticación *de novo* de un arroz silvestre

abriendo con ello la posibilidad de domesticar nuevos cultivos en una fracción del tiempo de lo que normalmente tomó para los actuales cultivos.<sup>2</sup> Estos dos avances tecnológicos relacionados a la agricultura y otros igual de revolucionarios en biomedicina no hubiesen sido posibles hace solo ocho años. En las siguientes líneas trataré de introducirlos a la tecnología de edición de genomas y para ello comenzaré con su momento culminante, el anuncio de los ganadores del Premio Nóbel de Química del 2020.

El pasado 7 de octubre Göran K. Hansson, Secretario General de la Real Academia de las Ciencias de Suecia, inició el anuncio de las ganadoras del Premio Nóbel de Química del 2020 con estas palabras: "...*El premio de este año consiste en reescribir el código de la vida...*". Era el reconocimiento de que por primera vez la especie humana era capaz de modificar su propio código y el de otras especies, un verdadero parteaguas en la corta historia evolutiva del *Homo sapiens* sobre la tierra. El Dr. Hansson continuó con el anuncio de los nombres de las ganadoras: la francesa Emmanuelle Charpentier y la estadounidense Jennifer Doudna por el desarrollo de un método para la edición genómica. El desarrollo de este revolucionario método representa, sin embargo, el trabajo de una docena de científicos alrededor del mundo quienes ayudaron con la dilucidación, primero, del sistema inmunológico adaptativo bacteriano CRISPR-Cas para dar luego al método mismo. La historia de este método comienza hace unos 30 años en el pequeño puerto de Santa Pola ubicada en la región de Costa Blanca, España, a pocos kilómetros de Alicante y conocida por sus marismas y salinas. Un joven Francisco Mojica iniciaba su doctorado en la Universidad de Alicante en 1989 después de obtener su B.S. en biología de la Universidad de Valencia. Su tutor, Francisco Rodríguez-Valera, trabajaba

con una arquea, la *Haloferax mediterranei*, aislada precisamente de las salinas de Santa Paola, y responsable del color rosáceo que adquieren las salinas cuando aumenta la concentración de la sal. El joven estudiante recibió el encargo de elucidar porqué la concentración de sal en el medio de cultivo parecía afectar la manera en que las enzimas de restricción cortaban el DNA de esta halobacteria. Fue así que Francisco Mojica comenzó a caracterizar los fragmentos alterados del genoma mediante el secuenciamiento de DNA.

Cuenta Mojica que en el verano de 1992 un joven becario le recitaba la secuencia de bases reveladas en la película de rayos X mientras él apuntaba la secuencia letra a letra en su cuaderno de laboratorio hasta que lo paró en seco para reclamarle que se había equivocado pues le acababa de repetir una secuencia que ya le había dictado. Comenzaron de nuevo y una y otra vez encontraron la misma secuencia reiterada muchas veces. Era una secuencia de 30 bases, un palíndromo casi perfecto, separado por secuencias espaciadoras de 36 bases sin homología a nada conocido hasta ese momento en bacterias.<sup>3</sup> Muy pronto su curiosidad lo llevó a estudiar otras arqueas, una dentro del mismo género, *Haloferax volcanii* y otras arqueas halofílicas mucho más distantes –*Haloarcula* spp,- y en todas ellas encontró secuencias repetidas similares. Cuando revisó la literatura encontró que Yoshizumi Ishino en 1987 y Peter Hermans en 1991 habían reportado secuencias repetidas similares en *Escherichia coli*, una bacteria gramnegativa, y en *Mycobacterium tuberculosis*, una grampositiva, aunque con diferente secuencia. Mojica concluyó que estaba ante una función fundamental para todos los procariontes.<sup>4</sup>

Durante los próximos diez años el único interesado en estas secuencias en el mundo fue Mojica quien después de unas cortas

estadías postdoctorales en la Universidad de Utah (Prof. John S. Parkinson) y Universidad de Oxford (Prof. Christopher F. Higgins) había regresado a la Universidad de Alicante como miembro *junior* de la División de Microbiología del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología. Mojica bautizó a estas secuencias repetidas con el acrónimo SRSRs (Short Regularly Spaced Repeats). Posteriormente, en un intercambio epistolar con el microbiólogo Ruud Jansen, sugirió cambiarlo a Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR). Mojica recuerda que Ruud le dijo: “Qué buen acrónimo es CRISPR ... Tiene gancho”.<sup>5</sup> Ruud Jansen de hecho usó el acrónimo por primera vez en la literatura cuando anunció la caracterización de los genes *Cas* (CRISPR-associated).<sup>6</sup>

No fue sino hasta agosto del 2003 cuando Mojica en un momento *eureka* logro descifrar el enigma de las secuencias espaciadoras: éstas correspondían a secuencias cortas de virus de bacterias, los llamados bacteriófagos, insertadas en el genoma de las bacterias como *memorabilia* de contactos previos con patógenos virales. En todos los casos, las bacterias eran resistentes a los virus cuyas secuencias se encontraban presentes como secuencias espaciadoras en sus genomas. Se trataba de un sistema inmune adaptativo bacteriano nunca antes descrito. Semejante descubrimiento debía ser reportado de inmediato. Cuenta Mojica que su artículo anunciando este sofisticado sistema de defensa bacteriano fue rechazado por cuatro revistas a lo largo de seis meses: *Nature*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *Molecular Microbiology* y *Nucleic Acid Research* antes que fuera aceptado finalmente por el *Journal of Molecular Evolution* donde fue publicado, después de un año de revisiones, el 1 de febrero de 2005.<sup>7</sup> Curiosamente, otros dos grupos franceses encabezados por Gilles Vergnaud y Alexander Bolotin reportaron

resultados muy similares a los de Mojica en *Yersinia pestis* y *Streptococcus thermophilus*, respectivamente, en marzo y septiembre del mismo año.<sup>8,9</sup>

Durante los próximos años varios grupos alrededor del mundo fueron añadiendo las piezas faltantes al rompecabezas de este sistema de defensa propuesto por Mojica. Finalmente fue emergiendo una gran diversidad de sistemas CRISPR organizados actualmente en dos clases generales y subdivididas en cinco tipos cuya descripción en detalle escapa al propósito del presente artículo.

En la Figura 1 se presenta uno de los sistemas CRISPR más simples perteneciente a la Clase 2, Tipo II de *Streptococcus thermophilus* y *S. pyogenes*. Este locus CRISPR contiene un arreglo de secuencias CRISPR (CRISPR array) con regiones repetidas (diamantes negros) separadas por regiones espaciadoras (rectángulos de colores) derivadas de diferentes virus invasores así como cuatro genes codificadores de proteínas (*cas9*, *cas1*, *cas2*, y *csn2*). El gen *cas9* codifica una nucleasa, Cas9, que confiere inmunidad al cortar el DNA invasor con una perfecta homología a las regiones espaciadoras. Los otros tres genes *cas1*, *cas2* y *csn2*, codifican proteínas involucradas en la adquisición de nuevas secuencias espaciadoras a partir del DNA de virus invasores. El tercer elemento del locus CRISPR es la secuencia tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*) cuyo transcrito representa, sorprendentemente, el tercer RNA más abundante después de rRNA y tRNA. El transcrito tracrRNA es un pequeño RNA no codificante que posee una secuencia de 24 nucleótidos de casi perfecta complementariedad con las secuencias repetidas del arreglo CRISPR que también son transcritas como un precursor largo pre-crRNA (CRISPR RNA). Estos dos RNAs se hibridizan a través de la

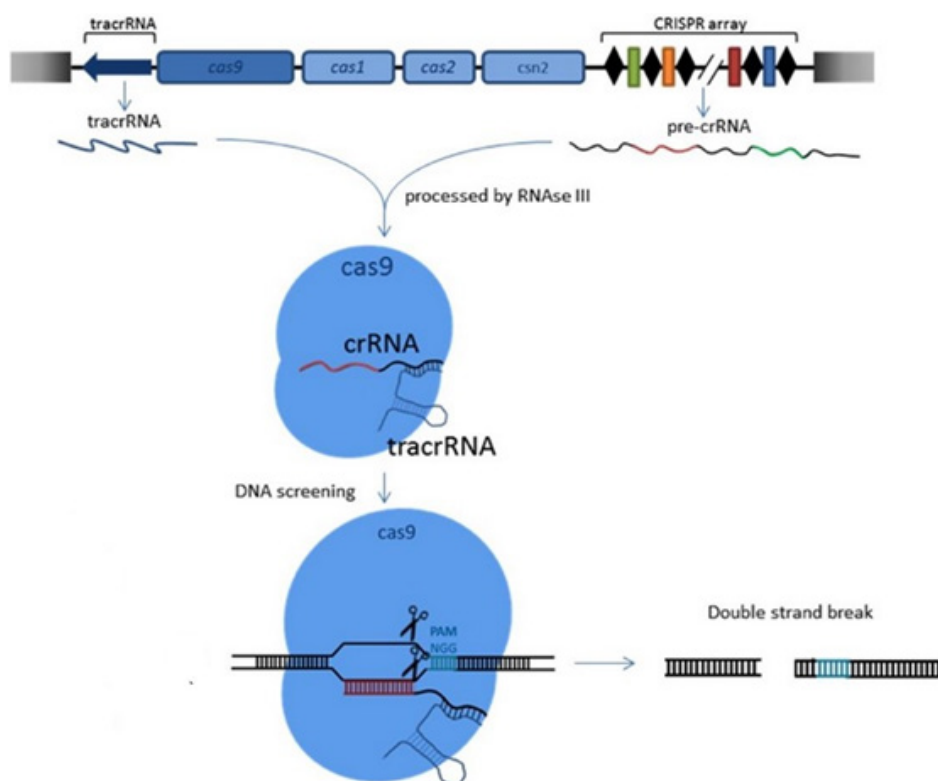


Figura 1. Sistema CRISPR-Cas9 Clase 2, Tipo II de *Streptococcus thermophilus*.

secuencia complementaria y son procesadas a formas más cortas por la RNasa III y la Cas9. El complejo terciario Cas9 + tracrRNA + crRNA se embarca a la búsqueda de secuencias de DNA que coincidan con la secuencia espaciadora (en rojo). La unión de la Cas9 requiere la presencia de una secuencia motif adyacente al protoespaciador (PAM, Protospacer Adjacent Motif) en la secuencia blanco que funciona como una suerte de asa molecular a la que se sujeta la nucleasa. Una vez que la Cas9 se une al sitio blanco con una coincidencia en secuencia entre el crRNA y el DNA blanco, corta el DNA tres bases 5' corriente arriba (*upstream*) del sitio PAM. La nucleasa Cas9 posee dos dominios de endonucleasa, el HNH y el RuvC, los que cortan, respectivamente, la cadena complementaria y no complementaria

del DNA blanco creando extremos romos a través de una rotura de doble cadena (double strand break).

Emmanuelle Marie Charpentier nació el 11 de diciembre de 1968 en Juvisy-sur-Orge, a 25 km de París, en Francia. En 1992 se graduó con un título en bioquímica de la Universidad Pierre y Marie Curie (la UPMC forma parte de la Universidad de Sorbona desde el 2018). Obtuvo su PhD. en Microbiología en el Instituto de Pasteur bajo la dirección de Patrice Courvalin en 1995. Sorprendentemente, en sus dos primeros artículos en los que publica resultados de su tesis de doctorado, la joven estudiante de doctorado es la autora de correspondencia.<sup>10,11</sup> Después de una corta estancia postdoctoral en el mismo Instituto,

Charpentier viajó a los Estados Unidos donde completó varias estancias postdoctorales en la Universidad Rockefeller, el Centro Médico Langone de la Universidad de Nueva York, el Instituto Skirball de Medicina Biomolecular, en Nueva York, y el Hospital de Investigación Infantil St. Jude, en Memphis. En 2002 regresó a Europa a la Universidad de Viena en Austria y en 2009 se incorporó al Centro de Investigación Microbiana de la Universidad de Umeå, Suecia.

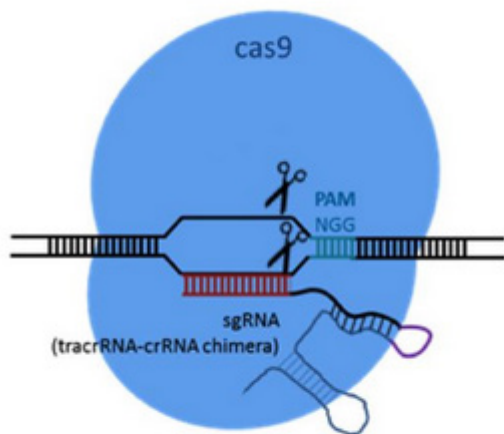
Después de descubrir el *tracrRNA* y elucidar su rol en la maduración de los *crRNAs* en colaboración con Jörg Vogel del Grupo de Biología del RNA en el Instituto de Biología Molecular de la Infección en la Universidad de Würzburg, en Würzburg, Alemania, Emmanuelle Charpentier y su equipo pusieron a prueba todos sus conocimientos en bioquímica para embarcarse en la caracterización bioquímica del sistema CRISPR *in vitro*.<sup>12</sup> Pronto iban a conocer a una aliada y colaboradora crucial.

La historia se puso más interesante cuando, en marzo de 2011, Charpentier fue invitada a dar una conferencia plenaria en una reunión científica, "Regulando Bacteria con RNA" organizada por la Sociedad Americana de Microbiología en Puerto Rico donde conoció a Jennifer Doudna, una bióloga estructural estadounidense y experta en RNA mundialmente conocida.

Jennifer Doudna nació el 19 de febrero de 1964 en Washington, DC, EE.UU., en una familia académica. Cuando cumplió siete años de edad la familia se mudó a Hawaii. Su padre fue Profesor de literatura estadounidense en la Universidad de Hawaii, en Hilo, y su madre enseñó historia en un community college. En 1985 obtuvo su B.Sc. en Química en Pomona College y su PhD. de la Universidad de

Harvard bajo la dirección de Jack W. Szostak, en 1989. Su interés en el RNA se inició con su trabajo de tesis para su doctorado. Logró rediseñar un intrón capaz de autoempalmarse en una ribozima con habilidad de copiar un molde de RNA. Este interés inicial se amplió a la biología estructural en el laboratorio de Thomas R. Cech en la Universidad de Colorado y Premio Nóbel de Química en 1989, donde fue capaz de resolver varias estructuras cristalinas de ribozimas.

Las dos científicas decidieron unir esfuerzos para caracterizar el sistema CRISPR en *Streptococcus pyogenes*. Para ello usaron Cas9 recombinante de *S. pyogenes* expresada en *E. coli* así como *tracrRNA* y *crRNA* transcritos *in vitro*. Con esos ingredientes moleculares fueron capaces no solo de demostrar que Cas9 cortaba DNA *in vitro* sino que su especificidad contra DNA podía ser reprogramada con *crRNAs* hechos a la medida. También fueron las primeras en crear un RNA quimera fusionando en una sola molécula al *tracrRNA* y *crRNA* para dar lugar al RNA guía (single-guide RNA o sgRNA) y demostraron que era tan funcional *in vitro* como sus componentes separados (ver Figura 2). Charpentier y Doudna enviaron sus resultados a la revista *Science* el 8 de junio del 2012 y el artículo fue publicado en línea en tiempo récord solo veinte días después, el 28 de junio.<sup>13</sup> Sin embargo, el grupo encabezado por Virginijus Siksnys había enviado un artículo con resultados muy similares (excepto el sgRNA) a la revista *Cell* el 6 de abril de ese mismo año. Desafortunadamente, el artículo fue rechazado y devuelto a sus autores sin revisión por pares solo seis días después. Siksnys decidió entonces trabajar en una versión mucho más corta de su artículo y lo envió a *PNAS* el 21 de mayo pero no fue publicado en línea sino hasta el 4 de septiembre, un poco más de dos meses después del de Charpentier y Doudna.<sup>14</sup> De haber sido aceptado el artículo de Siksnys por



**Figura 2.** RNA guía (sgRNA) desarrollado por Charpentier y Doudna (2012).

la revista *Cell* quizás otro habría sido el destino del premio Nóbel de Química del 2020.

La primera aplicación del método de Charpentier y Doudna para reprogramar el sitio blanco de la Cas9 fue realizada por Feng Zhang y su equipo en el Department of Brain and Cognitive Sciences del Massachusetts Institute of Technology. Zhang fue capaz de demostrar edición del genoma en varios loci de células humanas y de ratón mediante la modificación del RNA guía así como la modificación simultánea de varios loci usando diferentes secuencias guías en un solo crRNA.<sup>15</sup> Su artículo fue enviado a *Science* el 12 de octubre del 2012 y apareció en línea el 3 de enero del 2013. Se convirtió en el artículo más citado en el campo de edición genómica mediante CRISPR.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu L, Gallagher J, Arevalo ED, Chen R, Skopelitis T, Wu Q, Bartlett M, Jackson D. Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR- Cas9 promoter editing of maize CLE genes. *Nature Plants*. 2021; 7, 287-294.
2. Yu H, Lin T, Meng X, Du H, Zhang J, Liu G, et al. A route to de novo domestication of wild allotetraploid rice. *Cell*. 2021; 184, 1156-1170.
3. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993;9, 613-621.
4. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 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*. 1995;17, 85-93.
5. Mojica FJ. Prólogo. Editando genes: recorta, pega y colorea: Las maravillosas herramientas CRISPR de Lluís Montoliu. Next Door Publishers. 2018
6. Jansen R, Embden JDAV, Gaastra W, and Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002; 43, 1565-1575.
7. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J. and Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005; 60, 174-182.
8. Pourcel C, Salvignol G, and Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151, 653-663.
9. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, and Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151, 2551-2561.
10. Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene *let(S)* in *Listeria monocytogenes* BM4210. *Gene*. 1993; 131, 27-34.
11. Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin, P. Presence of the *Listeria* Tetracycline Resistance Gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38, 2330-2335.
12. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. et al. CRISPR RNAmaturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011; 471, 602-607.
13. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, and Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337, 816-821.

14. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, and Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109, E2579-E2586.

15. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339, 819-823.

Fecha de recepción: 17-03-2021.

Fecha de aceptación: 22-03-2021.

Conflicto de interés: ninguno, según el autor.

Financiamiento: por el autor.