

Elaboración de un modelo de CRISPR-Cas9 de papel

INTRODUCCIÓN

- [“La controversial tecnología CRISPR quiere ayudar a alimentar al mundo”](#) (Wired, 27 enero de 2023)
- [“La revolución del ADN”](#) (National Geographic España, 7 octubre de 2020)
- [“¿Podremos algún día “borrar” las enfermedades más mortales del ser humano?”](#) (BBC News Mundo, 30 enero de 2018)

Como muestran estos titulares, hay mucha exaltación en torno a la tecnología CRISPR. Pero, ¿qué es exactamente?

El sistema CRISPR-Cas9 (comúnmente conocido como CRISPR) es una herramienta biotecnológica que puede utilizarse para editar el ADN de células y organismos de forma relativamente barata y rápida. Desde que se identificó por primera vez en 2012, este sistema ha generado mucho interés por su notable potencial para tratar enfermedades genéticas, combatir virus y producir mejores cultivos. También ha generado preocupación por la seguridad de los alimentos y los pacientes, así como la posible creación de bebés de diseño o superhumanos.

En esta actividad, explorarás cómo funciona el sistema CRISPR-Cas9 en la edición del ADN al construir tu propio modelo de papel. Utilizarás este modelo para aprender cómo se utiliza el sistema CRISPR-Cas9 para inactivar genes y para editar secuencias de una manera más específica. Luego examinarás un modelo de CRISPR-Cas9 disponible en línea y verás cómo se utiliza esta herramienta en la investigación actual.

MATERIALES

- copias de las hojas de los modelos
- tijeras
- cinta adhesiva transparente

PARTE 1: UN MODELO DE PAPEL DEL SISTEMA CRISPR-CAS9

En esta parte de la actividad, utilizarás los materiales proporcionados para construir un modelo de papel del sistema CRISPR-Cas9 y para analizar cómo funciona. Este modelo incluye los siguientes componentes:

- **Cas9:** una enzima nucleasa cuya función es cortar el ADN
- **ARN guía:** una secuencia de ARN que se une a la Cas9 y le permite reconocer al gen objetivo
- **ADN objetivo:** una secuencia de ADN que contiene un “gen objetivo” que el sistema CRISPR-Cas9 debe cortar
- **Nucleótidos aleatorios:** nucleótidos que pueden insertarse en el lugar de corte del gen objetivo
- **ADN donador:** ADN que puede utilizarse para editar el gen objetivo de una forma más específica

CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

En primer lugar, prepararás las partes del modelo de papel para construir la herramienta CRISPR-Cas9.

1. Recorta la enzima Cas9 y las dos pestañas de la hoja mostradas en la Figura 1.

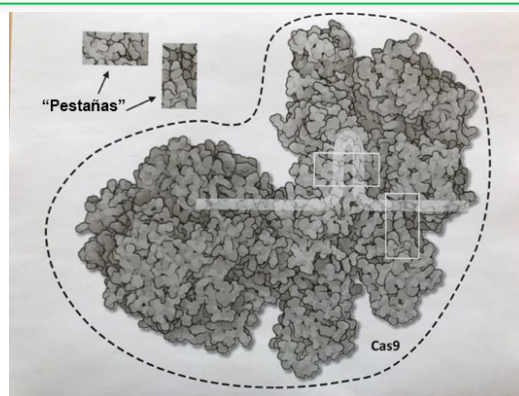


Figura 1. Hoja con el modelo de Cas9.

2. Coloca las dos pestañas en los rectángulos delineados en blanco sobre la enzima Cas9. Pega los bordes **cortos** de cada pestaña y asegúrate de *no* colocar cinta sobre los bordes largos. Los rectángulos azules de la Figura 2 muestran dónde debes colocar la cinta adhesiva.

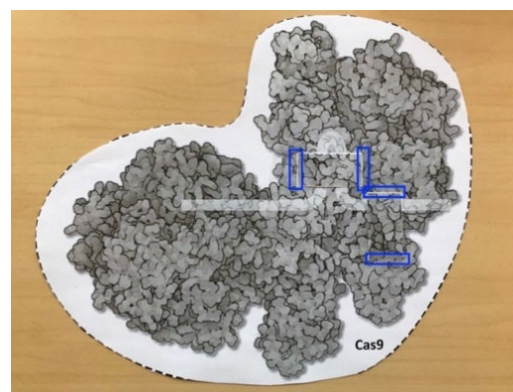


Figura 2. El modelo de Cas9 con las pestañas colocadas en los sitios adecuados y pegadas con cinta adhesiva. Las marcas azules muestran dónde se debe colocar la cinta adhesiva. Asegúrate de que la cinta cubra solo los extremos cortos de las pestañas.

3. Recorta las dos moléculas de ADN objetivo, las dos moléculas de ARN guía, el ADN donador y los nucleótidos aleatorios de la hoja mostrados en la Figura 3.

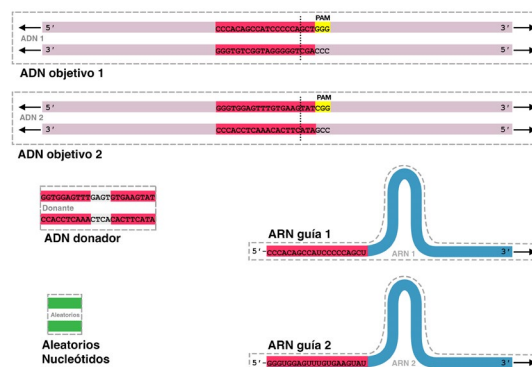


Figura 3. Hoja con el modelo de ARN y ADN.

- Para construir el modelo del sistema CRISPR-Cas9, deberás representar la unión del ARN guía a la enzima Cas9. Sujeta el ARN guía 1 a la enzima Cas9 deslizando por debajo de las pestañas, como se muestra en la Figura 4.

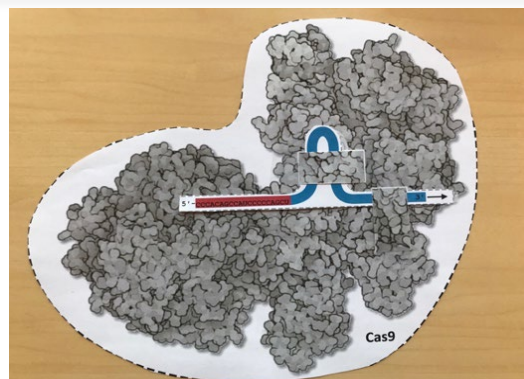


Figura 4. Modelo del sistema CRISPR-Cas9 que utiliza el ARN guía 1. El bucle del ARN guía debe deslizarse por debajo de la pestaña superior y el extremo 3' debe deslizarse por debajo de la pestaña de la derecha.

En este modelo, la sección **azul** del ARN guía representa la parte que se une a la enzima Cas9. La sección **roja** del ARN, que tiene una secuencia escrita, representa una “secuencia de reconocimiento” que está libre para unirse a una secuencia complementaria de ADN.

REPRESENTACIÓN DEL RECONOCIMIENTO Y LA UNIÓN

Tu complejo Cas9-ARN ahora está “programado” para buscar un ADN objetivo. La enzima Cas9 primero reconoce y se une a una secuencia de tres nucleótidos denominada PAM, presente en todo el genoma. Un ejemplo de una secuencia PAM está resaltado en **amarillo** en el ADN objetivo de tu modelo.

Una vez que se une a una secuencia PAM, la Cas9 desenrolla la doble hélice del ADN. Si el ARN guía coincide con la secuencia de ADN que está junto a la secuencia PAM, se unirá a la hebra de ADN complementaria. Si esto no ocurre, el ADN volverá a comprimirse y la enzima Cas9 se unirá a otras secuencias PAM hasta que encuentre el ADN objetivo complementario.

Ahora harás una representación de cómo el ARN guía encuentra su ADN objetivo complementario mediante el **ADN objetivo 1**. La secuencia de ADN objetivo 1 proviene de un gen real denominado *MC1R*. Este gen codifica para una proteína que afecta el color de la piel y del cabello.

- Desliza el ADN objetivo 1 por debajo del ARN guía 1 a través de la pestaña que se encuentra más a la derecha de la enzima Cas9. **Alinea** la secuencia de reconocimiento **roja** del ARN guía con la secuencia complementaria del ADN objetivo, como se muestra en la Figura 5.

Pregunta 1a. Anota la secuencia del ARN guía 1 que se une al ADN y la secuencia complementaria del ADN 1 a la que se une. Identifica los extremos 5' y 3' de ambas hebras.

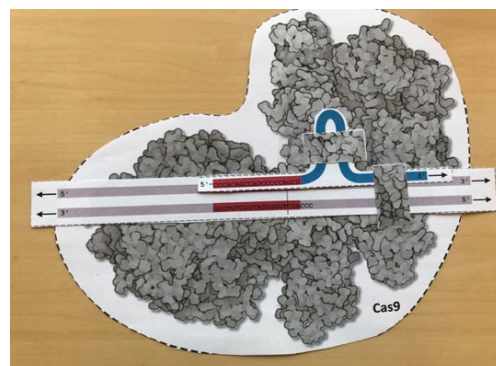


Figura 5. Modelo del complejo Cas9-ARN guía unido al ADN objetivo 1.

REPRESENTACIÓN DE LA RUPTURA

Una vez que el ARN guía se une al ADN, acciona la actividad de nucleasa (capacidad de corte del ADN) de la enzima Cas9. El corte del ADN también se denomina “ruptura”. La enzima Cas9 siempre corta *ambas* hebras del ADN tres nucleótidos aguas arriba (hacia el extremo 5') de la secuencia PAM.

- Para simular cómo la enzima Cas9 rompe el ADN, utiliza las tijeras para recortar el ADN objetivo 1 a lo largo de la línea entrecortada, como se muestra en la Figura 6. No cortes el ARN guía.

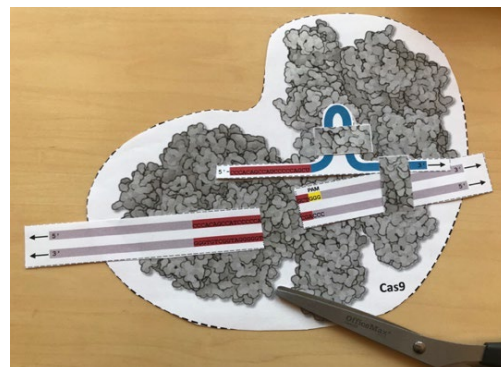


Figura 6. Modelo de la enzima Cas9 cortando el ADN objetivo 1.

REPRESENTACIÓN DE LA REPARACIÓN DEL ADN

Una vez que la enzima Cas9 corta el ADN, las enzimas celulares intentarán reparar la ruptura. El sistema CRISPR-Cas9 aprovecha estos mecanismos de reparación para alterar la secuencia genética objetivo. Ahora explorarás dos aplicaciones de CRISPR-Cas9 que utilizan diferentes mecanismos de reparación.

En primer lugar, harás una representación de cómo se puede utilizar el sistema CRISPR-Cas9 para *inactivar* un gen objetivo. En este caso, la célula utiliza la **unión de extremos no homólogos (NHEJ)**, un mecanismo de reparación que a veces es propenso a errores, para reparar la ruptura del ADN.

- Para representar un posible resultado de la NHEJ cuando se utiliza el sistema CRISPR-Cas9, pega con cinta los trozos cortados del ADN objetivo 1 y el trozo de “nucleótidos aleatorios” entre ellos. Estos nucleótidos representan una mutación que probablemente inactiva el gen objetivo.

Pregunta 1b: Compara las secuencias del modelo que acabas de armar con las de tu respuesta a la pregunta 1a. ¿Cómo cambió la secuencia del gen debido al sistema CRISPR-Cas9? ¿Dónde se realizó este cambio (en el ARN, en una hebra de ADN o en ambas)?

Pregunta 1c. ¿Cómo podría este cambio inactivar o bloquear un gen?

Ahora harás una representación de cómo se puede utilizar el sistema CRISPR-Cas9 para *editar* un gen objetivo. En este caso, la célula utiliza la **reparación por recombinación homóloga (HDR)**, que es menos propensa a errores que la NHEJ, para reparar la ruptura del ADN. La HDR repara el ADN mediante una secuencia de plantillas, generalmente a partir de un cromosoma homólogo. Los científicos pueden proporcionar un “ADN donador” como plantilla para “engañar” a la célula para que utilice la HDR. Este método puede utilizarse para sustituir una mutación por una secuencia funcional o para añadir una nueva secuencia genética (activación de un gen).

- Quita el ARN guía 1 y el ADN objetivo 1 de tu enzima Cas9 y luego repite los pasos 4–6 anteriores con el ARN guía 2 y el ADN objetivo 2. La secuencia del ADN objetivo 2 proviene de una versión mutante real de un gen denominado *MYBPC3*, que tiene una delección de cuatro nucleótidos (GAGT) en comparación con el gen funcional. Esta delección causa un tipo de enfermedad cardíaca.

Pregunta 2a: Anota la secuencia del ARN guía 2 que se une al ADN y la secuencia complementaria del ADN 2 a la que se une. Identifica los extremos 5' y 3' de ambas hebras.

9. Para representar el resultado de la HDR, coloca la pieza de “ADN donador” sobre los fragmentos cortados de ADN objetivo 2 con las secuencias correspondientes superpuestas. Pega con cinta adhesiva el ADN donador sobre los fragmentos de ADN objetivo para que estén todos unidos.

Pregunta 2b: Compara las secuencias del modelo que acabas de armar con las de tu respuesta a la pregunta 2a. ¿Cómo cambió la secuencia del gen mutante MYBPC3 debido al sistema CRISPR-Cas9?

Pregunta 2c. ¿Cómo podría afectar este cambio al gen mutante *MYBPC3*?

PREGUNTAS ADICIONALES

3. Describe brevemente una situación en la que una persona de la comunidad científica querría inactivar un gen.
4. Describe brevemente una situación en la que una persona de la comunidad científica querría editar una secuencia o añadir una nueva a un gen (activación de un gen).
5. El sistema CRISPR-Cas9 se ha descrito como una tijera molecular de ADN con un GPS programable. Utiliza lo que aprendiste con tu modelo para explicar esta analogía.

PARTE 2: EXPLORACIÓN INTERACTIVA DEL SISTEMA CRISPR

Abre el *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) y selecciona “Cómo funciona”. Desplázate por los pasos para ver la animación y haz clic en los botones que aparecen para obtener más información.

1. Con la información del *Haz clic & aprende*, resume cada paso del sistema CRISPR-Cas9 en la siguiente tabla.

Paso	Resumen

Piensa en el modelo bidimensional de papel que construiste en la Parte 1 y en el modelo tridimensional que viste en el *Haz clic & aprende* y luego responde las siguientes preguntas.

- ¿Cuál es una de las limitaciones del modelo de papel en comparación con el modelo interactivo de la actividad del *Haz clic & aprende*?
- ¿Cuál es una de las limitaciones del modelo del *Haz clic & aprende* en comparación con el modelo de papel?
- ¿Cuál es una de las limitaciones de ambos modelos en comparación con el estudio del proceso en una célula real?

PARTE 3: EXTENSIÓN DE LA EXPLORACIÓN INTERACTIVA DEL MODELO (OPCIONAL)

Vuelve al *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) y selecciona “Cómo se usa”. Ve el primer video “Una tecnología innovadora” y después navega por los otros videos en el lado derecho de la pantalla.

1. Con base en el título de los videos, elige a una persona de la comunidad científica sobre la que te gustaría aprender más. Marca la casilla correspondiente a tu elección.

- Jennifer Doudna
- David Liu
- Robert Reed
- Neville Sanjana
- Amy Wagers

2. Reproduce los videos relacionados con la persona que hayas elegido. Resume cada video en un enunciado en la siguiente tabla.

Título del video	Resumen del video

Después de ver los videos, reflexiona sobre todo lo que has aprendido sobre la herramienta biotecnológica CRISPR-Cas9 y responde las siguientes preguntas.

3. ¿Puedes mencionar **tres** elementos que hayas aprendido?

4. ¿Puedes mencionar **dos** cosas que te hayan parecido especialmente interesantes?

5. ¿Puedes mencionar **una** duda que aún tengas sobre el sistema CRISPR-Cas9?