



Uso de CRISPR para identificar la función de algunos genes en mariposas

INTRODUCCIÓN

La comunidad científica ha secuenciado el genoma completo de muchos organismos, incluidos los seres humanos. Al analizar los patrones de las secuencias, se puede calcular el número de genes que tiene un organismo. Los seres humanos, por ejemplo, tienen alrededor de 20,000. Pero las secuencias por sí solas no revelan específicamente la función de cada gen. ¿Cómo saberlo?

En esta actividad, aprenderás sobre una herramienta que se puede utilizar para determinar la función de un gen. Después diseñarás tu propia versión de esta herramienta para analizar los genes que influyen en los colores y patrones de las alas de las mariposas.

PARTE 1: Uso del sistema CRISPR-Cas9 para inactivar genes

Una forma de descubrir la función de un gen es inactivándolo, este proceso es comúnmente conocido como “knockout”, y después observar los efectos en una célula u organismo. La comunidad científica puede inactivar genes de células que crecen en un laboratorio o en organismos modelo, como moscas o ratones.

1. Analiza con tu compañero qué significa inactivar un gen y cómo se puede hacer. Anota tus ideas.
2. ¿Se te ocurren otras formas de averiguar qué hacen los genes? Anota una o dos ideas.

El sistema CRISPR-Cas9, comúnmente conocido como CRISPR, es una herramienta biotecnológica con la que se pueden inactivar genes específicos. Para obtener más información sobre el sistema CRISPR-Cas9, puedes explorar la sección “Cómo funciona” del *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#)

Como se muestra en el *Haz clic & aprende*, la herramienta CRISPR-Cas9 utiliza una enzima que corta el ADN, una nucleasa, llamada **Cas9**. Esta enzima fue descubierta en bacterias, donde se utiliza para combatir a los virus. La comunidad científica combina la enzima Cas9 con una molécula de ARN llamada **ARN guía** para formar un complejo Cas9-ARN. Una parte del ARN guía coincide con la secuencia del ADN objetivo presente en el gen que se desea inactivar.

A continuación, revisarás cada paso del proceso de inactivación de un gen mediante el sistema CRISPR-Cas9 usando como ejemplo la secuencia real de un gen.

Paso 1: Reconocimiento

Primero, el complejo Cas9-ARN reconoce y se une a una secuencia de tres nucleótidos denominada PAM (*proto-spacer adjacent motif*), que significa “motivo adyacente al protoespaciador”. Las secuencias PAM se encuentran en todo el genoma y pueden estar en cualquiera de las hebras de ADN. Cada secuencia PAM tiene la forma 5'-NGG-3', donde N representa a cualquier nucleótido del ADN (A, C, G o T).

3. La siguiente secuencia genética (ADN) parcial contiene múltiples secuencias PAM. Identifica **seis de ellas** en la hebra superior (5' a 3').

5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

Una vez que se une a una secuencia PAM, la Cas9 desenrolla el ADN. Si el ARN guía coincide con la secuencia de ADN que está *junto a* la secuencia PAM, el ARN guía se unirá a la hebra de ADN mediante el apareamiento de bases complementarias. Si esto no ocurre, el ADN volverá a juntarse y la Cas9 seguirá uniéndose a otras secuencias PAM hasta encontrar la secuencia de ADN objetivo correspondiente.

4. A continuación, se muestra parte de una secuencia de un ARN guía. La sección subrayada está diseñada para que coincida con una secuencia específica del ADN objetivo.

5'-GGCGGAGCGGUUCUUGGCAGGUUUUAGAGCUAGAAUAGC-3'

Revisa nuevamente la secuencia genética. Contiene la del ADN objetivo que coincide con el ARN guía anterior. Identifica la **única secuencia PAM** en la hebra superior (5' a 3') que está *junto a* la secuencia del ADN objetivo. (La secuencia aguas arriba, antes de PAM, en dirección 5', debe coincidir con la secuencia subrayada en el ARN guía, lo que hace que la hebra de ADN opuesta presente un apareamiento de bases complementarias con la secuencia subrayada. Recuerda que las U del ARN son equivalentes a las T del ADN).

5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

Paso 2: Unión

Una vez que la enzima Cas9 se une a la secuencia PAM correcta, el ARN guía se une a la del ADN objetivo mediante el apareamiento de bases complementarias.

5. Anota la secuencia del ARN guía que se une al ADN y la secuencia a la que se une (el complemento del ADN objetivo). Identifica los extremos 5' y 3' de las hebras de ARN y de ADN.

Paso 3: Corte

Una vez que el ARN guía se une al complemento de la secuencia del ADN objetivo, acciona la actividad nucleasa (capacidad de corte del ADN) de la enzima Cas9. El corte del ADN también se denomina "escisión". La Cas9 siempre corta *ambas* hebras del ADN. Corta el ADN objetivo y su complemento tres nucleótidos aguas arriba (hacia el extremo 5') en la secuencia PAM.

6. A continuación, vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo y su complemento, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría ambas hebras del ADN.

Paso 4: Reparación del ADN

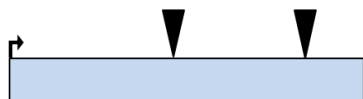
Una vez que la enzima Cas9 corta el ADN, las enzimas celulares intentarán reparar la ruptura. La mayoría de las veces, reparan el ADN sin errores. Sin embargo, la enzima Cas9 seguirá cortando el ADN en el mismo lugar hasta que se cometa un error.

7. Los errores en la reparación del ADN consisten en la eliminación o inserción de nucleótidos de manera aleatoria en el sitio del corte. Explica cómo estos cambios pueden inactivar un gen.

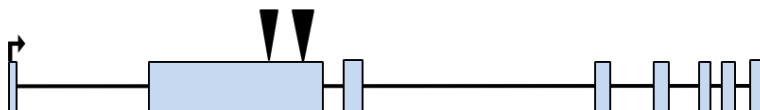
PARTE 2: Inactivación de los genes de las mariposas

Robert Reed, biólogo de la Universidad de Cornell, quería identificar los genes relevantes en la formación de los patrones de las alas de las mariposas. Él y sus colegas utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 para inactivar diferentes genes y luego observaron los efectos en las mariposas. En la Figura 1 se muestran modelos de los tres genes que inactivaron.

Gen *optix*:



Gen *spalt*:



Gen *Distal-less*:

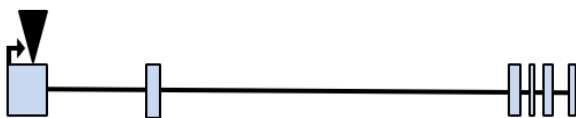


Figura 1. Modelos de tres genes implicados en el desarrollo de los patrones de las alas de las mariposas: *optix*, *spalt* y *Distal-less*. Los rectángulos sombreados representan los **exones** y las líneas horizontales entre los rectángulos corresponden a los **intrones**. Los triángulos negros sobre los rectángulos señalan las **secuencias del ADN objetivo** que coinciden con los ARN guías que el equipo de investigación sintetizó. Las flechas al principio de cada gen representan los sitios de inicio de la transcripción.

1. ¿Qué son los exones y los intrones y en qué se diferencian?

- En la Figura 1 se observa que todas las secuencias del ADN objetivo se encuentran en los exones. ¿Por qué la comunidad científica se concentra en las secuencias ubicadas en los exones en lugar de las que están en los intrones cuando inactiva genes?

PARTE 3: Diseño de un ARN guía

Ahora diseñarás tu propio ARN guía para inactivar el gen de una mariposa de la misma manera que lo hizo Robert Reed. Tu objetivo es inactivar el gen *optix* de una especie de mariposa llamada dama pintada (*Vanessa cardui*).

Tu ARN guía debe coincidir con la secuencia del ADN objetivo del gen que quieras inactivar. A continuación, se muestra una parte de la secuencia de un exón del gen *optix* de la mariposa.

```

5'-CGACACCGTTCCAGCGCTCGAGCCACGCGAAGCTTCAGGCGCTGTGGCTGGAAG
3'-GCTGTGGCCAAGGTCGCGAGCTCGGTGCGCTTCGAAGTCCGCGACACCGACCTTC

CGCACTACCAGGAAGCGGAGCGCCTCCGCGGTCGCCCGCTCGGGCCCGTCGACAA
GCGTGATGGTCCTTCGCCTCGCGGAGGCGCCAGCGGGCGAGCCCGGGCAGCTGTT

GTACCGGGTGC GGAAGAAGTCCCTCTGCCGAGGACTATTTGGGACGGCGAACAG-3'
CATGGCCACGCCTTCTCAAGGGAGACGGCTCCTGATAAACCTGCCGCTTGTC-5'

```

- Subraya una **secuencia del ADN objetivo** de 20 nucleótidos en la hebra superior (5' a 3') del exón anterior. Recuerda que debe estar aguas arriba (en el extremo 5') al lado de una secuencia PAM (5'-NGG-3').
- Identifica y resalta la **secuencia PAM** que está junto a la del ADN objetivo que hayas subrayado. Aquí es donde se unirá la Cas9.
- A continuación, vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo y su complemento, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría ambas hebras del ADN.
- Anota la **secuencia del ARN guía** de 20 nucleótidos que coincida con la del ADN objetivo que hayas elegido. Esta secuencia *no* debe incluir la PAM.
- En el laboratorio de Robert Reed, en la Universidad de Cornell, se diseñaron ARN guías para inactivar el gen *optix* en tres especies de mariposas: dama pintada (*Vanessa cardui*), ojo de venado común (*Junonia coenia*) y voladora del Golfo (*Agraulis vanillae*). En las Figuras 2–4 se comparan las alas de las mariposas tipo silvestre (control) con las de las de aquellas cuyo gen *optix* fue inactivado.



Figura 2. Mariposas *V. cardui* (izquierda: tipo silvestre (control); derecha: gen *optix* inactivado).



Figura 3. Alas de mariposas *A. vanillae* (izquierda: tipo silvestre (control); derecha: gen *optix* inactivado).



Figura 4. Alas de mariposas *J. coenia* (izquierda: tipo silvestre (control); derecha: gen *optix* inactivado).

- Para cada especie mostrada, describe cómo se diferencian las alas de las mariposas de tipo funcional (control) con aquellas en las que se inactivó el gen *optix*.
- Con base en las figuras, determina la función del gen *optix*. ¿Cumple el gen la misma función en las tres especies de mariposas? Si no es el caso, explica cómo es diferente entre las tres especies.
- Utiliza evidencia de las tres figuras para justificar tu predicción. Especifica tu respuesta.

6. Abre el *Haz clic & aprende* [CRISPR-Cas9: Mecanismo y aplicaciones](#) y dirígete a la pestaña “Cómo se usa”. Desplázate por los videos que se encuentran en la parte derecha de la pantalla y mira las tres entrevistas con Robert Reed. Usa la información de estos videos para revisar tus respuestas a la pregunta 5.

EXTENSIÓN: Determinar la función de un gen diferente

Utiliza lo que aprendiste en las secciones anteriores de esta actividad para averiguar cómo inactivar un gen diferente: el gen *spalt* en la mariposa *V. cardui*.

1. A continuación, se muestra parte de la secuencia de un exón del gen *spalt* de la mariposa. Esta vez, solo se muestra una de las hebras del ADN.

5'-

```
CGATATCTGGACCAATTTCAATAGCAACAGGACTACGTACTTTTCCTTCATATCCACTATTTCCAAATTCCCCA
CCAAGCAGTGTCTCATCTGGATGTCTTACACCTTTCCAAAGTAATCCCAACAGCATAATAGACAGTGACATA
ACTCGTGATCCCATATTTTATAATTCACCTTTACCGCGTCCTGGAAGTAATGACAACCTTTGGGAAAGTTTGA
TTGAAATACTAAAACCTTCAGAAACGTCAAATTTGCAACAGTTAGTAGATAATATTGATAACAAAGTTACTG
ATCCTAACGAGTGTATTGTATGTCATCGCGTCTTATCTTGAAAAGTGCTTTACAGATGCACTACCGAACTCA
TACCGGGGAAAGACCTTTTACAGATGTAAATTGTGCGGTCGTGCTTTTACTACAAAGGGCAATTTAAAACTCA
TATGGGTGTCCATCG-3'
```

- Subraya una **secuencia del ADN objetivo** de 20 nucleótidos en el exón anterior. Recuerda que debe estar situada aguas arriba de una secuencia PAM.
 - Identifica y resalta la **secuencia PAM** que está junto a la del ADN objetivo que hayas subrayado.
 - Vuelve a escribir la secuencia del ADN objetivo, indica con un espacio o una línea vertical (|) el sitio donde la enzima Cas9 cortaría el ADN.
2. Anota la **secuencia del ARN guía** de 20 nucleótidos que coincida con la del ADN objetivo que hayas elegido.
3. Las personas del laboratorio de Reed utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 para inactivar el gen *spalt* en dos especies de mariposas: *V. cardui* y *J. coenia*. En las Figuras 5 y 6 se comparan las alas de las mariposas tipo silvestre con las de aquellas cuyo gen *spalt* fue inactivado.



Figura 5. Alas de mariposas *J. coenia* (izquierda: tipo silvestre (control); derecha: gen *spalt* inactivado).

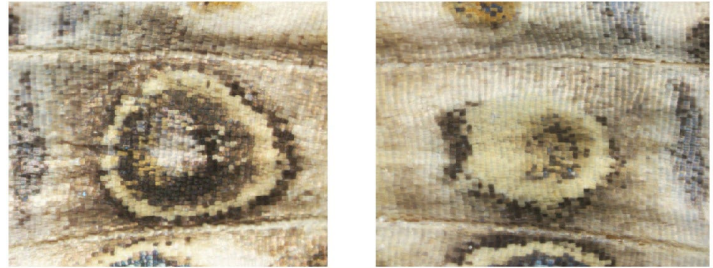


Figura 6. Primer plano de las marcas en las alas de las mariposas *V. cardui*

- a. Para cada especie mostrada, describe cómo se comparan las alas de las mariposas de tipo funcional (control) con las de aquellas en las que se inactivó el gen *spalt*.

- b. Con base en las figuras, determina la función del gen *spalt*. ¿Cumple el gen la misma función entre las tres especies de mariposas? Si no es el caso, explica cómo es diferente en las tres especies.

- c. Utiliza evidencia de ambas figuras para justificar tu predicción. Especifica tu respuesta.