

Dos herramientas de la biología sintética

Carla Giménez, Lucía A. Curti y Federico Pereyra-Bonnet

RESUMEN

La Biología sintética llegó para quedarse y expandir los límites de la ciencia. Numerosas técnicas moleculares que están siendo empleadas hoy en muchos laboratorios superaron la ficción para convertirse en una realidad. En este artículo se presentan dos técnicas innovadoras de la Biología sintética, como son la técnica de CRISPR, en especial la aplicación de CRISPR-*on* en la activación de genes específicos humanos, y el uso de ARN mensajeros sintéticos para la purificación y aislamiento celular. Con una mirada enfocada en la medicina traslacional, las herramientas de la Biología sintética ofrecen un gran potencial terapéutico.

Palabras clave: Biología sintética, CRISPR, ARN mensajeros sintéticos, medicina regenerativa, terapia celular.

TWO SYNTHETIC BIOLOGY'S TOOLS

ABSTRACT

Synthetic biology came to settle in and break the boundaries of the science. Many molecular techniques overcome the fiction to become reality. This article discusses two innovative techniques, as CRISPR, in particular the application of CRISPR-*on* which is able to activate particular human genes, and the synthetic RNAs messengers for isolation and purification specific cells. From a gaze focused on translational medicine, both tools offer great therapeutic potential.

Key words: synthetic biology, CRISPR, RNAs synthetic messengers, regenerative medicine, cell therapy.

Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2016; 36(3): 124-128.

INTRODUCCIÓN

Si bien podríamos dar una definición para explicar a qué llamamos Biología sintética, es más fácil entender de qué se trata mediante algunos ejemplos. Desde los descubrimientos de Watson y Crick, nadie duda de que la información almacenada en el código genético de los organismos está compuesta por 4 letras A, G, C, T (adenina, guanina, citocina y timina), o al menos nadie lo dudaba hasta ahora. Solo dos años atrás, un grupo de científicos en los Estados Unidos sintetizó dos nuevas “letras” del código genético d5SICS y dNaM. Aunque algunos grupos pueden proclamarse pioneros en la invención de nuevas bases, este trabajo fue el primero que demostró la replicación de las nuevas bases *in vivo* conformando un organismo antes inexistente con ADN semisintético (Malyshev y col., 2014).

Otro ejemplo que puede representar el alcance de la Biología sintética es la reciente “aparición” del organismo con

la menor cantidad de ADN posible. El proyecto “Genoma mínimo” fue liderado por Craig Venter, el científico estadounidense que le declaró tablas al consorcio mundial que descifró el código genético humano en el año 2001. Luego, este mismo grupo, en el año 2010, sintetizó un genoma bacteriano completo insertando base a base el código genético dentro de la bacteria. Siguiendo ese proyecto crearon este año a JCVI-Syn 3.0, el microorganismo con el genoma mínimo que tiene tan solo 473 genes contra los 22 000 genes aproximadamente que tienen los seres humanos. Al igual que en el año 2010, y a diferencia de sus antecesores, es el primer organismo con una carga genética sintetizada químicamente (Hutchinsin y col., 2016).

Estos y otros emprendimientos tienen su foco en la invención de microorganismos con aplicaciones industriales y médicas. Por ejemplo, la creación de bacterias sintéticas que degraden el petróleo a otras moléculas biodegradables podría utilizarse para reparar los desastres ecológicos que suceden en altamar con los buques petroleros. Asimismo, alguno de estos nuevos organismos sintéticos podría ser la fuente de hidrógeno para las celdas de combustible en tanques biológicos de energía.

La Biología sintética creando formas originales de vida podría responder a un sinfín de necesidades actuales y aplicaciones emergentes. Además existen proyectos que trabajan sobre la conformación y estructura de algunas de las biomoléculas importantes para la vida. Si bien no existe

Recibido 11/08/16

Aceptado 29/08/16

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Instituto Universitario del Hospital Italiano (C.G., F.P.B.). Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires, UNNOBA (L.A.C).

Correspondencia: federico.pereyra@hospitalitaliano.org.ar

ningún proyecto de Biología sintética avanzado sobre genes artificiales para uso en seres humanos, está claro que tarde o temprano la comunidad toda deberá atender a esta tecnología emergente desde todos sus aspectos, tanto éticos, religiosos como científicos. Mientras tanto, desde una óptica más lúdica podríamos escuchar cómo suenan estas nuevas biomoléculas en el *Gene2Music* (el programa que transforma en música una secuencia de ADN). Si tomamos las dos nuevas bases sintéticas de ADN (d5SICS y dNaM) y las agregamos al *Gene2Music*, podremos interpretar melodías más enriquecidas.

NUESTRO APORTE

Si bien durante este artículo hemos empezado dando ejemplos de Biología sintética desde lo general, esta revolución no puede llevarse a cabo sin las herramientas moleculares necesarias. Como toda nueva terminología que se quiere imponer, esta fagocita tecnologías existentes. Así, por ejemplo, dentro de la definición de Biología sintética hoy se engloban técnicas como ADN sintético, ingeniería genética, biomoléculas sintéticas, biología *in silico*, ingeniería de tejidos, etcétera.

Desde la Unidad de Reprogramación Celular del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Instituto Universitario estamos llevando a cabo dos líneas de investigación que incluyen herramientas de Biología sintética de última generación.

El sistema CRISPR

La primera de ellas se denomina sistema CRISPR (por sus siglas en inglés de Agrupación de Repeticiones Palindrómicas Regularmente Intercaladas). Dentro de su contexto natural, CRISPR fue descrito inicialmente como

un sistema de defensa primitivo hallado en bacterias y Archaea, denominado sistema CRISPR/Cas (Makarova y col., 2011). Gracias a este mecanismo, las bacterias podían reconocer y protegerse mediante la degradación de ADN virales. Hace algunos pocos años, los investigadores rediseñaron el sistema CRISPR/Cas a fin de convertirlo en una herramienta muy específica para la corrección y modificación de genes (Jinek y col., 2012; Mali y col., 2013). Entre los ya grandes logros de CRISPR podemos mencionar la eliminación de copias de ADN retroviral del genoma del cerdo, para darles una nueva oportunidad a los xenotrasplantes (Yang y col., 2015); la eliminación del virus de HIV en células humanas infectadas (Kaminski y col., 2016) y la reciente y polémica publicación de modificación genética de embriones humanos llevada adelante por investigadores chinos (Liang y col., 2015).

Es fácil notar el rápido impacto que ha tenido esta técnica cuando la analizamos desde dos puntos de vista bien distintos. El primero, desde el momento en que Bill Gates y otros inversores crearon un fondo de 120 millones de dólares para fundar “Editas Medicine”, la primera empresa de Biomedicina sobre el sistema CRISPR. Y el segundo puede advertirse por el incremento de publicaciones científicas que incluyen la técnica de CRISPR, que pasó de tener 45 publicaciones en el año 2010 a tener más de 1200 en el año 2015 y sigue sumando (Fig. 1).

El desarrollo de esta novedosa tecnología nos ayuda a enfrentar un nuevo desafío biomédico denominado “Terapia epigenética”. En líneas generales, la terapia epigenética consiste en apagar o prender genes asociados a enfermedades o cambiar el patrón de genes activos para modificar la identidad celular (de Groote y col., 2012). Dentro de las variadas aplicaciones de CRISPR/Cas se ha desarrollado

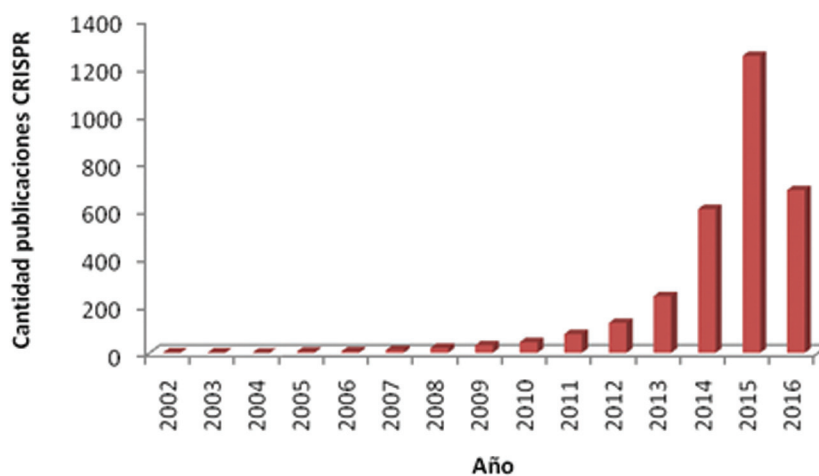


Figura 1. Variación de la cantidad de publicaciones científicas referidas a CRISPR desde el año 2002 hasta la actualidad. Fuente: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI).

CRISPR-*on*, un complejo biotecnológico para modificar la epigenética (señales químicas que controlan los genes) y prender la expresión de un gen de forma puntual. Esto se logra mediante el uso de un pequeño ARN y un complejo proteico activador (dCas9-VP160) (Cheng y col., 2013). Con la ayuda de las grandes bases de datos del genoma humano y programas bioinformáticos de uso libre y gratuito (p. ej., CRISPR-ERA, véase en www.crispr-era.stanford.edu), los investigadores pueden diseñar las moléculas de ARN sintéticas capaces de reconocer el gen de interés. Estas moléculas de ARN y el complejo proteico activador son ingresados en las células donde se unen y viajan al núcleo buscando el ADN celular. Gracias al diseño de las guías de ARN, este complejo es capaz de localizar una secuencia específica (por complementariedad), colocarse sobre el gen de interés y atraer la maquinaria de activación molecular para prenderlo (Fig. 2).

Nuestro grupo hizo uso de esta herramienta dentro del marco de un proyecto donde conviven la ciencia básica y la aplicada para brindar una alternativa terapéutica a la diabetes tipo I. El objetivo general es obtener células productoras de insulina a partir de otros tipos celulares para realizar estudios *in vitro* y un potencial tratamiento de terapia celular. Recientemente utilizamos el sistema CRISPR-*on* para activar el gen de insulina en líneas celulares humanas y estudiamos sus marcas epigenéticas para entender su regulación y desarrollar mejores estrategias de activación (Giménez y col., 2016). Mediante el uso de CRISPR-*on* observamos que ciertas marcas epigenéticas activadoras aumentan (acetilación de H3K9), mientras que otras asociadas a la represión génica no varían (metilación del ADN) en el gen de insulina. Asimismo, el uso de muchos complejos activadores en simultáneo aumenta sinérgicamente la activación del gen en comparación con el uso de moléculas individuales. Actualmente seguimos trabajando en el diseño y aplicación de CRISPR-*on* para otros genes de desarrollo pancreático temprano como *PDX1*, *NGN3*, *NKX6.1* y *PAX4*. La reprogramación celular tiene un enorme potencial en el campo de la medicina regenerativa con un futuro prometedor gracias, en gran

parte, a los avances de la Biología sintética como el sistema CRISPR-*on*.

Diseñando ARN mensajeros sintéticos

Hace menos de una década se creía que existía una gran porción de genoma que no tenía función y se lo denominó ADN no codificante o ADN basura. Este preconcepción atentaba contra el darwinismo y su concepción de la eficacia de la evolución. Hoy se sabe (en parte gracias al proyecto ENCODE: <https://www.genome.gov/10005107/>) que dicho ADN basura es imprescindible y que interviene, entre otras muchas funciones de regulación, en la síntesis de moléculas de ARN no codificantes. Entre estas moléculas de ARN no codificantes se encuentran los micro-ARN. Hoy existe sobrada evidencia de que una subclase de micro-ARN presente en las células sirve para la regulación génica y es la firma indistinguible de diferentes tipos celulares (Lee 1993; Kim, 2005; Ruvkun, 2001) (<http://www.mirbase.org/>).

El reconocer un tipo celular específico (por ejemplo células productoras de insulina) es una necesidad a la hora de purificar poblaciones celulares generadas *in vitro* u obtenidas *in vivo*, para ser usadas en trasplantes celulares en medicina regenerativa (Pereyra-Bonnet y col., 2014; Orqueda y col., 2016). Sin embargo, muchos tipos celulares no tienen marcadores de superficie específicos que faciliten su identificación y, a su vez, los anticuerpos en la superficie de las células trasplantadas pueden ser inmunogénicos y causar inflamación local y hasta rechazos del injerto. Para responder a esta necesidad, un grupo de investigadores japoneses desarrolló recientemente un método alternativo de purificación basado en detectar y distinguir la actividad de los micro-ARN endógenos mediante el uso de ARN mensajeros sintéticos (Kenji Miki, 2015).

¿Cómo funcionan los ARN mensajeros (ARNm) sintéticos? Se construye un ARN mensajero que contiene una secuencia complementaria del micro-ARN *target* característico de la célula que se va a purificar. Este ARNm

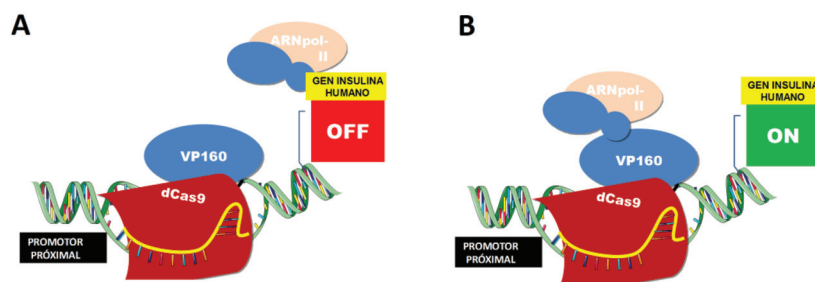


Figura 2. Esquema del sistema CRISPR-*on*. Las hebras amarillas representan la molécula de ARN sintética que localiza el gen de interés en el ADN (hebra verde). El complejo CRISPR-*on* ubica el complejo activador (A) y activa el gen (B).



Figura 3. Esquema del templado de un ARNm sintético. Podemos ver que la construcción contiene un promotor para la transcripción *in vitro*, una región 5'UTR, una región complementaria del micro-ARN *target*, una secuencia que codifica para una proteína (en este caso la proteína apoptótica BIM), una región 3'UTR y una cola de PoliA

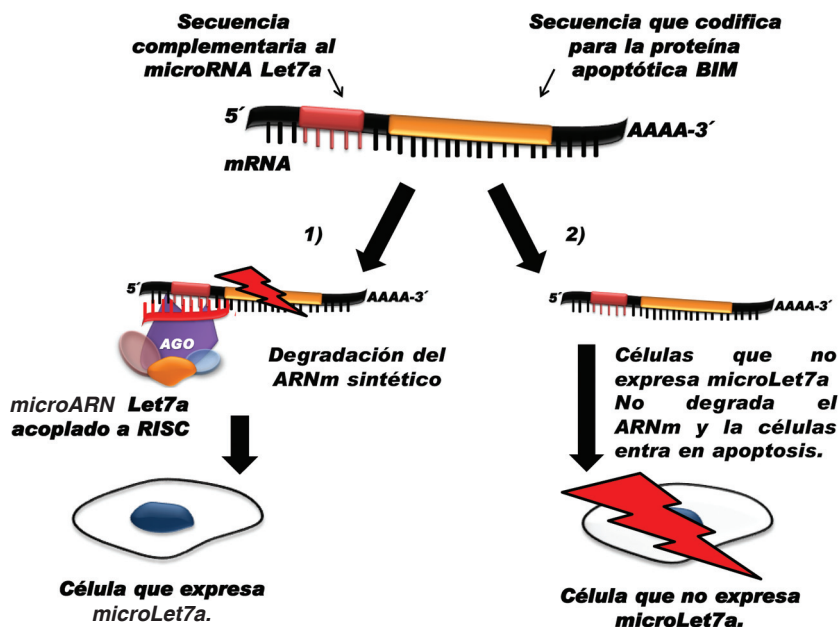


Figura 4. Esquema del mecanismo subyacente en la utilización de los ARNm sintéticos para purificar tipos celulares.

sintético codifica a su vez para una proteína apoptótica (por ejemplo, la proteína BIM). En la figura 3 mostramos un esquema de un ARNm sintético.

Una vez diseñados e introducidos en las células, los ARNm sintéticos podrán tener uno de dos destinos: 1) en el caso donde el tipo celular contenga el micro-ARN complementario (células de fenotipo deseado) se formará un ARN doble cadena que será reconocido por el complejo RISC y degradado impidiendo la expresión de la proteína apoptótica. Por el contrario, 2) en las células donde no se encuentre el micro-ARN *target* (células que queremos descartar) no se formará el ARN doble cadena y, por lo tanto, se expresará la proteína apoptótica llevando a la células a “suicidarse”. De esta manera se pueden purificar células de un determinado fenotipo sin la necesidad de contar con un citómetro de flujo acoplado a un *cell sorter* pero manteniendo su funcionalidad. En la figura 4 ejemplificamos todo el mecanismo.

En los últimos meses, nuestro equipo comenzó a diseñar y trabajar con ARNm sintéticos para los micro-ARN 375 y Let7a, dos marcadores de células productoras de insulina. Los primeros resultados son más que alentadores.

CONCLUSIONES

Entre crear vida artificial, nuevas biomoléculas y herramientas de edición génica, la Biología sintética es un término que vino a compilar varias biotecnologías, pero también a desarrollar nuevas. En definitiva, desde hace algunas décadas, los descubrimientos y posibilidades en esta rama de la ciencia nos viene deslumbrando y lejos de desacelerarse, su velocidad va en aumento.

En nuestro caso, algunas herramientas como los ARNm sintéticos o el sistema de edición CRISPR nos están permitiendo superar límites antes infranqueables dentro de los protocolos de reprogramación celular. No cabe duda de que las técnicas de Biología sintética tienen un potencial terapéutico muy alto. No es un ejercicio difícil proyectar algunas décadas al futuro e imaginar hasta dónde podremos llegar con estos nuevos avances.

Lo que hay que tener presente es que estar por encima de la creatividad natural es un desafío de alta inventiva, no vaya a ser que estemos ensayando moléculas sintéticas que ya fueron creadas, probadas y descartadas por la evolución. Y en vez de ir al futuro, estemos invirtiendo tiempo y recursos yendo al pasado.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Malyshev DA, Dhimi K, Lavergne T, et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*. 2014;509(7500):385-8.
- Hutchison CA 3rd, Chuang RY, Noskov VN, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 2016;351(6280):aad6253.
- Makarova KS, Wolf YI, Snir S, et al. Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems. *J Bacteriol*. 2011;193(21):6039-56.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-6.
- Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015;350(6264):1101-4.
- Kaminski R, Chen Y, Fischer T, et al. Corrigendum: Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep*. 2016;6:28213.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363-72.
- de Groot ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(21):10596-613.
- Zhao Y, Schapotschnikow P, Skajaa T, et al. Probing lipid coating dynamics of quantum dot core micelles via Förster resonance energy transfer. *Small*. 2014;10(6):1163-70.
- Giménez CA, Ielpi M, Mutto A, et al. CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther*. 2016;23(6):543-7.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
- Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*. 2001;294(5543):797-9.
- Kim DS, Gusti V, Pillai SG, et al. An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*. 2005;11(11):1667-77.
- Pereyra-Bonnet F, Gimeno ML, Argumedo NR, et al. Skin fibroblasts from patients with type 1 diabetes (T1D) can be chemically transdifferentiated into insulin-expressing clusters: a transgene-free approach. *PLoS One*. 2014;9(6):e100369.
- Orqueda AJ, Giménez CA, Pereyra-Bonnet F. iPSCs: A Minireview from Bench to Bed, including Organoids and the CRISPR System. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5934782.
- Miki K, Endo K, Takahashi S, et al. Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches. *Cell Stem Cell*. 2015;16(6):699-711.