

Avance y Perspectiva

Revista de divulgación del CINVESTAV

La manipulación del ADN mitocondrial, frontera de la edición genómica con grandes perspectivas

Karina Galache · Saturday, December 31st, 2022

Categorías: [Ciencias Naturales y de la Salud, Zona Abierta](#)

Las mitocondrias, organelos que proveen de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) a la célula, contienen un pequeño cromosoma circular llamado ADN mitocondrial (ADNmt). Este ADN tiene genes que codifican para unas pocas proteínas y algunos ARN necesarios para su síntesis, que resultan esenciales para la función mitocondrial y, por supuesto, para el metabolismo celular. Existen diversas enfermedades, de herencia materna, que tienen su origen en mutaciones del ADNmt, y, además, se piensa que muchas de las variantes de esta molécula pueden tener efectos causales en el desarrollo de enfermedades complejas, como la diabetes, el cáncer o padecimientos neurodegenerativos.

Por ello, desde hace tiempo existe la necesidad de manipular el ADNmt, tanto para poder realizar terapia genética mitocondrial, como para desarrollar investigación funcional de variantes mitocondriales que se observan en la población. La terapia genética consiste en la modificación o sustitución de genes defectuosos con versiones funcionales para curar o prevenir una enfermedad genética. Pero salvo para un reducido número de microorganismos (como la levadura) la modificación del ADNmt estaba fuera del alcance.

Los primeros esfuerzos para la edición del ADNmt en mamíferos se basaron en la introducción del ADNmt en la bacteria *E. coli* para realizar los cambios deseados, y luego recuperarlo para introducirlo en mitocondrias activas mediante electroporación (Yoon y Koob, 2003), una técnica que utiliza descargas eléctricas para abrir poros en las membranas y así introducir ADN externo. El proceso era complejo, y a juzgar por la ausencia de trabajos posteriores, esta elaborada técnica no resultó exitosa, quizá por no ser reproducible o porque su tasa de éxito fuese extremadamente baja.

Los desafíos de llegar a la mitocondria dentro de la célula y luego superar la barrera que representa la doble membrana mitocondrial mantuvieron a raya los esfuerzos de modificación genética del ADNmt por algún tiempo. Otro problema es que mientras el ADN nuclear está presente en dos copias por célula, el ADNmt puede hallarse en cientos o miles de copias, dependiendo del tipo de célula. De hecho, en cada mitocondria hay un número variable de copias y a su vez puede haber muchas mitocondrias por célula.



En este sistema multicopias, las moléculas de ADNmt con mutaciones que desembocan en enfermedades pueden coexistir con moléculas carentes de estas variantes, condición conocida como heteroplasmia, cuando hay dos tipos de ADNmt en el organismo. Normalmente, la enfermedad mitocondrial se produce cuando las moléculas mutantes superan un cierto umbral de porcentaje respecto a las moléculas sin la mutación, por ejemplo, a partir de un 60 %. Mientras no se sobrepase el umbral, las copias sin mutación pueden sostener las funciones mitocondriales en niveles no patogénicos.

Esta heteroplasmia permitió diseñar estrategias para eliminar mutaciones patogénicas sin la necesidad de llevar a cabo la edición genómica. Por ejemplo, se usaron enzimas de restricción, que cortan el ADN cuando reconocen pequeñas secuencias específicas, para eliminar selectivamente copias mutantes y así reducir su porcentaje en la célula (Srivastava y Moraes, 2001). La estrategia consiste en modificar estas enzimas para añadirles lo que se conoce como un péptido señal, una secuencia de aminoácidos que hace que la enzima sea reconocida e importada desde el citosol a la mitocondria por los mecanismos celulares. No obstante, la modificación de este tipo de enzimas para que reconozcan distintas secuencias de interés y así eliminar moléculas con distintos tipos de mutaciones, no es factible, por lo que la aplicación de este procedimiento resultaba muy limitada.

Posteriormente surgieron modificaciones de sistemas utilizados para la edición genética nuclear, pero añadiendo péptidos de importación a mitocondria, como las mitoTALEN y las mtZFN (por sus siglas en inglés) (Gammage *et al.* 2018). En ambos casos, el reconocimiento del sitio de corte lo llevan a cabo un tipo de proteínas conocidas como proteínas de dedos de zinc y pueden modificarse hasta cierto punto para reconocer secuencias distintas, dando mayor flexibilidad a la clase de mutaciones que se pueden eliminar en comparación con las enzimas de restricción clásicas, pero aún con algunas limitaciones.

Más recientemente, Mok y col. (2020) modificaron una toxina de bacterias, a la que llamaron DddA, uniéndola a otras enzimas y a un péptido de importación a mitocondria para obtener un editor de bases derivado de DddA (DdCBE, por sus siglas en inglés) capaz de convertir citocinas en timinas (y guanina en adenina en la cadena complementaria) en sitios específicos del ADNmt. Representa la primera técnica de auténtica edición genética del ADNmt dentro de la mitocondria y, aunque es un avance importante, continúa teniendo limitaciones. El reconocimiento del sitio en el que se hará la conversión se da mediante una proteína TALE, por lo que la variedad de posibles sitios de reconocimiento no es muy amplia.

En 2022 se demostró que la técnica produce modificaciones adicionales no intencionales (Wei *et al.* 2021), lo que significa un grave problema para cualquier método de edición genética. No obstante, se han desarrollado estrategias para mejorar la precisión de la técnica (Lee *et al.* 2022) y ya se cuenta con una versión que permite la conversión de adeninas en guaninas en sitios específicos del ADNmt (Cho *et al.* 2022), ampliando así el repertorio del tipo de nucleótidos del ADNmt que se pueden editar. Cabe mencionar que estas técnicas se han usado con éxito en ratones, para eliminar mutaciones homólogas que en las personas producen enfermedades mitocondriales, por lo que se están estableciendo como un método sólido para la edición genética mitocondrial.

Por otra parte, el surgimiento y popularidad de la edición genética con el sistema CRISPR-Cas9, un sistema que utiliza una enzima que corta el ADN y un ARN guía que indica a la enzima dónde debe cortar, levantó expectativas para una edición mitocondrial más flexible y eficiente. Para que funcione es necesario introducir el ARN guía en la mitocondria y no está muy clara la existencia de

mecanismos de importación de ARN en mitocondria de mamíferos (Gammage *et al.* 2018). A pesar de ello, existen por lo menos dos trabajos publicados que informan el uso de este sistema para la modificación del ADNmt, el más reciente publicado este año (Bi *et al.* 2022). No queda claro cómo se da la importación del ARN guía, pero con secuenciación masiva se demuestra que se lograron introducir los cambios deseados en el ADNmt. Seguramente en los próximos años veremos más trabajos con estos sistemas, llamados mito-Cas9.

Por el momento, se cuenta con sistemas adecuados para la edición mitocondrial y se abren múltiples expectativas. La que genera más interés y que se ha probado ya en organismos modelo (ratón, rata, pez cebra, etcétera), es la eliminación de mutaciones deletéreas del ADNmt, lo que posibilitaría evitar que fuesen heredadas a la descendencia. Esta aplicación competiría con otra técnica que tiene el mismo fin, conocida como la técnica de tres progenitores. Consiste en la fertilización de dos óvulos, uno de la que será la madre y que porta mutaciones mitocondriales, y otro de una donante que no tiene estas mutaciones, con el esperma del padre, produciendo dos cigotos. Después se trasplanta el pronúcleo del primer cigoto al segundo, al que previamente se le ha retirado el pronúcleo, para finalmente implantar el cigoto completo en el útero de la madre. El pronúcleo es el núcleo del esperma y del óvulo durante la fertilización antes de la fusión nuclear.

Esta técnica ya ha sido empleada con éxito en seres humanos y actualmente está aprobada en el Reino Unido como técnica de reproducción asistida cuando se quiere evitar la herencia de enfermedades mitocondriales. Las mitocondrias heredadas con esta técnica serán distintas a las de la madre y puede ser que, en el futuro, las parejas prefieran editar el ADNmt materno para así heredar a sus descendientes tanto la parte correspondiente del genoma nuclear materno como su ADNmt editado, siempre y cuando las técnicas sean fiables y eficientes.

La edición genómica mitocondrial tiene otras aplicaciones. Por ejemplo, se pueden crear modelos animales con mutaciones homólogas de mutaciones mitocondriales humanas, para estudiar los mecanismos patogénicos y métodos de tratamiento, descubrimiento de fármacos, etcétera. Así mismo, puede estudiarse el efecto en la función mitocondrial de variantes poblacionales que no producen enfermedades mitocondriales pero que puedan crear susceptibilidades a otro tipo de enfermedades o distintos fenotipos. En el trasfondo, representa una herramienta para entender mejor el papel del ADNmt y de la mitocondria en la función celular. El futuro es muy prometedor en el área de la genómica mitocondrial, entendida como el estudio de todos los genes que intervienen en la función mitocondrial, tanto los codificados en el núcleo como aquellos del ADNmt, y su interacción.

Referencias

Bi R, Li Y, Xu M, Zheng Q, Zhang DF, Li X, Ma G, Xiang B, Zhu X, Zhao H, Huang X, Zheng P, Yao YG. 2022. Direct evidence of CRISPR-Cas9-mediated mitochondrial genome editing. *Innovation (Camb)*. 3(6):100329. doi: 10.1016/j.xinn.2022.100329.

Cho SI, Lee S, Mok YG, Lim K, Lee J, Lee JM, Chung E, Kim JS. 2022. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*. 185(10):1764-1776.e12. doi: 10.1016/j.cell.2022.03.039.

Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. 2018. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-Ized. *Trends Genet*. 34(2):101-110. doi:

10.1016/j.tig.2017.11.001.

Lee S, Lee H, Baek G, Kim JS. Precision mitochondrial DNA editing with high-fidelity DddA-derived base editors. 2022. Nat Biotechnol. doi: 10.1038/s41587-022-01486-w. Epub ahead of print.

Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. 2020. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. Nature.583(7817):631-637. doi: 10.1038/s41586-020-2477-4.

Srivastava S, Moraes CT. 2001. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. Hum Mol Genet. 10(26):3093-9. doi: 10.1093/hmg/10.26.3093.

Wei Y, Li Z, Xu K, Feng H, Xie L, Li D, Zuo Z, Zhang M, Xu C, Yang H, Zuo E. 2022. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos. Cell Discov. 8(1):27. doi: 10.1038/s41421-022-00391-5.

Yoon YG, Koob MD. 2003. Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in *Escherichia coli* and transfer into transcriptionally active mitochondria. Nucleic Acids Res. 31(5):1407-15. doi: 10.1093/nar/gkg228.

Imágenes de Freepik

This entry was posted on Saturday, December 31st, 2022 at 2:05 pm and is filed under [Ciencias Naturales y de la Salud](#), [Zona Abierta](#)

You can follow any responses to this entry through the [Comments \(RSS\)](#) feed. Both comments and pings are currently closed.