

## **Un ancestro resucitado de Cas12a amplía el acceso al objetivo y el reconocimiento del sustrato para la edición y detección de ácidos nucleicos**

**Ref.: 10.1038/s41587-024-02461-3**

Las propiedades de las enzimas Cas12a limitan el rango de dianas accesibles y sus aplicaciones. Estas enzimas pertenecen a la familia de las nucleasas, las cuales cortan ADN y ARN y se utilizan en tecnologías de edición genética como CRISPR-Cas. Normalmente, las Cas12a tienen limitaciones: solo pueden cortar en ciertas regiones del ADN donde encuentran una secuencia específica llamadas PAM.

Sin embargo, los investigadores de este estudio aplicaron a un conjunto de genes similares (ortólogos) de Cas12a en hidrobacterias una técnica llamada "Reconstrucción de Secuencias Ancestrales" (en inglés, ASR) para reconstruir un ancestro común, ReChb, y mejorar estas limitaciones.

ReChb comparte un 53% de identidad de secuencia con el ortólogo de Cas12a más cercano, pero ya no requiere secuencias PAM ricas en T (timina, una de las cuatro bases del ADN) y puede lograr la edición del genoma en células humanas en sitios inaccesibles para otras nucleasas Cas12a naturales o incluso que otras diseñadas y flexibles a PAM. Además, ReChb puede ser activado no solo por ADN bicatenario sino también por dianas de ARN y ADN monocatenarios, ampliando el tipo de objetivos y moléculas que puede reconocer y cortar. Esto resulta en una "escisión colateral" (un corte no específico) en los tres tipos de sustratos de ácidos nucleicos, con alta eficiencia en todos.

Las estructuras terciarias y cuaternarias de ReChb obtenidas mediante microscopía electrónica criogénica revelaron los detalles moleculares que subyacen a sus actividades biofísicas expandidas.

Hasta donde se sabe, ReChb es la única nucleasa descrita con actividades tan expandidas. Es muy posible que existan nucleasas con estas características en la naturaleza, pero buscar en el espacio de las enzimas naturales podría resultar arduo, costoso y llevar mucho tiempo. De manera similar, los métodos computacionales basados en aprendizaje automático aún están en sus inicios y todavía no son capaces de diseñar enzimas con funciones complejas y controladas, como cambios conformacionales a gran escala. Los métodos de aprendizaje profundo desarrollados recientemente (OpenCRISPR-1), aunque prometedores, aún no han demostrado la capacidad de diseñar proteínas con nuevas funcionalidades. Estas limitaciones resaltan la capacidad de ASR para generar enzimas sintéticas complejas con múltiples y mejoradas propiedades y abren nuevas vías para su combinación con el aprendizaje profundo y los métodos del lenguaje.

En general, ReChb representa un avance en las herramientas de edición genética al ampliar el rango de aplicaciones posibles de las nucleasas Cas12a, gracias al uso de la ASR para mejorar sus propiedades.

ReChb es versátil, ya que puede utilizarse tanto para la edición genómica como para el diagnóstico basado en la detección de ácidos nucleicos. En los últimos años, se han desarrollado ensayos basados en la actividad colateral de Cas12a y Cas13 como herramientas de diagnóstico. Cas12a y Cas13 pueden ser activadas eficientemente solo por ADN y ARN y, por lo tanto, dependiendo de la secuencia a detectar, normalmente debe utilizarse una enzima u otra. ReChb no está limitado de esta manera, ya que puede ser activado por cualquier ácido nucleico y es capaz de identificar cualquier tipo de diana genética. Además, demostramos que la capacidad de reconocimiento flexible de PAM de ReChb permite superar una de las principales limitaciones de los diagnósticos basados en Cas12: el reconocimiento de dianas de dsADN sin la restricción PAM. Hasta donde sabemos, ReChb es la única nucleasa descrita con actividades tan expandidas.

Es muy posible que exista una nucleasa con estas características en la naturaleza, pero buscar en el espacio de las enzimas naturales podría resultar arduo, costoso y llevar mucho tiempo. De manera similar, los métodos computacionales basados en aprendizaje automático aún están en sus inicios y aún no son capaces de diseñar enzimas con funciones complejas y controladas, como cambios conformacionales a gran escala. Los métodos de aprendizaje profundo desarrollados recientemente (OpenCRISPR-1), aunque prometedores, aún no han demostrado la capacidad de diseñar proteínas con nuevas funcionalidades. Estas limitaciones resaltan la capacidad de ASR para generar enzimas sintéticas complejas con múltiples y mejoradas propiedades y abren nuevas vías para su combinación con el aprendizaje profundo y los métodos del lenguaje.