



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

SISTEMA CRISPR/Cas y su aplicación a la edición dirigida de genomas

Alumno/a: Andrea García Melero

Julio, 2023



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

SISTEMA CRISPR/Cas y su aplicación a la edición dirigida de genomas

Alumno/a: Andrea García Melero

Firmado por GARCIA MELERO ANDREA -
77434035G el día 04/07/2023 con un
certificado emitido por AC FNMT
Usuarios

Julio, 2023

ÍNDICE

RESUMEN	<u>1</u>
1. INTRODUCCIÓN	<u>2</u>
2. OBJETIVOS	<u>3</u>
3. ANTECEDENTES.....	<u>3</u>
3.1. Nucleasas de dedos de zinc (ZFN).....	<u>3</u>
3.2. TALEN's.....	<u>4</u>
4. SISTEMAS CRISPR/CAS.....	<u>5</u>
4.1. Origen y descubrimiento.....	<u>5</u>
4.2. Función de los sistemas CRISPR/Cas in vivo.....	<u>8</u>
4.3. Componentes de los sistemas CRISPR/Cas.....	<u>10</u>
4.3.1. Secuencias CRISPR.....	<u>10</u>
4.3.2. Proteínas Cas.....	<u>11</u>
4.4. Clasificación del sistema CRISPR/Cas.....	<u>12</u>
5. APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS EN LA EDICIÓN DE GENOMAS.....	<u>13</u>
5.1. Edición de genomas.....	<u>13</u>
5.1.1. Vías de reparación.....	<u>14</u>
5.1.2. CRISPR/Cas en células madre un vivo.....	<u>15</u>
5.1.3. Regulación génica por CRISPR/Cas.....	<u>15</u>
5.2. Medicina.....	<u>16</u>
5.2.1. Tratamiento de enfermedades genéticas.....	<u>16</u>
5.2.2. Manejo de enfermedades infecciosas.....	<u>17</u>
5.2.3. Cáncer.....	<u>19</u>
5.3. Mejoras vegetales.....	<u>20</u>
5.3.1. Fitomejoramiento en agricultura y biotecnología vegetal.....	<u>20</u>
5.3.2. Industria alimentaria.....	<u>22</u>
5.4. Aplicación para diseñar genomas bacterianos.....	<u>22</u>
5.4.1. <i>Bacillus</i>	<u>22</u>
5.4.2. <i>Clostridium</i>	<u>23</u>
5.4.3. <i>Escherichia coli</i>	<u>23</u>
5.4.4. <i>Corynebacterium</i>	<u>24</u>
5.4.5. <i>Streptomyces</i>	<u>24</u>
6. TÉCNICAS DERIVADAS DE CRISPR	<u>25</u>

7. LIMITACIONES Y PROBLEMAS ÉTICOS DE CRISPR/CAS.....	<u>26</u>
8. CONCLUSIÓN.....	<u>28</u>
9. REFERENCIAS.....	<u>28</u>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas

ZFN: nucleasas con dedos de zinc

TALEN: nucleasas basadas en efectores similares a activadores de la transcripción

TAL: activador de la transcripción

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

IHF: factor de integración del huésped

LAS: secuencia de anclaje líder

crRNA: ARN de los sistemas CRISPR

PAM: motivo adyacente protoespaciador

NHEJ: unión de extremos no homólogos

DSB: sitio en el que se producen las rupturas de las cadenas

HDR: reparación dirigida por homología

AAV: virus adenoasociados

DMD: distrofia muscular de Duchenne

AATD: deficiencia de antitripsina α -1

HSPC: progenitoras hematopoyéticas

SCD: enfermedad de células falciformes

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

HSV: virus del herpes simple

EBV: virus de Epstein-Barr

HCMV: citomegalovirus humano

RT-PCR: “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”

CART: “Chimeric Antigen Receptor T cells”

PD-1: proteína de muerte celular programada 1

pUC: sitio de multiclonado

BGC: grupos de genes biosintéticos

sgRNA: ARN guía

TSS: sitios de inicio de la transcripción

RESUMEN

CRISPR/Cas son una tecnología de edición genética que permite editar y alterar el ADN de forma precisa y eficiente. Se descubrió por primera vez en *E. coli*. Está compuesto por una endonucleasa Cas y un ARN guía.

Su simplicidad y su habilidad para cortar el ADN hace que esta herramienta se use en numerosas aplicaciones, como edición de genomas, medicina, mejora de cultivos e incluso se han usado para diseñar genomas bacterianos.

CRISPR/Cas tiene limitaciones y algunos problemas éticos a los que se tiene que enfrentar. A pesar de esto, las perspectivas de futuro son buenas.

PALABRAS CLAVE: CRISPR/Cas, edición genómica, proteínas Cas, actividad endonucleasa.

ABSTRACT

CRISPR/Cas is a genetic editing technology that allows for precise and efficient editing and alteration of DNA. It was first discovered in *E. coli*. It is composed of a Cas endonuclease and a guide RNA.

Its simplicity and ability to cut DNA make this tool widely used in numerous applications, such as genome editing, medicine, crop improvement, and even designing bacterial genomes.

CRISPR/Cas has limitations and ethical issues that need to be addressed.

Despite this, the future prospects are promising.

KEYWORDS: CRISPR/Cas, genomic edition, Cas proteins, endonuclease activity.

1. INTRODUCCIÓN

Poder modular y editar la información genética es algo crucial para poder estudiar la función de los genes. Desde que se hizo la primera demostración de producción de fragmentos de ADN específicos con enzimas de restricción, se han ido aprovechando moléculas procariotas para la edición de genes (Danna et al., 1971). Además de las enzimas de restricción, también se incluyen otras, por ejemplo, recombinasas y algunas nucleasas programables como meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc, nucleasas efectoras parecidas a activadores de la transcripción y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) con endonucleasas asociadas (sistemas CRISPR/Cas) (Roberts et al., 2005; Olorunniji et al., 2016; Chandrasegaran et al., 2016). Las proteínas de unión que modifican loci específicos de ADN han avanzado mucho en la ciencia, biotecnología y medicina.

En la naturaleza, los sistemas CRISPR/Cas son un mecanismo de inmunidad adaptativa en procariota que previene la infección por fagos y se suele usar para eliminar ácidos nucleicos invasores (Barrangou et al., 2007). Han evolucionado el campo de la biología molecular y la edición genética. La característica central de los sistemas CRISPR/Cas es la presencia de secuencias de ADN repetidas y espaciadas conocidas como repeticiones palindrómicas. Estas repeticiones están separadas por secuencias espaciadoras que corresponden a fragmentos de ADN viral u otros elementos genéticos invasores previamente integrados en el genoma bacteriano. Cuando un virus infecta nuevamente a una bacteria portadora de CRISPR/Cas, el sistema se activa y utiliza las secuencias espaciadoras como guías para reconocer y destruir el ADN del invasor. Este proceso implica la acción de una enzima llamada nucleasa Cas, que actúa como unas "tijeras moleculares" para cortar de manera precisa y específica el ADN viral complementario a las secuencias guía. La manipulación de estos sistemas permite guiar a las endonucleasas reprogramadas hacia genes diana. La capacidad de los sistemas CRISPR/Cas para buscar y cortar secuencias específicas de ADN con alta precisión ha llevado a su adaptación como herramienta poderosa para la edición genética en una amplia variedad de organismos. CRISPR es una técnica de edición del genoma que permite modificar el ADN/ARN interno de una forma específica y se puede reprogramar. Además, se han descubierto una gran variedad de sistemas CRISPR/Cas que se diferencian en sus componentes y sus mecanismos de acción. La variante más

conocida y utilizada es el sistema CRISPR-Cas9, que utiliza una guía de ARN sintética para dirigir la nucleasa Cas9 a secuencias de ADN diana en células de plantas, animales y humanos. También se han conseguido aplicar estos sistemas CRISPR/Cas con gran éxito en el campo de la agricultura, en agentes terapéuticos e infecciosos, en industrias alimentarias y en bioenergía.

A medida que la tecnología CRISPR/Cas avanza, también surgen desafíos éticos y regulatorios. La capacidad de editar el ADN humano plantea cuestiones fundamentales sobre la modificación genética de embriones y la responsabilidad en el uso adecuado de esta tecnología.

2. OBJETIVOS

Conocer el origen y el estado de desarrollo en que se encuentra la tecnología CRISPR/Cas. Cómo pueden desarrollarse aplicaciones tecnológicas que revolucionarán la terapia de enfermedades genéticas o la manipulación genética de organismos.

3. ANTECEDENTES

La edición del genoma es un método innovador y muy usado actualmente para alterar secuencias específicas con varios propósitos. A diferencia de la tecnología transgénica tradicional que inserta material genético aleatoriamente en un genoma, la tecnología de edición del genoma funciona sobre secuencias genómicas específicas dentro del genoma. Para lograr esto, la edición del genoma requiere una nucleasa que pueda reconocer las secuencias específicas; estas nucleasas sirven como tijeras moleculares para cortar las secuencias específicas. Con anterioridad de habían desarrollado algunas estrategias que pueden utilizarse para la edición específica del genoma, por ejemplo, las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) o las nucleasas basadas en efectores similares a activadores de la transcripción (TALEN).

3.1. Nucleasas de dedos de Zinc (ZFN)

Las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) funcionan como dímeros, y cada monómero es una proteína de fusión de un dominio de unión al ADN con dedos de zinc y una nucleasa no específica FokI (Kim et al., 1996). Un dedo de zinc está formado por agrupaciones repetidas de residuos de cisteína e histidina y reconoce 3 nucleótidos. Cada monómero ZFN se compone típicamente de 3 o 4 dedos de zinc, que reconocen de 9 o 12 nucleótidos en el ADN. Se cree que los dedos de zinc son modulares, lo que hace posible reconocer un tramo largo de ADN al juntar varios dedos de zinc (Beerli et al., 2002; Segal et al., 2003). Sin embargo, los ZFN basados

en ensamblaje modular suelen tener poca actividad y alta toxicidad (Ramirez et al., 2008; Cornu et al., 2008), lo que sugiere que existe una dependencia del contexto entre los dedos vecinos (Figura 1).

Lss ZFN se utilizaron por primera vez en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Lloyd et al., 2005). Desde ese momento, las ZFN se volvieron cada vez más populares para las modificaciones del genoma en varias especies usadas en cultivos, como el arroz (Cantos et al., 2014) y el maíz (Gao et al., 2010). Pero los ZFN tienen varias limitaciones como la complejidad del contacto entre los dedos de zinc y el ADN. Esto es un inconveniente inherente y produce desafíos en la autenticación de proteínas para un locus de un ADN particular.

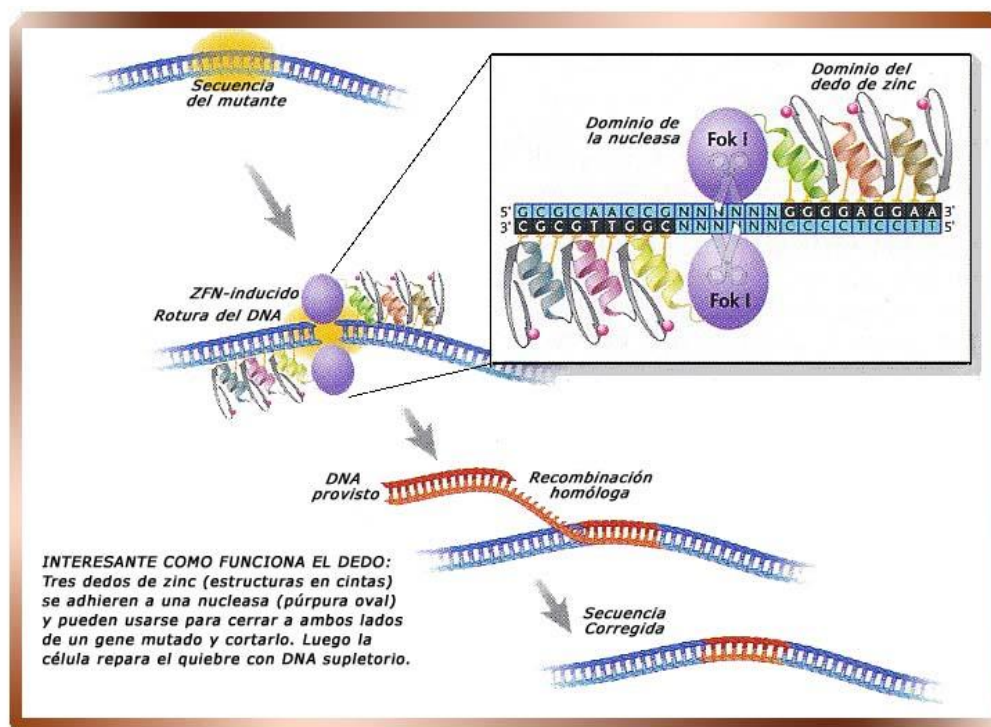


Figura 1. Funcionamiento de las nucleasas con dedos de zinc en edición genómica (Creces et al., 2006).

3.2. TALEN's

El diseño de efectores de tipo activador de la transcripción (TAL) para la edición del ADN se comenzó a hacer en 2009 cuando se descubrió como era su mecanismo de unión al ADN (Moscou et al., 2009; Boch et al., 2009). Los efectores TAL en la naturaleza son introducidos en las células huésped de la planta por la bacteria *Xanthomonas*, donde alteran la expresión génica del huésped para satisfacer las necesidades de la bacteria. Este avance condujo rápidamente a la creación de un

nuevo tipo de SSN (nucleasas específicas de secuencia) llamado nucleasa efectora TAL (TALEN), que se basa en la fusión de un dominio de nucleasa Fok1 a las repeticiones TALE de unión al ADN (Christian et al., 2010; Mahfouz et al., 2011). Como pasa en los ZFN, los TALEN son fusiones de repeticiones de efectores similares a activadores transcripcionales (TALE) contruidos a partir de matrices de 33–35 módulos de aminoácidos y de la encima de restricción FokI del patógeno vegetal *Xanthomonas* (Schiml S. et al., 2015; Ye et al., 2018; Afzal S. et al., 2020). ZFN y TALEN tienen una parte funcional común que es esta endonucleasa Fok1. Sin embargo, el diseño de TALEN es más asequible que ZFN (Nargesi S. et al., 2021). Los TALEN son más simples de construir y de autenticar y, por tanto, van a proporcionar un método que será más rápido y más rentable de edición del genoma. Sin embargo, los desafíos que se asocian con la síntesis, el diseño de proteínas y la corroboración van a seguir siendo obstáculos para un uso más extenso en aplicaciones de edición de genomas (Bétermier et al., 2014) (Figura2). Hay beneficios al elegir TALEN en lugar de ZFN. En primer lugar, los TALE son menos tóxicos y, en segundo lugar, son más fáciles de diseñar. Sin embargo, la secuencia repetitiva de TALE dificulta su construcción mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esto se abordó con el desarrollo de múltiples métodos de ensamblaje basados principalmente en la clonación Golden Gate (Cermak T. et al., 2011; Morbitzer R. et al., 2011), lo que fomentó la rápida adopción de la tecnología TALEN para la edición del genoma en muchos organismos, incluidas las plantas.

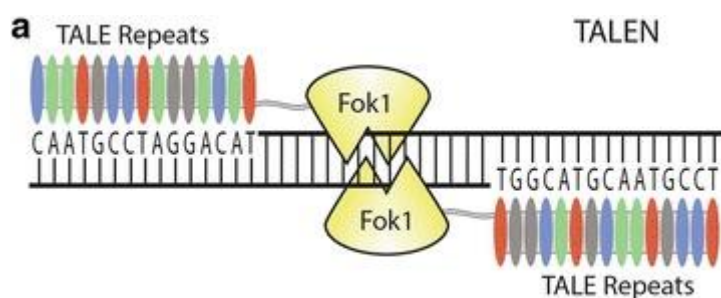


Figura 2. Composición de talen (Tomado de: Bétermier et al., 2014)

4. SISTEMAS CRISPR/CAS

4.1. Origen y descubrimiento

Para poder comprender el origen de CRISPR hay que dejar un poco de lado la tecnología usada en ciencia biomédica e intentar profundizar más en la carrera armamentística que hay entre las bacterias y los virus bacterianos.

Sabemos lo que son las bacterias, que pueden causar infecciones y enfermedades, pero también sabemos que son indispensables en el funcionamiento humano. Pocas personas fuera de la comunidad científica son conscientes de la existencia de los bacteriófagos (comedores de bacterias), siendo la forma de vida más abundante de nuestro planeta (Keen et al., 2015).

En 1987, se detecta en *E. coli* que hay conjuntos de secciones repetidas de ADN con una gran longitud, y estos eran los CRISPR. Pero en los 2000, investigadores vieron que había sistemas CRISPR en muchas otras especies bacterianas además de en *E. coli* (Mojica et al., 2000).

Del año 1993 al 2011, se comenzó a caracterizar la estructura y la función de los sistemas CRISPR/Cas. Algunos investigadores, en 2002, vieron que estos sistemas estaban localizados en el genoma cerca de sistemas de reparación de ADN (Makarova et al., 2002). Estos genes estaban acompañando a los genes CRISPR y, por tanto, se pasaron a denominar genes asociados a CRISPR (genes Cas) (Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005).

A pesar del descubrimiento de que CRISPR esté en un tercio de todas las bacterias y en casi todas las arqueas, la función biológica fue un misterio hasta 2005. En este año aparecieron pistas en las cuales se vinculaba CRISPR con la inmunidad a los virus (Mojica et al., 2005). Se comprobó, con análisis informáticos, que había secuencias de ADN viral que estaban repetidas, como si las bacterias hubieran robado el código genético vírico. Con esto se llegó a la pregunta de si esa información podría reconocer y destruir el ADN viral en el curso de una infección. Para intentar resolver esta pregunta se hicieron experimentos llevados a cabo en una compañía de yogures. Lo que intentaban con estos experimentos era buscar la regeneración de cepas resistentes a los virus de la bacteria *Streptococcus thermophilus* y vieron que estas cepas también tenían CRISPR. Lo que se hizo fue infectar las cepas con una serie de virus distintos y al analizar después el ADN de las bacterias, que se volvían inmunes, se demostró que CRISPR confería inmunidad adaptativa (Barrangou et al., 2007).

Una vez encontrado esto, se deja que genetistas y bioquímicos determinen los sistemas inmunes CRISPR, concretamente, las enzimas que participaban y cómo hacían para reconocer los rasgos únicos de ADN viral durante una infección.

Después de muchas más investigaciones llegaron a la conclusión de que bacterias y arqueas usan ARN para identificar secuencias repetidas de ADN en el genoma viral,

junto con una o más proteínas que están codificadas por genes asociados a CRISPR para fragmentar el ADN.

CRISPR en realidad es como unas tijeras moleculares de precisión, con la capacidad de actuar sobre secuencias específicas de ADN y neutralizarlas. Además, el actor principal en este sistema era una proteína llamada Cas (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012).

En 2006, investigadores analizaron el vínculo entre las funciones de CRISPR y los genes Cas como un sistema y vieron una similitud de este sistema con la de un sistema inmunitario de interferencia de ARN procariótico (Makarova et al., 2006). CRISPR/Cas proporciona resistencia a los virus (Barrangou et al., 2007). En 2011, se propuso un análisis actualizado de las relaciones evolutivas entre CRISPR y las proteínas Cas (Makarova et al., 2011).

De 2011 hasta hoy en día, las investigaciones de CRISPR siguieron creciendo con el paso de los años en muchos de los laboratorios de todo el mundo. En 2011 pudieron por primera vez transferir el sistema CRISPR/Cas9 de una bacteria a otra (Sapranauskas et al., 2011) y en el 2012 se concluyó por varias investigaciones que la escisión llevada a cabo por la proteína Cas orientaba secuencias cortas de ARN que actuarían como guía (Jinek et al., 2012). Las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna vieron el potencial de este sistema para potenciar cambios en humanos cuando estudiaban el mecanismo de CRISPR/Cas9 en bacterias (Jinek et al., 2012). Sin embargo, el primero en conseguir que el sistema CRISPR/Cas9 se adaptase a células eucariotas fue Feng Zhang del Instituto de Tecnología de Massachusetts; esto lo hizo realizando modificaciones en el genoma de células de ratón.

La figura 3 muestra los avances de CRISPR/Cas desde su descubrimiento hasta su aplicación como herramienta de edición génica y manipulación genómica (Figura 3).

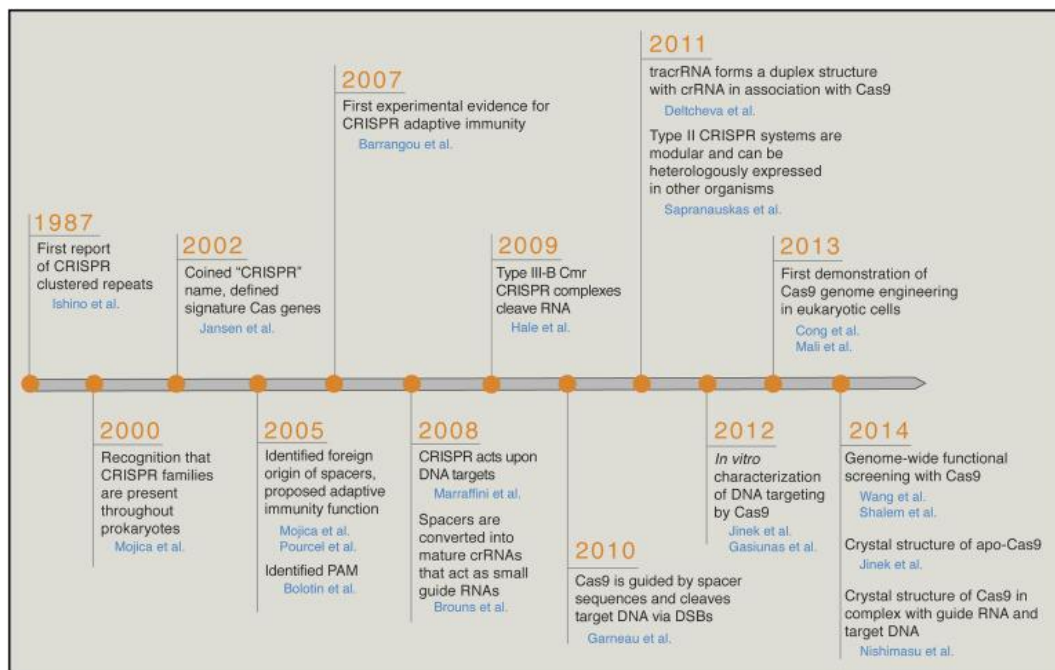


Figura 3. Esquema de la cronología de los avances realizados en referencia al sistema CRISPR-Cas, desde su descubrimiento en 1987 hasta su aplicación como herramienta de edición y manipulación genómica. Tomado de (Hsu et al, 2014)

4.2. Función de los sistemas CRISPR/Cas *in vivo*

La función del sistema permaneció oculta al principio; esto se debe a que la gran presencia de CRISPR/Cas en bacterias y *Archaea* lo que informaba era del vínculo entre el sistema y la resistencia a los bacteriófagos. Esto llevó a que la comunidad científica se centrara más en encontrar la razón por la que se había creado ese vínculo. Después de muchas investigaciones pudieron descubrir que, tras una infección por un virus, se insertaban nuevas secuencias espaciadoras del bacteriófago invasor en el genoma del huésped. Cualquier adición o delección de estas secuencias espaciadoras insertadas alteraba el fenotipo de resistencia a los fagos de la célula (Barrangou et al., 2007). Diversos trabajos influyentes llevaron a deducir el camino de las funciones del sistema. Los pasos funcionales más importantes del sistema CRISPR/Cas son: adaptación, expresión e interferencia.

1) Adaptación (inserción o adquisición): es un proceso de incorporación de secuencias de ADN extrañas en matrices de CRISPR (espaciadores). Esta incorporación de un nuevo espaciador está medida por un complejo protéico heterohexamérico ((Cas1₂ – Cas2)₂) localizado en la secuencia líder de la matriz de CRISPR. Podemos encontrar dos tipos de sistema de adquisición de espaciadores: tipo I y tipo II.

Los de tipo I utilizan el factor de integración del huésped (IHF) unido a la secuencia líder induciendo la flexión del ADN. La flexión que se produce hace que el complejo $(Cas1_2 - Cas2)_2$ realice una escisión inicial para la inserción del espaciador.

En un sistema de tipo II, la secuencia de anclaje líder (LAS) se la reconoce usando la proteína Cas1 del complejo $(Cas1_2 - Cas2)_2$ y, posteriormente, se inserta el espaciador polar (McGinn J et al., 2019) (Figura 4).

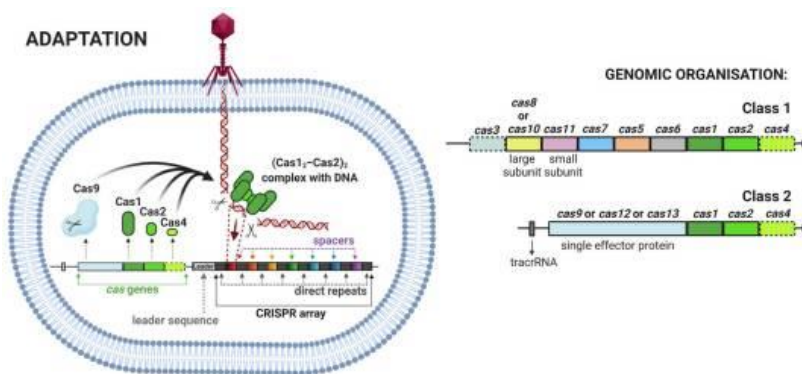


Figura 4. Lado izquierdo: paso de adaptación CRISPR. Lado derecho: Organización genómica generalizada en sistemas de clase 1 y clase 2. Un contorno discontinuo indica que el gen es prescindible o falta en algunos subtipos o variantes. (Figura creada con BioRender.com)

2) Expresión (biogénesis de CRISPR RNA (crRNA: ARN de los sistemas CRISPR) o procesamiento de crRNA): en esta fase lo que ocurre es que se transcribe CRISPR dando un precursor de pre-crRNA dentro de cada secuencia de repetición directa para así poder producir ARN CRISPR (crRNA) más cortos y maduros. Algunos crRNA pueden someterse a recortes en los extremos 5' o 3'. Las enzimas que están involucradas en este procesamiento de crRNA son de diferentes tipos, incluso se pueden dividir en subtipos del sistema CRISPR/Cas (Hochstrasser et al., 2015) (Figura 5).

3) Interferencia: esta fase implica la formación de un complejo efector multiprotéico o una proteína efectora única. El complejo efector multiprotéico es típico de los sistemas de clase 1 y está compuesto de múltiples proteínas Cas y crRNA. La proteína efectora única se usa en sistemas de clase 2 y solo tiene una única proteína Cas con crRNA. Estos dos complejos tienen como objetivo principal reconocer secuencias iguales o muy similares en el genoma del virus o del plásmido invasor. Una vez se han reconocido estas secuencias, el genoma invasor queda cortado por el complejo y por tanto queda inactivado (Makarova et al., 2020). A veces, en esta fase, algunos sistemas pueden requerir el reconocimiento de un motivo adyacente protoespaciador (PAM) en el genoma invasor. El PAM es una

secuencia corta de ADN que no está presente en el genoma del huésped bacteriano. Además, es una secuencia de orientación esencial para que algunas proteínas Cas se puedan unir, seguido de una escisión (Gleditsch et al., 2018) (Figura 5).

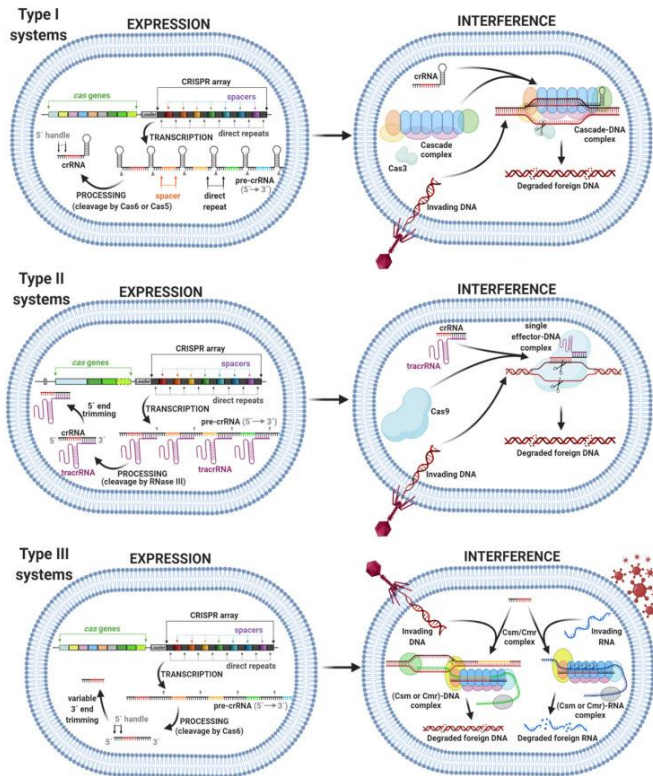


Figura 5. Paso de expresión e interferencia CRISPR en sistemas tipo I (arriba), tipo II (medio) y tipo III (abajo). (La figura fue creada con BioRender.com)

4.3 Componentes de los sistemas CRIPR/Cas

4.3.1 Secuencias CRISPR

Las especies procariotas contienen un locus CRISPR en sus cromosomas (Jansen et al., 2002); sin embargo, hay especies que contienen más loci de CRISPR (Mojica et al., 2000). El locus de CRISPR consta de tres partes principales:

- Matriz CRISPR: son repeticiones cortas y directas que están rodeadas de espaciadores. Estas repeticiones son secuencias de nucleótidos que hay en el genoma y que tienen una longitud y secuencia idénticas. Pueden ser similares en especies que estén relacionadas. El tamaño de la matriz CRISPR es de 32pb, pero puede variar entre 21 y 47 pb. Los espaciadores son secuencias de nucleótidos que tienen una longitud fija, pero en este caso las secuencias suelen ser muy variables. El tamaño suele ser entre 20 y 72 pb (Karginov et al., 2009).

- Secuencia líder: suele estar cerca de la matriz CRISPR y está involucrada en la adaptación y en la transcripción. Estas secuencias tienen una conservación muy limitada. Se vio que los loci CRISPR sin estas secuencias líder están inactivos en la fase de adaptación, pero sigue contribuyendo en la fase de la interferencia que está dirigida por crRNA (Alkhnbashi et al., 2016).

- Genes asociados a CRISPR (proteínas Cas): son un grupo de genes de orientación y orden variables que codifican a las proteínas Cas correspondientes. Hasta ahora se han identificado 93 genes cas diferentes. Además, las proteínas Cas juegan un papel fundamental en la adquisición y en la destrucción de secuencias extrañas (Makarova et al., 2015).

4.3.2 Proteínas Cas

Las proteínas Cas son nucleasas, es decir, cortan el ADN de forma específica guiadas por secuencias de ARN. Son la columna vertebral de los sistemas CRISPR. Tienen una distribución muy variable. Algunas de ellas participan en la mayoría de los sistemas, mientras que otras son proteínas que participan en algunos tipos o subtipos de los sistemas (Makarova et al., 2006; Shmakov et al., 2015). Estas proteínas se clasifican según las funciones que realicen: adaptación, expresión, interferencia y auxiliares (Makarova et al., 2015) (Figura 6).

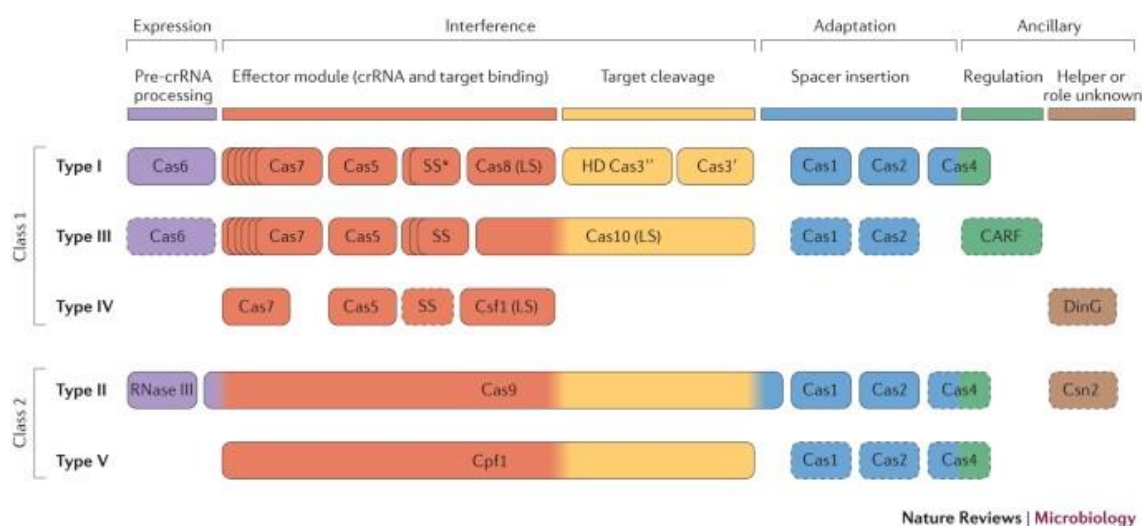


Figura 6. Clasificación funcional de las proteínas Cas. En color morado se encuentran las proteínas Cas que participan en la maduración del cr-RNA. El color rojo y amarillo representan las proteínas Cas que forman parte del complejo efector y del reconocimiento del material genético a escindir. Las proteínas Cas que intervienen en el proceso de adaptación están coloreadas en azul. El verde y el marrón representa otras proteínas que realizan otras funciones o funciones desconocidas. (Tomado de: Makarova et al., 2015).

4.4. Clasificación del sistema CRISPR/Cas

Los sistemas CRISPR/Cas son una familia grande. Según algunos estudios recientes podemos dividir los sistemas en dos clases, seis tipos y 33 subtipos en función de una serie de criterios (Tabla 1), como la similitud de secuencia, características distintas en los componentes o incluso en el análisis filogenético (Makarova et al., 2020). A medida que se vayan descubriendo nuevos CRISPR/Cas la clasificación irá aumentando. Tener una clasificación de los sistemas CRISPR/Cas es esencial para poder comprender el origen y para poder seguir investigando sobre éstos (Makarova et al., 2011). Los tres primeros tipos son los que primero se descubrieron y además son de los que más información se conoce. Estos tipos son I, II y III. Luego están los tipos IV, V y VI que son más recientes y están menos caracterizados.

Los sistemas de clase 1 están compuestos por los sistemas de tipo I (tiene como proteína característica la Cas3), III (tiene como proteína característica la Cas10) y IV. En esta clase se usa un complejo efector que está compuesto por diferentes proteínas Cas y crRNA. A su vez los sistemas de tipo I tienen 7 subtipos con varias variantes. Los sistemas del tipo III tienen 3 subtipos; algunos incluyen transcriptasas inversas. Los sistemas de tipo IV contienen 3 subtipos; éstos suelen carecer de proteínas Cas en el paso de adaptación y en la escisión de los genomas extraños. Además, se ha descubierto recientemente que los sistemas CRISPR/Cas de tipo IV podrían ser derivados divergentes de los sistemas I o III. Los de clase 2 son sistemas de tipo II (la proteína característica es la Cas9), V y VI. A diferencia de los de clase 1, éstos tienen una proteína Cas única, grande y con multidominios unida a crRNA. Los sistemas de tipo II incluyen 3 subtipos. Los sistemas de tipo V tienen 10 subtipos. Por último, los sistemas de tipo VI contienen 4 subtipos (Makarova et al., 2020; Charpentier et al., 2015; Makarova et al., 2015; Özcan et al., 2019).

CLASE	TIPO	SUBTIPO
1	I	IA
		IB
		IC
		ID
		IE

			IF
			IG
	III		III-A
			III-B
			III-C
			III-D
			III-E
			III-F
	IV		IV-A
			IV-B
			IV-C
2	II		II-A
			IIB
			II-C
			VA
			VB
			VC
			VD
			VE
			VF
			VG
			VH
			VI
			VK
	VI		VI-A
			VI-B
			VI-C
			VI-D

Tabla 1. Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas (Elaboración propia).

5. APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS EN LA EDICIÓN DE GENOMAS

5.1. Edición de genomas

La edición del genoma es un grupo de tecnologías que dan la posibilidad de cambiar el ADN de un organismo. Permiten adicionar, delecionar o alterar material genético.

Es de gran interés en la prevención y en el tratamiento de enfermedades. Se usa en células y en modelos animales en laboratorios de investigación para poder comprender las enfermedades. Aún se está estudiando si usar estas tecnologías en personas son un método seguro y efectivo.

Para poder realizar la edición de genomas se crea un ARN con una secuencia “guía” corta que se une a una secuencia objetivo del ADN. El ARN guía, después de unirse al ADN, se une a la proteína Cas. Cuando se introduce en las células, este ARN guía va a poder reconocer la secuencia de ADN que se esté buscando y ahí es cuando la enzima Cas va a cortar el ADN en la ubicación objetivo. Una vez hecho esto, se usan unas vías de reparación del ADN para adicionar o eliminar secuencias del ADN.

5.1.1. Vías de reparación

Una vez que se han formado las rupturas en las cadenas por CRISPR/Cas en el ADN, las células se someten a mecanismos de reparación. El mecanismo más utilizado es NHEJ (unión de extremos no homólogos), en el cual una ligasa une los extremos de ADN rotos para volver a conectar la secuencia. Es normal que durante el proceso se eliminen o inserten uno o más nucleótidos en el sitio DSB (sitio en el que se producen las rupturas de las cadenas), es por eso que la unión de estos extremos da como resultado un cambio en el marco de lectura de las secuencias de aminoácidos o produciendo alguna mutación sin sentido. Por tanto, CRISPR/Cas es un método más eficiente para producir mutaciones genéticas y se usa para estudiar funciones de genes individuales.

Otro de los métodos de reparación es HDR (reparación dirigida por homología). Es una vía de reparación que no comete errores, en la cual se inserta una plantilla de ADN homólogo, obtenida de una copia del gen, para poder reparar el DSB y volver a formar la secuencia de ADN original (Heyer et al., 2010). Todo esto facilita los estudios de sobreexpresión, ya que permite que se inserten genes dirigidos en unas ubicaciones precisas del ADN.

Otra ruta que se está estudiando para aumentar la eficiencia y la especificidad es la modificación de las endonucleasas Cas. La mayoría de los estudios se han centrado en modificar los dominios de corte en Cas9 y han demostrado que la función de pérdida de un solo dominio (nCAs: Nick Cas), o de ambos dominios (dCas: dead Cas) no afectan en la función de unión. Tampoco la pérdida de función de un dominio afecta a la función del otro. Estas proteínas modificadas pueden llegar a

fusionarse con otras proteínas funcionales, lo que ha llevado hacia la creación de nuevos editores de genoma CRISPR/Cas con muchos nuevos propósitos.

5.1.2. CRIPR/Cas en células madre *in vivo*

Para realizar edición directa del genoma *in vivo*, por ejemplo, en humanos, es fundamental que haya precisión, eficiencia y seguridad de la propia herramienta CRISPR (Doudna et al., 2020). Hay diversos métodos, el más destacado es el uso de vectores AAV (virus adenoasociados), que proporcionan expresión del genoma a largo plazo sin necesidad de integración genómica, son seguros y no son patógenos. En humanos, estas herramientas han presentado algunos problemas, esto es debido a que han necesitado sistemas CRISPR/Cas más grandes y con funciones más específicas. El problema está en que existe un límite de 4-5kb en la cadena de ADN que se va a editar, y el promotor y la secuencia codificante de Cas9 ya están cerca de 4kb (Heidenreich et al., 2015). Sin embargo, la edición genómica en ratones a través del uso de estos vectores de AAV no ha dado tantos problemas (Levy et al., 2020). Dados estos inconvenientes, se está considerando establecer otros sistemas de administración no virales, obteniendo estudios *in vivo* prometedores (Cheng et al., 2020).

5.1.3. Regulación génica por CRISPR/Cas

La regulación de genes concretos es posible gracias a la ingeniería de Cas9. (Thakore et al., 2016). Ciertas mutaciones producidas en unos dominios de nucleasa van a destruir la actividad catalítica de Cas9 mientras que su capacidad de unión al ADN guiada por ARN se mantiene (Jinek et al. 2012; Qi et al. 2013). Al fusionar dCas9 (Cas9 mutada) con diversos efectores, la caja de herramientas CRISPR/Cas se amplió; estos efectores pueden ser efectores o represores de la transcripción, modificadores epigenéticos y fluoróforos.

Para que se produzca la represión de la transcripción, dCas sola o dCas9 fusionado con efectores puede dirigirse hacia los promotores y, además, se pueden dirigir a la región no traducida en 5' (5' UTR) (Gilbert et al. 2013; Gao et al. 2014; Thakore et al. 2015). La función de dCas con dominios de activación de la transcripción favorece la activación de la transcripción. Se pueden usar las combinaciones de sistemas dCas9 inducibles para la manipulación dinámica de diversos objetivos a la vez (Gao et al. 2016). Las herramientas CRISPR/Cas pueden monitorear o manipular las interacciones de la cromatina que va a regular la expresión génica (Myers et al. 2018).

5.2. Medicina

5.2.1. Tratamiento de enfermedades genéticas

El sistema CRISPR/Cas se ha utilizado en la corrección de enfermedades genéticas humanas (distrofia muscular de Duchenne (DMD)) (Min et al., 2019), la deficiencia de antitripsina α -1 (AATD) (Bjursell et al., 2018), la hemofilia (Ohmori et al., 2015), etc. Estas correcciones genéticas se hacen en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) utilizando CRISPR/Cas (Dever et al., 2016).

Por ejemplo, en trastornos de la sangre, como la β -talasemia y la enfermedad de células falciformes (SCD), son causados por la producción anormal o reducida de cadenas β , lo que disminuye la capacidad de transporte de oxígeno de la hemoglobina. Usando la tecnología de CRISPR/Cas9, eliminan una región de 200pb en el genoma de células linfoides haciendo posible que, gracias a esa eliminación, se induzca a la expresión de hemoglobina (Khosravi et al., 2019).

5.2.2. Manejo de enfermedades infecciosas

Se sabe que algunos virus causan infecciones latentes como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del herpes simple (HSV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus humano (HCMV), etc (Traylen et al., 2011). Además, para muchas enfermedades virales infecciosas no se han creado vacunas efectivas que eliminen por completo el virus del huésped. Pero el sistema CRISPR-Cas representa una herramienta prometedora para combatir infecciones virales. También se predice que CRISPR puede editar el genoma humano para evitar que las personas se infecten.

Por ejemplo, en el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el ARN del virus depende de un huésped para su replicación (similar a la de cualquier otro virus de ARN) y se va a integrar en el genoma actuando como un reservorio latente, creando un problema con su erradicación (Craigie et al., 2012; Finzi et al., 1999). Por tanto, para combatir las infecciones latentes debidas al VIH, la tecnología de CRISPR/Cas ha tenido un papel en la destrucción de los provirus del VIH. La tecnología de CRISPR/Cas9 ha permitido la modificación de linfocitos B para tener la capacidad de expresar anticuerpos contra el VIH (Voss et al., 2019; Moffett et al., 2019).

Otra de las enfermedades es el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Los investigadores están usando diferentes tecnologías de CRISPR/Cas para poder detectar de forma rápida y eficaz los virus. El reciente brote de un nuevo SARS-CoV-2 se detecta mediante un ensayo de CRISPR/Cas12 dual

todo en uno en el que se utilizó un par de crRNA introducidos para poder detectar los ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 (ADN y ARN). Además, la rápida detección del nuevo patógeno ha planteado desafíos tecnológicos para el campo científico.

Algunos investigadores lograron desarrollar una herramienta de diagnóstico basada en CRISPR, altamente sensible para la detección genética de cepas como SARS-CoV. Aunque la investigación está en evaluación, promete tiempos de ejecución más cortos y una detección de mayor sensibilidad que la RT-PCR ("Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction") (Hou et al., 2020). Este mecanismo se basa en analizar las muestras buscando secuencias de ARN características del SARS-CoV-2 (previamente secuenciado). Para poder detectar el virus se usaron unos métodos, los cuales usan el sistema CRISPR/Cas. Algunos de estos métodos son el método SHERLOCK (desbloqueo específico del reportero enzimático de alta sensibilidad), el STOP-Covid o el sistema de diagnóstico DETECTR.

El método SHERLOCK-Covid está basado en CRISPR/Cas13. Combina la amplificación de ácidos nucleicos a través de CRISPR/Cas para reconocer secuencias específicas de ADN o ARN. La amplificación viene de muestras de pacientes infectados por el virus (Wang et al., 2020; Esbin et al., 2020; Kellner et al., 2019).

Este método es rápido, ultrasensible, preciso y de bajo coste, que usa como elemento efector la enzima Cas13a (al activarse con la unión del ARN guía al fragmento complementario de ARN degrada los fragmentos de ARN presentes). El funcionamiento básico es simple, cuando hay presencia del ARN a detectar, el ARN guía se une a su secuencia diana y activa la enzima Cas13a, que empieza a degradar el ARN. Para ver si el ARN es el del virus se incluye en la reacción pequeños fragmentos de ARN marcados que al degradarse emiten fluorescencia o calor (Sherlock Biosciences et al., 2021) (Figura7).

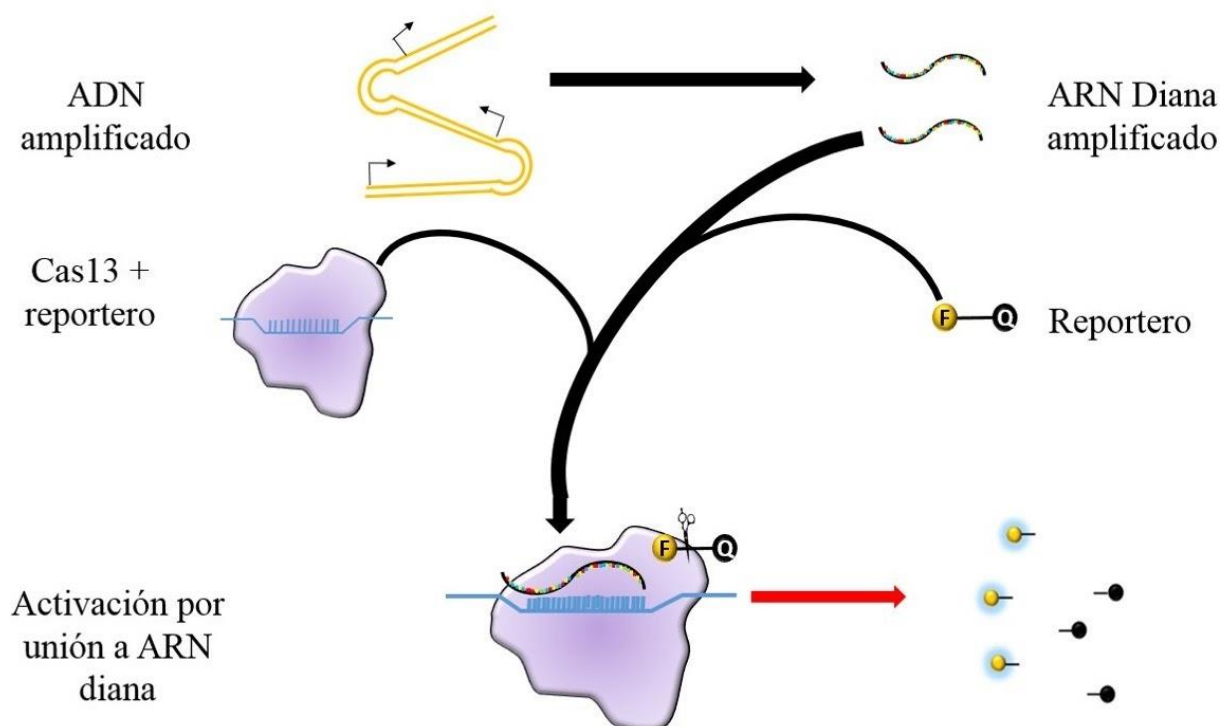


Figura 7. Metodología SHERLOCK/CRISPR-CoV para la detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 (Tomado de: Sherlock Biosciences et al., 2021).

El STOP-Covid es un ensayo que combina la extracción de ARN viral con la amplificación isotérmica mediada por bucle y la detección llevada a cabo por CRISPR/Cas12b. A diferencia del anterior método, éste proporciona sensibilidad sin tener que tener un proceso de amplificación del ácido nucleico (Patchsung et al., 2020).

Otra de las tecnologías usadas es el sistema de diagnóstico DETECTR. Es un poco más complejo ya que hay que transformar las moléculas de ARN a ADN. Una vez realizado este paso, el genoma del virus puede ser detectado por su ARN guía, y tras la activación de la nucleasa Cas12a, se produce una respuesta inespecífica que va a originar luz u otra reacción química (Rahimi et al., 2021).

A parte de la detección del virus, CRISPR/Cas se ha usado como terapia para inhibir el virus. El uso de CRISPR/Cas13 ("PAC-MAN": The Prophylactil Antiviral CRISPR in human cells) tiene como objetivo destruir el ciclo de vida del coronavirus. El proceso consiste en degradar el ARN genómico del virus, limitando por tanto la expresión de proteínas vitales y la expresión del virus en las células humanas. También, la tecnología CRISPR/Cas se ha dirigido a estudiar la identificación de anticuerpos y antivirales contra SARS-CoV-2 y generar protección en la sociedad con el fin de poder controlar la enfermedad en un futuro.

5.2.3. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por tener muchos oncogenes y por las modificaciones epigenéticas que se producen. Con la tecnología que tienen los sistemas CRISPR/Cas para la edición de genes, se ha visto lo fácil que es la transferencia de estos sistemas a las células, y la amplia aplicación que tiene en la biología y en los oncogenes del cáncer (Tian et al., 2019). Las células usadas en inmunoterapia contra el cáncer son las CART (“Chimeric Antigen Receptor T cells”). Una vez conocidas las funciones y los límites de estas células se vio la necesidad de una herramienta que permita poder perfeccionar la inmunoterapia y poder hacerlo a un bajo coste para que sea accesible a toda la población. Para poder llevar a cabo esto es donde entra en juego los sistemas de edición genética, concretamente CRISPR/Cas. El sistema CRISPR/Cas es una herramienta adecuada para poder explorar distintos mecanismos oncológicos, como la aparición, el desarrollo y el tratamiento de tumores por reparación de mutaciones y genes “knockout”.

Para la inmunoterapia se usan células T autólogas (que se obtienen del mismo individuo que lo recibe), porque es un proceso costoso a nivel de tiempo y a nivel económico (Salas-Mckee et al., 2019). Por esta razón, uno de los retos de la inmunoterapia es poder fabricar células T universales. Para lograr esto, se necesitarían células alogénicas (proceden de otro individuo de la misma especie del que lo recibe) de donantes sanos para después modificarlas en función de las necesidades que se requieran. Pero estas células alogénicas han supuesto un problema en la reacción entre el injerto contra el huésped, por lo que algunos estudios han aplicado el sistema CRISPR/Cas para realizar el “knockout” génico. Gracias a esto se ha logrado tener una primera aproximación para la elaboración de células T universales (Gornalusse et al., 2017).

En el primer ensayo clínico que usa CRISPR para la terapia del cáncer se evalúa la seguridad de las células T modificadas *ex vivo* con PD-1 (proteína de muerte celular programada 1) en el tratamiento del cáncer de pulmón de células cancerosas que se han expandido después de realizar los tratamientos estándares. El regulador del punto de control de PD-1 es un receptor de las células T que se encarga de inhibir la activación de estas células T, lo que lleva a la regulación de la tolerancia inmunitaria y a la disminución de reacciones autoinmunes, todo esto con el fin de permitir el escape inmunitario de los cánceres. Los anticuerpos neutralizan PD-1, y éstos se utilizan para el tratamiento del cáncer de pulmón, entre otros. Lo que se observa con

esto es que se están proporcionando linfocitos de sangre periférica y que se estén eliminando PD-1 de las células T, por CRISPR/Cas9 (esto se realiza *ex vivo*). Una vez realizado esto, se seleccionan los linfocitos editados, se replican y se vuelven a introducir al paciente del que se ha obtenido (Tianzuo et al., 2018) (Figura 8).

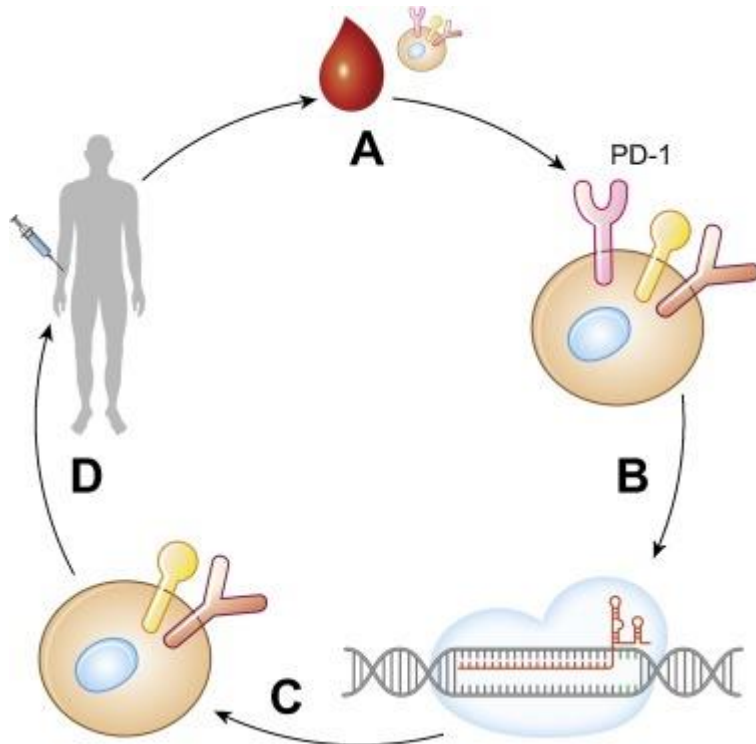


Figura 8. CRISPR/Cas9 como herramienta terapéutica. Se muestra uno de los primeros ensayos clínicos que utilizan un knockout ex vivo CRISPR/cas9: Se extraen linfocitos de sangre periférica del paciente con un tumor (A) y se realiza un knockout mediado por CRISPR/Cas9 del gen del punto de control inmunitario PD1 en Células T (B–C). Las células T knockout para PD1 se expanden ex vivo y luego se vuelven a transfundir al paciente (D), donde se supone que inducen una respuesta inmunológica contra las células tumorales (Tomado de: Tianzuo et al., 2018)

5.3 Mejora vegetal

5.3.1. Fitomejoramiento en agricultura y biotecnología vegetal

El sistema CRISPR/Cas9 se utiliza para generar mutantes knockout mediante la edición de un solo gen. El desarrollo y la ventaja de los editores de bases ha ampliado el alcance de la edición del genoma mediante la introducción de sustituciones de bases sin necesidad de ADN donante (Nadakuduti et al., 2018; Choi et al., 2021).

Las mejoras de los sistemas CRISPR/Cas han permitido mejorar la productividad de las plantas o poder desarrollar otras características. Un objetivo que se tiene con esto es poder inducir reordenamientos cromosómicos específicos como inversiones

o translocaciones con la finalidad de generar líneas diploides autocompatibles y generar knockouts usando CRISPR/Cas9 (Enciso-Rodriguez et al., 2019). La opción de usar la herramienta CRISPR/Cas y la estrategia de edición general depende de algunos factores, como el tipo de célula, el entorno celular, la forma del agente, el método de administración, cada uno impone diferentes restricciones y diferentes propensiones a eventos de modificación del genoma no deseados (Anzalone et al., 2020). El uso de CRISPR/Cas9 *in vivo* e *in vitro* se ha descrito para la mejora de cultivos a través de la mejora nutricional y la producción de plantas tolerantes al estrés biótico y abiótico.

La edición del genoma dirigida lo que ha conseguido es aumentar la productividad (aumento del tamaño del grano, el peso, el número, el contenido de proteínas, etc, de los cultivos de arroz, trigo, arroz y maíz) (Miao et al., 2013; Shan et al., 2024; Zhang et al., 2018; Ma et al., 2015). Los cultivos modificados que usan el sistema CRISPR/Cas tienen como objetivo reducir los niveles de glicoalcaloides esteroideos tóxicos, mejorando así el color de las frutas y verduras para así hacerlas más atractivas. Las modificaciones llevaron a un aumento en los niveles de amilosa, almidón, grasas buenas (ácido oleico), mejoras en las fragancias, una disminución en proteínas de gluten y ácidos grasos insaturados, etc (Jiang et al., 2017; Sánchez León et al., 2018; Aznar-Moreno et al., 2017; Sun et al., 2017).

El estrés en las plantas produce una reducción significativa en la producción de los cultivos agrícolas. Esto ha llevado a inducir mutaciones a algunos cultivos para poder protegerlos del estrés tanto biótico como abiótico (Shan et al., 2013; Klap et al., 2017; Lu et al 2018).

Por ejemplo, la zanahoria es un cultivo con gran importancia económica. Las zanahorias se pueden agrupar en dos grupos según su pigmentación: grupos carotenos u occidental y grupos antocianinas u oriental. Los cultivos de zanahoria morada son ricos en antocianinas mientras que los cultivos de zanahoria naranja, amarilla y roja acumulan carotenoides (Xu et al., 2017). Estos carotenoides y antocianinas proporcionan varios beneficios para la salud de las personas. Algunas investigaciones informaron sobre la pérdida de la función del gen F3H (mediada por CRISPR/Cas9) que es fundamental para la biosíntesis de las antocianinas. Se estudiaron algunas variantes de optimización de codones de los genes SpCas9 y demostraron que AteCas9 (plásmido AteCas9) tiene alta eficiencia para producir mutaciones en las células de la zanahoria. Una vez inactivado el gen F3H se

observa que se produce decoloración, pero no se generan plantas transgénicas (Lino et al., 2018)

5.3.2. Industria alimentaria

La ingeniería del genoma de microorganismos usando la tecnología de CRISPR/Cas se lleva a cabo por varias investigaciones cuyo fin es mejorar el metabolismo celular y la producción de metabolitos celulares importantes (Jakočiūnas et al., 2016). Un ejemplo de vía metabólica es la del mevalonato que es la encargada de la producción del colesterol y de los monoterpenos, que son importantes industrias farmacéuticas y cosméticas tanto tradicionales como modernas. La edición del genoma (edición de genes nativos o introducción de vías multienzimáticas heterólogas para poder vincular transformaciones posteriores a marcadores individuales seleccionables) en la levadura lo que hace es aumentar el mevalonato en más de 41 veces si lo comparamos con cepas que no estén editadas (Jakočiūnas et al., 2015). También se usó el sistema CRISPR/Cas para integrar la vía sintética del β -caroteno en el genoma *Escherichia coli*, y para la modificación de las vías metabólicas centrales y del fosfato metileritritol para la sobreproducción del β -caroteno (Li et al., 2015).

CRISPR no solo edita el genoma de los organismos para la producción de metabolitos, también elimina los contaminantes que se forman durante el proceso de formación de éstos (Liu et al., 2020). La tecnología de CRISPR ha mostrado altas respuestas en la mejora de cultivos, pero aún este ámbito está por explorar.

5.4. Diseño de genomas bacterianos

El sistema CRISPR/Cas9 se ha usado en diversas células bacterianas, mediante la utilización de sus herramientas de manipulación genética para la expresión de Cas9 y gRNA, como por ejemplo en *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia coli* o *Streptomyces*.

5.4.1. *Bacillus*

Como ya se sabe los bacilos tienen una gran capacidad para sintetizar diversas proteínas y productos bioquímicos. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis*, aplicaron el sistema CRISPR/Cas9 de tipo II para editar su genoma usando un sistema con un único plásmido el cual tenía el origen de replicación pUC (sitio de multiclonado: lugar donde hay muchas dianas para enzimas de restricción que solo cortan una vez) y el origen de replicación sensible a la temperatura pE194. (Altenbuchner et al., 2016). Este sistema produjo deleciones generando mutaciones genéticas en *B. subtilis*.

Para poder tener una selección eficiente de células con genoma editado, CRISPR/Cas se expresó en un plásmido que tenía un origen de replicación sensible a la temperatura, lo cual es muy útil porque en este caso *B. subtilis* también tiene un origen de replicación que es sensible a la temperatura. Este sistema va a permitir la eliminación de genes que están regulados por la temperatura (Mougiakos et al., 2017). Además, el sistema mostró que la eliminación de genes multiplexados (genes que pueden activar las funciones de varios genes a la vez) tuvo una eficiencia del 11,6% y la eliminación de fragmentos de ADN grandes tuvo una eficiencia del 79%. La inserción de genes también tuvo una gran eficiencia (76,5%) (Li et al., 2018).

5.4.2. *Clostridium*

Las cepas de *Clostridium* son bacilos anaerobios, gram positivos y formadores de esporas. Provocan diversas respuestas patógenas como diarrea, también producen diversas toxinas como la toxina A (TcdA), la toxina B (TcdB) y la toxina botulínica (Di Bella et al., 2016; Bartlett et al., 2008; Rossi et al., 2014). En relación con las toxinas que producen, se dice que la toxina de *C. butulinum* es el veneno fetal biológico más potente que paraliza los músculos; aun así, es la toxina que más se usa en la actualidad en cirugía estética y en algunos ámbitos terapéuticos como trastornos musculares y dolor de cabeza (Pirazzini et al., 2017).

En los últimos años hay muchas demandas en las aplicaciones de *clostridium*, por lo que han tenido que desarrollar tecnologías para la manipulación del genoma para la aplicación industrial de las diferentes especies de *Clostridium*. El sistema CRISPR/Cas9 se aplicó por primera vez en *clostridios* solventogénicos, teniendo así una gran importancia en la industria para la producción de biocombustibles y bioquímicos como sería la acetona, el butanol y el etanol (Pidot et al., 2014; Wang et al., 2011). Tiene una baja eficiencia de recombinación homóloga, pero al usar el sistema CRISPR/Cas9 permitió la eliminación de genes, incluso de fragmentos grandes de genes de su cromosoma; también permitió la integración y la modificación de un solo nucleótido con alta eficiencia (Wang et al., 2016; Wang et al., 2015).

5.4.3. *Escherichia coli*

E. coli es una de las cepas con mayor importancia en la industria para la producción de diversos productos bioquímicos y biocombustibles (ácidos grasos, aminoácidos, poliésteres, etc) (Yim et al., 2011; Yang et al., 2018; Rude et al., 2009; Xu et al., 2013; Zang et al., 2008; Xu et al., 2011). Los modelos usados con *E. coli* son los

más representativos para el desarrollo de nuevas herramientas de CRISPR/Cas y tener mayor eficiencia (casi del 100%) en edición genómica (eliminación e inserción de genes) (Jiang et al., 2013).

Por ejemplo, el β -caroteno es un pigmento de color rojo anaranjado que pertenece a la familia de los isoprenoides y que se usa en la industria farmacéutica. Para poder mejorar la producción de este pigmento se hicieron delecciones y sobreexpresiones de genes con la ayuda de CRISPR/Cas9. Como consecuencia, a partir de glucosa como fuente de carbono se produjo β -caroteno (Li et al., 2015; Ajikumar et al., 2010).

5.4.4. *Corynebacterium*

Las *corinebacterias* son bacterias Gram-positivas con un alto contenido en G:C genómico y son muy útiles para la producción de biomateriales. Por ejemplo, *C. glutamicum* es la cepa más desarrollada para la producción industrial de aminoácidos, no tienen endotoxinas, además tienen actividad mínima de proteasas y tienen un sistema de secreción de proteínas eficiente (Peng et al., 2017; Srivastava et al., 2005). Se consiguió manipular el genoma basándose en el sistema CRISPR/Cas9 de tipo II para lograr la eliminaciones de genes, para mutaciones puntuales y para realizar inserciones en el genoma de *C. glutamicum* con una gran eficiencia (hasta el 100%). Se realizó una regulación génica basada en CRISPRi en *C. glutamicum* para la producción de aminoácidos (Lindner et al., 2013).

5.4.5. *Streptomyces*

Los *estreptomicetos* son el género más grande de *Actinobacteria*, son bacterias Gram-positivas, son abundantes en el suelo y producen diversos metabolitos secundarios que son importantes en la industria y en clínica (Berdy et al., 2005; Bibb et al., 2005). Los metabolitos secundarios más representativos son los antibióticos como la vancomicina, los herbicidas como la fosfotricina, los quimioterapéuticos como la daunorubicina y los inmunosupresores como la rapamicina.

Para poder identificar, caracterizar y producir estos metabolitos secundarios es necesario tener herramientas de manipulación genéticas eficientes; el problema está en que las herramientas genéticas actuales son insatisfactorias con respecto a su eficiencia, esto llevo a que se genera un cuello de botella para la ingeniería metabólica sistemática de las cepas de *Estreptomicetos* (Cobb et al., 2015).

Se usó un método de edición del genoma basado en CRISPR/Cas9 para varias cepas de *Streptomyces* (Cobb et al., 2015). Usando Cas9 construyeron un plásmido que albergaba dos sgRNA (ARN guía) y dos plantillas de edición para la

recombinación homóloga. Este sistema demostró que las regiones genómicas específicas de diversos tamaños se pueden eliminar con una eficiencia de hasta el 100%. Se desarrolló un sistema CRISPR/Cas9 muy eficiente para la eliminación de genes, para el reemplazo de genes y para el control reversible de la expresión génica. Además, la aplicación de CRISPR/Cas9 con una plantilla de recombinación homóloga produjo una eliminación precisa de genes llevando consigo una eficiencia de inserción del 90-100%.

Para la identificación de productos naturales, en farmacéutica a partir de cepas de *Streptomicetes* se investigaron los grupos de genes biosintéticos (BGC). Se diseñó un sistema modelo para poder desencadenar la producción de metabolitos mediante la activación de los BGC sobre la base del reemplazo del promotor. Se insertaron promotores fuertes y constitutivos aguas arriba usando CRISPR/Cas9.

Por tanto, varias aplicaciones de ingeniería genética de *Streptomyces* basadas en los sistemas CRISPR/Cas9 pueden llegar a mejorar significativamente la extracción de sustancias químicas con gran importancia en la industria y en farmacéutica.

6. TÉCNICAS DERIVADAS DE CRISPR

Las pantallas de eliminación (CRISPRn), inhibición (CRISPRi) y activación (CRISPRa) de CRISPR del genoma han identificado genes esenciales en células cancerígenas, genes que están involucrados en la respuesta de inhibidores de algunas moléculas pequeñas, etc. Estas pantallas CRISPR para el crecimiento o supervivencia celular han tenido bastante éxito, aunque se están optimizando más para tener fenotipos más complejos. A continuación, se hace una comparación de los efectos, el mecanismo y de la diana de las diferentes pantallas (Tabla 2):

TIPO	EFEECTO	MECANISMO	DIANA
CRISPRn (CRISPR nucleasa)	knockout	Deleción o inserción que causa una mutación	Cualquier región del genoma que tenga PAM
CRISPRi (CRISPR inhibidor)	Knockout	Interferencia en la transcripción	Sitios de iniciación de la transcripción y que tengan PAM

CRISPRa (CRISPR activador)	activación	Activación de la transcripción	Sitios de iniciación de la transcripción y que tengan PAM
----------------------------------	------------	-----------------------------------	---

Tabla 2. Comparación de técnicas derivadas de CRISPR (Elaboración propia)

CRISPRn (“CRISPR nucleasa”): Cas9 y sgRNA actúan en un sitio concreto hasta que se elimina ese sitio, por lo que pueden generar fenotipos de inactivación homocigóticos con una alta frecuencia en las células. Dependen del cambio de marco de secuencias para poder generar knockouts, esto lleva a que se afecte a la pauta de lectura de las secuencias (Wang et al., 2015; Muñoz et al., 2016; Aguirre et al., 2016).

CRISPRi (“CRISPR inhibidor”): no se basan en el cambio de marco de lectura y ofrecen algunas ventajas sobre CRISPRn desde el punto de vista del descubrimiento de fármacos, ya que la eliminación de la expresión génica lo que hace es imitar los efectos de un inhibidor (Mandegar et al., 2016). Es una herramienta muy útil para eliminar la expresión génica de manera transitoria o constitutiva sin producir alteración en el gen objetivo. Puede bloquear flujos metabólicos que vayan a subproductos y aumentar el flujo que va hacia los productos que se están buscando. Puede determinar la dirección en la que se transportan los productos, esto es posible por una inhibición de la actividad del transportador. También pueden identificar las contribuciones que tienen las transcripciones que surgen de diferentes sitios de inicio de la transcripción (TSS). Por ejemplo, CRISPRi se usó para mejorar la producción de flavonoides por un ajuste de algunas vías metabólicas (glucólisis, síntesis de los ácidos grasos, etc) (Wu et al., 2015).

CRISPRa (“CRISPR activador”): evalúa objetivos genéticos que lleva a obtener fenotipos determinados debido a su sobreexpresión (Gilbert et al., 2014; Konermann et al., 2015). Cuando se estimula la expresión de un locus, CRISPRa puede activar la expresión de algunas variantes de transcritos. CRISPRa no tendría efecto si el gen objetivo tiene mutaciones con pérdida de función o que falte en la línea celular de interés. Hay una técnica para poder detectar a CRISPRa, ésta es la activación de genes que están altamente reprimidos. Aunque para hacer esto se han tenido que desarrollar algunas variedades de sistemas CRISPRa que puedan reclutar los dominios de activación transcripcional múltiples para aumentar la potencia de la activación génica (Gilbert et al., 2014; Konermann et al., 2015).

7. LIMITACIONES Y PROBLEMAS ÉTICOS DE CRISPR/CAS

Una limitación que se le presenta a los sistemas CRISPR/Cas es la producción de efectos fuera del objetivo en las células huésped. La principal razón detrás de los efectos que se produzcan fuera de lo que es el objetivo principal es el no poder reconocer las secuencias que se buscan por parte de la secuencia protoespaciadora a lo largo del sgRNA (Cho et al., 2014). Elegir secuencias específicas en el genoma y optimizar el sgRNA y Cas9 puede reducir las mutaciones fuera del objetivo de la endonucleasa guiada por ARN. La introducción de sgRNA y Cas9 a la célula huésped representa un desafío constante para la comunidad científica. Los científicos han optado por la utilización de plásmidos o virus para que esto sea posible y no presente tantas complicaciones (Cho et al., 2014).

Otro de los temas que más se han discutido relacionados con los sistemas CRISPR es la edición del genoma humano. El poder modificar el ADN humano genera muchos debates en ética y derecho. Hay tres problemas principales por los que se generan estos debates:

A: El riesgo y la incertidumbre de la tecnología y su aplicación.

B: La modificación de la línea germinal humana y la responsabilidad hacia las generaciones futuras.

C: La legitimación de las medidas de edición del genoma humano con respecto a los conceptos de terapia y mejora.

La introducción de los sistemas CRISPR/Cas ha acelerado los esfuerzos para encontrar soluciones adecuadas a otros problemas asociados con otras técnicas de edición del genoma. La suposición de riesgo que podría haber asociado con la edición del genoma humano llevaron a restringir o prohibir sus aplicaciones en humanos. Comenzaron a generarse críticas hacia los científicos que usaban estos sistemas de edición genética argumentando que se creían Dios, o que jugaban a ser Dios con esto. En aspectos económicos también llega a ser un tema de debate. Los escépticos temen que CRISPR-Cas se convierta en una tecnología beneficiosa solo para los ricos. Suponían que la sociedad del futuro se iba a dividir en dos grupos, uno sería el de los ricos y sanos, y el otro grupo sería el de los pobres y enfermos (Schleiden et al., 2020; Furtado et al., 2019; Locke et al., 2020).

La limitación o miedo más temible asociado con el sistema CRISPR-Cas es el desarrollo de la guerra biológica. La edición de genes puede modificar genéticamente las bacterias y los virus para que se utilicen en ataques biológicos contra humanos o para causar daños generalizados a los cultivos (DiEuliis et

al.,2017; DiEuliis et al., 2018). Las aplicaciones potenciales de la tecnología de edición de genes surgen de la ciencia y la tecnología CRISPR, lo que genera serias preocupaciones sobre la bioseguridad como un "arma de doble filo". Las posibles amenazas de bioseguridad de las ediciones de genes mediadas por CRISPR incluyen la creación de nuevas neurotoxinas/neuroarmas; de virulencia aumentada; de novopatógenos humanos y vegetales; mayor tolerancia humana para los soldados contra la guerra biológica y química; y bioagentes que causan enfermedades humanas, degradación, discapacidad y letalidad (West RM et al.,2020; Ayanoğlu FB et al., 2020).

8. CONCLUSIÓN

Los sistemas CRISPR/Cas son sistemas que han revolucionado el campo de la biología y abriendo una nueva dimensión en el campo de la ingeniería genética y en la edición específica de nucleótidos dentro de un gen que esté defectuoso. La gran eficacia y la amplitud de las herramientas que usa para editar una gran cantidad de genes encontraron funciones y rasgos importantes en diversas aplicaciones como en terapia génica, mejoras vegetales, etc.

Los sistemas CRISPR/Cas brindan muchos beneficios y engloban una amplia gama de campos de la ciencia y tecnología. Es una herramienta de edición genética de alta precisión que nos permite ir mejorando nuestra calidad de vida. Aunque sigue habiendo polémicas en cuanto a su uso y tiene algunas limitaciones.

9. REFERENCIAS

- Afzal, S., & Singh, N. K. (2020). A review of CRISPR associated genome engineering: application, advances and future prospects of genome targeting tool for crop improvement. *Biotechnology Letters*, 42(9), 1611-1632.
<https://doi.org/10.1007/s10529-020-02950-w>
- Aguirre, A. J., Meyers, R. M., Weir, B. A., Vazquez, F., Zhang, C., Ben-David, U., Cook, A., Ha, G., Harrington, W. J., Doshi, M. B., Kost-Alimova, M., Gill, S. J., Xu, H., Ali, L. D., Jiang, G., Pantel, S., Lee, Y., Goodale, A., Cherniack, A. D., . . . Hahn, W. C. (2016). Genomic Copy Number Dictates a Gene-Independent Cell Response to CRISPR/Cas9 Targeting. *Cancer Discovery*, 6(8), 914-929.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0154>
- Ajikumar, P. K., Xiao, W. H., Tyo, K. E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T. H., Pfeifer, B., & Stephanopoulos, G. (2010). Isoprenoid pathway

- optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 70–74. <https://doi.org/10.1126/science.1191652>
- Alkhnbashi, O. S., Shah, S. A., Garrett, R. A., Saunders, S. J., Costa, F., & Backofen, R. (2016). Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(17), i576–i585. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw454>
- Altenbuchner, J. (2016). Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5421-5427. <https://doi.org/10.1128/aem.01453-16>
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature biotechnology*, 38(7), 824–844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>
- Ayanoğlu, F., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. (2020). Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turkish Journal of Biology*, 44(2), 110-120. <https://doi.org/10.3906/biy-1912-52>
- Aznar-Moreno, J. A., & Durrett, T. P. (2017). Simultaneous Targeting of Multiple Gene Homeologs to Alter Seed Oil Production in *Camelina sativa*. *Plant and Cell Physiology*, 58(7), 1260-1267. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx058>
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero DA, Horvath P. (2007). CRISPR proporciona resistencia adquirida contra virus en procariotas. *Ciencia* 315,1709–1712. doi: 10.1126/ciencia.1138140.
- Bartlett, J. G., & Gerding, D. N. (2008). Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s1), S12-S18. <https://doi.org/10.1086/521863>
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>
- Bjursell, M., Porritt, M. J., Ericson, E., Taheri-Ghahfarokhi, A., Clausen, M., Magnusson, L. U., Admyre, T., Nitsch, R., Mayr, L. M., Aasehaug, L., Seeliger, F., Maresca, M., Bohlooly-Y, M., & Wiseman, J. (2018). Therapeutic Genome

- Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine*, 29, 104-111.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.015>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5959), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Cantos, C., Francisco, P., Trijatmiko, KR, Slamet-Loedin, I. y Chadha-Mohanty, PK. (2014). Identificación de loci de "puerto seguro" en el genoma del arroz Indica mediante el aprovechamiento de la propiedad de las nucleasas con dedos de zinc para inducir Daño y reparación del ADN. *Fronteras en la ciencia vegetal*, 5, 302.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00302>
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12), e82.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2016). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of molecular biology*, 428(5 Pt B), 963–989.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.014>
- Charpentier, E., Richter, H., Van Der Oost, J., & White, M. F. (2015). Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *Fems Microbiology Reviews*, 39(3), 428-441.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv023>
- Cheng, H., Jian, S., Liu, D., Ng, T., Huang, W., & Lin, H. (2020). Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods Before and After Symptom Onset. *JAMA Internal Medicine*, 180(9), 1156. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.2020>
- Cho, S. Y., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H., Bae, S., & Kim, J. (2013b). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*, 24(1), 132-141.
<https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>

- Choi, M., Yun, J. H., Kim, J. S., Kim, J., & Kim, S. (2021b). The efficacy of CRISPR-mediated cytosine base editing with the RPS5a promoter in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87669-y>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2014). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 723-728. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- Craigie, R., & Bushman, F. D. (2012). HIV DNA Integration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006890. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890>
- Danna, K., & Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(12), 2913–2917. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.12.2913>
- Dever, D. P., Bak, R. O., Reinisch, A., Camarena, J., Washington, G., Nicolas, C. E., Pavel-Dinu, M., Saxena, N., Wilkens, A. B., Mantri, S., Uchida, N., Hendel, A., Narla, A., Majeti, R., Weinberg, K. I., & Porteus, M. H. (2016). CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 539(7629), 384–389. <https://doi.org/10.1038/nature20134>
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A. (2016). Clostridium difficile Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins*, 8(5), 134. <https://doi.org/10.3390/toxins8050134>
- DiEuliis, D., & Giordano, J. (2017b). Why Gene Editors Like CRISPR/Cas May Be a Game-Changer for Neuroweapons. *Health security*, 15(3), 296-302. <https://doi.org/10.1089/hs.2016.0120>
- DiEuliis, D., & Giordano, J. (2017d). Gene editing using CRISPR/Cas9: implications for dual-use and biosecurity. *Protein & Cell*, 9(3), 239-240. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0493-4>
- Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 578(7794), 229-236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>

- Enciso-Rodríguez, F. E., Manrique-Carpintero, N. C., Nadakuduti, S. S., Buell, C. R., Zarka, D., & Douches, D. S. (2019b). Overcoming Self-Incompatibility in Diploid Potato Using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00376>
- Esbin, M. N., Whitney, O. N., Chong, S., Maurer, A., Darzacq, X., & Tjian, R. (2020). Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA (New York, N.Y.)*, 26(7), 771–783. <https://doi.org/10.1261/rna.076232.120>
- Finzi, D., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T. C., Smith, K. A., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T. C., Chaisson, R. E., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Gange, S. J., Gallant, J. E., & Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine*, 5(5), 512–517. <https://doi.org/10.1038/8394>
- Furtado, R. N. (2019b). Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. *Revista Bioética*, 27(2), 223–233. <https://doi.org/10.1590/1983-80422019272304>
- Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M. G., West, A., Bidney, D., Falco, S. C., Jantz, D., & Lyznik, L. A. (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(1), 176–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04041.x>
- Gao, X., Tsang, J. C., Gaba, F., Wu, D., Lu, L., & Liu, P. (2014). Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic acids research*, 42(20), e155. <https://doi.org/10.1093/nar/gku836>
- Gao, Y., Xiong, X., Wong, S., Charles, E. J., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. *Nature methods*, 13(12), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4042>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 109(39), E2579–E2586.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M., & Weissman, J. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159(3), 647–661.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gleditzsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., & Randau, L. (2018). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*, 16(4), 504–517.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>
- Gornalusse, G. G., Hirata, R. K., Funk, S. E., Rioloobos, L., Lopes, V. S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A. G., Hanafi, L. A., Clegg, D. O., Turtle, C., & Russell, D. W. (2017). HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nature biotechnology*, 35(8), 765–772.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3860>
- Heidenreich, M., & Zhang, F. (2016). Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(1), 36–44.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.2>
- Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. (2010). Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nature reviews. Cancer*, 10(7), 470–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2877>
- Hochstrasser, M. L., & Doudna, J. A. (2015). Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.007>
- Hou, T., Zeng, W., Yang, M., Chen, W., Ren, L., Ai, J., Wu, J., Liao, Y., Gou, X., Li, Y., Wang, X., Su, H., Gu, B., Wang, J., & Xu, T. (2020). Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus.

- medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory).*
<https://doi.org/10.1101/2020.02.22.20025460>
- Jakočiūnas, T., Bonde, I., Herrgård, M. J., Harrison, S. D., Kristensen, M., Pedersen, L. H., Jensen, M. C., & Keasling, J. D. (2015b). Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 28, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.008>
- Jakočiūnas, T., Jensen, M. C., & Keasling, J. D. (2016). CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metabolic Engineering*, 34, 44-59. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.12.003>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002b). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D. G., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233-239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Jiang, W. G., Henry, I. M., Lynagh, P., Comai, L., Cahoon, E. B., & Weeks, D. P. (2017). Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR /Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5), 648-657. <https://doi.org/10.1111/pbi.12663>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M. H., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Karginov, F. V., & Hannon, G. J. (2010c). The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. *Molecular Cell*, 37(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.033>
- Keen E. C. (2015). A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
- Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature protocols*, 14(10), 2986–3012. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>

- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., Hsu, P. D., Habib, N., Gootenberg, J. S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Klap, C., Yeshayahou, E., Bolger, A., Arazi, T., Gupta, S. K., Shabtai, S., Usadel, B., Salts, Y., & Barg, R. (2016). Tomato facultative parthenocarpy results from *SIAGAMOUS-LIKE* 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5), 634–647. <https://doi.org/10.1111/pbi.12662>
- Levy, J. I., Yeh, W., Pendse, N. D., Davis, J. R., Hennessey, E. K., Butcher, R., Koblan, L. W., Comander, J., Liu, Q., & Liu, D. R. (2020). Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses. *Nature Biomedical Engineering*, 4(1), 97–110. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0501-5>
- Li, Y., Lin, Z., Huang, C., Zhang, Y., Wang, Z., Tang, Y., Chen, T., & Zhao, X. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR–Cas9 mediated genome editing. *Metabolic Engineering*, 31, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.06.006>
- Li, Y., Lin, Z., Huang, C., Zhang, Y., Wang, Z., Tang, Y. J., Chen, T., & Zhao, X. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metabolic engineering*, 31, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.06.006>
- Lindner, S. N., Petrov, D., Hagmann, C. T., Henrich, A., Krämer, R., Eikmanns, B. J., Wendisch, V. F., & Seibold, G. M. (2013). Phosphotransferase System-Mediated Glucose Uptake Is Repressed in Phosphoglucose isomerase-Deficient *Corynebacterium glutamicum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2588–2595. <https://doi.org/10.1128/aem.03231-12>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liu, W., An, C., Shu, X., Meng, X., Yao, Y., Zhang, J., Chen, F., Xiang, H., Yang, S., Gao, X., & Gao, S. (2020). A Dual-Plasmid CRISPR/Cas System for Mycotoxin Elimination in Polykaryotic Industrial Fungi. *ACS Synthetic Biology*, 9(8), 2087–2095. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00178>

- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., & Drews, G. N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 2232–2237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409339102>
- Locke, L. (2020). The Promise of CRISPR for Human Germline Editing and the Perils of “Playing God”. *The CRISPR journal*, 3(1), 27-31. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0033>
- Lu, H., Luo, T., Fu, H., Wang, L., Tan, Y., Huang, J., Wang, Q., Ye, G., Gatehouse, A. M. R., Lou, Y., & Shu, Q. (2018). Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature plants*, 4(6), 338-344. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0152-7>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., & Liu, Y. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., & Zhu, J. K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), 2623–2628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019533108>
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., & Zhang, F. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, 30(2), 482-496. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.482>
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Zhang, F. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., Van Der

- Oost, J., & Zhang, F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., Van Der Oost, J., . . . Zhang, F. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., . . . Zhang, F. (2019). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Mandegar, M. A., Huebsch, N., Frolov, E. B., Shin, E., Truong, A., Olvera, M. P., Chan, A. H., Miyaoka, Y., Holmes, K., Spencer, C. I., Judge, L. M., Gordon, D. E., Eskildsen, T. V., Villalta, J. E., Horlbeck, M. A., Gilbert, L. A., Krogan, N. J., Sheikh, S. P., Weissman, J. S., Qi, L. S., ... Conklin, B. R. (2016). CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs. *Cell stem cell*, 18(4), 541–553.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.022>
- McGinn, J., & Marraffini, L. A. (2018). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 7-12.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0071-7>
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., & Qu, L. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1233-1236. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.123>
- Min, Y., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Mireault, A. A., Huang, J., Shelton, J. M., McAnally, J., Amoasii, L., Mammen, P. P., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2019). CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Science Advances*, 5(3).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4324>

- Moffett, H. F., Harms, C. K., Fitzpatrick, K. S., Tooley, M. R., Boonyaratanakornkit, J., & Taylor, J. J. (2019). B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Science immunology*, 4(35), eaax0644. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax0644>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244-246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. S., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Morbitzer, R., Elsaesser, J., Hausner, J., & Lahaye, T. (2011). Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5790-5799. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr151>
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5959), 1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- Mougiakos, I., Bosma, E. F., Weenink, K., Vossen, E., Goijvaerts, K., Van Der Oost, J., & Van Kranenburg, R. (2017). Efficient Genome Editing of a Facultative Thermophile Using Mesophilic spCas9. *ACS Synthetic Biology*, 6(5), 849-861. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00339>
- Mougiakos, I., Bosma, E. F., Weenink, K., Vossen, E., Goijvaerts, K., van der Oost, J., & van Kranenburg, R. (2017). Efficient Genome Editing of a Facultative Thermophile Using Mesophilic spCas9. *ACS synthetic biology*, 6(5), 849–861. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00339>
- Muñoz, D. M., Cassiani, P. J., Li, L., Billy, E., Korn, J. M., Jones, M. P., Golji, J., Ruddy, D. A., Yu, K. M., McAllister, G., De Weck, A., Abramowski, D., Wan, J. S., Shirley, M. H., Neshat, S. Y., Rakiec, D. P., De Beaumont, R., Weber, O., Kauffmann, A., . . . Schlabach, M. R. (2016). CRISPR Screens Provide a Comprehensive Assessment of Cancer Vulnerabilities but Generate False-Positive Hits for Highly Amplified Genomic Regions. *Cancer Discovery*, 6(8), 900-913. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0178>

- Myers, S. A., Wright, J., Peckner, R., Kalish, B. T., Zhang, F., & Carr, S. A. (2018). Discovery of proteins associated with a predefined genomic locus via dCas9-APEX-mediated proximity labeling. *Nature methods*, 15(6), 437–439. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0007-1>
- Nadakuduti, S. S., Buell, C. R., Voytas, D. F., Starker, C. G., & Douches, D. S. (2018). Genome Editing for Crop Improvement – Applications in Clonally Propagated Polyploids With a Focus on Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01607>
- Nargesi, S., Kaboli, S., Thekkiniath, J., Heidari, S., Keramati, F., Seyedmousavi, S., & Hedayati, M. T. (2021). Recent Advances in Genome Editing Tools in Medical Mycology Research. *Journal of Fungi*, 7(4), 257. <https://doi.org/10.3390/jof7040257>
- Ohmori, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Sakata, Y., & Nishimura, S. (2015). New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13 Suppl 1, S133-42. <https://doi.org/10.1111/jth.12926>
- Olorunniji, F. J., Rosser, S. J., & Stark, W. M. (2016). Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. *The Biochemical journal*, 473(6), 673–684. <https://doi.org/10.1042/BJ20151112>
- Özcan, A., Pausch, P., Linden, A., Wulf, A. J., Schühle, K., Heider, J., Urlaub, H., Heimerl, T., Bange, G., & Randau, L. (2018). Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nature microbiology*, 4(1), 89-96. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0274-8>
- Patchesung, M., Jantarug, K., Pattama, A., Aphicho, K., Suraritdechachai, S., Meesawat, P., Sappakhaw, K., Leelahakorn, N., Ruenkam, T., Wongsatit, T., Athipanyasilp, N., Eiamthong, B., Lakkanasirorat, B., Phoodokmai, T., Niljianskul, N., Pakotiprapha, D., Chanarat, S., Homchan, A., Tinikul, R., Kamutira, P., ... Uttamapinant, C. (2020). Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nature biomedical engineering*, 4(12), 1140–1149. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>
- Peng, F., Wang, X., Sun, Y., Dong, G., Yang, Y., Liu, X., & Bai, Z. (2017). Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microbial cell factories*, 16(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0814-6>

- Pidot, S. J., Ishida, K., Cyrulies, M., & Hertweck, C. (2014). Discovery of Clostrubin, an Exceptional Polyphenolic Polyketide Antibiotic from a Strictly Anaerobic Bacterium. *Angewandte Chemie*, 53(30), 7856-7859.
<https://doi.org/10.1002/anie.201402632>
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., & Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacological Reviews*, 69(2), 200-235. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012658>
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Rahimi, H., Salehiabar, M., Barsbay, M., Ghaffarlou, M., Kavetsky, T., Sharafi, A., Davaran, S., Chauhan, S. C., Danafar, H., Kaboli, S., Nosrati, H., Yallapu, M. M., & Conde, J. (2021). CRISPR Systems for COVID-19 Diagnosis. *ACS sensors*, 6(4), 1430–1445. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02312>
- Roberts, R. D. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 5905-5908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500923102>
- Rossi, F., Rizzotti, L., Felis, G. E., & Torriani, S. (2014). Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. *Food Microbiology*, 42, 232-243. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.004>
- Rude, M. A., & Schirmer, A. (2009). New microbial fuels: a biotech perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3), 274-281.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.04.004>
- Salas-Mckee, J., Kong, W., Gladney, W. L., Jadowsky, J. K., Plesa, G., Davis, M. M., & Fraietta, J. A. (2019). CRISPR/Cas9-based genome editing in the era of CAR T cell immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(5), 1126–1132. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571893>
- Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. I., Sousa, C., Voytas, D. F., & Barro, F. (2017). Low-gluten, nontransgenic wheat

- engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), 902-910.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275-9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>
- Schimpl, S., Fauser, F., & Puchta, H. (2014). The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in plant* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant Journal*, 80(6), 1139-1150. <https://doi.org/10.1111/tpj.12704>
- Schleiden, S., Dederer, H., Sgodda, S., Cravcisin, S., Lüneburg, L., Cantz, T., & Heinemann, T. (2020). Human germline editing in the era of CRISPR-Cas: risk and uncertainty, inter-generational responsibility, therapeutic legitimacy. *BMC Medical Ethics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12910-020-00487-1>
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 9(10), 2395-2410.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J., Qiu, J., & Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(8), 686-688.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
- Sherlock Biosciences. Instructions for Use SHERLOCK™ CRISPR SARS-CoV-2 kit.(2021). For Emergency Use Authorization (EUA).
<https://www.fda.gov/media/137746/download>
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., & Zhang, F. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 60(3), 385-397.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>
- Srivastava, P., & Deb, J. K. (2005). Gene expression systems in corynebacteria. *Protein Expression and Purification*, 40(2), 221-229.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.06.017>
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Wenming, D., Du, J., Francis, F., Zhao, Y., & Xia, L. (2017). Generation of High-Amylose Rice through

- CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00298>
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E., & Gersbach, C. A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature methods*, 12(12), 1143–1149.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>
- Thakore, P. I., Black, J. B., Hilton, I. B., & Gersbach, C. A. (2016). Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nature methods*, 13(2), 127–137.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3733>
- Tian, X., Gu, T., Patel, S., Bode, A. M., Lee, M., & Dong, Z. (2019). CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *npj precision oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0080-7>
- Traylen, C. M., Patel, H., Fondaw, W., Mahatme, S., Williams, J. W., Walker, L. R., Dyson, O. F., Arce, S., & Akula, S. M. (2011). Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virology*, 6(4), 451-463.
<https://doi.org/10.2217/fvl.11.21>
- Voss, J. E., Gonzalez-Martin, A., Andrabi, R., Fuller, R. P., Murrell, B., McCoy, L. E., Porter, K., Huang, D., Li, W., Sok, D., Le, K., Briney, B., Chateau, M., Rogers, G., Hangartner, L., Feeney, A. J., Nemazee, D., Cannon, P., & Burton, D. R. (2019). Reprogramming the antigen specificity of B cells using genome-editing technologies. *eLife*, 8, e42995. <https://doi.org/10.7554/eLife.42995>
- Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N. W., Krupczak, K. M., Post, Y., Wei, J. J., Lander, E. S., & Sabatini, D. M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6264), 1096–1101. <https://doi.org/10.1126/science.aac7041>
- Wang, Y., & Blaschek, H. P. (2011). Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Bioresource Technology*, 102(21), 9985-9990.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.038>
- Wang, Y., Zhang, Z., Seo, S. I., Choi, K. J., Lu, T., Jin, Y., & Blaschek, H. P. (2015). Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using

- CRISPR/Cas9 system. *Journal of Biotechnology*, 200, 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.005>
- Wang, Y., Zhang, Z., Seo, S. I., Lynn, P., Lu, T., Jin, Y., & Blaschek, H. P. (2016). Bacterial Genome Editing with CRISPR-Cas9: Deletion, Integration, Single Nucleotide Modification, and Desirable “Clean” Mutant Selection in *Clostridium beijerinckii* as an Example. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 721-732.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00060>
- Wang, X., Shang, X., & Huang, X. (2020). Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1682–1691. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1793689>
- West, R. L., & Gronvall, G. K. (2020). CRISPR Cautions: Biosecurity Implications of Gene Editing. *Perspectives in Biology and Medicine*, 63(1), 73-92.
<https://doi.org/10.1353/pbm.2020.0006>
- Wu, J., Du, G., Chen, J., & Zhou, J. (2015). Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 5(1).
<https://doi.org/10.1038/srep13477>
- Xu, P., Gu, Q., Wang, W., Wong, L., Bower, A., Collins, C. H., & Koffas, M. A. G. (2013). Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2425>
- Xu, P., Ranganathan, S., Fowler, Z., Maranas, C. D., & Koffas, M. A. G. (2011). Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metabolic Engineering*, 13(5), 578-587. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.06.008>
- Xu, ZS., Feng, K., Que, F.(2017). A MYB transcription factor, DcMYB6, is involved in regulating anthocyanin biosynthesis in purple carrot taproots *Sci Rep* 7, 45324
<https://doi.org/10.1038/srep45324>
- Yang, J. D., Park, S. J., Kim, W. H., Kim, H. T., Kim, B. J., Lee, J., Shin, J., & Lee, S. Y. (2018). One-step fermentative production of aromatic polyesters from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02498-w>
- Yim, H., Haselbeck, R. J., Niu, W., Pujol-Baxley, C. J., Burgard, A. P., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J. D., Osterhout, R. E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H., Andrae, S., Yang, T., Lee, S. Y., Burk, M. J., & Van

- Dien, S. J. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nature Chemical Biology*, 7(7), 445-452. <https://doi.org/10.1038/nchembio.580>
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in cancer biology*, 55, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
- Zhang, W., Li, Y., & Tang, Y. (2008). Engineered biosynthesis of bacterial aromatic polyketides in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20683-20688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809084105>
- Zhang, Y., Li, D., Zhang, D., Zhao, X., Cao, X., Dong, L., Liu, J., Chen, K., Zhang, H., Gao, C., & Wang, D. W. (2018). Analysis of the functions of *TaGW2* homologs in wheat grain weight and protein content traits. *Plant Journal*, 94(5), 857-866. <https://doi.org/10.1111/tpj.13903>