



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

SISTEMA CRISPR/Cas9 y su aplicación a la edición dirigida de genomas

Alumno: Eduardo Vega Sánchez

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

SISTEMA CRISPR/Cas9 y su aplicación a la edición dirigida de genomas

Alumno: Eduardo Vega Sánchez

Julio, 2019

RESUMEN

CRISPR/Cas9 es un sistema de manipulación genética de una aparición muy reciente. Compuesto por las secuencias CRISPR y sus proteínas asociadas (Cas), actúan en bacterias de manera natural como un sistema de defensa inmunitario contra fagos y elementos genéticos móviles. El sistema, gracias a su actividad endonucleasa dirigida por ARN guía y la sencillez que presenta para modificarlo a placer, constituye un importante avance en el campo de la modificación dirigida de genomas y sus aplicaciones se han convertido en uno de los bloques más importantes a explotar durante los próximos años en esta área de la biología.

PALABRAS CLAVE: sistema CRISPR/Cas9, secuencias CRISPR, proteínas Cas, sistema de defensa inmunitario, fagos, ARN guía, actividad endonucleasa.

ABSTRACT

CRISPR/Cas9 is a system of genetic manipulation of a very recent appearance. Composed by the CRISPR sequences and their associated proteins (Cas), they act in bacteria in a natural way as an immune defence system against phages and mobile genetic elements. The system, thanks to its directed endonuclease activity by guide RNA and the simplicity that presents to modify it at pleasure, constitutes an important advance in the field of directed modification of genomes and their applications and has become one of the most important blocks to explode during the next few years in this area of biology.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9, CRISPR sequences, Cas proteins, immune defense system, phages, guide RNA, endonuclease activity.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	Pag.7
2. OBJETIVO DE LA REVISIÓN.....	Pag.8
3. ANTECEDENTES.....	Pag.9
3.1 Manipulación genética por sustitución dirigida de genes mediante recombinación homóloga (HDR).....	Pag.10
3.2 Nucleasas de dedos de Zinc (ZFN).....	Pag.11
3.3 TALEN's (<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>).....	Pag.12
4. EL SISTEMA CRISPR/Cas.....	Pag.14
4.1 Descubrimiento.....	Pag.14
4.2 Funcionamiento en la naturaleza.....	Pag.15
4.3 Tipos de sistemas CRISPR/Cas.....	Pag.16
4.4 Componentes del sistema CRISPR/Cas.....	Pag.19
4.4.1 Secuencias CRISPR.....	Pag.19
4.4.2 Proteínas Cas.....	Pag.20
5. SISTEMA CRISPR/Cas9 APLICADO A LA EDICIÓN DIRIGIDA DE GENOMAS.....	Pag.22
5.1 Funcionamiento.....	Pag.22
5.2 Aplicaciones de CRISPR/Cas9.....	Pag.24
5.2.1 Inserciones o deleciones de nucleótidos ``Indels''	Pag.24
5.2.2 Inversiones y translocaciones cromosómicas.....	Pag.25
5.2.3 Terapia génica.....	Pag.26
5.2.4 ``Imaging''	Pag.27
5.2.5 Alteraciones epigenéticas.....	Pag.29
5.2.6 Edición múltiple del genoma.....	Pag.30
5.2.7 Represión transcripcional (CRISPRi).....	Pag.31
5.2.8 Activación transcripcional (CRISPRa).....	Pag.33
5.2.9 Generación de modelos animales.....	Pag.33
5.2.10 Modificación de genomas en plantas.....	Pag.34
6. INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA.....	Pag.35
6.1 Cortes <i>Off-target</i>	Pag.35
6.2 Autoinmunidad.....	Pag.36
6.3 Prevalencia de NHEJ ante HDR.....	Pag.37

7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	Pag.38
8. CONCLUSIONES Y TRASFONDO ÉTICO.....	Pag.39
9. BIBLIOGRAFÍA.....	Pag.41

1. INTRODUCCIÓN

El campo de la biología ha crecido exponencialmente en los dos últimos siglos, convirtiéndose en una de las disciplinas más importantes para la ciencia y la investigación en el mundo actual.

Este crecimiento en el área de la genética viene constituido por el afán científico de conocer los entresijos que rodean nuestra existencia y cómo funciona la molécula de ADN para conformar la vida y dotarla de un funcionamiento tan complejo.

La genética, es una de las áreas que más han experimentado este cambio, concretamente en los últimos 70 años, tras el descubrimiento de la estructura bicatenaria en hélice antiparalela del ADN por James Watson y Francis Crick, entre otros, en 1953. (Watson, J. D. & Crick, 1953)

Tras el descubrimiento de la doble hélice, se descifró el código genético en 1966 con la colaboración del español Severo Ochoa y, en 1976, se comenzó con la secuenciación del ADN por el método de Sanger, colocando un pilar fundamental hacia el conocimiento del genoma humano, del cual se obtuvo un primer borrador en el año 2000 mediante el Proyecto Genoma Humano (PGH), que buscaba obtener un mapa físico y funcional del genoma humano.

La información sobre la secuencia de genes y genomas permitió el desarrollo de técnicas de modificación genética, las cuales han sufrido una revolución en las últimas décadas tras el desarrollo de métodos de edición genómica basados en cortes en el genoma dirigidos por las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), por TALEN (Transcription activator-like effector nucleases), o por ARN, como ocurre con el sistema CRISPR/Cas (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein*), del cual trata esta revisión.

CRISPR / Cas9 es un sistema de defensa inmune que se encuentra en bacterias y arqueas y combina la especificidad de los ácidos nucleicos con la eficiencia de nucleasas de ADN de doble cadena (DSB por *Double stranded break*, corte de

doble cadena). Las secuencias CRISPR (*Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas*) son secuencias "espaciadoras" intercaladas en secuencias de ADN repetidas altamente conservadas. Las secuencias espaciadoras son complementarias a ácidos nucleicos extraños (invasores) y permiten a la nucleasa Cas9 (guiada por un ``ARN guía´´ que se une a secuencias de ADN complementarias) produzca una DSB, degradando el material extraño. De este modo protegen a las bacterias de patógenos, funcionando como un sistema inmune hereditario. (Wang, La Russa, & Qi, 2016)

La tecnología CRISPR/Cas9 desarrollada a partir del sistema existente en bacterias es versátil, eficiente, simple de diseñar y específica, de manera que está suplantando rápidamente a las técnicas de la manipulación dirigida del ADN preexistentes. Por otro lado, la capacidades del sistema CRISPR/Cas9 se están refinando rápidamente y sus aplicaciones se amplían. Como tal, CRISPR/Cas9 probablemente será el motor de gran parte de la terapia basada en la edición genética en los próximos años. (Ewart, Peterson, & Steer, 2019)

Teniendo en cuenta la información disponible, este tipo de tecnologías van camino de revolucionar campos como la medicina, por sus aplicaciones en terapia génica (tumores, distrofia muscular, ...), terapia celular (reemplazo celular en enfermedades degenerativas como el Alzheimer) o generación de modelos patológicos de forma rápida (generar modelos de enfermedades mediante mutaciones), además de sus aplicaciones en genómica funcional o en la obtención de modelos animales para experimentación, entre otras muchas. (Lammoglia-Cobo et al., 2016)

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es vislumbrar el estado actual de la tecnología de edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas9 y sus fundamentos, además de su funcionamiento, los sistemas que precedieron a esta técnica y los inconvenientes que puede presentar su uso al ser una técnica de reciente descubrimiento.

3. ANTECEDENTES

Inicialmente, la manipulación genética era posible mediante recombinación homóloga directa (HDR), una técnica que apareció por primera vez en los años 70 pero que, pese a que permite una manipulación genética bastante precisa y eficiente en procariotas, no ocurre lo mismo en eucariotas, donde su eficiencia es bastante reducida. El empleo de mecanismos de selección específicos de eucariotas ha posibilitado su empleo en algunas especies, aunque no es una buena opción cuando queremos modificar de forma rápida y eficiente genomas de animales, plantas o células humanas, que suelen ser el principal objetivo de este campo (Kim, 2016). Además requiere de procedimientos complejos y largos de realizar y que además no son efectivos en todos los casos (Lammoglia-Cobo et al., 2016).

Para resolver los problemas de eficiencias de esta técnica se desarrollaron nuevos procedimientos cada vez más sofisticados y que encajaban mejor en el objetivo de la edición genómica: las nucleasas de dedos de zinc (*Zinc Fingers Nuclease*, ZFN) y las TALEN's (*Transcription activator-like effector nucleases*).

Estas nucleasas quiméricas se componen de dominios de unión al ADN específicos de secuencia y programables, vinculados a un dominio de restricción de ADN no específico. Las ZFN y los TALEN's permiten una amplia gama de modificaciones genéticas al inducir roturas de doble cadena del ADN que estimulan la unión de extremos no homólogos propensos a errores o la reparación dirigida por homología en ubicaciones genómicas específicas (Gaj, Gersbach, & Barbas, 2013).

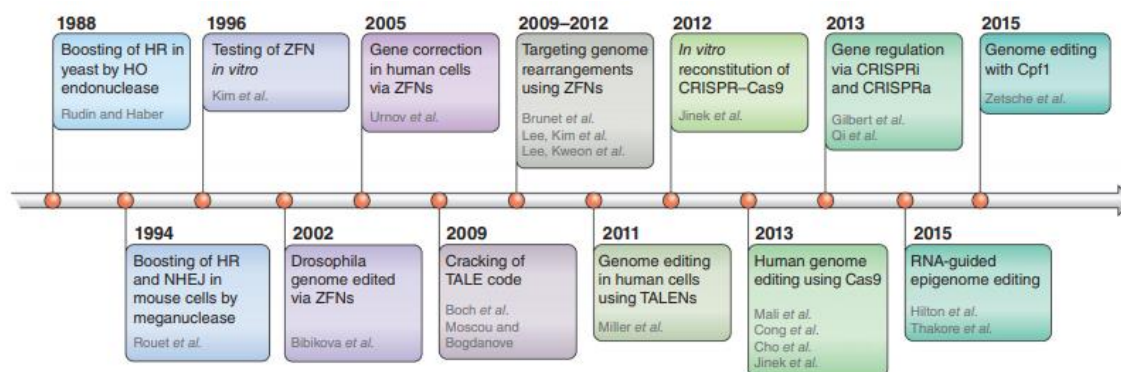


Figura 1. Evolución de los métodos de edición genómica (Kim, 2016).

3.1 Manipulación genética por sustitución dirigida de genes mediante recombinación homóloga (HDR)

Uno de los primeros sistemas de edición genómica que se utilizaron fue la recombinación homóloga (HDR). Este es un sistema fundamental en las divisiones celulares que se dan mediante meiosis en la reproducción sexual, ya que es lo que hace posible la variabilidad genética y la evolución debido a que se generan nuevos cromosomas por el intercambio que se da entre las zonas complementarias de dos cromosomas homólogos diferentes.

El método de manipulación genética basado en HDR consta de tres partes: un transgén que expresa una recombinasa específica del sitio, un transgén que expresa una endonucleasa también específica del sitio y un constructo donante transgénico que lleva sitios de reconocimiento para la endonucleasa y con homología con el ADN del lugar al que se va a dirigir. La acción combinada de estas dos enzimas produce una molécula de ADN donante recombinogénico y extracromosómico en las células. La progenie con eventos de ``gene targeting`` puede ser recuperada por cruzamiento de prueba, es decir, cruzando un descendiente de esta técnica con un individuo fenotípicamente recesivo. Esta técnica de selección de genes proporciona una forma de mutar genes que están identificados solo por secuencia, para más tarde analizar sus funciones (Figura 2) (Rong & Golic, 2000).

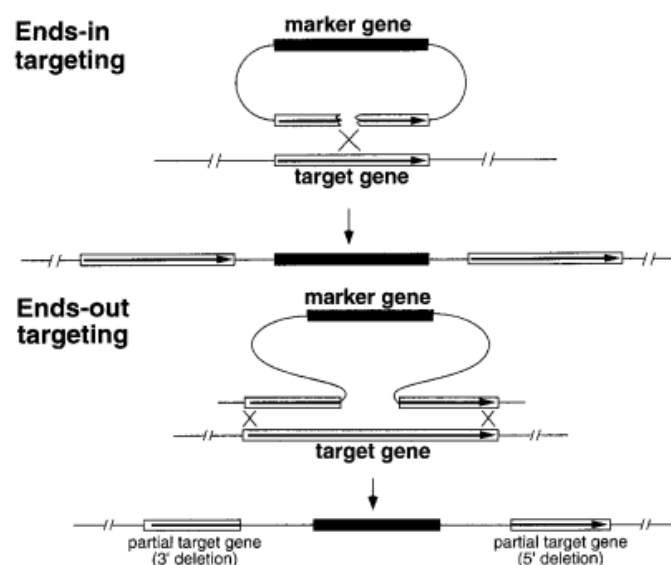


Figura 2. Manipulación genética por recombinación homóloga (Rong & Golic, 2000).

3.2 Nucleasas de dedos de Zinc (ZFNs)

Los dedos de zinc son estructuras proteicas pequeñas que tienen funciones relacionadas con la estabilización de moléculas tales como ácidos nucleicos (ARN o ADN), proteínas u otras moléculas. Fueron primeramente descubiertos en el anfibio *Xenopus laevis* (J. Miller, Mclachlan, & Klug, 1985) y constituyen uno de los motivos estructurales más comunes en los eucariotas. Cada dedo de zinc está conformado aproximadamente por 30 aminoácidos, y suelen aparecer como repeticiones en tándem, con dos, tres o más dedos que comprenden el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción. Existen evidencias que sugieren que algunos dedos de zinc Cys2His2 se unen al ARN, y que otros pueden participar en interacciones proteína-proteína, pero parece que su papel predominante es en el reconocimiento de proteína-ADN, lo cual se ha estudiado con más detalle (Aterials, Fried, Manaa, Pagoria, & Simpson, 2001).

Las ZFN son endonucleasas artificiales creadas como un híbrido de un dominio de unión al ADN que contiene dedos de zinc de un factor de transcripción eucariótico y el dominio de corte de la endonucleasa *FokI*, que corta el ADN adyacente a su sitio de reconocimiento (5'-GGATG-3'). Las ZFN son altamente precisas y pueden diseñarse para dirigirse a cualquier secuencia de ADN (Ewart et al., 2019).

(a) ZFNs

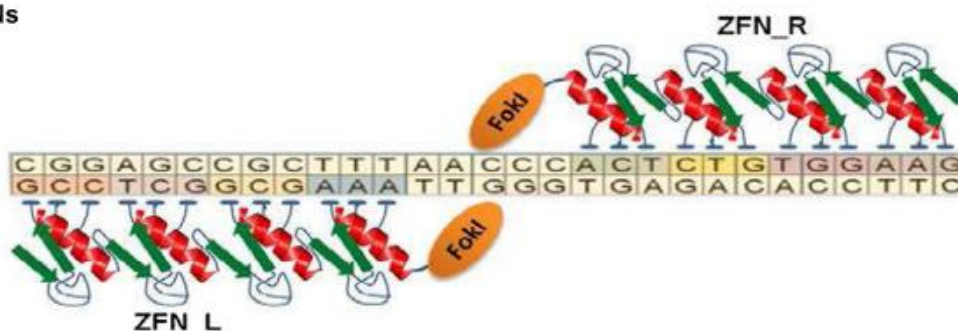


Figura 3. Mecanismo de unión de las ZFNs a la molécula de ADN y su actividad endonucleasa mediada por la enzima de restricción *FokI* (Chandrasegaran & Carroll, 2016).

3.3 TALEN's (*Transcription activator-like effector nucleases*)

Los efectores TAL (TALEs) son proteínas naturales del género de bacterias patógenas de plantas *Xanthomonas*. Son una estrategia que usan las bacterias de este género para la infección de plantas (Bonas, Stall, & Staskawicz, 1989). Estos efectores se inyectan en células vegetales a través del sistema de secreción bacteriano tipo III, se importan a los núcleos de células vegetales, y se dirigen a los promotores de genes específicos del efector para activar la transcripción de genes que contribuyen a la colonización bacteriana (Kay, Hahn, Marois, Hause, & Bonas, 2007). Contienen dominios de unión al ADN compuestos por una serie de dominios de repetición de 33 a 35 aminoácidos que reconocen, cada uno, un solo par de bases. La especificidad de los TALE está determinada por dos aminoácidos hipervariables que se conocen como los "di-residuos de repetición variable" (RVD) (Gaj et al., 2013).

Al igual que los dedos de zinc, las repeticiones modulares de TALE se unen entre sí para reconocer secuencias de ADN contiguas. Sin embargo, a diferencia de las proteínas de dedos de zinc, no es necesaria una reingeniería del enlace entre las repeticiones necesarias para construir matrices largas de TALE con la capacidad de dirigirse a sitios individuales en un genoma (Gaj et al., 2013).

Los efectores TAL existentes se emplearon por primera vez para manipular el ADN genómico en plantas (Kay et al., 2007). La especificidad de unión al ADN está determinada por los RVD con A, C, G, T reconocidos por NI (Asn Ile), HD (His Asp), NN (Asn Asn) / NK (Asn Lys) y NG (Asn Gly), respectivamente. Además, otra característica común de los efectores TAL naturales es que siempre comienzan con una repetición que reconoce T en el extremo 5' de sus secuencias de unión (Boch et al., 2009; Bogdanove & Voytas, 2011). La especificidad bien descifrada de los RVD para sus nucleótidos diana hace posible desarrollar herramientas de edición del genoma basadas en TALEs. Al fusionar la nucleasa *FokI* con un TALE artificial para crear un TALEN específico, se obtiene una poderosa herramienta de edición genómica capaz de funcionar en una amplia gama de sistemas modelo y células humanas cultivadas. Un solo TALEN consiste en un dominio N-terminal que incluye una señal de localización nuclear, un dominio central compuesto típicamente de repeticiones TALE en

tándem para el reconocimiento de una secuencia de ADN específica (para TALEN naturales la longitud del ADN la secuencia diana suele ser de 17 a 18 pares de bases, y para los TALEN artificiales, suele ser de 14 a 20 pares de bases), y un dominio C-terminal formado por el dominio de restricción funcional de la endonucleasa *FokI*. *FokI* funciona de forma dimérica, y por lo tanto se necesitan un par de TALENs para hacer un corte en un sitio particular del genoma mediante DSB. El par de TALEN diseñados se une a sus secuencias de ADN diana que flanquean un ADN espaciador (generalmente de 14 a 18 pb), lo que facilita la heterodimerización de *FokI*. El dímero *FokI* corta el genoma en un sitio específico. Alternativamente, las DSB mediadas por TALEN también pueden estimular la ruta de HR en presencia de ADNs donantes homólogos, permitiendo la inserción específica de sitio de una secuencia de ADN exógena (Bedell et al., 2012; J. C. Miller et al., 2011; Zu et al., 2013), o un reemplazo preciso de un nucleótido endógeno "no deseado" con un nucleótido deseado o corregido en su lugar (C. Wei et al., 2013).

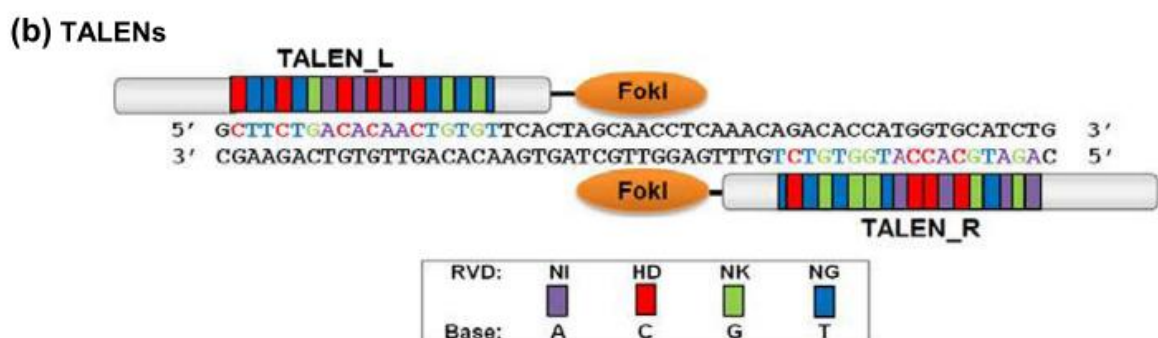


Figura 4. Mecanismo de acción de TALENs mediante la unión de sus RVD a cada nucleótido y acción de la endonucleasa de restricción *FokI* (al igual que en ZFNs) para la edición de genomas (Chandrasegaran & Carroll, 2016).

4. EL SISTEMA CRISPR/Cas

4.1 Descubrimiento

El descubrimiento de las secuencias CRISPR se atribuye al microbiólogo español Francisco Juan Martínez Mojica, quien, en 1989 comenzó a trabajar en un grupo de investigación que se dedicaba a estudiar el microorganismo perteneciente al grupo de las archeas *Haloferax mediterranei*. Se trata de un

microorganismo extremófilo, tolerante a las altas concentraciones de sal que se dan en las salinas de Santa Pola (Alicante).

El grupo detectó que la concentración de sal posiblemente influía en la forma en la que las enzimas de restricción cortaban el genoma de estos microorganismos y Mojica se dedicó a ver qué ocurría con estas secuencias de ADN que se cortaban de forma anómala. En el primer fragmento que caracterizó observó una estructura hasta ese momento desconocida en el resto de bacterias. Se trataba de muchas copias de una misma secuencia que se repetían, con una longitud de unos 30 pares de bases cada una y separadas entre sí por espaciadores de unas 36 pares de bases. Además, eran secuencias palindrómicas (M., G., & F., 1993).

Tras este primer contacto, Mojica comenzó a investigar con otros microorganismos como *Haloferax volcanii* y otras arqueobacterias halófilas relacionadas, observando secuencias similares. Además descubrió que este tipo de repeticiones también aparecían en eubacterias (*E. coli*) apoyándose en un estudio de un grupo japonés de unos años atrás (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura, & Nakata, 1987). Con estos datos, Mojica fue el primero en vislumbrar la importancia de este hallazgo y pensó que si estas repeticiones aparecían tanto en arqueas como en eubacterias, debían tener una función importante (FJM, C, G, & F, 1995).

Después de esto, Mojica, por falta de presupuesto, comenzó a estudiar estas repeticiones mediante bioinformática, encontrándolas en muchos otros microorganismos (F. J M Mojica, Díez-Villaseñor, Soria, & Juez, 2000). Finalmente, se decidió darles el nombre de *Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas* o CRISPR, por sugerencia de Mojica tras alguna nomenclatura anterior que no se adaptaba a sus características (Jansen, Embden, Gaastra, & Schouls, 2002; Francisco J. M. Mojica & Garrett, 2013).

Asociados a CRISPR se observó la presencia de unos genes, Cas, que se relacionaban con las funciones de las secuencias (Jansen et al., 2002). Posteriormente se postularon diversas hipótesis sobre las funciones de estas

secuencias, aunque ninguna de ellas se sustentaba demasiado en pruebas fehacientes hasta que finalmente, y tras varios años de estudio de las secuencias y de sus espaciadores, Mojica dio con la clave, en un lugar CRISPR que había secuenciado recientemente a partir de una cepa de *E. coli*, uno de los espaciadores coincidía con la secuencia de un fago P1 que infectaba a muchas cepas de *E. coli*: Sin embargo, se sabía que, en particular, ese espaciador era resistente a la infección por P1 y propuso que se trataba de un sistema inmune adaptativo de las bacterias frente a patógenos y que los *loci* CRISPR debían codificar las instrucciones para ello (Francisco J.M. Mojica, Díez-Villaseñor, García-Martínez, & Soria, 2005).

4.2 Funcionamiento en la naturaleza

El funcionamiento de CRISPR/Cas en la naturaleza para dotar a la bacteria de inmunidad frente a virus u otros patógenos de índole genética, como plásmidos, se divide en tres partes o procesos (Figura 5). Hay que tener en cuenta que en cada sistema CRISPR/Cas, las proteínas características de cada uno realizarán sus funciones acordes a cada sistema, dichas funciones de las proteínas Cas vienen comentadas en el apartado 4.2.2.

- Fase adaptativa: en esta primera fase, las enzimas del sistema CRISPR toman los PAM (motivo adyacente de protoespaciador) procedentes del material genético exógeno y lo adquieren como propio en su propio genoma. Así, este material queda fijado en la bacteria y hace posible el reconocimiento de este ADN en una infección posterior.

- Fase de expresión: en esta fase, se transcribe el ADN que anteriormente se insertó en el genoma y las proteínas Cas correspondientes serán las encargadas de formar el crARN mediante cortes en este material genético.

- Fase de interferencia: por último, el crARN actúa como ARN guía para el ADNcomp y los PAM, para que se de la unión del sistema CRISPR/Cas al ADN exógeno promulgando así su corte en un lugar específico y evitando un nuevo

ataque del agente externo. (Gasiunas, Barrangou, Horvath, & Siksnys, 2012)(Hsu, Lander, & Zhang, 2014)

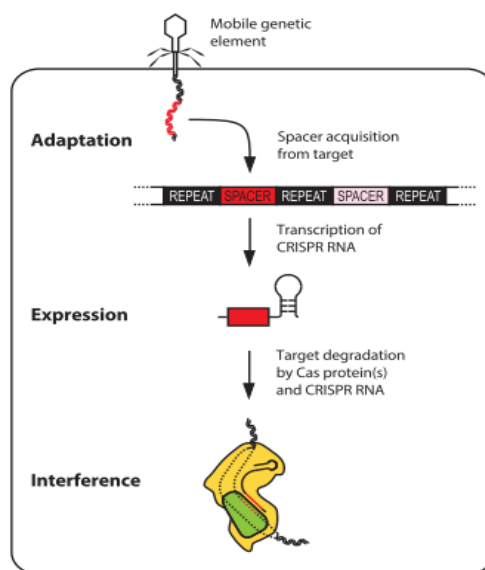


Figura 5. Pasos clave de la inmunidad mediada por CRISPR/Cas. 1) Adaptación: inserción de nuevos espaciadores en el locus CRISPR. 2) Expresión: transcripción del locus CRISPR y procesamiento del crARN. 3) Interferencia: detección y degradación de elementos genéticos móviles por cfARN y proteínas Cas (Rath, Amlinger, Rath, & Lundgren, 2015a).

4.3 Tipos de sistemas CRISPR/Cas

Los sistemas CRISPR/Cas son muy diversos, ya que cada bacteria y cada arquea tiene el suyo propio. Estos sistemas se clasifican y diferencian según las características específicas de las nucleasas. Se pueden dividir en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III.

En el **tipo I** todos los *loci* contienen el gen Cas3 (lo que los diferencia del resto), que codifica una proteína grande con actividad helicasa y actividad ATPasa acoplada al desenrollado de los dúplex ADN-ADN y ARN-ADN (Sinkunas et al., 2011). Dentro de este grupo existe una división en subtipos (seis en concreto) que va desde I-A a I-F (dentro de estos subtipos están apareciendo nuevos subtipos) y que se diferencian por presentar diferentes variantes de genes Cas. Normalmente, los sistemas de tipo I están codificados por un solo operón que contiene los genes Cas1 y Cas2, los genes para las subunidades del complejo efector o Cascada (que es el que se une a crARN y localiza el objetivo cuando se pone en funcionamiento), los genes Cas5 y Cas7, y el gen Cas6, que se

encarga de la transcripción del pre-crARN. Este complejo necesita que todos los genes Cas funcionen conjuntamente para operar. Cada gen en los operones del sistema de tipo I suele estar presente en una sola copia (Makarova & Koonin, 2015).

El **tipo II** se caracteriza por que su gen diferencial es Cas9, que codifica una proteína multidominio que combina todas las funciones de los complejos efectores y la escisión del ADN diana, y es esencial para la maduración del crARN, que a su vez se produce por acción de un trans-activador (tracrRNA) que es complementario a las repeticiones en el pre-crARN (Martin Jinek et al., 2012). Lo más importante es que sólo una endonucleasa, Cas9, es la responsable del corte después de ser guiada al DNA exógeno por el crARN-tracrARN.

Cada locus CRISPR/Cas de este subtipo, además del gen Cas9, también contiene los genes Cas1 y Cas2. Además de estos tres genes codificadores de proteínas, la gran mayoría de los loci de tipo II también abarcan uno o dos genes para el tracrARN, un ARN que es parcialmente homólogo asociado al CRISPR (Chylinski, Makarova, Charpentier, & Koonin, 2014). Estos sistemas utilizan la RNasa III celular (no codificada dentro de los loci CRISPR-Cas) y el tracrARN para el procesamiento del pre-crARN. La proteína Cas9 grande (~ 800–1,400 aminoácidos) contiene dos dominios con actividad nucleasa. A saber, la nucleasa de tipo RuvC y el dominio de nucleasa HNH (similar al complejo efector del tipo I), que se encuentra en el centro de la proteína. Ambas nucleasas son necesarias para la escisión del ADN (Makarova & Koonin, 2015).

Se han conseguido varias estructuras cristalinas para este segundo tipo de sistema CRISPR/Cas9, incluida una con un ARN guía artificial (sgARN) y un ADN diana que se pueden utilizar para la modificación de genomas. Se ha demostrado que Cas9 forma una estructura de dos lóbulos, con el ADN diana y el sgARN posicionados en la interfaz entre los dos lóbulos. Dos bucles en ambos lóbulos contribuyen al reconocimiento de la PAM (Protospacer adjacent motif). Un grupo de arginina conservado en el extremo N de Cas9 pertenece a una hélice puente que es crítica para el sgARN: reconocimiento de ADN (Nishimasu et al., 2014). La parte de la proteína Cas9 que incluye tanto los dominios con función nucleasa,

como el grupo rico en arginina, probablemente se originó a partir de genes móviles que no están asociados con repeticiones CRISPR (Chylinski et al., 2014). Los sistemas CRISPR/Cas Tipo II se clasifican a su vez en tres subtipos (II-A, II-B y II-C).

El tipo **III** se caracteriza por el gen Cas10, que codifica una proteína multidominio con función de efector en el sistema. Dentro de la estructura de Cas10 se han identificado cuatro dominios distintos: un dominio tipo N-terminal de ciclase, un dominio helicoidal que contiene el motivo en forma de clave de sol de unión a Zn, un dominio que conserva los residuos catalíticos y se predice que estarán activos, y un dominio hélice alfa C-terminal que se asemeja al dominio del pulgar de la ADN polimerasa de la familia A y Cmr5, una pequeña proteína alfa helicoidal presente en algunos de los sistemas CRISPR-Cas de tipo III (Cocoziak et al., 2012). Este sistema usa Cas6 para fabricar el pre-crARN. Las proteínas Cas se destinan a los complejos Csm (tipo III-A) o Cmr (tipo III-B), que son similares a las proteínas Cascada del tipo I. Los subtipos de loci III-A poseen Cas1, Cas2 y Cas6 y se dirigen al ADN (Makarova, Wolf, & Koonin, 2018), mientras que la mayoría de los sistemas III-B carecen de estos genes y, por lo tanto, dependen de otros sistemas CRISPR-Cas presentes en el mismo genoma. Se ha demostrado que los sistemas de tipo III-B CRISPR-Cas se dirigen al ARN (Makarova & Koonin, 2015; Spilman et al., 2013).

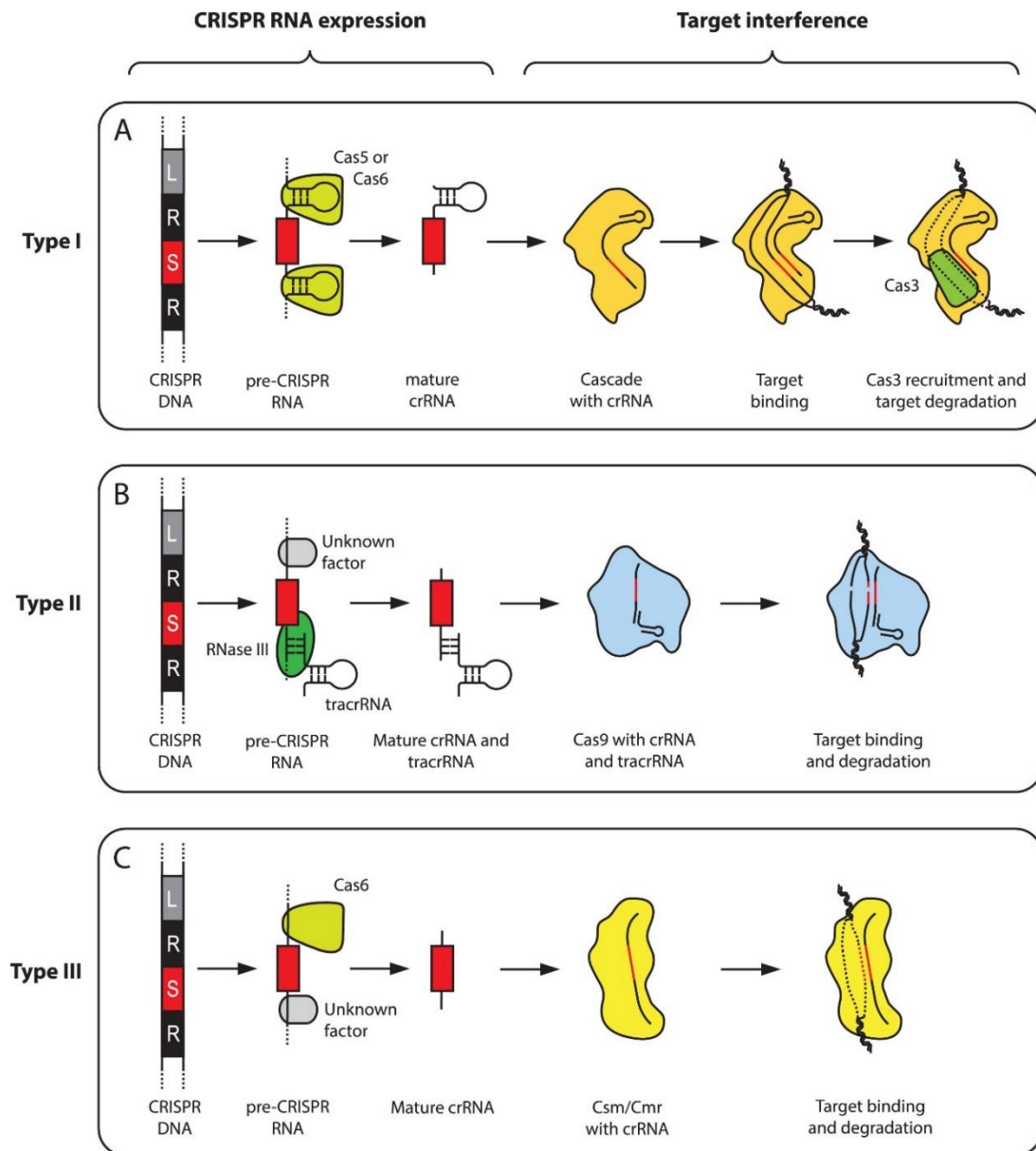


Figura 7. Funcionamiento de los tres tipos de sistemas CRISPR/Cas desde la expresión génica del crARN al reconocimiento de la secuencia diana y actuación de las proteínas Cas: Tipo I (A), Tipo II (B) y Tipo III (C) (Rath, Amlinger, Rath, & Lundgren, 2015b)

4.4 Componentes del sistema CRISPR/Cas

4.4.1 Secuencias CRISPR

Como se ha comentado con anterioridad, las secuencias CRISPR (*Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas*), son secuencias de ADN que aparecen en el genoma de gran parte de bacterias, y proceden de contactos con sistemas genéticos móviles como plásmidos y virus. Tras infectar a las bacterias, su ADN es insertado por estas en su propio genoma

como mecanismo de defensa inmune que les permite defenderse frente a una nueva infección gracias al reconocimiento por complementariedad de bases, cuando ese ADN exógeno, con el que la bacteria ya estuvo en contacto, vuelve a aparecer en el sistema (Lander, 2016).

4.4.2 Proteínas Cas

Las proteínas Cas son enzimas producidas tras la expresión de los genes del mismo nombre. Generalmente tienen función nucleasa, es decir, cortan el ADN de forma específica, guiadas por secuencias de ARN guía (sgARN). Están asociadas a las secuencias CRISPR y cumplen las diferentes funciones de regulación y degradación de material genético exógeno.

Podemos dividir estas proteínas en varios grupos según la función que desempeñan en el proceso. Así, encontramos tres tipos:

- Adaptativas: dentro de este grupo encontramos Cas1, Cas2 y Cas4 (en ocasiones), las cuales forman un complejo para realizar esta función. Cas1 tiene función RNasa y corta sitios específicos en las secuencias CRISPR. Su eliminación en *E. coli* da como resultado un aumento de la sensibilidad al daño del ADN y un deterioro de la segregación cromosómica (Babu et al., 2011). La función específica de Cas2 no se conoce exactamente, aunque tiene actividad RNasa específica a regiones ricas en U y DNasa de doble cadena. Pese a ello, se cree que tiene un papel fundamental en el proceso ya que el complejo Cas1-Cas2 aparece en todos los tipos de sistemas CRISPR/Cas (Nuñez et al., 2014)(Makarova & Koonin, 2015).

- De expresión: en este grupo se encuentran Cas6 (tipos I y III), RNasa III (tipo II) y Csm2, Csm3 y Csm5 (tipo III) (Francisco J. M. Mojica & Garrett, 2013). Cada uno aparece en un sistema CRISPR distinto, pero cumplen función de creación y maduración del crARN por su actividad endorribonucleasa (Jore et al., 2011)(Makarova & Koonin, 2015).

- Interferentes: aquí encontramos a Cas3, Cas4, Cas5, Cas7, Cas8 (pertenecientes al sistema CRISPR tipo I), Cas9 (tipo II) y las proteínas Csm

(subtipo III-A) y Csr (subtipo III-B) (Francisco J. M. Mojica & Garrett, 2013). Con respecto a su papel, Cas5 y Cas7 forman parte del complejo Cascada del tipo I e interactúan uniéndose al crARN. También pertenece al complejo Cascada Cas8, que actúa en este caso en el reconocimiento de PAM. Cas4 posee actividad de exonucleasa 5'-ssDNA, Cas3 es nucleasa de ADN monocatenario con dominio HD y helicasa dependiente de ATP. Todas estas proteínas trabajando conjuntamente hacen funcionar los sistemas de corte de dianas de tipo I (Brouns et al., 2008). Las proteínas Csm y Cmr realizan una función análoga al complejo cascada en los sistemas de tipo III. En cuanto a la función de Cas9, se basta sola para generar crARN y para escindir el DNA diana, aunque requiere la ayuda de un gen de mantenimiento que codifica la RNasa III y un gen especial tracrARN codificado en los respectivos locus CRISPR/Cas. Tanto los dominios de nucleasa RuvC como HNH de Cas9 están implicados en la escisión del ADN diana (Martin Jinek et al., 2012)(Makarova & Koonin, 2015).

Table 1.2 Summary of core Cas proteins associated with the different functional steps

Protein	CRISPR-Cas type	Evidence	Reference
<i>Acquisition</i>			
Cas1	All	Genome analyses and genetics	Makarova et al. 2011
Cas2	All		Garrett et al. 2011
Cas4	All		Yosef et al. 2012
<i>Expression</i>			
Cas6	I, III-A, III-B	Crystal structures—type I and IIIB	Haurwitz et al. 2010 Wang et al. 2011
RNAse III (host)	II	Biochemical	Deltcheva et al. 2011
Csm2, Csm3 and/or Csm5	III-A	Biochemical	Hatoum-Aslan et al. 2011
<i>Interference</i>			
Cas5, Cas6, Cas7, Cas8	I	Biochemical 3D reconstruction	Brouns et al. 2008 Jore et al. 2011
Cas3	I	Crystal structure	Beloglazova et al. 2011 Sinkunas et al. 2011 Wiedenheft et al. 2011
Cas9	II	Biochemical	Barrangou et al. 2007 Sapranauskas et al. 2011
Csm1–5	III-A	Genome analyses	Marraffini and Sontheimer 2008
Cmr1–6 or Cmr1–7	III-B	Biochemical Crystal structure	Hale et al. 2009 Zhang et al. 2012

Figura 6. Tipos de proteínas Cas con el tipo de sistema CRISPR/Cas al que pertenecen (I, II o III y sus subtipos) y función que desempeñan (Francisco J. M. Mojica & Garrett, 2013).

Se han descubierto varios tipos nuevos de proteínas asociadas a CRISPR de polipéptido único, es decir, Cas12a / Cpf1 y Cas13a / C2c2. Estos sistemas adicionales tienen características novedosas de estructura y función (como la

ausencia de necesidad de un tracrARN para procesar su propio crARN o la generación de extremos escalonados 17–18 nucleótidos distales desde el PAM) que proporcionan grandes oportunidades para la edición del genoma (Bak, Gomez-Ospina, & Porteus, 2018; Wu, Lebbink, Kanaar, Geijssen, & van der Oost, 2018).

5. APLICACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/Cas9 A LA EDICIÓN DIRIGIDA DE GENOMAS

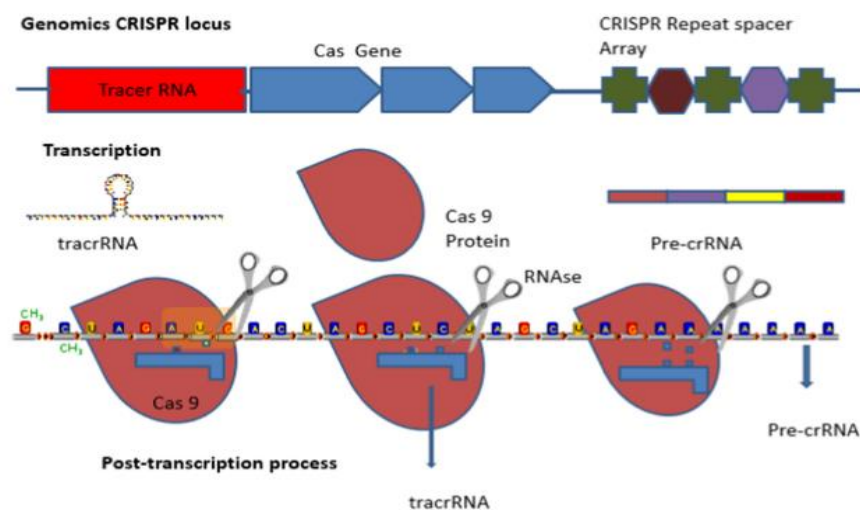
5.1 Funcionamiento

La aplicación del sistema CRISPR/Cas9 a la edición genómica en eucariotas vino determinada por su sencillez, que permite incluso trabajar *in vivo*. El tipo de sistema CRISPR/Cas seleccionado procede generalmente de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (Charlesworth et al., 2018). Perteneció al grupo de los sistemas de tipo II y es el que se utiliza para la edición genética debido a su sencillez (solo necesita una nucleasa para realizar la actividad) y adaptabilidad para moldearlo con este fin. Está compuesto por la proteína Cas9 (endonucleasa) y un ARN guía (sgARN de cadena simple y pequeño tamaño, formado a su vez por dos componentes: crARN y tracrARN unidos en una molécula) que conduce a la proteína Cas9 hacia la secuencia diana que deseamos modificar. Ambos forman el complejo CRISPR/Cas9 (M. Jinek et al., 2012).

La especificidad de la orientación de Cas9 se determina por los primeros 20 nucleótidos en el extremo 5' de una molécula de sgARN, que se puede cambiar fácilmente para apuntar a cualquier locus deseado. El ARN guía cargado en Cas9 se une a su secuencia diana complementaria solo si es seguido inmediatamente por el protoespaciador del motivo adyacente (PAM), que es 5'-NGG-3' (base nitrogenada cualquiera-guanina-guanina) para la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Una vez formado el complejo y reconocido el ADN que se quiere modificar por el sgARN, Cas9 produce un corte de la doble cadena de ADN en lugares concretos de la secuencia (Tadić, Josipović, Zoldoš, & Vojta, 2019). Tras esta escisión, hay dos sistemas de reparación de DSB que COMPITEN para corregir ese corte:

- NHEJ (unión de extremos no homólogos): esta vía es la que la célula usa como prioritaria para la corrección de roturas de doble hebra, aunque en la reparación de la rotura la célula es propensa a producir otro tipo de errores. Así, puede dejar mutaciones en forma de *Indels* (inserción/delección). El NHEJ puede aprovecharse para obtener *knockouts* genéticos, ya que los *indels* que ocurren dentro de un exón codificador pueden conducir a mutaciones de cambio de pauta de lectura y codones de parada prematura (Lin, Staahl, Alla, & Doudna, 2014).

- HDR (reparación dirigida por homología): es la vía de reparación de DSB de ADN alternativa. A pesar de que la reparación HDR suele ocurrir con menor frecuencia que NHEJ, se puede aprovechar para generar modificaciones precisas y definidas en un lugar diana en presencia de una plantilla de reparación introducida de forma exógena. La plantilla de reparación puede estar en forma de construcciones de ADN de doble cadena convencionales con brazos de homología que flanquean la secuencia de inserción, o bien oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla (ssADN). Este último tipo proporciona un método eficaz y simple para realizar pequeñas ediciones en el genoma, como la introducción de mutaciones de un solo nucleótido para investigar variaciones genéticas causales. La HDR generalmente está activa solo durante la división de las células, y su eficiencia puede variar ampliamente según el tipo y el estado de la célula, así como el locus genómico y la plantilla de reparación empleada (W. Hussain et al., 2019).



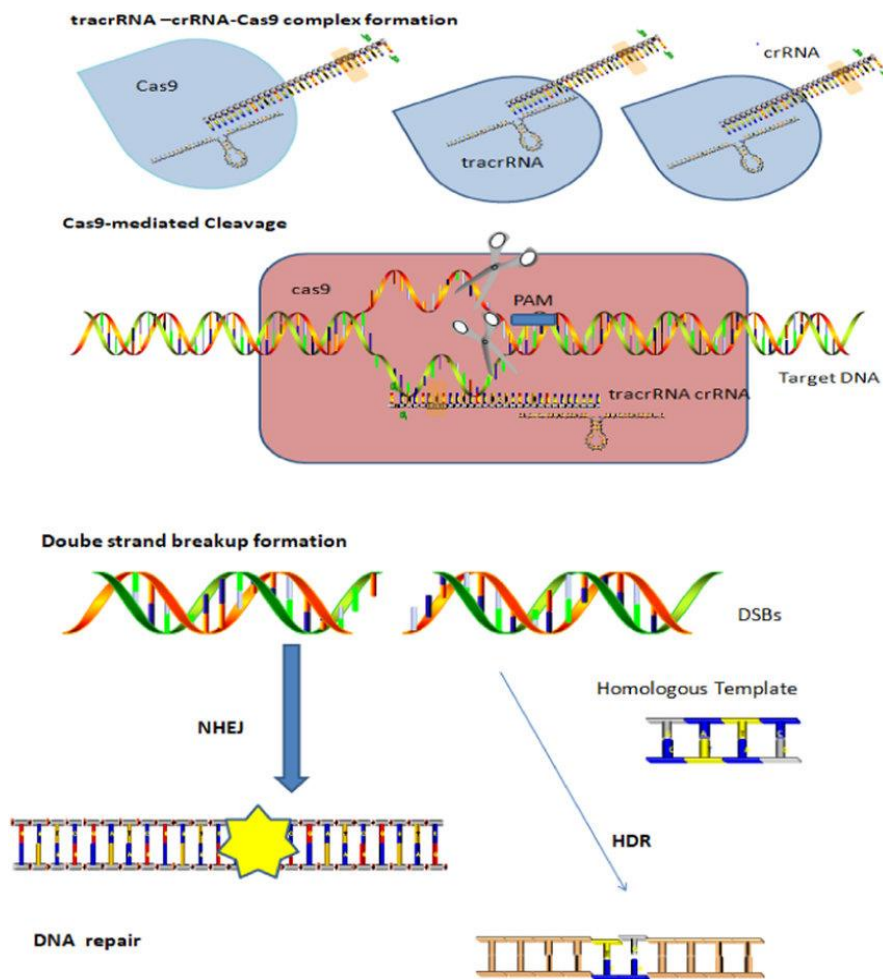


Figura 8. Biología general del sistema de edición del genoma de CRISPR/Cas. La expresión de este locus del genoma da lugar a a transcripción de tracrRNA, pre-crRNA y la enzima Cas 9. Todas ellas se combinan y forman un pre-crRNA y tracrRNA el dúplex, que conduce a Cas9 para generar una ruptura de doble cadena en los sitios diana. La formación de DSB puede repararse mediante HDR o NHEJ (W. Hussain et al., 2019).

5.2 Aplicaciones de CRISPR/Cas9

5.2.1 Inserciones o deleciones de nucleótidos: “Indels”

Como se ha comentado con anterioridad, la reparación de DSB está mediada por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por reparación dirigida por homología (HDR) (W. Hussain et al., 2019). El NHEJ es un mecanismo activo y propenso a errores donde los fragmentos de ADN aleatorios se alinean con ambos extremos de la DSB y se unen por la maquinaria de reparación endógena. La NHEJ puede dar lugar a pequeñas inserciones o eliminaciones de nucleótidos (*indels*) en la región de la DSB, que a su vez puede originar una gran cantidad de inserciones, eliminaciones o mutaciones de cambio en el marco de lectura

(Waters et al., 2014). Estas mutaciones derivadas de los DSB inducidos por Cas9 pueden ser beneficiosas cuando se intenta lograr la eliminación en el gen diana, ya que los *indels* a menudo dan como resultado codones de parada prematuros y, en consecuencia, hacen que el gen sea inoperante. Sin embargo, las NHEJ son demasiado aleatorias e impredecibles, lo que las hace poco adecuadas en la generación de ediciones de una sola base o en la inserción de secuencias específicas (Chandrasegaran & Carroll, 2016).

La HDR aparece, por tanto, como un método más preciso para la reparación de DSB y la incorporación o eliminación de secuencias específicas después de la actuación de Cas9. Al contrario que NHEJ, HDR requiere una plantilla de ADN que contenga la secuencia que se enviará a la célula, junto con Cas9 y el gARN (Pardo, Gómez-González, Aguilera, & Vespucio, 2009). Para que el HDR actúe correctamente, ambos extremos de la plantilla deben ser homólogos a la región terminal de la DSB y la secuencia PAM debe estar ausente de la plantilla de reparación para evitar la separación de la secuencia insertada y Cas9. Finalmente, por la alta eficiencia de la actividad de Cas9 y la prevalencia de NHEJ ante HDR, el aislamiento y la amplificación de la secuencia deseada son de suma importancia para mejorar la eficiencia *in vitro* de HDR (Loureiro & da Silva, 2019).

5.2.2 Inversiones y translocaciones cromosómicas

Realizando estudios sobre las modificaciones *off-target* se observó que estas en ocasiones causan reordenamientos cromosómicos tales como translocaciones, deleciones e inversiones, planteando así la posibilidad de editar cromosomas completos y no solo en genes individuales. Los reordenamientos cromosómicos dirigidos se demostraron por primera vez utilizando ZFNs, cuando en 2009 se realizaron translocaciones cromosómicas en células humanas utilizando dos ZFN dirigidos a dos cromosomas diferentes para el estudio del cáncer (Brunet et al., 2009). Más tarde, también con ZFN, se indujeron grandes deleciones cromosómicas, duplicaciones e inversiones en un cromosoma (Brunet et al., 2009). Dado que, por ejemplo, dos grandes inversiones cromosómicas que alteran el gen F8 son responsables de casi la mitad de los casos graves de hemofilia A, se ha usado CRISPR/Cas9 para revertir los segmentos

cromosómicos invertidos a la orientación normal en células madre pluripotentes inducidas en humanos, y así corregir la enfermedad (Park et al., 2015). Por otro lado, en ocasiones es posible corregir funcionalmente las mutaciones genéticas mediante modificaciones cromosómicas dirigidas. Este es el caso las reparaciones inducidas por Cas9 del gen de la distrofina, causante de la distrofia muscular de Duchenne humana, y que dieron como resultado la producción de distrofina funcional, mejorando así el diagnóstico (Young et al., 2016). La generación de este tipo de reordenamientos cromosómicos dirigidos utilizando nucleasas programables ofrece una forma poderosa de estudiar la función de las variaciones en el número de copias o las variaciones estructurales encontradas en los genomas humanos y corregir defectos genéticos causados por reordenamientos cromosómicos aberrantes, que se ha demostrado que causan muchos trastornos genéticos innatos, enfermedades y cánceres (Kim, 2016).

5.2.3 Terapia génica

En terapia génica se intenta combatir enfermedades mediante la inserción de genes *in vivo* en los pacientes. Se trata de un campo controvertido por el desconocimiento de los posibles efectos secundarios que puede causar este tipo de técnica. En este área, los vectores de AAV (virus adeno-asociados) son los más utilizados para la terapia génica somática debido a su baja respuesta inmune, su falta de patogenicidad y su capacidad para atacar a las células que no se dividen (Tadić et al., 2019). El gran tamaño de SpCas9 hace que su uso en terapia génica basada en AAV aun sea un problema, especialmente cuando se necesitan secuencias promotoras, señales de localización, ADN donador o sgARN extras. Así, entra en juego SaCas9, que tiene una secuencia codificadora aproximadamente 1 kb más corta que SpCas9, lo que permite su empaquetamiento en vectores basados en AAV para la edición de genes (Ran et al., 2013). Usando este enfoque de AAV y SaCas9, se indujo de manera eficiente la formación de *indels* de más del 40% del gen Pcsk9 (proprotenina convertasa subtilisina/kexina tipo 9), regulador de colesterol en el hígado de ratón, después de 1 semana de tratamiento, lo que provocó una caída del 95% en los niveles de Pcsk9 sérico y una caída del 40% en el colesterol total (Ran et al., 2013). También existen métodos no virales para administrar plásmidos que

codifican Cas9 o Cas9 mRNA en células y tejidos animales. Los vectores que contienen Cas9 pueden introducirse en animales adultos a través de inyecciones hidrodinámicas, lo que conduce a correcciones genéticas eficaces o mutaciones (Mout, Ray, Lee, Scaletti, & Rotello, 2017). Otra opción es el uso de Cas9-sgARN ribonucleoproteínas purificadas (RNPs), que permiten una acción rápida del complejo RNP en el núcleo y una duración más corta de la presencia de nucleasa Cas9 en las células, aumentando así la eficiencia y reduciendo la efectos *off-target*. El uso de RNP también evita las alteraciones genómicas no deseadas que pueden ocurrir al usar otros métodos de administración de nucleótidos (Lin et al., 2014). Se pueden introducir mediante microinyecciones, electroporación y transfección mediada por lípidos. Por ejemplo, usando electroporación para introducir complejos Cas9-sgARN en células primarias y células madre embrionarias, se ha observado que estos pueden inducir mutaciones de genes dirigidos y grandes eliminaciones de cromosomas al tiempo que minimizan los efectos *off-target* (X. Xu et al., 2018).

En lo que a terapia contra el cáncer se refiere, tenemos el ejemplo del uso de una nanopartícula de ADN, denominada ``nanoclew'', para entregar un complejo Cas9 RNP en células U2OS para la edición de genes. Utilizando ``nanoclews'' se administró el complejo Cas9-sgRNA *in vivo*, editando con éxito una proteína verde fluorescente (GFP) integrada en el genoma en el 25% de las células tumorales U2OS, que se habían realizado mediante un xenoinjerto en ratones para observar el desarrollo de tumores (Sun et al., 2015).

5.2.4 ``Imaging''

Otra de las aplicaciones de este sistema son las imágenes basadas en Cas9, que combinan las ventajas de las interacciones de nucleótidos y las interacciones proteína-ADN para marcar *loci* genómicos concretos. En uno de los primeros estudios de esta aplicación, se fusionó Sp dCas9 con GFP (proteína verde fluorescente) para visualizar la dinámica de los *loci* genómicos de las secuencias codificantes y no codificantes en células humanas vivas. En este estudio, se rastrearon dinámicamente los *loci* genómicos repetitivos durante el ciclo celular utilizando un único ARNg. Un locus genómico no repetitivo también se puede

etiquetar mediante el uso simultaneo de varios sgARNs que forman el *locus* para poder ver así el conjunto de este (Chen et al., 2013). Tras este primer estudio, se han realizado variaciones y modificaciones distintas para mejorar y expandir las imágenes genómicas basadas en Cas9, como por ejemplo la combinación de imágenes genómicas mediadas por dCas9 con la matriz de péptidos SunTag (sistema de etiquetado de proteínas para la amplificación de la señal, que consiste en una serie de péptidos repetitivos y una proteína de fusión de anticuerpos, que se pueden unir entre sí) para amplificar la señal fluorescente generada por cada dCas9 (Tanenbaum, Gilbert, Qi, Weissman, & Vale, 2014), o el desarrollo de imágenes genómicas multicolor usando dCas9s ortogonales marcados con diferentes proteínas fluorescentes (FP). Concretamente, en este trabajo se marcaron con FP de diferentes colores Sp dCas9, Nm dCas9 y St1 dCas9 y se dirigieron a distintos *loci* genómicos por sus correspondientes sgARNs. Debido a que los tres dCas9s reconocen distintas sgRNAs y secuencias PAM, este sistema proporcionó una herramienta para rastrear simultáneamente la dinámica de múltiples *loci* genómicos (Ma et al., 2015).

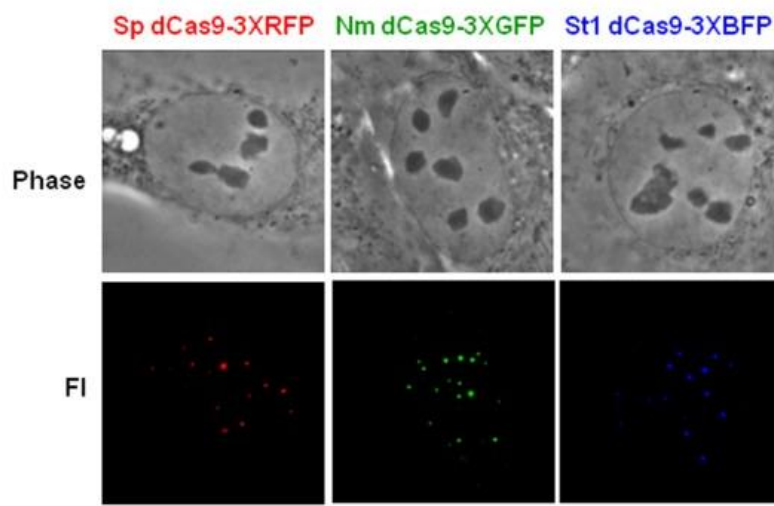


Figura 9. sgRNAs y secuencias PAM diseñadas para unirse a telómeros por cada uno de los ortólogos dCas9 Sp, Nm y St1. Las figuras superiores son imágenes obtenidas mediante contraste de fase y debajo se muestran las señales fluorescentes para los telómeros en células U2OS humanas que expresan los dCas9-FP indicados y los sgRNA afines (Ma et al., 2015).

5.2.5 Modificaciones epigenéticas

Las proteínas de unión a ADN específicas de secuencia pueden reclutar modificadores epigenéticos para remodelar el epigenoma en sitios concretos.

Estudios previos demuestran que ZFN y las TALE, unidas a modificadores epigenéticos, son capaces de alterar diferentes marcas epigenéticas en zonas concretas del ADN produciendo así cambios en la expresión génica (Rivenbark et al., 2012; Thakore et al., 2015).

La realización de modificaciones epigenéticas mediante el sistema CRISPR/Cas9 se basa en la unión de estas enzimas modificadoras del epigenoma a dCas9 inactivado (mutación D10A en RuvC y H840A en el dominio de nucleasa HNH), y usarse para escribir o borrar específicamente ciertas marcas epigenéticas en secuencias diana (Tadić et al., 2019). Algunos estudios muestran cómo es posible modificar la expresión génica mediante cambios epigenéticos introducidos, por ejemplo, por la fusión dCas9-KRAB, que puede inducir la trimetilación de H3K9 (H3K9me3) cuando se dirige al potenciador HS2, suprimiendo así la expresión de genes de globina, regulados por dichos potenciadores HS2 (Thakore et al., 2015). Por otro lado, la fusión de Nm dCas9 con la histona desmetilasa LSD1, dirige este complejo a los potenciadores de genes (por ejemplo, Oct4, Tbx3), cruciales para mantener la pluripotencia en células madre embrionarias de ratón (mESCs), suprimiendo eficazmente la expresión de los genes controlados por los potenciadores específicos al disminuir el nivel de las marcas epigenéticas H3K4me2 y H3K27ac cerca de la región del “enhancer” Tbx3, causando también cambios en la morfología celular (Kearns et al., 2015).

Todos estos experimentos demuestran que es posible alterar la regulación de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas mediadas por proteínas de fusión dCas9, que no solo modifican el epigenoma de la zona diana mediante metilaciones o modificaciones de histonas, sino que pueden llegar a regular la expresión génica de genes relevantes que no estén necesariamente en la zona circundante. Pese a ello, esta técnica debe usarse con cautela ya que aún tenemos sobre la mesa los problemas de errores *off-target* que podrían causar otros problemas al huésped (Wang et al., 2016).

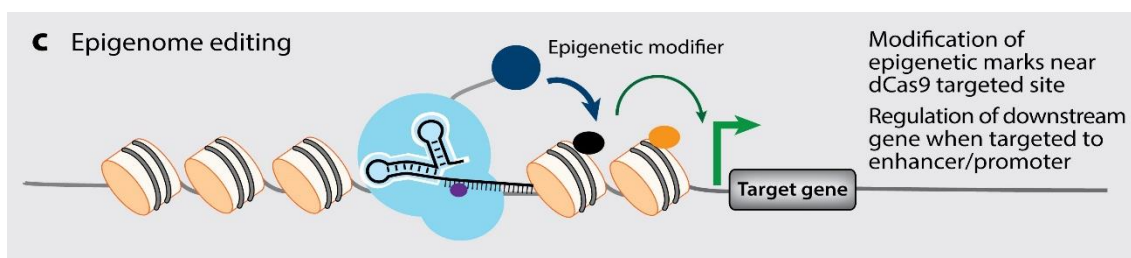


Figura 10. Aplicaciones de la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) en la edición de genes, la regulación de genes, la edición de epigenomas y las imágenes genómicas. (c) La modificación epigenética (Wang et al., 2016).

5.2.6 Edición múltiple del genoma

La edición simultánea de múltiples *loci* es necesaria cuando queremos introducir varios genes heterólogos a la vez. Tras la aparición del sistema CRISPR/Cas, aún pasó algún tiempo hasta que este tipo de manipulación fue posible, ya que es necesario el empleo de marcadores de selección para realizar este trabajo, además de necesitar de bastante más tiempo y herramientas. Inicialmente se utilizaron los sistemas CRISPR/Cas sin marcadores de selección, pero usando la nucleasa Cas9 nativa de *Streptococcus pneumoniae* y dos espaciadores expresados desde una matriz sintética integrada en el genoma (W. Jiang, Bikard, Cox, Zhang, & Marraffini, 2013). Se realizaron estudios con esta nucleasa en células de mamíferos y en microorganismos tanto procariotas como eucariotas usados en la industria microbiológica (Cong et al., 2013; P. Mali et al., 2013). Posteriormente se observó que la actividad de procesamiento de crARN de los recientemente descubiertos Cas12a aumenta la simplicidad de la edición múltiple del genoma. Al expresar una única matriz CRISPR que contiene múltiples espaciadores bajo la regulación transcripcional de un solo promotor y terminador, se pueden apuntar simultáneamente a múltiples *loci* (Zetsche et al., 2017). Estudios recientes han demostrado el potencial de edición múltiple de la endonucleasa Cas12a en una amplia gama de microorganismos (Adiego-Pérez et al., 2019).

5.2.7 Activación transcripcional (CRISPRa)

Para poder realizar esta técnica es necesario desactivar la actividad endonucleasa de la proteína Cas9 (dCas9) en el sistema CRISPR/Cas9. De este modo el sistema pierde su capacidad de generar DSB, pero aún puede reconocer y vincular al gen diana con el sgARN específico (Chavez et al., 2015; Prashant Mali et al., 2013; Saprunauskas et al., 2011). Teniendo esto en cuenta, si fusionamos los activadores transcripcionales apropiados al extremo C-terminal de dCas9, el sistema CRISPR/dCas9 puede activar la transcripción *in situ* del gen diana en el genoma (Gilbert et al., 2013; Maeder et al., 2013; Prashant Mali et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Solo debe seleccionarse una secuencia diana de 20 nucleótidos seguida por la secuencia de PAM para diferentes genes en este sistema, lo que simplifica su aplicación y selección a gran escala.

En líneas celulares de mamíferos destacan el sistema VP64-p65-Rta (VPR) (Chavez et al., 2015), y el sistema de mediador de activación sinérgica (SAM) (Konermann et al., 2015). Para el sistema VPR, los activadores transcripcionales VP64, p65 y Rta se fusionan al extremo C-terminal de dCas9 en un controlador de tándem que puede activar un gen diana guiado por el sgARN (Chavez et al., 2015). En el sistema SAM, se expresan dos proteínas de fusión con activadores transcripcionales apropiados, dCas9-VP64 y MCP-p65-HSF1. La proteína MCP puede reconocer los MS2loops en sgARN, y así estos dos activadores fusionados pueden ser reclutados en el gen diana con la ayuda del sgARN y finalmente lograr la activación transcripcional (Konermann et al., 2015). Tanto VPR como SAM son sistemas que se pueden usar para la construcción y selección genómica en líneas celulares de mamíferos, y han generado una serie de descubrimientos importantes. (R. G. Xu et al., 2019) (Figura 11).

5.2.8 Represión transcripcional (CRISPRi)

El sistema CRISPR/Cas9 también se puede utilizar para hacer todo lo contrario a lo expuesto en el punto anterior, la represión transcripcional (CRISPRi). En este caso, la transcripción se ve reprimida cuando la proteína dCas9 es guiada hacia el gen diana e impide el inicio o el alargamiento de la transcripción (Qi et al., 2013). La represión se puede optimizar fusionando los factores de represión

transcripcional con el extremo C-terminal de dCas9, de manera parecida a como se realiza en la activación transcripcional mediante CRISPRa.

Esta técnica se desarrolló por primera vez en *E. coli*, utilizando el complejo de reconocimiento de ADN dCas9-sgRNA (Qi et al., 2013). El dCas9-sgRNA se dirigió a un gen específico para interferir con el proceso de transcripción y, finalmente, reprimir la expresión del gen diana. Cuando se aplica directamente este complejo dCas9-sgRNA en células de mamíferos no se observó un efecto de represión evidente ya que la regulación transcripcional eucariota es un proceso mucho más complejo que en procariotas (Conaway, 2012). Para aumentar aún más la eficiencia del sistema CRISPRi y poder aplicarlo en células de mamíferos se optimizó el uso codónico de dCas9 y se probaron las proteínas de fusión dCas9 con diferentes factores represivos en su extremo C-terminal que pueden reclutar un complejo proteico represor e inhibir así la transcripción (Gilbert et al., 2013). La fusión de dCas9 con el dominio KRAB (caja asociada al gen Kruppel) de Kox1 da lugar a un silenciamiento significativo de la expresión de los genes diana similar a la eficiencia de silenciamiento producida por el ARNi (ARN de interferencia), no observándose efectos *off-target*. Esta técnica proporciona, por tanto, otro poderoso método de regulación de la expresión génica en células de mamíferos (Ecco, Imbeault, & Trono, 2017; Gilbert et al., 2013)(R. G. Xu et al., 2019) (Figura 11).

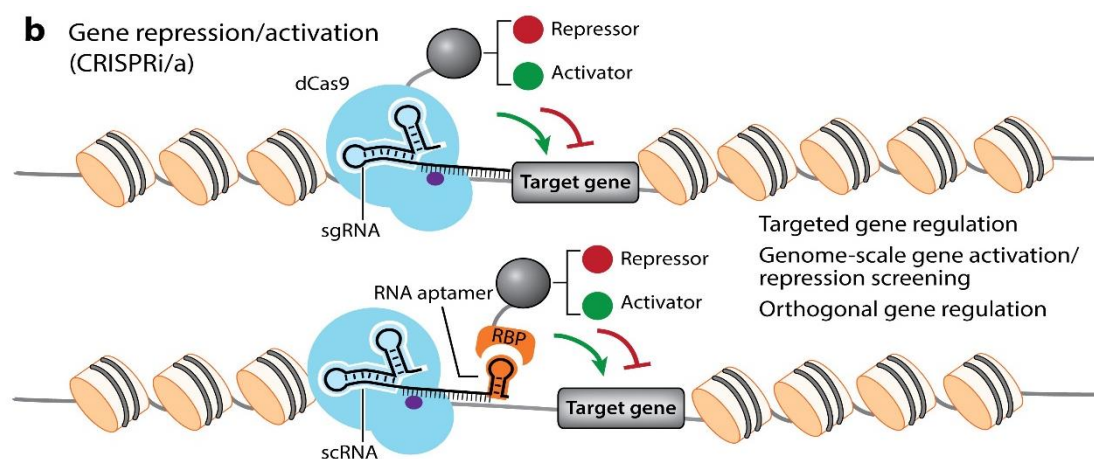


Figura 11. Aplicaciones de la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) en la edición de genes, la regulación de genes, la edición de epigenomas y las imágenes genómicas (b) Las herramientas basadas en nucleasa desactivada Cas9 (dCas9) se construyen para lograr la represión o la activación de genes específicos. Es decir, la interferencia CRISPR (CRISPRi) y la activación de CRISPR (CRISPRa) (Wang et al., 2016).

5.2.9 Generación de modelos animales

La fabricación de modelos animales con genomas editados que portan mutaciones genéticas responsables de una serie de enfermedades humanas para estudiarlas *in vivo* es otra de las útiles aplicaciones de este sistema CRISPR/Cas9. Estos modelos son útiles para investigar la patología de la enfermedad o para probar posibles tratamientos. Además, estos animales también se pueden usar para probar la capacidad de la edición de genes mediada por CRISPR/Cas9, para corregir una mutación que produce la enfermedad *in vivo*.

La tirosinemia tipo I, enfermedad genética grave que afecta a hígado, riñones y produce retraso mental, proporciona un ejemplo de este tipo de aplicaciones. La tirosinemia tipo I se debe a mutaciones en el gen *Fah*, que codifica la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa, ya que la pérdida de esta enzima conduce a la acumulación de metabolitos tóxicos que destruyen a los hepatocitos. La inyección hidrodinámica de un ADN donadormonocatenario más un vector de expresión Cas9 y sgARN en la vena de la cola de ratones puede dar lugar a la edición del gen mediada por CRISPR/Cas9 y producir la expresión del gen *Fah* corregido, al tiempo que conduce a la supervivencia y expansión de los hepatocitos rescatados. Es importante destacar que la edición del gen no se produjo en todos los hepatocitos, pero los hepatocitos editados al azar pudieron sobrevivir, crecer y posteriormente repoblar el hígado. Este estudio aprovecha una forma de selección positiva proporcionada por una edición de genes, y puede ofrecer un nuevo concepto para usar esta tecnología de manera efectiva *in vivo* (Yin et al., 2014).

Otro ejemplo lo proporciona la distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad muscular genética fatal, producida por deleciones que afectan al gen de la distrofina. Para tratar de curar esta enfermedad se utilizó un virus adeno-asociado (AAV) para administrar el sistema de edición CRISPR/Cas9 en el ratón con el objetivo de eliminar las secuencias de ADN nocivas y restaurar el marco de lectura del gen *Dmd* en cardiomiocitos y células madre musculares. Este tratamiento CRISPR mediado por AAV fue capaz de rescatar la estructura y función muscular, y demuestra el potencial terapéutico de CRISPR en

enfermedades humanas resultantes de mutaciones de un solo gen (Zuo et al., 2017).

También existen modelos generados para estudiar enfermedades producidas por virus, como el VIH. En concreto la técnica se utilizó para interrumpir la expresión de un gen crucial requerido para la integración del VIH en el genoma del huésped mediante una inyección de CRISPR/Cas9 dirigida a dicho gen (Kaminski et al., 2016). Los animales tratados demostraron una expresión reducida del gen del VIH en múltiples órganos de tejido, lo que implica una reducción en la infectividad viral gracias a la edición con CRISPR/Cas9 *in vivo* (Cai, Fisher, Huang, & Xie, 2016).

5.2.10 Modificación de genomas en plantas

Con respecto a la modificación de genomas vegetales también encontramos utilidad de este sistema en la mejora de especies agroalimentarias y aplicaciones al sector. Una de estas aplicaciones es el desarrollo de cultivos climáticamente inteligentes capaces de adaptarse a las condiciones que está generando el cambio climático y que producen una bajada del rendimiento de los cultivos. Se han usado varias modificaciones para editar los genes reguladores de las cascadas de señalización para respuestas de estrés abiótico. Por ejemplo, una nueva estrategia CRISPR/Cas9 involucró el uso de un sgARN truncado (17-18 nucleótidos) para inducir una mutación de cambio de marco en el gen OST2 de la bomba de protones de *Arabidopsis*, mejorando el cierre estomático, reduciendo la transpiración y mejorando así la tolerancia al estrés abiótico (temperatura, sequía, precipitaciones...) (Osakabe et al., 2016). De manera similar, el *knockout* del gen MIR169a por sgRNA/Cas9 confirió tolerancia a la sequía en *Arabidopsis*. Tras 12 días de tratamiento de sequía y rehidratación, el 54-57% de las plantas mutadas sobrevivieron, mientras que no se observó supervivencia en las plantas de tipo salvaje (Zhao et al., 2016).

Otra aplicación es la mejora de las propiedades nutritivas de los vegetales, como por ejemplo la selección de tres genes de desaturasas de ácidos grasos (FAD2) por CRISPR/Cas9 mejoró significativamente la composición del aceite en *Camelina sativa*, produciendo plantas con 50% de contenido de ácidos grasos saludables (ácido oleico) en comparación con el 16% que aparecía en las plantas

de tipo salvaje. Además, los niveles de ácidos grasos menos deseables, ácido linolénico y ácido linoleico, disminuyeron a 10 y 4% en comparación con 35 y 16%, respectivamente, en plantas de tipo salvaje. El aceite mejorado producido en las plantas modificadas genéticamente es más saludable y menos propenso a la oxidación que el aceite convencional (W. Z. Jiang et al., 2017).

También hay estudios que citan la mejora de plantas en su respuesta a herbicidas y otras aplicaciones prácticas en el campo de la agronomía para mejorar el rendimiento de cultivos (B. Hussain, Lucas, & Budak, 2018). Pese a ello, este tipo de modificaciones se ven algo restringidas por la opinión negativa de la sociedad hacia el consumo de vegetales modificados genéticamente.

6. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

6.1 Cortes *off-target*

Son el principal problema que presenta la técnica actualmente. Numerosos estudios han demostrado que Cas9 se une con relativa frecuencia a sitios no diana del genoma, constituyendo un grave problema de la aplicación de la técnica ya que produce cortes inespecíficos en el ADN en zonas no deseadas (Figura 12).

Uno de los motivos es la especificidad de las moléculas de sgARN, pese a que no se conocen los motivos por los que ocurre esto (Fu et al., 2013)(Hsu et al., 2013). EN un estudio se ha demostrado que el 98,4% de un total de 124,793 moléculas de ARN guía para SpCas9 dirigidas al promotor o a las regiones exónicas de los genes tienen uno o más sitios de unión fuera de la diana y que solo el 1,6% tienen una coincidencia perfecta (Bolukbasi, Gupta, & Wolfe, 2016). Así pues, la inespecificidad de CRISPR/Cas9 aún es un problema incipiente ya que parece casi imposible evitar que se produzcan estos cortes en zonas no deseadas del genoma cuando estamos trabajando con genomas de tamaño considerable.

Para que un sistema de edición genómica sea viable, se debe reducir el número de errores al mínimo posible y en el caso de CRISPR/Cas9 se están poniendo muchos esfuerzos en ello. Una de las soluciones que se dan a este problema es la creación de modelos Cas9 modificados que son ortólogos al original, pero que presentan una especificidad mucho más alta, reduciendo así los errores en la

edición de genomas. Este es el caso de SpCas9, xCas9 3.7, Sniper-Cas9, SaCas9, SaCas9-KKH, St1Cas9, St3Cas9, NmCas9, etc. (Tadić et al., 2019).

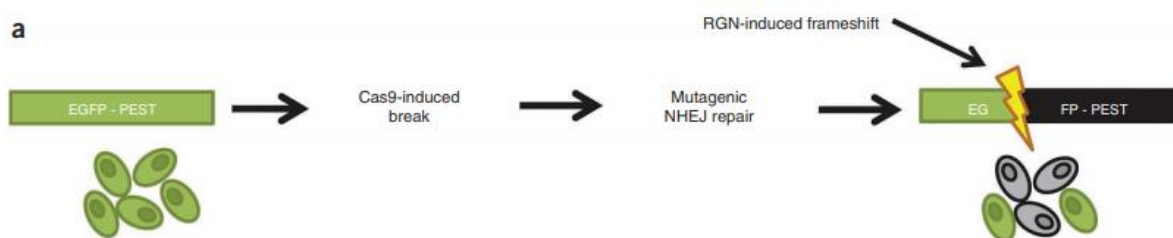


Figura 12. Esquema del ensayo de interrupción de EGFP (proteína verde fluorescente). La reparación de roturas de doble hebra mediadas por Cas9 en un único gen EGFP-PEST integrado por la reparación mediada por NHEJ propensa a errores conduce a mutaciones de cambio de marco de lectura que interrumpen la secuencia de codificación y dan lugar a la pérdida asociada de fluorescencia en las células (Fu et al., 2013).

6.2 Autoinmunidad

Este problema aparece cuando hablamos del uso del sistema CRISPR/Cas9 en organismos eucariotas *in vivo*. En concreto, el problema aparece por el origen de las proteínas Cas9, que proceden de diversos tipos de bacterias. Un estudio realizado recientemente ha comprobado que hay anticuerpos frente a las proteínas Cas9 de bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes* (SaCas9 y SpCas9) en el suero tanto de recién nacidos, como en adultos. El 79% del grupo de muestra presenta anticuerpos frente a SaCas9 y el 65% presenta anticuerpos frente a SpCas9, lo que indica que la población, al estar expuesta de manera habitual a bacterias de estos géneros, han desarrollado anticuerpos frente al sistema (Charlesworth et al., 2018). Este inconveniente supone un nuevo escollo para la aplicación de terapia génica con CRISPR/Cas9 en el ámbito de la sanidad, ya que estos anticuerpos confieren al huésped una resistencia frente a la actividad del sistema y puede causar una respuesta inmunitaria frente a él con consecuencias que pueden afectar a la salud.

6.3 Prevalencia de NHEJ ante HDR

Como se ha comentado con anterioridad en el punto 5.1, existen dos métodos de reparación de las roturas de doble cadena (DSB) en el ADN, NHEJ (unión de extremos no homólogos) y HDR (reparación dirigida por homología). Ambas son sistemas que aparecen de forma simultánea en las células, con el inconveniente de que NHEJ siempre prevalece sobre HDR ya que esta ruta no requiere una plantilla de reparación para arreglar los DSB inducidos por Cas9. Además, produce mutaciones aleatorias cuando actúa en dicha reparación, por lo que en la edición de genomas es preferible que actúe HDR. En circunstancias favorables, HDR puede representar entre el 20 y el 30% de los productos de reparación, y esos productos se pueden aislar mediante análisis molecular; pero hay organismos y tipos de células en los que esta frecuencia es mucho más baja, a veces menos del 1%.

El equilibrio entre HDR y NHEJ se puede cambiar al deshabilitar los componentes de la ruta principal de NHEJ. Por ejemplo, eliminando la ADN ligasa IV en *Drosophila* se eleva la proporción de productos HDR de alrededor del 20% a alrededor del 65%, a veces incluso más (K. J. Beumer et al., 2008; Kelly J. Beumer, Trautman, Mukherjee, & Carroll, 2013; Bozas, Beumer, Trautman, & Carroll, 2009). En ausencia de ligasa IV todavía se recuperaron las mutaciones ``indels`` características de NHEJ; por lo tanto, hay claramente rutas alternativas a este tipo de reparación. La reducción de la actividad de la ligasa IV también ha demostrado ser prometedora en células y embriones de mamíferos (Chu et al., 2015; Singh, Schimenti, & Bolcun-Filas, 2015).

Debido a que la reparación homóloga ocurre de forma natural solo en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando está presente una cromátida hermana, puede utilizarse la sincronización celular para favorecer la HDR con cierto éxito, pero no en todas las células (Lin et al., 2014; Urnov et al., 2005).

Es posible que no exista una solución general al desafío de mejorar la frecuencia de HDR debido a las diferencias entre los tipos de células, la complejidad general

de los mecanismos de reparación y la dificultad para identificar los factores que limitan cada tipo de reparación (Chandrasegaran & Carroll, 2016).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Tecnología ``Integrate``

Los elementos genéticos móviles (MGE) que facilitan la transferencia genética horizontal (HGT) aparecen con frecuencia en bacterias y arqueas, entre ellos encontramos a los virus, los plásmidos y los transposones (Toussaint & Chandler, 2012). En respuesta al ataque incesante de parásitos genéticos, las bacterias han desarrollado numerosas estrategias de defensa innatas y adaptativas de protección, incluidos los sistemas inmunitarios guiados por ARN (CRISPR) y genes asociados a CRISPR (Cas) (Doron et al., 2018; Dy, Richter, Salmond, & Fineran, 2014). Una variante de la evolución de CRISPR/Cas está íntimamente ligada al gran depósito de genes proporcionado por los MGE, con maquinarias enzimáticas centrales involucradas tanto en la adquisición de nuevos espaciadores (Cas1) como en la orientación del ADN guiado por RNA (Cas9 y Cas12) derivado de elementos transponibles (Koonin & Makarova, 2017).

El transposón de *E. coli* **Tn7** es único, ya que se moviliza a través de dos vías mutuamente exclusivas, una que involucra la integración no específica de la secuencia en la plantilla de la cadena retrasada durante la replicación, y una segunda vía que involucra la integración específica del sitio aguas abajo de una secuencia genómica conservada (Peters, 2014). Presenta una relación funcional entre la orientación del ADN guiado por ARN y la transposición (Peters, Makarova, Shmakov, & Koonin, 2017).

Los transposones similares a Tn7 que se asocian específicamente con los sistemas CRISPR/Cas carecen de un gen clave involucrado en la identificación del ADN, y los sistemas CRISPR/Cas que codifican carecen de un gen clave involucrado en la degradación del ADN, con lo cual, se plantea la hipótesis de que los sistemas CRISPR/Cas codificados por transposones se han rediseñado para que tengan un papel distinto al de la inmunidad adaptativa, en el que la

orientación del ADN guiada por ARN se aprovecha para un nuevo modo de movilización de transposones.

De hecho, el complejo efector CRISPR/Cas de *Vibrio cholerae* es capaz de dirigir una transposasa acompañante para integrar el ADN del transposón aguas abajo de un sitio genómico diana complementario a un ARN guía, representando así el primer ejemplo de una integrasa programable. Este mecanismo mediante el cual los elementos genéticos móviles han secuestrado la orientación del ADN guiado por ARN para su éxito evolutivo, ofrece una nueva oportunidad para la integración fácil y específica del ADN sin requerir de recombinación homóloga (Klompe, Vo, Halpin-Healy, & Sternberg, 2019).

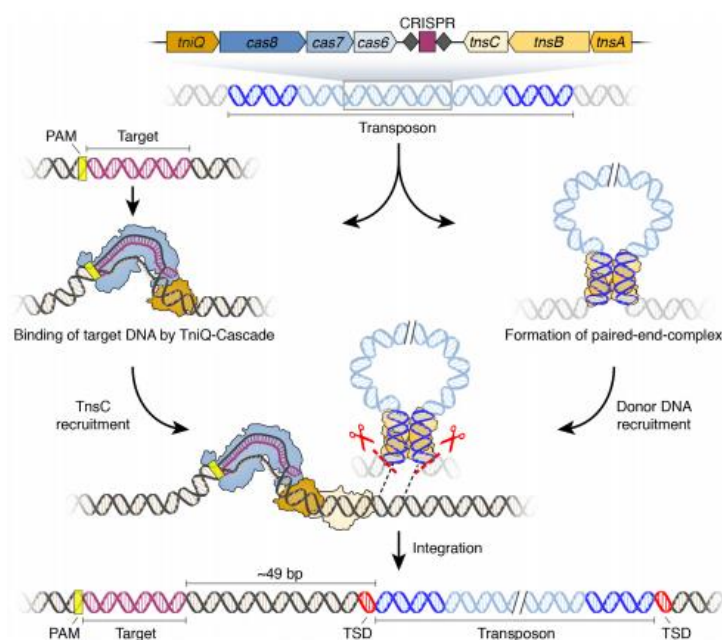


Figura 13. Modelo propuesto para la integración de ADN guiado por ARN mediante transposones similares a Tn7 que codifican sistemas CRISPR-Cas. (Klompe et al., 2019)

8. CONCLUSIONES E IMPLICACIONES ÉTICAS

El sistema CRISPR/Cas9 es hoy por hoy la vanguardia en lo que a edición genómica se refiere. Aunque que otros sistemas como TALEN o ZFN pueden ofrecer resultados similares, conllevan mucho más trabajo, tiempo y dinero. Lo destacable y que hace que se coloque a CRISPR/Cas9 a la cabeza de este sector como método de edición genética es su sencillez, ya que únicamente necesita de una nucleasa (Cas9) para realizar las modificaciones, que además es muy fácil de modificar para proporcionarle nuevas funcionalidades, su rapidez

y su eficacia. Se trata también de un proceso muy económico y pone el poder de la modificación genética al alcance de casi cualquier laboratorio del mundo, lo que abre enormes posibilidades de cara a la cura de enfermedades, creación de modelos animales y vegetales de interés tanto sanitario como agrícola y ganadero, estudios genómicos, solución de la resistencia a antibióticos por parte de bacterias y muchas otras aplicaciones.

Pese a ello, es un arma de doble filo ya que puede utilizarse con fines económicos, bélicos (por parte de grupos terroristas o dictadores) u otros intereses no menos peligrosos, como la mejora genética de la especie humana.

Por este tipo de problemas y los que puedan ir surgiendo con el paso del tiempo, es necesario un pacto a nivel global de todos los países e instituciones internacionales para regular el uso de esta técnica y fijar los límites morales y éticos que deben delimitar su uso para evitar casos como el de la modificación de embriones humanos, algo que, pese a que pueda ser ejecutado con la mejor intención con respecto a la cura de enfermedades, no deja de traspasar los límites éticos fijados por la comunidad científica a nivel global. Este es el caso de la modificación genética del gen CCR5- Δ 32 llevada a cabo por el científico chino He Jiankui de manera ilícita e ilegal con el objetivo de hacer resistentes a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a un grupo de bebés. Tras este hecho, un estudio posterior realizado en la Universidad de Berkeley, ha demostrado que la mutación realizada por He Jiankui está asociada con un incremento del 21% en mortalidad prematura de quienes la llevan (X. Wei & Nielsen, 2019), demostrando así que aún no tenemos el conocimiento suficiente como para modificar el genoma sin causar posibles efectos secundarios, más nocivos incluso que lo que se pretende paliar con estas modificaciones.

Así, la manipulación genómica, constituye hoy por hoy, uno de los mayores poderes que podemos poseer y quizás aún no somos conscientes de todo su potencial. Solo depende de nosotros el uso que demos a técnicas como CRISPR/Cas9 ya que, usadas adecuadamente, pueden ser de un beneficio

magnifico para la supervivencia, la mejora de calidad de vida y el desarrollo sostenible de la humanidad de aquí en adelante.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adiego-Pérez, B., Randazzo, P., Daran, J. M., Verwaal, R., Roubos, J. A., Daran-Lapujade, P., & van der Oost, J. (2019). Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas. *FEMS Microbiology Letters*, 366(8), 1–19. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz086>
- Aterials, E. N. M., Fried, L. E., Manaa, M. R., Pagoria, P. F., & Simpson, R. L. (2001). DESIGN AND SELECTION OF NOVEL CYS2HIS2 ZINC FINGER PROTEINS. *Materials Science*, 2(1), 291–321.
- Babu, M., Beloglazova, N., Flick, R., Graham, C., Skarina, T., Nocek, B., ... Yakunin, A. F. (2011). A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular Microbiology*, 79(2), 484–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07465.x>
- Bak, R. O., Gomez-Ospina, N., & Porteus, M. H. (2018). Gene Editing on Center Stage. *Trends in Genetics*, 34(8), 600–611. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.004>
- Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug, R. G., ... Ekker, S. C. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491(7422), 114–118. <https://doi.org/10.1038/nature11537>
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Bozas, A., Liu, J.-L., Rutter, J., Gall, J. G., & Carroll, D. (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19821–19826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810475105>
- Beumer, Kelly J., Trautman, J. K., Mukherjee, K., & Carroll, D. (2013). Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3 & Genes|Genomes|Genetics*, 3(4), 657–664. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005439>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., ... Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III

- effectors. *Science*, 326(5959), 1509–1512.
<https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2011). TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 333(6051), 1843–1846.
<https://doi.org/10.1126/science.1204094>
- Bolukbasi, M. F., Gupta, A., & Wolfe, S. A. (2016). Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nature Methods*, 13(1), 41–50. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3684>
- Bonas, U., Stall, R. E., & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MGG Molecular & General Genetics*, 218(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/BF00330575>
- Bozas, A., Beumer, K. J., Trautman, J. K., & Carroll, D. (2009). Genetic Analysis of Zinc-Finger Nuclease-Induced Gene Targeting in *Drosophila*. *Genetics*, 182(3), 641–651. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.101329>
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., ... van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960–964.
<https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Brunet, E., Simsek, D., Tomishima, M., DeKolver, R., Choi, V. M., Gregory, P., ... Jasin, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10620–10625. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902076106>
- Cai, L., Fisher, A. L., Huang, H., & Xie, Z. (2016). CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes and Diseases*, 3(4), 244–251.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.07.003>
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2016). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of Molecular Biology*, 428(5), 963–989.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.014>
- Charlesworth, C. T., Deshpande, P. S., Dever, D. P., Dejene, B., Gomez-Ospina, N., Mantri, S., ... Porteus, M. H. (2018). Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/243345>
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B. W., Tuttle, M., P R Iyer, E., ...

- Church, G. M. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods*, 12(4), 326–328.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G., ... Lei, S. (2013). Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*, 155(7), 1479–1491.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 33(5), 543–548. <https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- Cocozaki, A. I., Ramia, N. F., Shao, Y., Hale, C. R., Terns, R. M., Terns, M. P., & Li, H. (2012). Structure of the Cmr2 subunit of the CRISPR-Cas RNA silencing complex. *Structure*, 20(3), 545–553.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.018>
- Conaway, J. W. (2012). Introduction to Theme “Chromatin, Epigenetics, and Transcription.” *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 61–64.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090711-093103>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., ... Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), eaar4120.
<https://doi.org/10.1126/science.aar4120>
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annual Review of Virology*, 1(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Ecco, G., Imbeault, M., & Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development*, 144(15), 2719–2729. <https://doi.org/10.1242/dev.132605>

- Ewart, D., Peterson, E., & Steer, C. J. (2019). A New Era of Genetic Engineering for Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.05.004>
- FJM, M., C, F., G, J., & F, R.-V. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17(1), 85–93.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013, July). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, Vol. 31, pp. 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- 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*, 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., ... 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>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014, June 5). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, Vol. 157, pp. 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hussain, B., Lucas, S. J., & Budak, H. (2018). CRISPR/Cas9 in plants: at play in the genome and at work for crop improvement. *Briefings in Functional Genomics*, 17(5), 319–328. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely016>
- Hussain, W., Mahmood, T., Hussain, J., Ali, N., Shah, T., Qayyum, S., & Khan,

- I. (2019). CRISPR/Cas system: A game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases. *Gene*, 685(September 2018), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.072>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Embden, J. D. A. Van, Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.pdf*. 43, 1565–1575.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., 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. Z., Henry, I. M., Lynagh, P. G., 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., 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>
- Jinek, Martin, Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(August), 816–822.
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., ... Brouns, S. J. J. (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), 529–536. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2019>
- Kaminski, R., Bella, R., Yin, C., Otte, J., Ferrante, P., Gendelman, H. E., ... Khalili, K. (2016). Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Therapy*, 23(8–9), 690–695. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.41>

- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648–651. <https://doi.org/10.1126/science.1144956>
- Kearns, N. A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R. M., Silverstein, N. J., Garber, M., & Maehr, R. (2015). Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. *Nature Methods*, 12(5), 401–403. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3325>
- Kim, J. S. (2016, September 1). Genome editing comes of age. *Nature Protocols*, Vol. 11, pp. 1573–1578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.104>
- Klompe, S. E., Vo, P. L. H., Halpin-Healy, T. S., & Sternberg, S. H. (2019). Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*, (March). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1323-z>
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., ... Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2017). Mobile genetic elements and evolution of crispr-cas systems: All the way there and back. *Genome Biology and Evolution*, 9(10), 2812–2825. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx192>
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Balam Muñoz-Soto, R., ... De Revisión, A. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación En Discapacidad*, 5(2), 116–128. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2016/ir162e.pdf>
- Lander, E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1–2), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>
- Loureiro, A., & da Silva, G. (2019). CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010018>
- M., M. F. J., G., J., & F., R. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites.

- Molecular Microbiology*, 9(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
- Ma, H., Naseri, A., Reyes-Gutierrez, P., Wolfe, S. A., Zhang, S., & Pederson, T. (2015). Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(10), 3002–3007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420024112>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., & Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10(10), 977–979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology*, 1311, v–vii. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *The CRISPR Journal*, 1(5), 325–336. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0033>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mali, Prashant, Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., ... Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), 833–838. <https://doi.org/10.1038/nbt.2675>
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., ... Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>
- Miller, J., Mclachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor. 4(6), 1609–1614. <https://doi.org/10.1002/jtra.1022>
- 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, Francisco J. M., & Garrett, R. A. (2013). Discovery and Seminal

- Developments in the CRISPR Field. In *CRISPR-Cas Systems* (pp. 1–31).
https://doi.org/10.1007/978-3-642-34657-6_1
- Mojica, Francisco J.M., Díez-Villaseñor, C., 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>
- Mout, R., Ray, M., Lee, Y.-W., Scaletti, F., & Rotello, V. M. (2017). In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjugate Chemistry*, 28(4), 880–884.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00057>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V, Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- Osakabe, Y., Watanabe, T., Sugano, S. S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K., & Osakabe, K. (2016). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Scientific Reports*, 6(1), 26685.
<https://doi.org/10.1038/srep26685>
- Pardo, B., Gómez-González, B., Aguilera, A., & Vespucio, A. (2009). DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 1039 – 1056. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>
- Park, C.-Y., Kim, D. H., Son, J. S., Sung, J. J., Lee, J., Bae, S., ... Kim, J.-S. (2015). Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 17(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., ... Gersbach, C. A. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. *Nature Methods*, 10(10), 973–976. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2600>

- Peters, J. E. (2014). Joseph e. peters. *Sustainable Development and Environment (Reframed)*, 1, 1–20.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0010-2014.f1>
- Peters, J. E., Makarova, K. S., Shmakov, S., & Koonin, E. V. (2017). Recruitment of CRISPR-Cas systems by Tn7-like transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), E7358–E7366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1709035114>
- 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>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015a). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015b, October 15). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, Vol. 117, pp. 119–128.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Rivenbark, A. G., Stolzenburg, S., Beltran, A. S., Yuan, X., Rots, M. G., Strahl, B. D., & Blancafort, P. (2012). Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation. *Epigenetics*, 7(4), 350–360.
<https://doi.org/10.4161/epi.19507>
- Rong, Y. S., & Golic, K. G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 288(5473), 2013–2018.
<https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2013>
- Sapranauskas, 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>
- Singh, P., Schimenti, J. C., & Bolcun-Filas, E. (2015). A Mouse Geneticist's Practical Guide to CRISPR Applications. *Genetics*, 199(1), 1–15.

- <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169771>
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *The EMBO Journal*, 30(7), 1335–1342. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.41>
- Spilman, M., Cocozaki, A., Hale, C., Shao, Y., Ramia, N., Terns, R., ... Stagg, S. (2013). Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. *Molecular Cell*, 52(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.008>
- Sun, W., Ji, W., Hall, J. M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C. L., & Gu, Z. (2015). Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(41), 12029–12033. <https://doi.org/10.1002/anie.201506030>
- Tadić, V., Josipović, G., Zoldoš, V., & Vojta, A. (2019). CRISPR/Cas9-based epigenome editing: An overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity. *Methods*, (May). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.003>
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., & Vale, R. D. (2014). A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell*, 159(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., ... 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>
- Toussaint, A., & Chandler, M. (2012). *Prokaryote Genome Fluidity: Toward a System Approach of the Mobilome*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-361-5_4
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., ... Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042), 646–651. <https://doi.org/10.1038/nature03556>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227–264.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Waters, C. A., Strande, N. T., Pryor, J. M., Strom, C. N., Mieczkowski, P., Burkhalter, M. D., ... Ramsden, D. A. (2014). The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. *Nature Communications*, 5(1), 4286. <https://doi.org/10.1038/ncomms5286>
- WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171(15), 737–738.
- <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03500150078030>
- Wei, C., Liu, J., Yu, Z., Zhang, B., Gao, G., & Jiao, R. (2013). TALEN or Cas9 - Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(6), 281–289.
- <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.013>
- Wei, X., & Nielsen, R. (2019). CCR5-Δ32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nature Medicine*, 25(June). <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0459-6>
- Wu, W. Y., Lebbink, J. H. G., Kanaar, R., Geijsen, N., & van der Oost, J. (2018). Genome editing by natural and engineered CRISPR-associated nucleases. *Nature Chemical Biology*, 14(7), 642–651. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0080-x>
- Xu, R. G., Wang, X., Shen, D., Sun, J., Qiao, H. H., Wang, F., ... Ni, J. Q. (2019). Perspectives on gene expression regulation techniques in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics*, 46(4), 213–220.
- <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.03.006>
- Xu, X., Gao, D., Wang, P., Chen, J., Ruan, J., Xu, J., & Xia, X. (2018). Efficient homology-directed gene editing by CRISPR/Cas9 in human stem and primary cells using tube electroporation. *Scientific Reports*, 8(1), 11649.
- <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30227-w>
- Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., ... Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, 32(6), 551–553.
- <https://doi.org/10.1038/nbt.2884>
- Young, C. S., Hicks, M. R., Ermolova, N. V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., ... Pyle, A. D. (2016). A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in

- hiPSC-Derived Muscle Cells. *Cell Stem Cell*, 18(4), 533–540.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.021>
- Zetsche, B., Heidenreich, M., Mohanraju, P., Fedorova, I., Kneppers, J., DeGennaro, E. M., ... Zhang, F. (2017). Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, 35(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nbt.3737>
- Zhao, Y., Zhang, C., Liu, W., Gao, W., Liu, C., Song, G., ... Xie, C. (2016). An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Scientific Reports*, 6(1), 23890.
<https://doi.org/10.1038/srep23890>
- Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., ... Lin, S. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, 10(4), 329–331.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2374>
- Zuo, E., Huo, X., Yao, X., Hu, X., Sun, Y., Yin, J., ... Yang, H. (2017). CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination. *Genome Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1354-4>