



El sistema CRISPR/Cas, crónica de un premio Nobel anunciado

The CRISPR / Cas's system, chronicle of an announced Nobel prize

Mario Zurita¹

Recepción 16-06-2021

Recepción 06-07-2021

Resumen

Desde principios de la década pasada en la que se creó como herramienta para editar genomas el sistema CRISPR/Cas, la comunidad científica se dio cuenta de los alcances que podría tener esta poderosa metodología. Con el paso de los años ésta se ha hecho mucho más robusta y se han generado una serie de herramientas colaterales, en muchos casos adaptadas para cada organismo, de tal forma que su uso se está volviendo rutinario en cualquier laboratorio de Biología Molecular. Por lo tanto, el premio Nobel a Emmanuelle Charpentier y a Jennifer Doudna, que participaron de manera importante en el desarrollo de esta metodología, era esperado. En este artículo se describe cuáles fueron los descubrimientos clave que se dieron para poder usar este conocimiento en el desarrollo de la que es, probablemente, la herramienta molecular más importante desde el desarrollo de la Ingeniería Genética, y también, cómo es que funciona para editar genomas y algunas otras aplicaciones.

Palabras clave

Sistema CRISPR/Cas; crónica; Nobel; herramienta molecular; Ingeniería Genética.

Abstract

Since the beginning of the last decade, when the CRISPR / Cas system was created as a tool to edit genomes, the scientific community realized the importance of this powerful methodology. Over the years it has become much more robust and a series of collateral tools have been generated, in many cases adapted for each organism, in such a way that it is becoming routinely used in any Molecular Biology laboratory. Therefore, the Nobel Prize to Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna, who participated in an important way in the development of this methodology was expected. This article describes the key discoveries that were made in order to use this knowledge in the development of what is probably the most important molecular tool since the development of Genetic Engineering and also how it works to edit genomes as well as some other applications.

Keywords

CRISPR / Cas's system; chronicle; Nobel; molecular tool; Genetic engineering.

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. Correo: mario.zurita@ibt.unam.mx.

El premio Nobel de Química en el 2020 fue otorgado a las investigadoras Emmanuelle Charpentier del Instituto Max Planck en Biología de las Infecciones y a Jennifer Doudna de la Universidad de Berkeley y del Howard Hughes Medical Institute, por su aportación en el desarrollo de la herramienta de genética molecular conocida como CRISPR/Cas. El dar un premio Nobel a la creación de esta poderosa herramienta era altamente esperado y no fue una sorpresa. Esto es porque el contar con el sistema CRISPR/Cas ha generado una gran cantidad de posibilidades para editar el genoma de cualquier organismo de una manera precisa, elegante, y en general no tan complicada, como lo detallaré más adelante. Sin embargo, en la comunidad existía una gran curiosidad sobre quiénes serían las galardonadas y/o galardonados. Esto debido a que, como en muchas otras ocasiones en las que se ha entregado el premio Nobel en un descubrimiento o desarrollo específico, este se debe a la contribución de varios investigadores que aportaron información que se puede considerar de igual relevancia. De cualquier forma, el premio a Charpentier y a Doudna es merecido, pero una buena parte de la comunidad en Genética y Biología Molecular considera que bien podría haber otro galardonado más.

Para que el lector tenga una visión clara de cómo funciona esta poderosa herramienta y qué podemos hacer con ella, es importante conocer qué descubrimientos fueron hechos por diferentes grupos de investigación para finalmente desarrollar un protocolo para editar genomas. Para esto, se describe en forma resumida la cronología de los descubrimientos más importantes que llevaron a proponer el sistema CRISPR/Cas, y después, cómo se puede editar un gen o grupos de genes.

Breve historia de la generación del sistema CRISPR/Cas para editar genomas.

A finales de los años 80s del siglo pasado, un grupo japonés que estudiaba un gen de *Escherichia coli* observó, al final de este gen, la presencia de una secuencia de ADN con secuencia repetidas directas de 29 pares de bases que tienen, entre cada una de estas repeticiones, una secuencia de 32 pares de bases. Estas secuencias de 32 pares de bases, llamadas espaciadoras, que se encuentran entre los 29 pares de bases repetidos, son diversas, es decir, cada una es diferente (Figura 1). Pasaron varios años para que los biólogos moleculares de bacterias se dieran cuenta que este tipo de organización está presente en muchas especies de bacterias y sobre todo en las arqueas. El primero fue Francisco Juan Martínez Mojica en Alicante, España (Mojica *et al.*, 2000; Mojica *et al.*, 2005). Mojica junto con Ruth Jansen nombraron a estas secuencias repetidas "repeticiones palindrómicas cortas, regularmente espaciadas, agrupadas", que en inglés es "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", abreviado CRISPR. Un poco tiempo después, en el 2002, se demostró que estas secuencias de ADN repetido se transcriben y son parte de un sistema en el que se expresan también una serie de genes que se encuentran muy conservados en algunas bacterias y que forman un operón. A estos genes relacionados a los CRISPRs se les llamó "CRISPR-associated (Cas) genes" o "genes asociados a CRISPR" en español (Haft *et al.*, 2005). Los genes Cas codifican para varias proteínas que forman un complejo en el que una de ellas es una endonucleasa (Figura 1), es decir, una enzima que corta al ADN.

Un descubrimiento que fue un parteaguas en esta historia fue el del grupo de Mojica, que encontró en el 2005 que las secuencias espaciadoras entre las repetidas directas del CRISPR tenían homología con fragmentos de ADN codificados por fagos (virus) que infectan a la bacteria correspondiente, así como de algunos plásmidos (Mojica *et al.* 2005).

Esto sugirió que el sistema CRISPR/Cas es parte de la respuesta inmune adaptativa de las bacterias como defensa a las infecciones por fagos y de transferencia horizontal por plásmidos. En otras palabras, secuencias del genoma de fagos y plásmidos pueden ser incorporadas al genoma de la bacteria en fragmentos de 32 pares de bases dentro de la región CRISPR, y esto sirve para que, de alguna forma, estas secuencias interfieran con el ciclo de vida de estos virus bacterianos (Figura1). Un poco antes, Alexander Bolotin del Instituto Nacional para la Investigación en Agricultura de Francia, había encontrado que la bacteria *Streptococcus thermophilus*, codifica para una endonucleasa más grande, a la cual le puso Cas9 y que actúa sola, no formando un complejo con otras proteínas para funcionar. En la actualidad la Cas9 que se usa más es la de *Streptococcus pyogenes*. Bolotin también encontró algo muy importante, se dio cuenta de que la secuencia que está contenida dentro del fragmento CRISPR en los fragmentos que tienen homología con ADN de fagos, todas comparten una secuencia al final de este, o sea, en el 3' de esta secuencia. Esta pequeña secuencia es: 5'-NGG-3' en donde N es cualquiera de los cuatro nucleótidos en el ADN. A esta secuencia la nombraron “proto-spacer adjacent motif” o PAM (Bolotin *et al.*, 2005).

En el 2008 el grupo de John van der Oost, de la universidad de Wageningen en Holanda, encontró que el tramo de ADN que contiene la región CRISPR se transcribe y se procesa por la ARNasa III de las bacterias, formándose moléculas pequeñas de ARN que contienen un segmento de la secuencia repetida directa y una de las secuencias espaciadoras que tienen homología con fagos (Brouns *et al.*, 2008). A estos ARNs les puso el nombre de “CRISPR ARNs o crARNs”. En otras palabras, el segmento de ADN en el genoma de las bacterias que contiene a las repetidas directas que comparten la misma secuencia y que tienen secuencias de fagos o plásmidos entre estas, se expresa en las bacterias. De forma interesante, a finales del 2008, dos investigadores de North Western University en Illinois, Luciano Marraffini y Erik Sontheimer, demostraron que el blanco de los crARNs es el ADN (Marraffini, and Sontheimer, 2008). Un tiempo después, se reportó que la enzima Cas9 corta directamente el ADN, dirigida por un crARN. Esto fue demostrado por el grupo de Sylvain Moineau de la Universidad de Laval en Canadá. En el mismo trabajo también encontraron que la Cas9 no necesita de otras proteínas, como otros tipos de Cas de otras bacterias que forman un complejo de varias proteínas. También encontraron que la Cas9 corta justo tres nucleótidos hacia arriba de la secuencia PAM (que es 5'-NGG-3' para la Cas9) (Garneau, J.E. *et al.*, 2010). A partir de este punto es cuando aparece en escena Emmanuelle Charpentier. Charpentier descubrió que, al lado del gen de la Cas9, se transcribe, en el otro sentido, un ARN pequeño en el que parte de la secuencia de este es complementaria a la secuencia de la repetida directa presente en CRISPR (Deltcheva, *et al.*, 2011) (Figura1). Además, también encontró que este ARN se aparee con el crARN, formándose un ARN de doble cadena que es reconocido por la Cas9, y que es a este complejo de los dos ARNs y la Cas9 lo que reconoce el blanco en el DNA del fago y del plásmido. Charpentier llamó a este ARN pequeño “trans-activating-CRISPR-RNA” conocido ahora como “tracrARN” (Figura 1).

A partir de toda la información anterior y de forma súbita, los biólogos moleculares tuvieron enfrente de ellos una nueva caja de herramientas para manipular al ADN. La lógica de esto fue qué: si el crARN es capaz de reconocer cualquier secuencia de ADN de manera específica, entonces, tal vez, se podría dirigir a la endonucleasa Cas9 a cualquier lugar del genoma, hacer un corte y generar una mutación. Por otro lado, ya que somos capaces de expresar cualquier segmento de ADN de cualquier organismo dentro de cualquier otro, utilizando técnicas de ingeniería genética, tal vez podríamos hacer mutaciones dirigidas

con una alta precisión en el genoma de cualquier célula usando un crARN, el tracrARN y la Cas9. Las preguntas obvias fueron ¿puede el crARN reconocer secuencias de ADN que no sean típicas de fagos y plásmidos? ¿podrá este sistema de respuesta inmune adaptativa de una bacteria en particular funcionar en otras bacterias o arqueas y también en eucariontes?

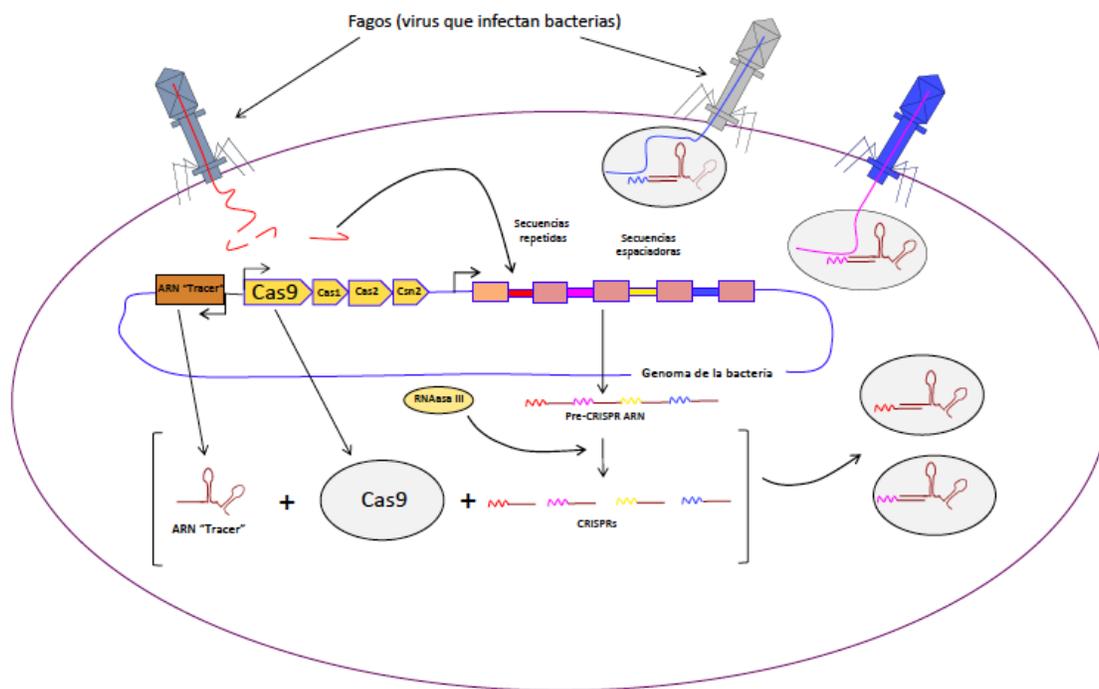


FIGURA 1. Sistema CRISPR/Cas9 de inmunidad adquirida en *Streptococcus thermophilus*. En general, diferentes fagos pueden infectar a esta bacteria, a los cuales la bacteria puede ser resistente activando su sistema CRISPR/Cas9. Las Cas9 más utilizada como herramienta es la de esta bacteria.

En el 2011 Virginijus Siksnys, del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Vilnius, en Lituania, publicó en la revista *Nucleic Acids Research* que los componentes crARN, el tracrARN y Cas9 de *S. thermophilus* funcionan en *Escherichia coli* (Saprunauskas *et al.*, 2011). Este experimento demostró que estos 3 componentes (Cas9, tracrRNA y el crRNA) pueden funcionar en una bacteria diferente de la que proceden, y lo más importante es que también demostró que con estos tres componentes es suficiente para cortar el ADN invasor a la bacteria, ya sea de fagos o de plásmidos. Un año más tarde, en una publicación que apareció en el *Proceedings of the National Academy of Sciences* de los Estados Unidos, el mismo grupo fue capaz de reproducir el mecanismo de corte específico de una secuencia blanco por el crARN *in vitro*, teniendo todos los componentes producidos en *E. coli*, y así, determinaron el mecanismo de cómo el sistema CRISPR/Cas9 reconoce la secuencia blanco, y qué regiones de la enzima son importantes para realizar este corte. También, encontraron que el crARN solo necesita 20 nucleótidos continuos de homología con la secuencia blanco para llevar al complejo CRISPR/Cas9 a dicha secuencia y realizar el corte. Así mismo, demostraron que la Cas9 tiene dos dominios de corte, uno que corta la cadena de ADN que no hibrida con el crARN, y otra que corta exactamente la otra cadena en el mismo par de bases. También corroboraron que el corte ocurre tres pares de bases antes de la secuencia PAM en el ADN que es blanco del crARN, y que la secuencia PAM es esencial para que Cas9 corte. Al final del artículo sugieren que este sistema podría ser utilizado para generar mutaciones dirigidas en otros organismos (Gasiunas *et al.*, 2012).

Prácticamente al mismo tiempo, Charpentier, ahora en colaboración con Jennifer Doudna de la Universidad de Berkeley en California, publicaron en la revista Science exactamente los mismos resultados que el grupo de Lituania. En su artículo en Science, además mostraron que si unían el tracrARN en el extremo 3' de crARN y formaban una molécula de ARN híbrida, esta funcionaba tan bien como tenerlas separadas (Jinek *et al.*, 2012). Esto fue muy importante porque simplificaba el sistema CRISPR/Cas9 de tres a dos componentes, lo que ha sido muy conveniente para su posterior uso como herramienta molecular. Otro aspecto importante es que mostraron que el blanco puede ser cualquier secuencia de ADN, no importa su origen y, al igual que los lituanos propusieron, que CRISPR/Cas9 puede ser utilizado para generar mutantes en regiones específicas en cualquier genoma (Figura 2).

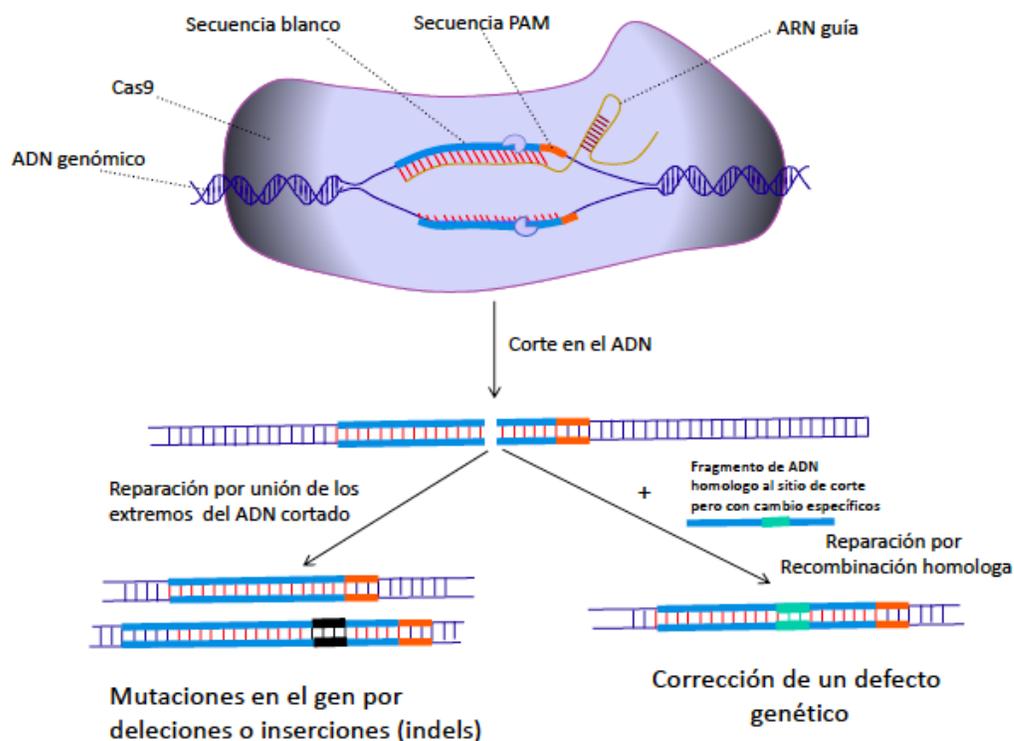


FIGURA 2. Mecanismos generales por medio del cual se pueden usar el sistema CRISPR/Cas9 para editar genomas.

El corte por la Cas9 en un lugar específico del genoma hace que los mecanismos de reparación por daño a ADN entren en acción, y esto media los cambios deseados, ya sean diferentes tipos de mutaciones o la sustitución de una región del genoma por otra diseñada por el investigador. Para detalles ver el texto.

Feng Zhang, del Broad Institute en el MIT y Harvard, así como George Church, también de Harvard, publicaron en el 2013, también en Science, artículos independientes en los que muestran que generando crARNs (ahora se conocen como ARNs guía), que llevan una secuencia complementaria de genes específicos en células humanas, e introduciéndolos en células junto con la Cas9, se pueden generar mutaciones específicas contra estos genes con una eficiencia muy alta para ese momento, que fue entre el 10 y 25% (en la actualidad se pueden obtener eficiencias de más del 80%, esto dependiendo del tipo celular). También mostraron que esta nueva y poderosa herramienta podía ser utilizada para hacer tamices genéticos, mutando al mismo tiempo la cantidad de genes que el investigador desee (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). La principal importancia de este trabajo es que mostró que el sistema CRISPR/Cas9 funcionaba en células de humano, y si esto trabajaba bien en el humano, se podía predecir que funcionaría en cualquier organismo: animal, planta, levadura o lo que fuera.

Después de esta breve reseña de la generación del sistema CRISPR/Cas9 como la poderosa herramienta que tenemos hoy, vemos que fue a partir de la contribución de muchos grupos de investigación en diferentes partes del planeta, todas igual de relevantes, que se llegó a esta nueva metodología para editar genomas. De hecho, es muy conocida la disputa por la patente sobre el uso del sistema CRISPR/Cas9 para editar genomas entre Charpentier y Doudna contra Zhang y Church, a la que se le conoció cómo el pleito Berkeley vs MIT/Harvard. Al final ganaron la patente los grupos del MIT y Harvard, y aunque la disputa sigue, realmente fueron Zhang y Church los primeros que editaron genes en una célula y dieron paso a la aplicación de esta metodología en otros organismos. Por otro lado, la contribución del lituano Virginijus Siksnys es equivalente a la de Charpentier y Doudna, solo que el artículo de ellas salió publicado un mes antes, aunque Siksnys envió a publicar su trabajo antes que las actuales premio Nobel. Finalmente, todo esto empezó a partir del trabajo pionero de Francisco Mojica, que a mi parecer era el candidato más obvio para obtener el Nobel. De cualquier manera, ahora contamos con una herramienta muy poderosa para modificar el genoma de cualquier organismo y que se está volviendo rutina en grupos alrededor del planeta.

Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9

La principal utilidad que ha tenido el sistema CRISPR/Cas9 ha sido la generación de mutaciones y ediciones en lugares específicos en el genoma. Sin embargo, también se puede utilizar para sobre activar la expresión de un gen o para silenciarlo. Así mismo, también a partir de esto se han desarrollado sistemas muy eficientes de diagnóstico molecular. En esta sección se describe el mecanismo de cómo opera esta herramienta.

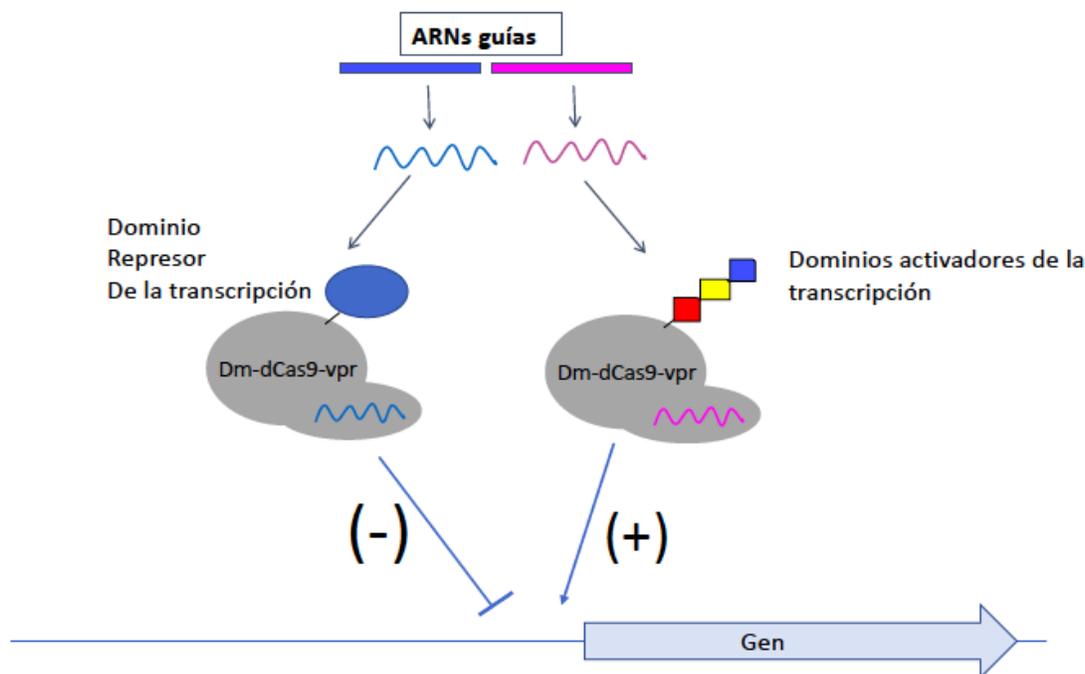
El sistema CRISPR/Cas9, funciona en parte tan bien porque durante la evolución se seleccionaron mecanismos de reparación del ADN que están presentes en todos los seres vivos y, en general, funcionan igual en todos ellos, dependiendo del tipo de daño. Usando ARNs guías (gARNs) específicos para editar una región del genoma podemos enviar a la Cas9 a cortar la doble hélice. Como se ha mencionado, esta enzima hace cortes en un sitio específico en las dos cadenas del ADN. Cuando esto ocurre en una célula, tanto procarionte como eucarionte, se activa un mecanismo de reparación para volver a pegar el cromosoma que ha sido cortado. La célula eucarionte posee dos mecanismos para reparar esta afectación en el ADN. Uno es el “Unión de los Extremos No Homólogos” que en inglés es “Non Homologous End Joining” (NHEJ). El otro mecanismo es el de “Reparación Directa por Homología” o HDR, en inglés. De los dos mecanismos, el NHEJ es el que entra en acción primero y lo que hace es pegar las dos cadenas resultantes del corte en el mismo sitio de este. Sin embargo, para el infortunio de la célula, pero para la fortuna de los biólogos moleculares, cuando este mecanismo vuelve a pegar las dos cadenas de ADN se pueden generar deleciones (pérdida de algunos pares de bases), o inserciones (adición de bases no codificadas en esa región), conocidas como INDELS. Por lo tanto, en el sitio en el genoma en el que el sistema CRISPR/Cas9 corta, genera mutaciones. Si por ejemplo, dirigimos un ARN guía a la región cercana al inicio de la traducción de un gen que codifica para una proteína, el que se inserten o se pierdan bases puede generar un cambio en la fase de lectura del ARN mensajero y, por lo tanto, que se produzca una proteína aberrante, o lo que es más común, que la nueva fase de lectura sitúe un codón de término de la traducción de la proteína y solo se produzca un péptido truncado sin ninguna función (Figura 2). De esta forma, con el sistema CRISPR/Cas9 podemos realizar una mutación en el lugar que nos plazca en cualquier genoma.

Sin embargo, el generar inserciones o deleciones de pares de bases no es lo único que podemos hacer con el CRISPR/Cas9. Resulta que el otro sistema de reparación del rompimiento de la doble hélice del ADN que involucra recombinación homóloga, también nos es muy útil para editar genomas. Durante la reparación de un cromosoma que ha sido roto en ambas cadenas de ADN puede haber reparación de esta molécula por recombinación, si hay otro cromosoma homólogo dentro de la célula. En este mecanismo de reparación hay un intercambio de cadenas de ADN entre los cromosomas homólogos alrededor del sitio de ruptura, de tal manera que el resultado es el juntar de nuevo las dos cadenas rotas, pero ahora con las cadenas homólogas presentes en el otro cromosoma (Figura 2). Este mecanismo de reparación es muy eficiente y casi siempre no genera mutaciones, de hecho, es parte del mecanismo de recombinación genética entre cromosomas durante la meiosis. Este mecanismo de reparación se puede dar por lo menos en células que poseen dos pares de cada cromosoma, o sea, que sean diploides. Pero, si este mecanismo no genera mutaciones al reparar el ADN, ¿para qué nos sirve utilizando el sistema CRISPR/Cas9? Tomando ventaja de este mecanismo de reparación que está presente en todos los eucariontes podemos introducir, al mismo tiempo que el ARN guía y la Cas9, un fragmento de doble cadena de ADN, e incluso de cadena sencilla lineal y que contenga regiones de homología con la región que nos interesa en el genoma. Una vez que la Cas9 genera el corte en el ADN, por medio de recombinación homóloga podemos sustituir un tramo del cromosoma por el ADN lineal que metimos en la célula. Por ejemplo, si queremos introducir en un gen cambios específicos en su secuencia, como podría ser cambiar aminoácidos específicos en la proteína codificada por este gen, usando CRISPR/Cas9 y el segmento de ADN que queremos substituir directamente en el gen, el sistema de reparación directa por homología de la célula lo puede hacer (Figura 2).

Recientemente se desarrolló una nueva aplicación para hacer substituciones específicas en una región del genoma. Ésta se basa en una Cas9 mutante que no corta completamente la doble hélice del ADN, sino que solo hace una mella. Esta Cas9 está fusionada a una transcriptasa reversa que puede copiar el ARN en ADN. Por otro lado, el ARN guía lleva una secuencia extra complementaria al gen blanco que, al momento del corte, le sirve como molde a la transcriptasa reversa para copiar el ADN con los cambios que se quieran hacer (Anzalone *et al.*, 2019). Este sistema no se ha probado en diferentes modelos como para que en este momento veamos su potencial uso rutinario.

El sistema CRISPR/Cas es tan versátil que no solo se puede usar para generar mutaciones en donde queramos en el organismo directamente, sino también podemos hacer otras cosas. Un ejemplo muy poderoso es que podemos manipular los niveles de expresión del gen que queramos en el tipo celular que deseemos. Para esto se utiliza una Cas9 mutante que no puede cortar al ADN (conocida como "dead Cas9 o dCas9"), pero que es capaz de reconocer al ARN guía y, por lo tanto, ser enviada a cualquier lugar en el genoma. Si a esta dCas9 le fusionamos dominios protéicos que activan la expresión de genes de manera general, podemos hacer que nuestro gen favorito se active cuando nosotros queramos. De manera similar, si a la dCas9 le fusionamos una región de una proteína que funciona reprimiendo la expresión genética, podemos inactivar a nuestro gen favorito (Figura3). Así mismo, también podemos alterar la configuración de los cromosomas fusionando enzimas a la dCas9 que modifican a los componentes de la cromatina, y lo que se nos ocurra enviar a cualquier lugar en el genoma (Domínguez *et al.*, 2016).

FIGURA 3. Utilización del sistema CRISPR/Cas9 para modular la expresión de un gen. Una Cas9 que no corta al ADN, pero que se puede dirigir a cualquier sitio en el genoma usando los ARN guías adecuados, puede llevar dominios que pueden activar la transcripción de un gen o dominios que repriman su expresión.



Otra impresionante edición que se puede hacer con el sistema CRISPR/Cas9 es cambiar una base por otra en el ADN en la región del genoma que nos interese. Para esto se utiliza una dCas9 fusionada con una desaminasa, que puede hacer cambios de un par de bases C-G a uno T-A, o A-T a G-C, generando mutaciones puntuales en los sitios hacia donde dirigimos a los ARNs guías sin escisión de ADN de doble hebra (Grünewald *et al.*, 2020).

Como se puede apreciar, la versatilidad del sistema CRISPR/Cas9 es asombrosa y nos permite diseñar ediciones en el lugar que deseemos del genoma de cualquier organismo. Aún más, el uso de sistemas similares de edición no solo está limitado al ADN como sustrato, sino que también al ARN.

Como se mencionó anteriormente, además de editar el ADN, los sistemas CRISPR-Cas también pueden editar ARN. Los sistemas como el CRISPR/Cas13 contienen una sola Proteína Cas13 guiada por ARN con actividad ribonucleasa, que se puede unir a ARN de cadena sencilla y cortarlo de manera específica. Este sistema se ha aplicado con éxito en la eliminación de ARNs específicos y recientemente en la detección de virus de ARN como el SARS-Cov2 (ver adelante). Este sistema se ha hecho más fino también, cambiando bases por medio de la fusión de una dCAS13 con una desaminasa (Cox *et al.*, 2017). Para algunas aplicaciones, este sistema tiene ventajas con respecto al CRISPR/Cas9, ya que los cambios o la aniquilación de un ARN no afectan al genoma, es muy eficiente y más específico en el reconocimiento del blanco.

De manera interesante, la Cas13 tiene la capacidad de cortar a otro ARN en otra región diferente del blanco, una vez que cortó al ARN al que fue dirigido por el ARN guía. Basado en que la Cas13 es muy específica en el corte que hace, se generó un protocolo de detección de ácidos nucleicos *in vitro* basada en la Cas13a al que le pusieron el nombre de SHERLOCK, por cierto, desarrollado por Feng Zhang (Gootenberg *et al.*, 2017).

Este sistema consiste en la Cas13a, el ARN guía dirigido a ARN específico, que puede ser el genoma del SARS-Cov2, secuencias y reporteros de ARN fluorescentes. El punto central en esta metodología es que la Cas13, una vez que corta a su blanco, puede cortar a otra molécula de ARN que puede estar acoplada a una molécula fluorescente. Por lo tanto, después de que la proteína Cas13 reconoce y escinde el ARN blanco, que hipotéticamente sería la del virus, cortará el ARN fluorescente y entonces se liberará la señal de fluorescencia, la cual es detectada solo cuando la muestra es positiva. Este sistema es igual de sensible que un RT-PCR, más rápido y más barato.

Conclusiones

En resumen, el sistema CRISPR/Cas9 nos permite manipular el genoma de cualquier organismo de una manera directa, en el lugar que queremos y de una forma altamente eficiente. Podemos generar las mutaciones de cualquier tipo en cualquier gen o región del genoma, podemos cambiar la secuencia de cualquier gen directamente en el organismo que deseamos, podemos manipular el grado de expresión de un gen y además lo podemos usar como un nuevo método de diagnóstico molecular. Aún hay más aplicaciones que en este momento se están desarrollando, que no solo tendrán impacto en el desarrollo del conocimiento básico, sino también en la medicina, la agricultura y la biotecnología en general. Por lo tanto, el otorgamiento del premio Nobel al desarrollo de esta poderosa herramienta era algo esperado por la comunidad científica. Pasaron solo 8 años después de que los artículos que mostraron el mecanismo y utilidad del sistema CRISPR/Cas fueron publicados, para que el comité Nobel decidiera dar el premio a Charpentier y a Doudna.

Pies de figuras-

Referencias

- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. & Liu, D.R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, (7785), 149-157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- Brouns, S.J., Jore, M.J., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V. & 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>.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas's systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.

- Cox, D. B. T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Franklin, B., Kellner, M.J., *et al.* (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6299), 1019–1027. <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://dx.doi.org/10.1038/nature09886>.
- Dominguez, A.A., Lim, W.A. & Qi, L.S. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17 (1), 5-15. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.2>.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.È., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H. & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468 (7320), 67-71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (39), 2579-2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., *et al.* (2017). Nucleic Acid Detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>.
- Grünewald, J., Zhou, R., Lareau, C.A., Garcia, S.P., Iyer, S., Miller, B.R., Langner, L.M., Hsu, J.Y., Aryee, M.J. & Joung, J.K. (2020). A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nat Biotechnol.*, 38(7), 861-864. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0535-y>.
- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F. & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 1(6): e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>.
- 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>.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, 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>.
- Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>.
- Mitsunobu, H., Teramoto, J., Nishida, K., & Kondo, A. (2017). Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function. *Trends Biotechnol.* 35 (10), 983-996. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.004>.

- Mojica, F.J., 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. *Mol. Microbio.*, 36(1), 244-246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
- Mojica, F.J.M., De-Villaseñor, C.S., García-Martínez, J.S. & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas's system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, 39(21), 9275-9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>.