



CRISPR-Cas9: Técnicas y aplicaciones

David Canet López
Máster Bioinformática y bioestadística

Ivette Olivares Castiñeira
24/05/2017



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>CRISPR-Cas9: Técnicas y aplicaciones</i>
Nombre del autor:	<i>David Canet López</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Ivette Olivares Castiñeira</i>
Nombre del PRA:	<i>Carles Ventura Royo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	05/2017
Titulación::	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Genómica comparativa</i>
Idioma del trabajo:	<i>Castellano</i>
Palabras clave	<i>CRISPR, Cas9, sgRNA</i>
<p>Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i></p>	
<p>La herramienta CRISPR-Cas9 permite la edición genómica de un sitio específico del DNA en células individuales u organismos complejos. La modificación de la nucleasa Cas9 ha permitido la utilización de esta técnica para crear distintos modelos celulares, animales, hacer screenings funcionales o realizar terapia génica en tan solo 5 años después de su descripción. Actualmente se está empezando a utilizar en clínica, se han aprobado ya dos terapias, en China y Estados Unidos. Debido a su auge el conocimiento de esta técnica es imprescindible para cualquier investigador. En este trabajo se presentan los tipos de mutaciones que permite realizar CRISPR-Cas9, su aplicación en el descubrimiento de fármacos, la generación de modelos animales para el estudio de enfermedades y los últimos avances logrados en terapia génica.</p>	

Abstract (in English, 250 words or less):

The CRISPR-Cas9 tool allows the genomic editing of a specific DNA site in individual cells or complex organisms. The modification of Cas9 nuclease allowed the use of this technique to create different cellular models, animal models, make functional screenings or perform gene therapy in only 5 years since its description. Currently CRISPR is being used in clinical practice, two therapies have already been approved in China and the United States. Due to its boom, the knowledge of this technique is required for any researcher. In this paper we present the types of mutations performed with CRISPR-Cas9, its application in drug discovery, the generation of disease animal models and the latest advances in gene therapy.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Contexto y justificación del Trabajo.....	1
1.2 Objetivos del Trabajo.....	2
1.3 Enfoque y método seguido.....	2
1.4 Planificación del Trabajo.....	3
1.5 Breve resumen de productos obtenidos.....	5
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria.....	5
2. Desarrollo del proyecto.....	6
2.1 Introducción.....	6
2.2 Tipos de mutaciones realizadas con CRISPR.....	12
2.3 Descubrimiento y desarrollo de medicamentos.....	22
2.4 Estudio de enfermedades con la herramienta CRISPR.....	29
2.5 Terapia génica.....	37
Ejemplo de producción de un sgRNA.....	44
3. Conclusiones.....	46
4. Glosario.....	47
5. Bibliografía.....	48

Lista de figuras

Figura 1. Aumento en el número de artículos por año sobre CRISPR a partir del año 2002, con respecto a TALENs y ZFN [2].	1
Figura 2. CRISPR tipo II, operón del gen <i>cas</i> con el <i>tracrRNA</i> y las secuencias que forman el <i>crRNA</i> [4].	6
Figura 3. Fases de la inmunidad del sistema CRISPR del tipo I y II [7].	7
Figura 4. Fases de los tipos I-III de CRISPR y sus diferencias [7].	8
Figura 5. El sistema CRISPR-Cas9, guiado de la Cas9 por el complejo <i>sgRNA</i> [3].	10
Figura 6. Corte de la Cas9 nativa [4].	12
Figura 7. Cas9 D10A y Cas9 H840A, pueden cortar únicamente la cadena en contacto con el <i>sgRNA</i> y la cadena que no está en contacto, respectivamente [4].	12
Figura 8. Doble corte generado en el DNA objetivo al utilizar la Cas9 D10A y dos <i>sgRNA</i> de guiado [4].	13
Figura 9. dCas9, no corta el DNA, se une a la diana especificada por la <i>sgRNA</i> [4].	14
Figura 10. A) Proceso de generación de <i>knockout</i> por reparación de DSBs por NHEJ. B) Inserciones específicas con CRISPR-Cas9 y el mecanismo de reparación HDR [11].	15
Figura 11. Proceso de translocación cromosómica e inversión [12].	16
Figura 12. Aa) Represión transcripcional mediada por dCas9 y un <i>sgRNA</i> . Ab) Represión transcripcional realizada por la fusión de dCas9 y KRAB, y el guiado de un <i>sgRNA</i> [21].	17
Figura 13. Ba) Activación transcripcional por la fusión de dCas9 con VP64. Bb) Reclutamiento de varios dominios de activación para aumentar el efecto de activación. Bc) Modificación del <i>sgRNA</i> para reclutar varios dominios de activación [21].	18
Figura 14. Mecanismo de multiplexado con dCas9 y la modificación de <i>sgRNA</i> [21].	18
Figura 15. Marcaje fluorescente mediada por CRISPR-Cas9 [26].	19
Figura 16. Mecanismo que permite la visualización multiplexada de varias zonas genómicas. CRISPRainbow [27].	20
Figura 17. Generación de varios colores de fluoróforos por combinación de los colores disponibles [27].	20
Figura 18. Esquema de la proteína de fusión dCas9-p300 [28].	20
Figura 19. Desmetilación y metilación de un locus diana al fusionar la dCas9 con el dominio Tet o el Dnmt [29].	21
Figura 20. Pasos que se están desarrollando para el descubrimiento de fármacos con CRISPR. 1) Identificación de la variación y su validación. 2) Creación de modelos seguros. 3) Desarrollo de terapias. [30].	22
Figura 21. Pasos en un screening funcional con CRISPR-Cas9[21].	25
Figura 22. Librerías LOF y GOF en el estudio del cáncer [32].	26
Figura 23. Generación de modelos animales a partir de la modificación de las células ES [35].	29
Figura 24. Generación de modelos animales <i>in vivo</i> con CRISPR [35].	31

Figura 25. Comparación de los tiempos necesarios para desarrollar un modelo con recombinación homóloga (a) y CRISPR <i>ex vivo</i> (b) e <i>in vivo</i> (c) [50].	34
Figura 26. Uso de la edición del genoma para generar rápidamente iPSCs isogénicas y células diferenciadas. La edición del genoma se puede utilizar para introducir una mutación o para corregir una mutación en iPSCs. Las líneas celulares isogénicas resultantes pueden entonces diferenciarse en el tipo de tejido deseado [57].	35
Figura 27. Enfermedades que han podido ser corregidas total o parcialmente con CRISPR-Cas9, 2015 [65].	38
Figura 28. Construcción realizada para generar el mosquito inmune a <i>P. falciparum</i> [70].	40
Figura 29. Vemos que existe un alelo patógeno. El cambio de G a A.	44
Figura 30. sgRNA elegido, se puede ver como hibrida sobre la secuencia diana.	45

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

La técnica de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) se utiliza para facilitar la edición genómica eficiente en células eucariotas simplemente especificando una secuencia de orientación de pocos nucleótidos dentro de un ARN guía. Desde que se descubrió esta funcionalidad en el sistema bacteriano CRISPR en el año 2013, los artículos publicados que incluyen la técnica han aumentado drásticamente superando los artículos que mencionan otras técnicas de edición genómica como las transcription activator–like effector nucleases (TALENs) o los dedos de cinc (ZFNs), gracias a que es una técnica barata, rápida y fácil de usar. Esta cantidad de artículos, en tan pocos años, es indicativo de las posibilidades que esta técnica puede proporcionar y está proporcionando [1,2,5].

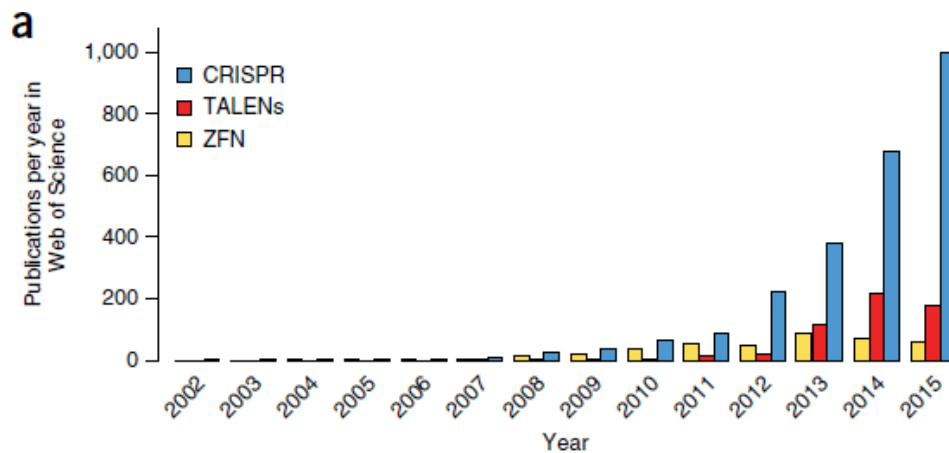


Figura 1. Aumento en el número de artículos por año sobre CRISPR a partir del año 2002, con respecto a TALENs y ZFN [2].

El sistema CRISPR se está implantando en laboratorios de todo el mundo, y se está convirtiendo dentro de estos en una herramienta imprescindible para el estudio de enfermedades, la generación de nuevas variedades de plantas, creación de fármacos o el avance en la terapia génica, entre muchas otras aplicaciones. Es por ello, que conocer y entender esta técnica es indispensable para cualquier investigador.

En el momento de planificar un proyecto es imprescindible tener en consideración todas aquellas técnicas que permitan obtener el resultado más óptimo con la menor cantidad de recursos (eficiencia); y posteriormente comparar estas técnicas para elegir aquella más apropiada. Para la elección más adecuada es necesario tener conocimientos sobre los sistemas que se van a comparar. Por ello, este trabajo presentará la herramienta CRISPR como preferencia en

proyectos de edición genómica o que utilicen la edición en algún paso de su protocolo.

Únicamente conocer la técnica no permite elegir una de ellas, es necesario buscar otros proyectos que la hayan utilizado y analizar sus resultados. En los siguientes apartados se van a evaluar diferentes proyectos en los que se ha utilizado la técnica CRISPR y se mostrarán las diferentes modificaciones que se pueden realizar con ella. También se presentarán las últimas funciones que se han desarrollado con la técnica, como el desarrollo de fármacos al descubrir dianas terapéuticas, o la situación actual de la terapia génica con CRISPR.

1.2 Objetivos del Trabajo

1. Analizar cómo se está utilizando actualmente la técnica CRISPR en los laboratorios.
 - 1.1 Evaluar la utilización de la herramienta CRISPR en el estudio de enfermedades
 - 1.2 Caracterizar los tipos de mutaciones que se pueden realizar con la técnica CRISPR
2. Investigar sobre los últimos descubrimientos y mejoras realizados sobre la técnica CRISPR.
 - 2.1 Describir el empleo del sistema CRISPR en la identificación de dianas terapéuticas y fármacos
 - 2.2 Estudiar la técnica CRISPR como terapia génica y evaluar el impacto ético de su utilización en humanos

1.3 Enfoque y método seguido

Como el proyecto será una revisión bibliográfica sobre CRISPR, lo adecuado será recoger la máxima información posible a partir de artículos científicos extraídos de la página PubMed. Una vez se conozca la técnica, el siguiente paso será la búsqueda de artículos más específicos para cada uno de los objetivos del proyecto. El análisis de cada artículo elegido será clave en el desarrollo de los apartados del proyecto.

No solo se obtendrá información a partir de artículos, si no que se indagará sobre investigaciones que se están realizando actualmente o futuras aplicaciones que se están desarrollando o investigando para CRISPR.

1.4 Planificación del Trabajo

a. Tareas

Introducción: Descripción de la herramienta CRISPR.

- Búsqueda de los artículos necesarios
- Estudio de los artículos elegidos y comprensión de la técnica
- Incluir la información más relevante en la memoria de una forma clara y organizada

Objetivo 1: Evaluar la utilización de la herramienta CRISPR en el estudio de enfermedades.

- Se priorizará la búsqueda de artículos que incluyan el objetivo 1 y el 2 (artículos sobre el estudio de enfermedades en los que se explique el tipo de mutaciones realizadas), para poder incluir ambos objetivos en un mismo apartado de la memoria.
- Estudio de los artículos elegidos y de las enfermedades
- Incluir la información obtenida en la memoria de una forma clara y organizada

Objetivo 2: Caracterizar los tipos de mutaciones que se pueden realizar con la técnica CRISPR.

- En el caso de no encontrar artículos adecuados que incluyan los objetivos 1 y 2 se buscarán otros artículos en los que se describan los tipos de mutaciones
- Estudio de los artículos elegidos y clasificación de los tipos de mutaciones
- Incluir la información obtenida en la memoria de una forma clara y organizada

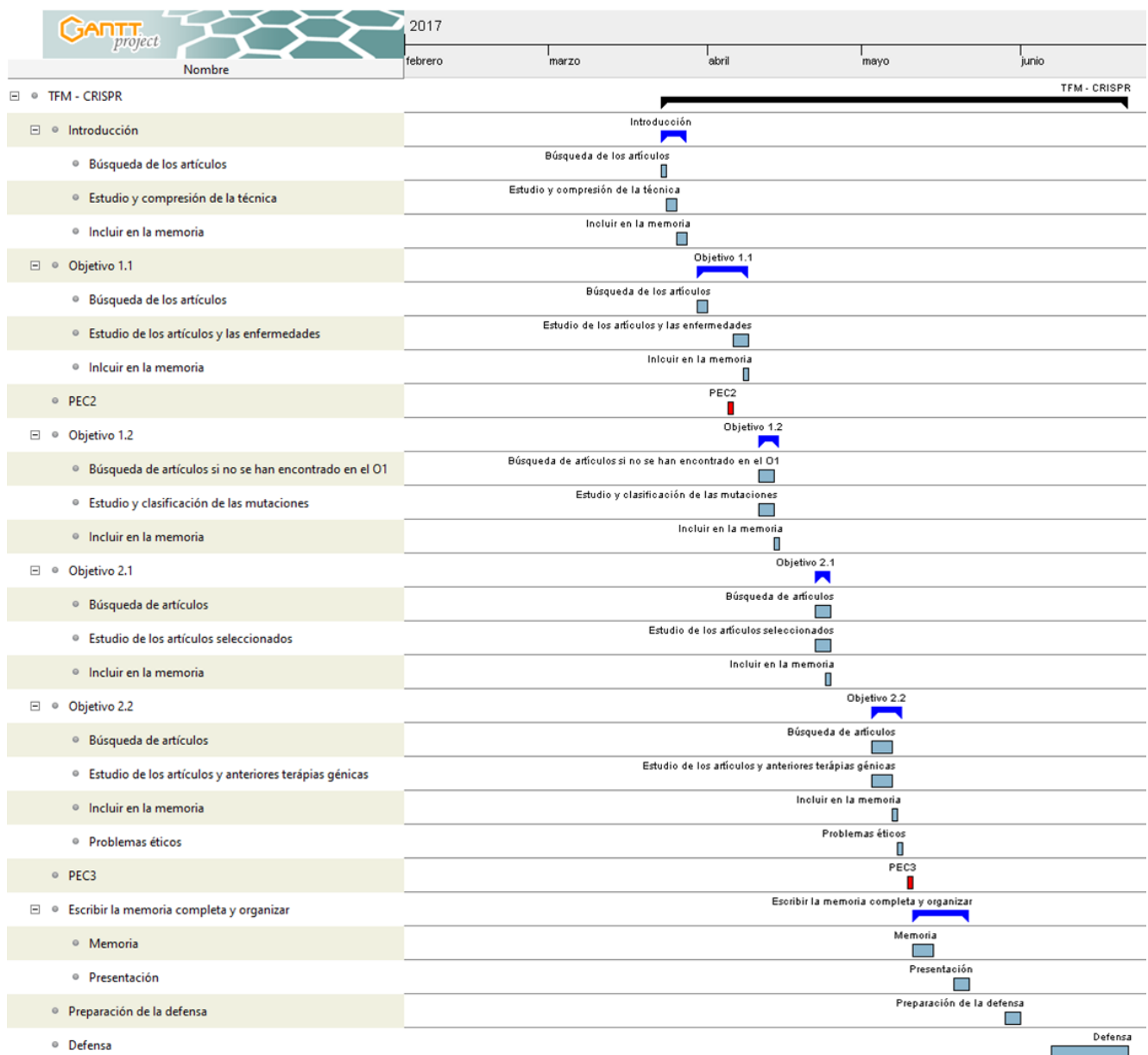
Objetivo 3: Describir el empleo del sistema CRISPR en la identificación de dianas terapéuticas y fármacos.

- Búsqueda de los artículos necesarios
- Estudio de los artículos elegidos
- Incluir la información obtenida en la memoria de una forma clara y organizada

Objetivo 4: Estudiar la técnica CRISPR como terapia génica y evaluar el impacto ético de su utilización en humanos

- Búsqueda de los artículos necesarios
- Estudio de los artículos elegidos y anteriores terapias génicas
- Incluir la información obtenida sobre la terapia génica en la memoria de una forma clara y organizada
- Búsqueda sobre los problemas éticos que pueda generar la utilización de CRISPR en humanos

b. Calendario



c. Hitos

Hito1: Completar la Introducción

Hito2: Terminar el Objetivo 1

Hito3: Entrega de la PEC2

Hito4: Completar el Objetivo 2

Hito5: Completar el Objetivo 3

Hito6: Terminar el Objetivo 4

Hito7: Entrega de la PEC3

Hito8: Entrega de la memoria

Hito9: Defensa

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

- Memoria: Contiene el desarrollo de todos los objetivos planteados, será una revisión bibliográfica.
- Presentación: Presentación con *Power Point* con los aspectos más importantes desarrollados en el TFM.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

1.1. CRISPR (Introducción)

Descripción de dónde procede CRISPR y cómo se utiliza en edición genómica. Tipos de CRISPR que existen.

1.2. Tipos de mutaciones con CRISPR

Se han clasificado los tipos de cortes y tipos de mutaciones que se pueden realizar con el sistema CRISPR-Cas9.

1.3. Identificación de dianas terapéuticas y fármacos con CRISPR

Se han descrito los distintos sistemas para el descubrimiento de nuevos fármacos utilizando CRISPR.

1.4. Estudio de enfermedades con CRISPR

Se han descrito diversos modelos desarrollados para distintos tipos de desórdenes. Modelos para enfermedades cardíacas, neurológicas y cáncer.

1.5. Terapia génica

Se han descrito los últimos avances en terapia génica con la herramienta CRISPR y además se ha descrito la ética relacionada con CRISPR.

2. Desarrollo del proyecto

2.1 Introducción

Algunas bacterias y la mayoría de arqueas poseen un sistema de defensa adaptativo que utiliza nucleasas guiadas por ARN (*Cas*), llamado repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y protegen a las bacterias de virus y plásmidos. Esta inmunidad la consiguen al introducir pequeñas secuencias de ADN, que provienen de virus o plásmidos, en el locus de CRISPR generando un registro de infecciones.

Se han identificado diferentes tipos (I – III) de sistemas CRISPR, cada uno tiene asociado un clúster de genes que codifican para las *Cas*, ARN no codificable y elementos repetitivos (Figura 2). Las repeticiones tienen intercaladas pequeñas secuencias derivadas de ADN exógeno (por ejemplo ADN de virus), llamado *spacer*; juntas, estas secuencias constituyen el array de ARN CRISPR (*crRNA*). En el ADN exógeno cada *protospacer* (es la secuencia *spacer* en el organismo exógeno) está siempre asociado a un motivo adyacente al *protospacer* (PAM), que varía según el sistema CRISPR [1,2,3].

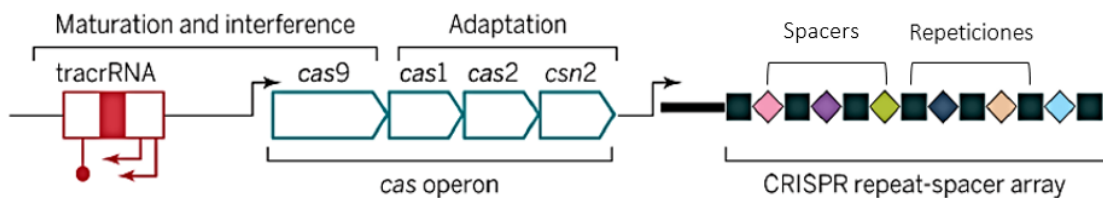


Figura 2. CRISPR tipo II, operón del gen *cas* con el *tracrRNA* y las secuencias que forman el *crRNA* [4].

La inmunidad mediada por CRISPR-Cas9 funciona en tres fases (Figura 3):

- **Fase adaptativa**, en la que los enzimas asociados a CRISPR adquieren los *protospacer* del ADN exógeno y lo integran en el locus CRISPR dentro del genoma procarionta seguido de la síntesis de una nueva repetición. Esta fase otorga memoria genética para poder realizar las dos siguientes fases.
- **Fase de expresión**, se transcribe la secuencia de repeticiones-*spacer* (locus CRISPR) y, luego las *Cas* lo escinden en pequeños fragmentos (*crRNA*), cada tipo de CRISPR actúa de forma distinta para generar estos fragmentos.

- **Fase de interferencia**, el crRNA guía a la maquinaria al DNA complementario que está flanqueado por la secuencia PAM para que corte el DNA exógeno en una zona concreta, cada tipo de CRISPR efectúa el corte con un complejo distinto. En esta fase se impide la infección [2,6,8].

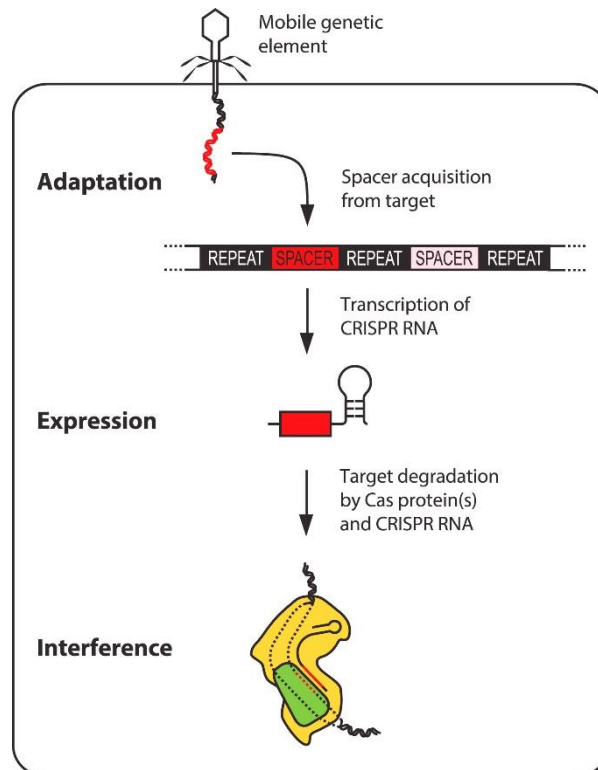


Figura 3. Fases de la inmunidad del sistema CRISPR del tipo I y II [7].

Existen tres tipos de sistemas CRISPR-Cas (I, II y III), todos ellos pueden coexistir en un mismo organismo. El tipo **I** es reconocido por la presencia de Cas3, una proteína con los dominios helicasa y DNasa que son los responsables de la degradación. Actualmente, se conocen seis subtipos del Tipo I-A al Tipo I-F que tienen un número variable de genes Cas. El pre-crRNA es procesado por Cas5 o Cas6. Aparte de Cas1, Cas2 y Cas3, todos los sistemas Tipo I codifican un complejo de tipo Cascada. Este complejo se une a crRNA y localiza el objetivo. Este tipo de CRISPR necesita de un complejo multi-Cas para su funcionamiento.

En el tipo **II** la maduración del crRNA se produce por un trans-activador (tracrRNA) que es complementario a las repeticiones en el pre-crRNA; lo más importante es que sólo una endonucleasa (Cas9) es la responsable del corte después del guiado al DNA exógeno por el crRNA-tracrRNA. Hay dos subtipos, II-A y II-B.

El sistema tipo **III** se asocia a la proteína Cas10 con una función poco clara. También utiliza la Cas6 para el procesado del pre-crRNA. Las proteínas Cas se destinan a los complejos Csm o Cmr, que son similares a las proteínas Cascada del tipo I.

Lo más significativo es que en los tipos I y III, utilizan endonucleasas Cas especializadas para procesar el pre-crRNA, y luego el crRNA maduro se asocia a un complejo multi-Cas, el cual reconocerá y cortará el DNA exógeno. Y en los tipos II la maduración del crRNA se produce por tracrRNA y solo necesita Cas9 para el corte del DNA objetivo (Figura 4) [1,7,8].

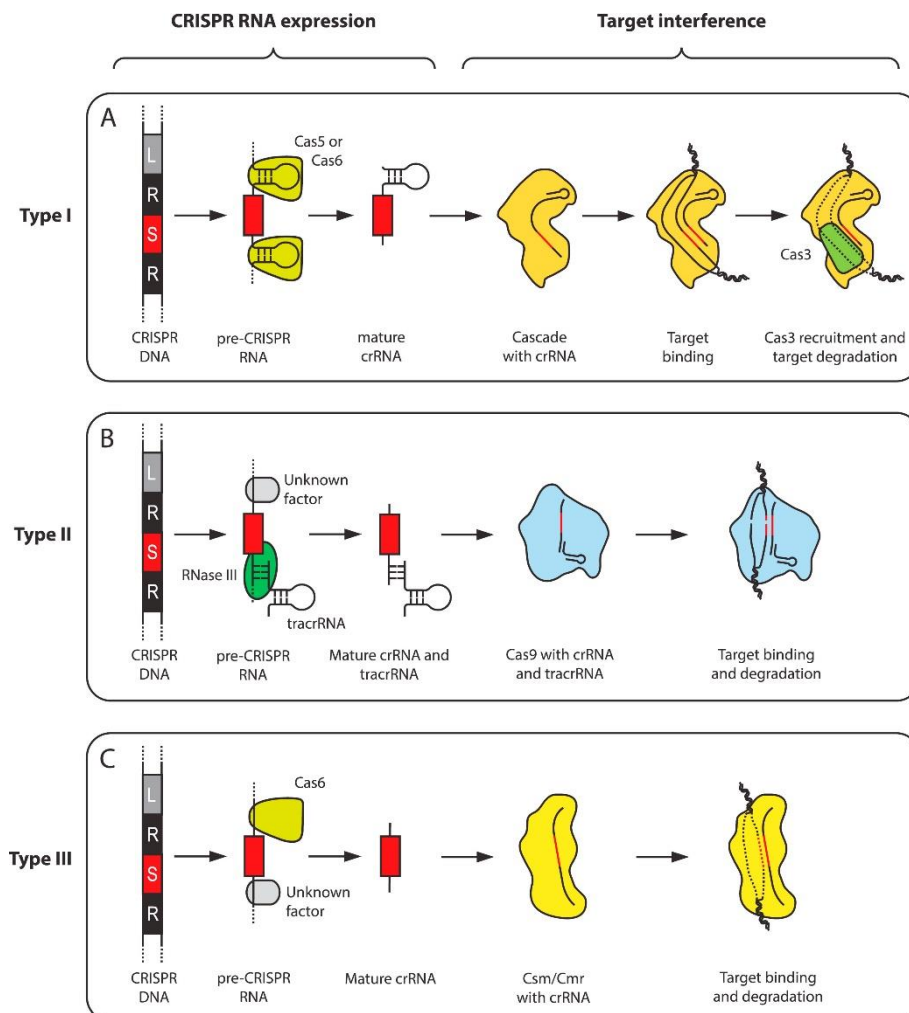


Figura 4. Fases de los tipos I-III de CRISPR y sus diferencias [7].

Se descubrió que esta técnica podía utilizarse para la ingeniería genética de una forma muy específica, eficiente y fácil de diseñar para una gran variedad de tipos celulares y organismos. Únicamente diseñando la secuencia de RNA guía se podía dirigir el corte de la Cas9. Se eligió para llevar a cabo esta función el tipo II de CRISPR ya que solo necesita una proteína (Cas9) guiada por ARN para cortar el ADN diana [1,8].

El método desarrollado para la utilización de CRISPR-Cas9 en ingeniería genética es el siguiente: diseño de la secuencia single-guide RNA (sgRNA, unión de crRNA y tracrRNA en una cadena) con un programa bioinformático como CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>). Se elige la Cas9 más adecuada; la Cas9 de cada organismo detecta una PAM distinta, la de *Streptococcus pyogenes* es la más utilizada y detecta la secuencia previa al motivo 5'-NGG, otra como la de *S. thermophilus* detecta 5'-NNAGAA y 5'-NGGNG. También se está empezando a utilizar otra endonucleasa, la Cpf1.

Es necesaria la expresión en las células objetivo, por ello, es importante elegir el método de liberación. Existen varios métodos que permiten su expresión como vectores de expresión de mamíferos, transducción lentiviral, transducción por virus adeno-asociado (AAV¹), plásmidos que contienen el mRNA de Cas9 y el sgRNA, y liberación del complejo Cas9-sgRNA por lípidos catiónicos. Estas técnicas permiten la coexpresión de la Cas9 junto al sgRNA en el organismo objetivo.

El sgRNA guía a la Cas9 al sitio específico del dsDNA por complementariedad de bases entre los 20 nt situados en el 5' del sgRNA, pero solo se unirá a aquellas secuencias que estén situadas inmediatamente en el 5' de la PAM (en el caso de elegir la Cas9 de *S. pyogenes* antes del motivo 5'-NGG). Para que la endonucleasa corte el dsDNA objetivo es necesario que los 12 nt más cercanos a la PAM tengan complementariedad (en los restantes 8 nt se puede permitir *mismatch*), si se produce la complementariedad, la Cas9 cortará 3 bases aguas arriba del borde 3' de la secuencia PAM. La escisión se produce en ambas cadenas de DNA (DSB) gracias a los dominios RuvC y HNH de la Cas9 (Figura 5).

La maquinaria de reparación propia de la célula repara el DSB producido por la Cas9 por dos mecanismos, por recombinación no homóloga (NHEJ) o por la reparación dirigida por homología (HDR) [1,2,3,4].

¹ AAV: Se trata de Parvovirus que infectan al hombre pero no son patógenos. Pertenecen al grupo de los Dependovirus, virus ADN sin envuelta que necesitan de funciones helper para completar su ciclo replicativo completo. Estas funciones helper las aporta un adenovirus o un herpesvirus que sobreinfecta las mismas células que previamente habían sido infectadas por un dependovirus.

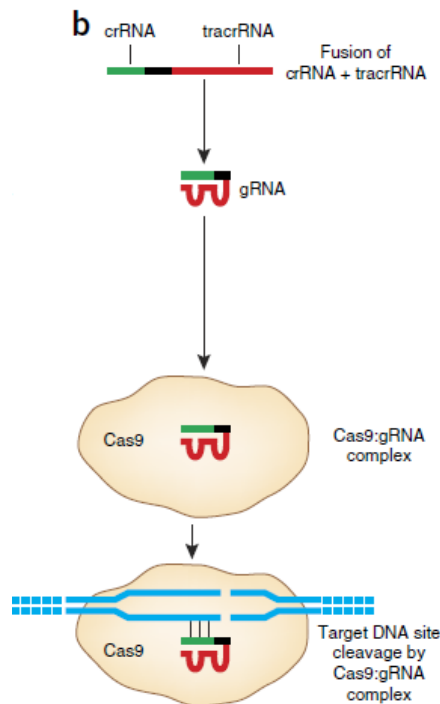


Figura 5. El sistema CRISPR-Cas9, guiado de la Cas9 por el complejo sgRNA [3].

El sistema CRISPR-Cas9 tiene ciertas limitaciones, una de ellas es la necesidad de encontrar la secuencia PAM por la Cas9; en el caso de SpCas9 (Cas9 de *S. pyogenes*) que es la más utilizada, no es una limitación severa, ya que la secuencia NGG puede encontrarse cada 8-12 nt a lo largo del genoma. La otra limitación es la posible actividad *off-target* de la herramienta, que aunque sea reducida existe esta actividad [8].

Se ha visto en anteriores estudios que la Cas9 no necesita mucha similitud entre el RNA de guiado con el objetivo para que esta se una, pero necesita una alta similitud para cortarla. Se determinó que los *mismatches* son mejor tolerados si se encuentran más cercanos del límite 5' de la secuencia de 20 nt que es complementaria al DNA objetivo. Los 8-12 nt más cercanos al 3', llamados secuencias semilla, son los más importantes para el reconocimiento de la secuencia objetivo y posterior corte. Más de 3 mismatches en la secuencia guía no son tolerados por la Cas9 para realizar el corte.

También puede ocurrir que la secuencia objetivo se encuentre en otra parte del genoma y, por tanto, la Cas9 cortará ambas. Esto puede predecirse por los programas bioinformáticos diseñados para la síntesis de sgRNA. La concentración enzimática parece ser otro factor determinante en la actividad *off-target*.

En general, los diversos estudios publicados sugieren fuertemente que la actividad *off-target* del CRISPR-Cas9 puede ser variable en frecuencia y difícil de predecir. Para cualquier objetivo, actualmente no es posible predecir cuántos desajustes pueden tolerarse, ni tampoco entender completamente por qué algunos sitios se escinde mientras que otros no. Pero hay diversos métodos que permiten reducir estos *off-target*. Reducir la concentración de sgRNA y Cas9 parece que disminuye la actividad *off-target* y aumenta la *on-target*, ya que a mayores concentraciones parece que los *mismatches* son más tolerados. La utilización de doble corte mejora la especificidad, esta técnica emplea dos Cas9 y dos sgRNAs para realizar dos cortes (se explicará el siguiente apartado). Como última mejora, se han acortado sgRNAs por el final 5' generando una secuencia que tiene 17-18 nt complementarios a la secuencia diana (tru-gRNA). Se ha visto con estas secuencias la misma actividad *on-target* pero una disminución de la actividad *off-target* al ser más sensibles a *mismatches* simples o dobles en la unión sgRNA-DNA [3,5,8].

2.2 Tipos de mutaciones realizadas con CRISPR

Tipos de cortes con CRISPR

Diversos grupos de investigación han desarrollado, a partir de la Cas9 nativa, otras variantes de la Cas9 que permiten realizar cortes en una de las dos cadenas de DNA específicamente, disminuir la actividad *off-target* o eliminar por completo su actividad de corta para que sea una estructura de guiado. Se van a mostrar estas variantes de la Cas9.

En primer lugar tenemos la Cas9 nativa, sus dominios RuvC y HNH permiten el corte de ambas hebras de DNA complementarias.

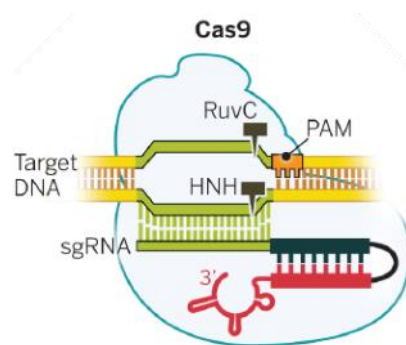


Figura 6. Corte de la Cas9 nativa [4].

A partir de esta Cas9 nativa, se han desarrollado dos nucleasas más: la Cas9 D10A y la Cas9 H840A. En la Cas9 D10A se ha mutado el dominio RuvC, por el intercambio del aspartato a la alanina en la posición 10, para que solo pueda realizar el corte el dominio HNH. Se genera una Cas9 que solo puede cortar la cadena de DNA en contacto con el sgRNA. En la Cas9 H840A, la mutación inactiva el dominio HNH, por lo que se genera una Cas9 que solo puede cortar la cadena que no está en contacto con el sgRNA (Figura 7) [3,4,9].

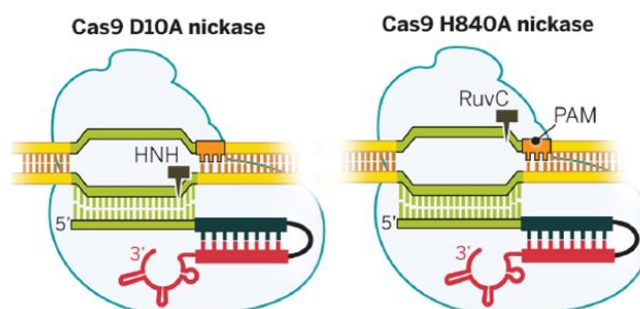


Figura 7. Cas9 D10A y Cas9 H840A, pueden cortar únicamente la cadena en contacto con el sgRNA y la cadena que no está en contacto, respectivamente [4].

Gracias al desarrollo de las anteriores Cas9, se ha podido realizar una estrategia para reducir el *off-target* de la Cas9, el doble corte. Mientras que la nucleasa Cas9 del Wild Type (WT) es guiada por un sgRNA para mediar un DSB en el locus diana, la Cas9 D10A puede guiarse con un par de sgRNAs espaciados y orientados apropiadamente para introducir simultáneamente cortes monocatenarios en ambas cadenas del DNA diana.

Los DSBs de doble corte se reparan a través de NHEJ y dan como resultado la formación de un indel con niveles de eficiencia similares a los de la Cas9 nativa. Como los cortes monocatenarios se reparan sin formación de un indel, el DSB sólo se produciría si ambos sgRNAs son capaces de localizar las secuencias objetivo dentro de un espacio definido. Por lo tanto, esta estrategia duplica el número de bases que necesitan ser específicamente reconocidos en el sitio de destino y aumenta significativamente la especificidad de la técnica CRISPR-Cas9 (Figura 8).

Para una realización óptima de esta técnica deben diseñarse sgRNAs que al cortar se generen extremos 5' salientes y, además, debe haber una separación entre ambas secuencias objetivo de entre 0-20 pares de bases (bp) [1,3,8].

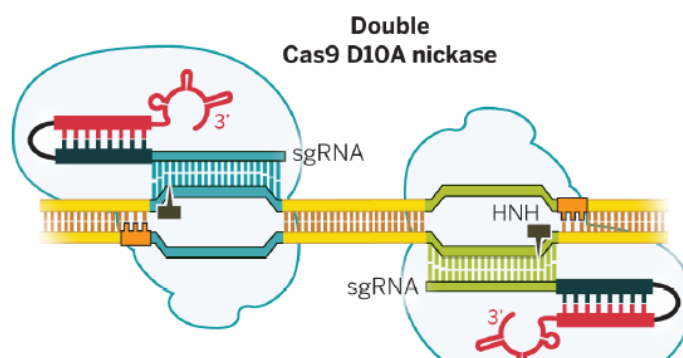


Figura 8. Doble corte generado en el DNA objetivo al utilizar la Cas9 D10A y dos sgRNA de guiado [4].

Una de las habilidades que se ha querido aprovechar de la Cas9 es su facilidad de unirse al DNA por el guiado de un sgRNA, pero evitando el corte. Para generar esta Cas9 se han inactivado ambos dominios (RuvC y HNH) con las mutaciones que se han visto, se conoce como la deactivated-Cas9 (dCas9, Figura 9). Esta dCas9 puede, por sí sola, reprimir en cierta cantidad la expresión de un gen o ser fusionada con otras proteínas para dirigirlas al lugar del DNA donde deben actuar. Estas funciones se verán más adelante, en la parte de tipos de mutaciones [3,4].

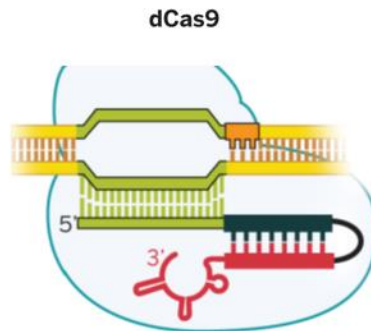


Figura 9. dCas9, no corta el DNA, se une a la diana especificada por la sgRNA [4].

Tipos de mutaciones

La técnica CRISPR-Cas9 fue descrita hace solo 5 años y, actualmente, es capaz de reemplazar, reparar, silenciar y remodelar elementos genómicos. A continuación se describen todas las modificaciones genómicas que la técnica permite realizar.

Knockouts

Los DSB introducidos por la nucleasa Cas9 en el DNA diana pueden ser reparados por uno de los sistemas de reparación que posee la célula, el NHEJ, que es el mecanismo de reparación más activo. Esta reparación resulta en la introducción de inserciones o deleciones aleatorias (InDels), produciendo la interrupción del marco de lectura de un gen o de los sitios de unión de factores de activación en promotores o potenciadores (Figura 10). El proceso resulta en el *knockout* del gen afectado [8,10,11,12].

Inserciones o correcciones específicas

Hay otro mecanismo en la célula que puede reparar los DSB, el HDR. A diferencia de la técnica anterior, el HDR permite la introducción nucleótidos específicos o largas inserciones. Para ello, es necesaria la introducción de una secuencia con los cambios que se quieren introducir, junto con el sgRNA y la Cas9 (Figura 10). La secuencia específica debe contener, además de los cambios que se quieran introducir, la secuencia homóloga aguas arriba y aguas abajo del objetivo; puede ser un oligonucleótido monocatenario, un oligonucleótido bicatenario o un plásmido de ADN bicatenario según la aplicación. También deberá carecer de la secuencia PAM, ya que si la incluye será un potencial objetivo de la Cas9 que introducimos.

Hay que saber que la eficiencia del HDR es baja. Por ello, muchos grupos están tratando de mejorarla de dos formas: sincronizando las células en la etapa celular cuando HDR es más activo, o por inhibición química o genéticas de los genes implicados en NHEJ. Al ser la eficiencia de escisión de Cas9 muy alta y la eficiencia de HDR relativamente baja, una parte de los DSB

se repararán a través de NHEJ, por ello, es necesario confirmar experimentalmente la presencia de la modificación deseada [10,11,13].

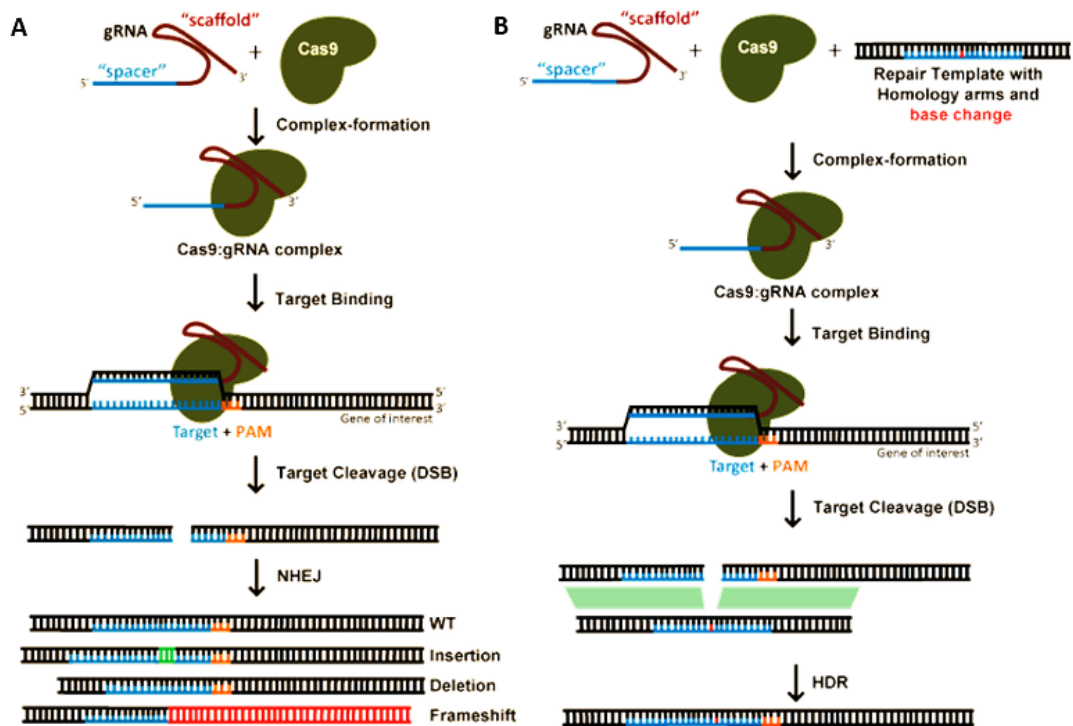


Figura 10. A) Proceso de generación de *knockout* por reparación de DSBs por NHEJ. B) Inserciones específicas con CRISPR-Cas9 y el mecanismo de reparación HDR [11].

Inversiones y translocaciones

Otra de las modificaciones que puede generar la técnica CRISPR-Cas9 son las translocaciones cromosómicas, técnica muy útil para estudiar ciertos cánceres. Se seleccionan dos sgRNAs para generar DSBs en dos loci de cromosomas no homólogos, seguido de la reparación por NHEJ. Es un proceso que puede realizarse *in vivo* (Figura 11).

También pueden realizarse inversiones que a diferencia de las translocaciones se generan dos DBS en el mismo cromosoma y al repararse por NHEJ se generará una inversión del fragmento generado por los dos cortes o una larga delección (Figura 11) [10,14,15].

En comparación con la reparación de un DSB único, la reparación de dos DSBs que conduce a la translocación cromosómica es ineficiente, que suele ocurrir a frecuencias de $\sim 10^{-3}$ a 10^{-4} . No es sorprendente entonces que la recuperación de clones que contienen translocaciones es una tarea laboriosa. Recientemente, se ha desarrollado un método para reparar y seleccionar las células que poseen las translocaciones con la reparación HDR.

Se introduce como secuencia de reparación para HDR, un gen de resistencia a antibióticos, dos sitios LoxP a cada extremo de este gen, y se delimitan los extremos con las secuencias complementarias a los fragmentos generados y que se quieren unir. De esta forma se pueden seleccionar aquellas células en las que se ha realizado la translocación con el gen de resistencia y luego permitir la síntesis del producto eliminando este gen con la recombinasa Cre [16].

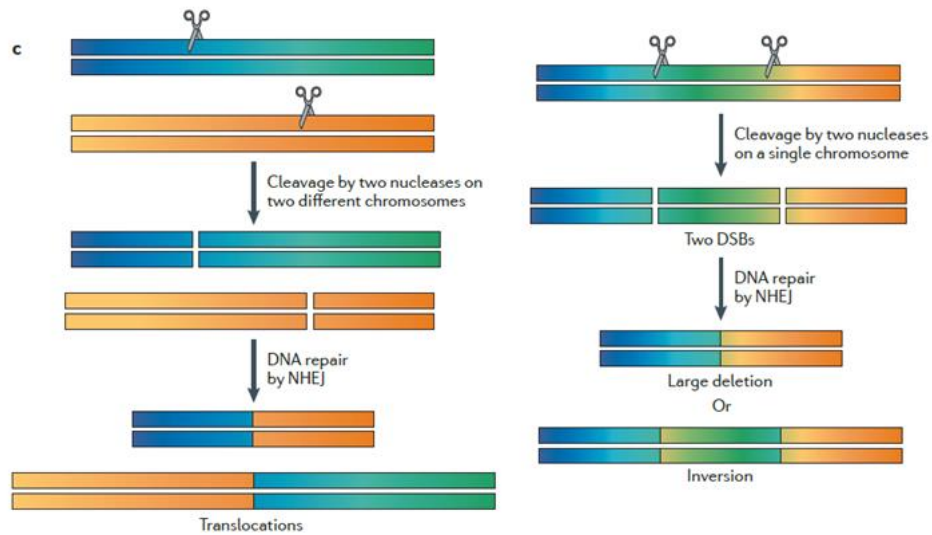


Figura 11. Proceso de translocación cromosómica e inversión [12].

Para los siguientes tipos de mutaciones realizadas con CRISPR, es necesaria la utilización de la dCas9 que servirá como herramienta de guiado para otras proteínas.

Represión transcripcional (CRISPRi)

El control de la expresión génica es un método muy importante y utilizado para entender las funciones de ciertos genes de interés y para la ingeniería de los sistemas de regulación genética. El primer método que se desarrolló con CRISPR fue el uso de la dCas9 con un sgRNA. La unión del complejo dCas9-sgRNA a la cadena de DNA no moldea de la región que codifica una proteína, produce el bloqueo de la elongación (Figura 12). Si el complejo se une a regiones promotoras, impide la unión de factores de transcripción y se bloquea la iniciación de la transcripción. Una de las grandes ventajas de la utilización de dCas9 como herramienta de guiado es que se pueden introducir múltiples sgRNAs para reprimir diversos genes al mismo tiempo y, además, es un sistema reversible [17,18].

El sistema anterior es muy efectivo en bacterias, pero en células de mamíferos solo se muestra un modesto bloqueo en la transcripción, existe una técnica que mejora su efectividad. La dCas9 puede fusionarse a efectores de represión para reprimir la expresión de un gen. Se ha demostrado que la fusión de dCas9 con el dominio represor modificador de la cromatina, Krüppel-associated box (KRAB), permite silenciar genes eficazmente en células de mamíferos (Figura 12). Este sistema reprime genes con una eficiencia comparable al silenciamiento con RNA de interferencia (RNAi), pero con menor impacto en genes no diana [19,20].

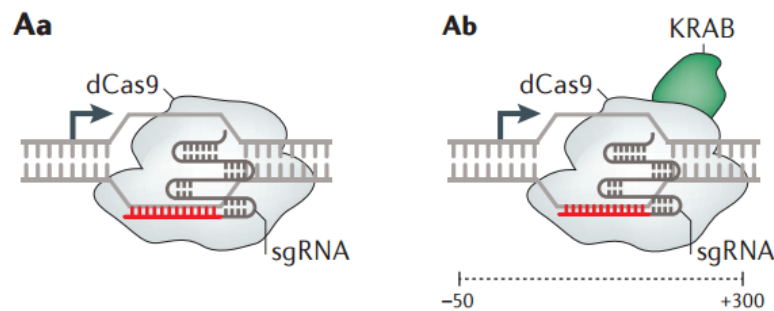


Figura 12. Aa) Represión transcripcional mediada por dCas9 y un sgRNA. Ab) Represión transcripcional realizada por la fusión de dCas9 y KRAB, y el guiado de un sgRNA [21].

Activación transcripcional (CRISPRa)

De la misma forma que en la represión, se puede fusionar la dCas9 a un efector de activación para activar la expresión de un gen. Se ha comprobado que la fusión de dCas9 con VP64 (dominio de activación transcripcional) (Figura 13), permite la activación del gen objetivo en bacterias y en células de mamíferos [21,22].

En determinados estudios se necesita una mayor expresión de la producida por el complejo dCas9-VP64, se sabe que el reclutamiento de varias copias de un dominio activador puede realizar este efecto aumentado. Han logrado realizar un sistema de reclutamiento utilizando dCas9. Este sistema está formado por la fusión de dCas9 a una colección epítopos peptídicos, los cuales reclutan de manera modular múltiples copias de fragmentos de anticuerpos de cadena única (ScFv) que están fusionados con dominios de activación transcripcional como VP64 (Figura 13) [21,23].

El último sistema para la activación transcripcional se desarrolló a partir de la estructura cristalina de la Cas9 de *S. pyogenes*. Se vio que se podían introducir sustituciones y deleciones en el *tetra*loop y el *stem loop 2* de la Cas9 sin afectar a su función, y que podía tolerar la adición de proteínas que interactúan con el RNA para facilitar el reclutamiento de dominios efectores al dCas9. El sistema que se desarrolló es el siguiente: la utilización de la proteína

fusionada dCas9-VP64 con un sgRNA modificado que contiene el motivo MS2 en estructura bucle en el *tetra loop* y el *stem loop 2*. Este bucle recluta la proteína MS2 de la capa (MCP) que está fusionada a otros activadores como el p65 o el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) (Figura 13) [21,24].

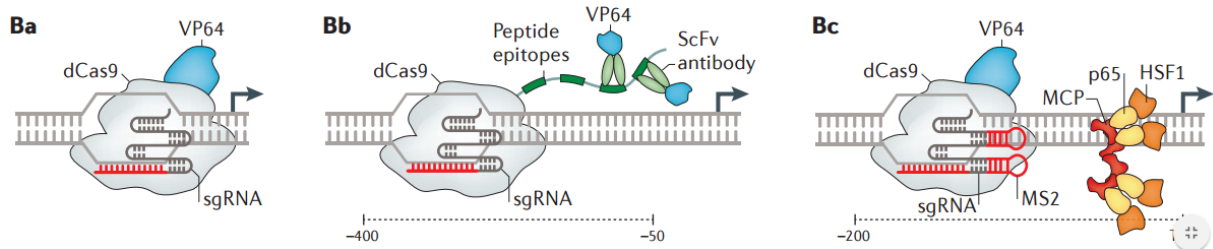


Figura 13. Ba) Activación transcripcional por la fusión de dCas9 con VP64. Bb) Reclutamiento de varios dominios de activación para aumentar el efecto de activación. Bc) Modificación del sgRNA para reclutar varios dominios de activación [21].

Activación y represión multiplexadas

Esta técnica permite hacer objetivo diversos genes para un estudio transcripcional y admite que sean unos activados y otros reprimidos en un mismo experimento. Este sistema se ha desarrollado en base al último sistema explicado. Se generan diversos sgRNAs con diferentes motivos de reconocimiento de RNA, pueden ser MS2, PP7 o com, y los correspondientes dominios de unión (MCP, PCP y Com) se fusionan con diferentes efectores transcripcionales (KRAB o VP64) (Figura 14) [25].

Si queremos activar un gen X y reprimir un gen Y, se generará un sgRNA para X con el motivo MS2, y se fusionará MCP con VP64. Para el gen Y, sgRNA-PP7 y se fusionará PCP con KRAB. Cuando se unan dCas9 y sgRNA y encuentren el gen X, se unirá el complejo MCP-VP64 y se activará la transcripción. En Y se unirá PCP-KRAB y se reprimirá.

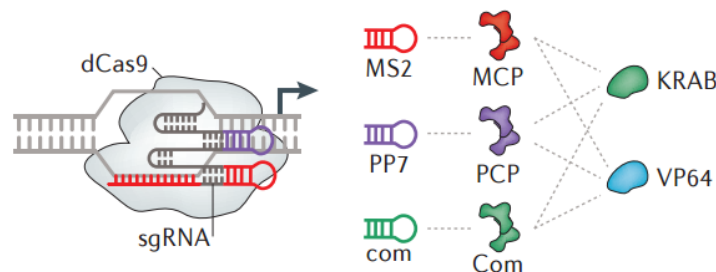


Figura 14. Mecanismo de multiplexado con dCas9 y la modificación de sgRNA [21].

Imagen

Para dilucidar los mecanismos que relacionan la función de elementos genómicos con su organización espaciotemporal, es indispensable un método para el visualizado de secuencias de ADN específicas en células vivas. Antes de CRISPR-Cas9, tales estudios se han basado principalmente en marcado del ADN con proteínas fluorescentes. Sin embargo, debido a su secuencia diana fija y a las opciones limitadas de proteínas nativas de unión a ADN, este enfoque se ha limitado a visualizar secuencias repetitivas artificiales insertadas en el genoma o elementos genómicos especializados como telómeros, centrómeros y, en bacterias, locis de unión H-NS. Aunque la hibridación in situ fluorescente (FISH) aporta flexibilidad es incompatible con la vida.

Con la aparición de CRISPR-Cas9 se ha desarrollado una técnica que permite resolver todos estos problemas. El sistema consiste en la fusión de la dCas9 con una proteína fluorescente (como la EGFP) y el sgRNA específico para dirigir al complejo (Figura 15). El complejo se une al loci específico y permite su visualización [26].

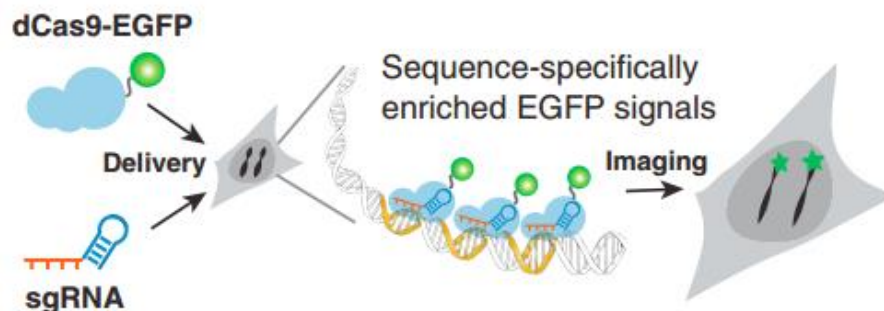


Figura 15. Marcaje fluorescente mediada por CRISPR-Cas9 [26].

Recientemente, se ha desarrollado un método para visualizar múltiples loci genómicos, el CRISPRainbow. Se basa en la misma técnica que la activación y represión multiplexada. Se genera un sgRNA con diferentes motivos de reconocimiento de RNA (como MS2 o PP7), y los correspondientes dominios de unión se fusionan con una proteína fluorescente. Para colores simples (azul, verde o rojo) se utiliza el mismo motivo de reconocimiento para ambos bucles y se fusionan los dos dominios de unión con la misma proteína fluorescente (Figura 16).

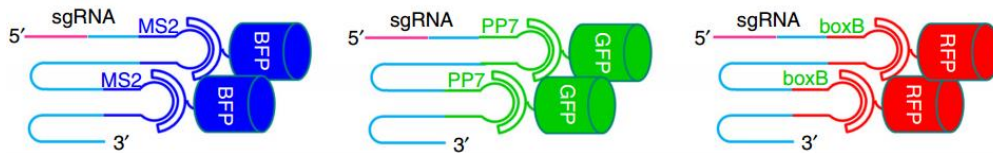


Figura 16. Mecanismo que permite la visualización multiplexada de varias zonas genómicas. CRISPRainbow [27].

Si se necesitan más colores para abarcar más loci, se utilizará en cada bucle del sgRNA un motivo de reconocimiento distinto (por ejemplo el PP7 y el boxB), y se fusionará cada dominio de unión con una proteína fluorescente (PCP-GFP y N22-RFP), generando así la combinación de los dos fluoróforos (Amarillo) (Figura 17) [27].

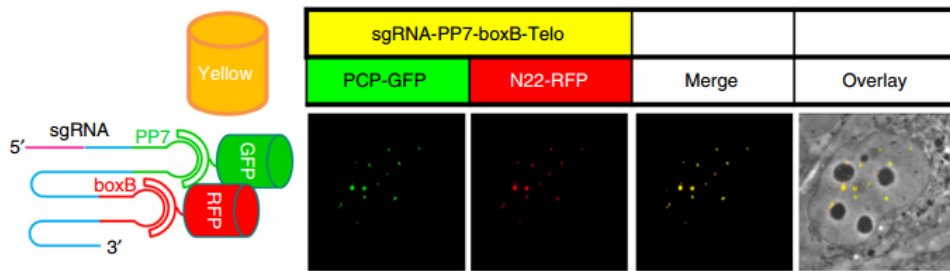


Figura 17. Generación de varios colores de fluoróforos por combinación de los colores disponibles [27].

Alterar el estado epigenético

Las técnicas para activar o reprimir genes con CRISPR son muy útiles pero no sirven para testear el rol específico de marcas epigenéticas ni sirven para alterar el estado epigenético. Para ello, existe un método específico, el CRISPR-Cas9 basado en la acetiltransferasa. Se ha fusionado la dCas9 con el núcleo catalítico de la acetiltransferasa p300 humana. Este complejo cataliza la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 en los sitios diana, dando como resultado la activación transcripcional robusta de los genes diana de promotores y potenciadores próximos y distales (Figura 18) [28].

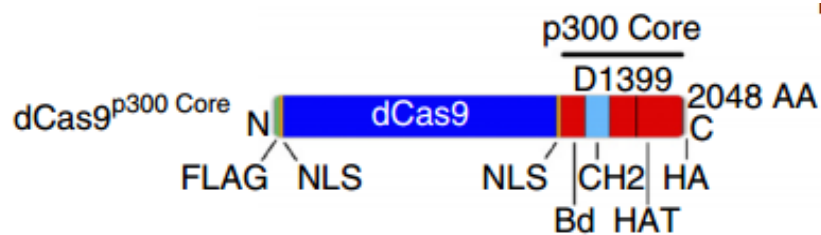


Figura 18. Esquema de la proteína de fusión dCas9-p300 [28].

La metilación del DNA es un mecanismo epigenético que controla la expresión de genes en muchos procesos biológicos, pero es difícil determinar las funciones de eventos de metilación específicos. Recientemente se creó un sistema con CRISPR que permite metilar o desmetilar sitios específicos del DNA. Consiste en la fusión de la dCas9 con el dominio enzimático Tet1 o con el dominio Dnmt3a para desmetilar o metilar el DNA diana, respectivamente (Figura 19) [29].

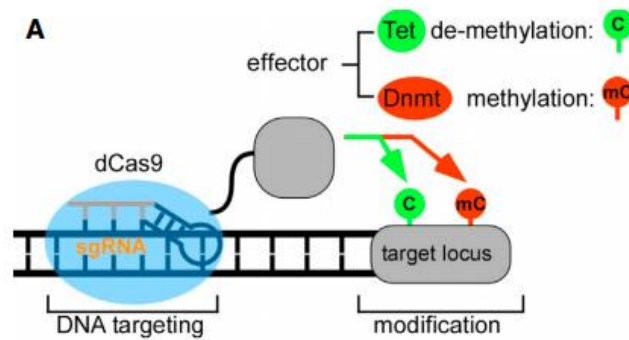


Figura 19. Desmetilación y metilación de un locus diana al fusionar la dCas9 con el dominio Tet o el Dnmt [29].

2.3 Descubrimiento y desarrollo de medicamentos

La técnica CRISPR-Cas9 está transformando las etapas que incluyen el descubrimiento y el desarrollo de un fármaco gracias a la facilidad y rapidez con la que permite la alteración genómica en los modelos mamíferos y en los tejidos humanos. Los tipos de mutaciones que se han explicado y su sencillez han permitido que esta herramienta sea una preferencia y se afiance sobre otras técnicas para el descubrimiento de medicamentos.

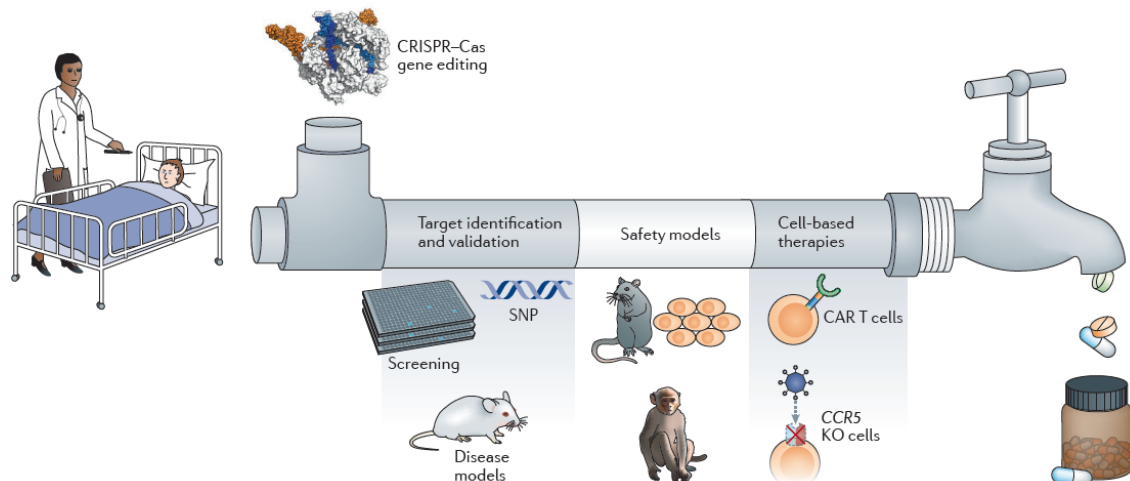


Figura 20. Pasos que se están desarrollando para el descubrimiento de fármacos con CRISPR. 1) Identificación de la variación y su validación. 2) Creación de modelos seguros. 3) Desarrollo de terapias. [30]

Desarrollo de modelos celulares con CRISPR-Cas9

En su momento los avances en secuenciación de DNA nos introdujeron en la variación entre grupos de pacientes y la población, dando a conocer una relación entre la variación genética y la predisposición a una enfermedad, su desarrollo y su respuesta al tratamiento. Estos avances llevaron a interesarnos en la medicina personalizada, la cual recurre a la información clásica del paciente (datos, historial, síntomas...) junto con datos genéticos personales para tratar de forma individual al paciente. Sin embargo, estas variaciones observadas necesitan ser testeadas en modelos genéticos precisos, para detectar variantes de significado desconocido, diseñar nuevos fármacos o cambiar las indicaciones de un fármaco ya creado.

Los investigadores pueden utilizar muestras de tejidos enfermos y normales extraídos de pacientes emparejados para separar las relaciones. Sin embargo, encontrar una gran cantidad de muestras emparejadas puede resultar difícil o no estar disponible. La generación de clones mutantes o *knockout* a través de la recombinación homóloga clásica condujo a un conjunto limitado de líneas celulares isogénicas, en las que una línea derivada difiere de

la madre por una mutación mínima definida. Estos recursos demostraron ser increíblemente útiles, pero las técnicas iniciales para su generación fueron muy costosas y consumieron mucho tiempo, lo que dificultó su adopción generalizada para el desarrollo de fármacos.

La herramienta CRISPR-Cas ha cambiado completamente esta situación, permitiendo la generación de líneas celulares humanas *knockout* isogénicas para genómica comparativa de forma muy sencilla. En 5 años, se ha convertido en una herramienta común en los laboratorios de todo el planeta. Los *knockouts* generados con CRISPR-Cas permiten establecer rápidamente a los investigadores los roles que desempeñan determinados oncogenes, supresores de tumores y otros factores en un determinado contexto.

De la misma forma, realizar el “knock-in” de alelos mutantes por HDR permite a los investigadores testear los efectos de la mutación asociada a la enfermedad en un fondo isogénico [30].

Screening funcional

El cribado genético de alto rendimiento es una herramienta muy potente para el descubrimiento de fármacos potenciales. Los *screens* genéticos avanzados son particularmente útiles para estudiar enfermedades o fenotipos para los cuales la causa genética que los produce no se conoce. En general, el objetivo de un *screen* genético es generar una gran población de células con mutaciones en una amplia variedad de genes y utilizar estas células mutantes para identificar las perturbaciones genéticas que dan lugar a un fenotipo deseado.

Antes de la utilización de CRISPR-Cas, el cribado de pérdida de función (LOF) y de ganancia de función (GOF) se realizaba con librerías de genes reprimidos basadas en RNAi y con librerías de genes sobreexpresados basadas en cDNA. Los RNAi muchas veces generaban un *knockdown* incompleto, lo que daba un alto ratio de falsos negativos y también posee una actividad *off-target* bastante alta, generando un alto ratio de falsos positivos. Las librerías de cDNA necesitan de mucho tiempo para ser generadas y no cubren todo el genoma debido a que muchos cDNAs son simplemente muy largos para clonarse y expresarse en los vectores utilizados. La aparición de las técnicas de CRISPR *knockout*, CRISPRi y CRISPRa, y la capacidad de diseñar y sintetizar semiautomáticamente sgRNAs, hace que sea la herramienta ideal para el cribado genético a una escala genómica.

El sistema más utilizado actualmente para el screening utiliza las librerías “pooled” lentivirales de CRISPR. Estas librerías consisten en una población heterogénea de vectores de transferencia lentivirales que contiene cada uno un sgRNA dirigido a un solo gen del organismo a estudio.

Los sgARNs se diseñan *in silico* y se sintetizan, luego se clonan en los vectores de transferencia lentivirales. En general todas las librerías tienen las siguientes características: cada librería contiene 3-6 sgRNAs por gen para asegurar que se cumpla la modificación en la diana. Los sgRNAs deben contener una secuencia única comparada con todo el genoma. Algunas librerías incluyen la Cas9 en el plásmido del sgRNA y otras liberan el Cas9 a las células por separado.

El primer paso a seguir con la librería es su amplificación, ya que su concentración será demasiado baja para utilizarla en experimentos. Se secuencian con next-generation sequencing (NGS). Una vez hecho esto se generan lentivirus que contengan toda la librería CRISPR. Los mutantes se generan al transducir las células con la librería lentiviral.

En los *screens* de selección positiva, se introduce una fuerte presión selectiva de tal manera que existe sólo una baja probabilidad de que las células sin una perturbación relevante permanezcan después de la selección. Comúnmente, los experimentos de selección positiva están diseñados para identificar las perturbaciones que confieren resistencia a un fármaco, toxina o patógeno. Al probar alguno de estos productos, la mayoría de los sgRNAs se agotan debido a la fuerte presión selectiva y sólo un pequeño número de células, que son transducidas con sgRNAs que introducen una mutación protectora, sobreviven y proliferan.

En la selección negativa, el objetivo es identificar las perturbaciones que causan que las células mueran durante la selección; estas perturbaciones afectan típicamente a los genes que son necesarios para la supervivencia bajo la presión selectiva elegida. El *screen* de selección más simple es el crecimiento continuado durante un período prolongado de tiempo, aquellas células que mueran serán las que llevaban reactivos dirigidos a genes esenciales en su proliferación. Hay que tener en cuenta que cuando se usa la nucleasa Cas9, existe la posibilidad de que no todas las mutaciones eliminen la función génica debido a pequeñas mutaciones en el marco de lectura, lo que resulta en un fenotipo mixto.

Después de ambos *screens*, de selección positiva y negativa, para identificar los genes relevantes hay que realizar la secuenciación con NGS (Figura 21) [11,21,30,31].

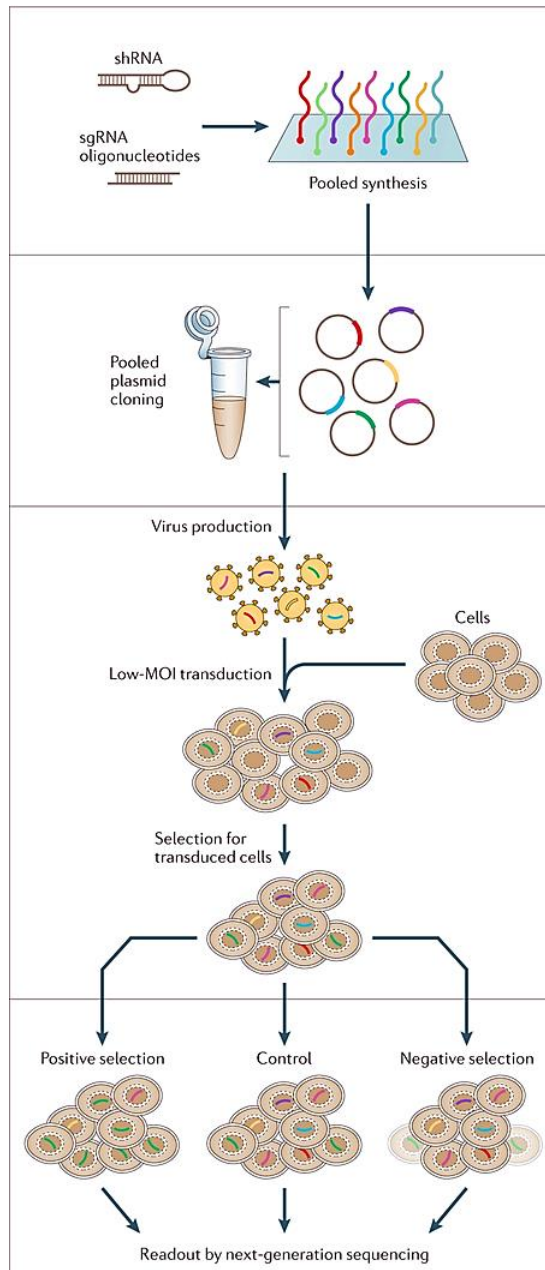


Figura 21. Pasos en un screening funcional con CRISPR-Cas9[21].

Ejemplo de aplicación más importante de los *screening* funcionales: en cáncer puede utilizarse para identificar sistemáticamente genes que apoyan la viabilidad de las células cancerosas y para regular la sensibilidad de los fármacos contra el cáncer. El cribado genético también puede utilizarse para descubrir nuevos componentes de una vía o nuevas interacciones entre vías. Esta información puede proporcionar una valiosa información para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

LOF en el estudio del cáncer

El cribado de selección negativa en células cancerosas se ha utilizado satisfactoriamente para identificar tanto los genes esenciales para la viabilidad celular como los genes letales en cáncer que son esenciales para mantener la viabilidad celular de las células cancerosas, utilizando tanto *knockouts* con CRISPR como CRISPRi. Este establecimiento de células esenciales es valioso por dos motivos. En primer lugar, este conjunto de genes de referencia es útil para evaluar la calidad de futuros *screens* de letalidad LOF, ya que la mayoría de estos genes deben ser letales en la mayoría de las líneas celulares. En segundo lugar, encontrar el fármaco que evita los genes celulares esenciales podría conducir a una mejor ventana terapéutica y a una menor toxicidad en los tejidos normales. La importancia de encontrar genes letales en cáncer reside en el potencial de estos genes como diana de fármacos específicos. También ha sido muy fructífero en la identificación de genes involucrados en la resistencia a los fármacos contra el cáncer (Figura 22).

GOF en el estudio del cáncer

El cribado GOF utilizando librerías CRISPRa, es una buena alternativa a las librerías de sobreexpresión basadas en cDNA. En estudios de cáncer, se ha utilizado CRISPRa para identificar genes que regulan positiva y negativamente la proliferación de células cancerosas. También para ver la sobreexpresión de qué genes genera la resistencia a determinado fármaco (Figura 22) [32].

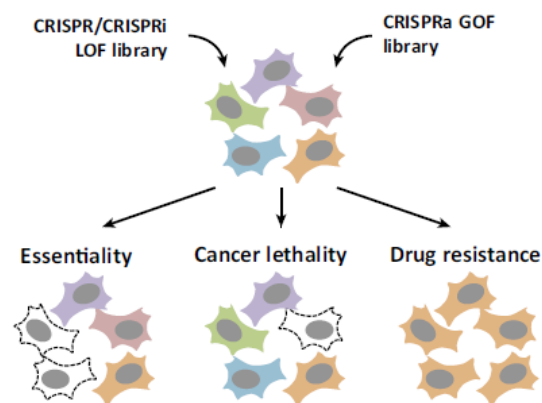


Figura 22. Librerías LOF y GOF en el estudio del cáncer [32].

Generación de modelos animales

La edición genómica, desde su aparición, ha alterado nuestra habilidad para generar modelos animales de enfermedades. Se utiliza para generar modelos de enfermedades y en donación de tejidos, y para salvar la distancia entre el paso de validación de un fármaco en roedores a ensayos clínicos en seres humanos.

Poco tiempo después de la aparición de CRISPR-Cas ya se utilizaba para generar ratones con múltiples lesiones en un simple paso. Reconociendo las mutaciones genéticas en poblaciones de pacientes, la edición basada en CRISPR puede ser usada para modelar rápidamente las variaciones genéticas y ver sus roles, en lugar de confiar en un modelo que solo exprese en su fenotipo uno de los trastornos.

Las técnicas de edición de CRISPR-Cas, incluyendo NHEJ y HDR, pueden lograrse mediante microinyección o simple electroporación de cigotos en lugar de continuar con la manipulación tradicional de células embrionarias. Hay que seguir dos caminos para su desarrollo. Primero, ya que múltiples genes pueden ser dirigidos en un solo paso, los ratones mutantes doble y triple pueden ser generados rápidamente sin la necesidad de cruzar cepas mutantes únicas. En segundo lugar, la edición del genoma en cigotos elimina el requisito de derivar, cultivar y editar las células madre (ES²), lo que ha frenado la generación de mutantes y ha sido una de las principales barreras en el tratamiento genético en muchos modelos para su utilización en el proceso de descubrimiento terapéutico. La edición de cigotos también acelera la generación de mutaciones adicionales en modelos animales preexistentes de la enfermedad concreta, al eliminar la necesidad de derivación de células ES o retrocruzamientos largos. Sin embargo, la introducción de grandes transgenes o sistemas complejos de múltiples componentes a través de la edición de cigotos sigue siendo ineficiente, y por ahora, la orientación génica en células ES es probable que siga siendo el método de elección para generar animales que albergan estas mutaciones.

Actualmente, se pueden generar una amplia gama de modelos en una escala de tiempo relevante para poder tomar decisiones tempranas de si seguir o no en el desarrollo de un fármaco.

El emparejamiento de CRISPR-Cas con vectores virales o basados en transposones ha permitido a los investigadores introducir directamente mutaciones somáticas en ciertos tejidos, como tejidos pulmonares y hepáticos, en animales adultos. La introducción *in situ* de mutaciones con CRISPR-Cas permite a los investigadores observar y estudiar con exactitud la iniciación, el desarrollo y el mantenimiento de la enfermedad en un entorno autóctono e inmunocompetente, incluyendo el microambiente nativo y la estructura tisular. Esta capacidad será transformadora para muchas enfermedades, en particular para el cáncer, en las que la interacción de células tumorales con células inmunitarias puede tener un efecto drástico en el resultado de la enfermedad [30].

² ES: Las células madre son células que se encuentran en todos los organismos pluricelulares y que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, además de autorrenovarse para producir más células madre

La técnica CRISPR-Cas9 también ha permitido reducir los costes y el tiempo de generación de los modelos animales. Por ejemplo, la generación de un ratón modelo utilizando células madre embrionarias tardaba unos 12-18 meses y costaba alrededor de unos \$100,000. En cambio, con CRISPR estos modelos tardan unos 6-8 meses y cuestan unos \$35,000. El tiempo ahorrado es muy importante para los investigadores para poder validar cuanto antes sus descubrimientos sobre algún fármaco [33].

2.4 Estudio de enfermedades con la herramienta CRISPR

Los modelos de enfermedades basados en CRISPR se han generado con éxito para cáncer, enfermedades neurológicas y otras enfermedades Mendelianas o complejas enfermedades genéticas, para investigar los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis. Se va a mostrar cómo se han generado algunos de estos modelos murinos.

Modelos de cáncer

El genoma del cáncer es altamente complejo, con cientos de mutaciones, translocaciones, y ganancias y pérdidas de cromosomas por tumor. Para su estudio es necesario crear modelos muy precisos, CRISPR-Cas9 se ha convertido en una herramienta imprescindible para crear estos modelos [34].

- **Generación de modelos a partir de la línea germinal**

Los modelos creados a partir de la línea germinal se desarrollan al introducir mutaciones cancerosas en células madre embrionarias (ES). Este método puede generar alelos transmisibles, lo que permite la cría de los alelos introducidos (Figura 23) [34].

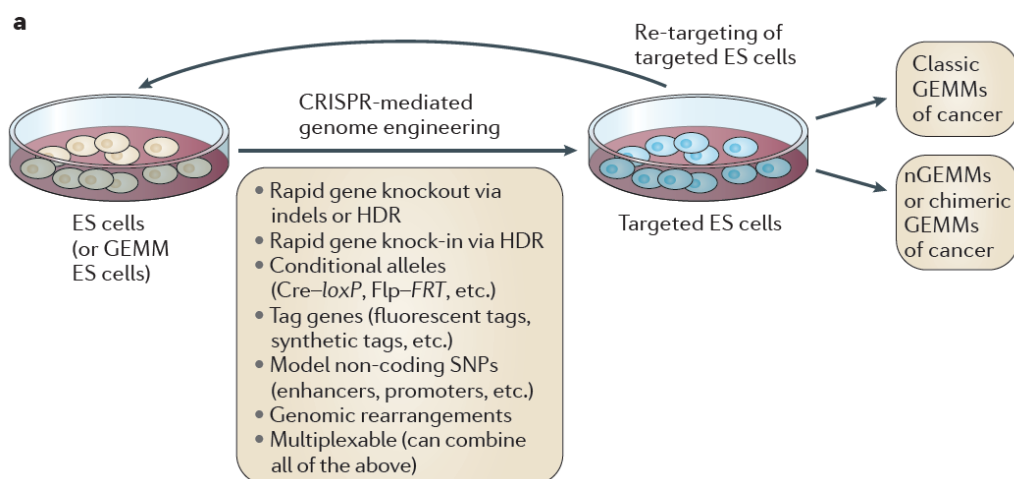


Figura 23. Generación de modelos animales a partir de la modificación de las células ES [35].

Diversos grupos han demostrado que el potencial de la utilización de CRISPR-Cas9 en la línea germinal. El grupo de Jaenisch demostró que se puede introducir mutaciones simultáneas en 5 genes (*Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, *Sry* y *Uty*) con alta eficiencia y en un simple paso en células ES. También vieron que la coinyección de Cas9 con el sgRNA de *Tet1* y *Tet2* en cigotos producía ratones que poseían mutaciones en ambos genes. Utilizaron CRISPR para generar mutaciones puntuales por HDR al introducir junto con la construcción oligos que llevaban la mutación deseada [36]. En un estudio posterior, este equipo, introdujo un marcador o una construcción reportera de fluorescencia en

los genes *Nanog*, *Sox2* y *Oct4* (importantes genes de la células ES) al inyectar en cigotos el mRNA Cas9, sgRNAs y oligos que codifican para los marcadores fluorescentes; la introducción de dos sgRNAs que tenían como diana el gen *Mecp2* producían ratones con deleciones definidas de 700bp [37].

Otros laboratorios han aprovechado estas técnicas, como el equipo de Lowe que ha utilizado CRISPR-Cas9 para mutar los genes *Apc*, *Trp53* y *CR8* en ES para modelizar el cáncer de colon [38].

- ***Edición genómica somática***

La mayoría de los cánceres (no familiares) son causados por la acumulación de mutaciones genéticas en las células somáticas. Los modelos creados para este tipo de cáncer somático recogen la progresión somática del cáncer y evitan la letalidad embrionaria causada por la eliminación de ciertos genes en todo el cuerpo, ya que solo suele mutarse un tipo de tejido. La proteína Cas9 tiene un gran tamaño (4kilobases (kb)), por ello supone un reto su liberación a las células somáticas. Sin embargo ciertos métodos han tenido éxito en cáncer. Se ha utilizado la inyección hidrodinámica para administrar selectivamente plásmidos al hígado de modelos animales. Este método inyecta en la vena de la cola un alto volumen y una alta presión para expresar transitoriamente el DNA en el 20-30% de los hepatocitos, fue utilizado por primera vez el equipo de Jacks [39].

La electroporación es otro sistema utilizado con éxito *in vivo* en modelos de cáncer, siendo probado en regiones del cerebro en desarrollo y órganos abdominales [40,41]. También se han utilizado métodos virales como el adenovirus utilizado para hacer objetivo otros órganos, los AAVs [42], que no son patogénicos y pueden hacer objetivo a neuronas post-mitóticas [43], y los vectores lentivirales utilizados células madre hematopoyéticas (HSCs) para introducirlos luego en un modelo animal [34,44].

o *Edición genómica somática ex vivo para modelar el cáncer in vivo*

En la generación de estos modelos se extrae una biopsia y se realiza la modificación fuera del organismo, luego se procede a la reinserción de las células modificadas. Estos son algunos de los grupos que han aplicado esta técnica de forma satisfactoria. El grupo de Ebert utilizó CRISPR-Cas9 en células Lineage⁻/Sca1⁺/cKit⁺ (LSK), que tienen actividad HSPC, para crear modelos de leucemia mieloide; se hizo con vectores lentivirales de forma *ex vivo* y se modificaron más de 6 genes (*Tet2*, *Runx1*, *Dnmt3a*, *Nf1*, *Ezh2* y *Smc3*) [44].

El laboratorio de Lowe, usó CRISPR *ex vivo* para eliminar el gen supresor de tumores de leucemia mixta 3 (*Mll3*) en las *shNf1;Trp53^{-/-}* HSPCs, demostrando que *Mll3* es un supresor de tumor haplosuficiente en la leucemia mieloide aguda (AML) [35,45].

El equipo de Herold generó un ratón modelo para el linfoma al eliminar los exones 4 y 5 del gen *Trp53* *ex vivo* con CRISPR y luego transducir las células resultantes a un ratón [46].

○ *Edición genómica somática in vivo para modelar el cáncer*

CRISPR-Cas9 puede utilizarse *in vivo* para generar rápidamente ratones portadores de tumores para estudiar tanto aspectos básicos como traslaciones del cáncer (Figura 24). El equipo de Ventura, ha aplicado *in vivo* CRISPR para realizar inversiones cromosómicas y modelizar el cáncer de pulmón. Se fijó como diana los genes *EML4* y *ALK* del mismo cromosoma para que se produjera la inversión (causante del cáncer). Se introdujo el complejo CRISPR-Cas9 con un adenovirus que infecta eficientemente el epitelio del pulmón. Como resultado, crearon un ratón que expresaba *EML4-ALK*, lo que producía el desarrollo de tumores en el pulmón [15].

También se han generado modelos de cáncer de hígado al hacer diana del complejo Cas9-sgRNA los genes supresores de tumores, *Pten* y *p53*. Se logró que el complejo realizara su función específicamente en el hígado al liberar el plásmido por inyección hidrodinámica. En este experimento se suprimieron ambos genes por separado y en conjunto, dando un resultado muy similar a la tecnología *Cre-LoxP* [36].

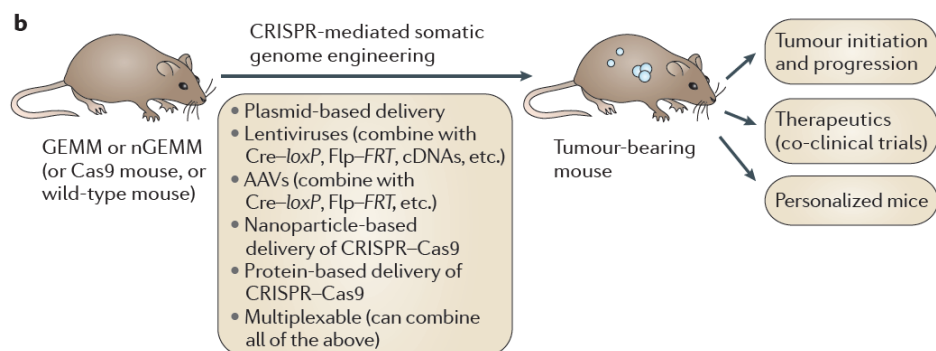


Figura 24. Generación de modelos animales *in vivo* con CRISPR [35].

Modelos de enfermedades neurológicas

A nivel molecular, los modelos animales no mamíferos pueden proporcionar información importante acerca de las características fundamentales del sistema nervioso como resultado de su bien caracterizada organización genética y celular, y su facilidad para aplicar la gama de herramientas genéticas. Por ejemplo, muchos genes conservados implicados en trastornos neurológicos humanos tales como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson se han estudiado extensamente con moscas, gusanos y peces [47-49]. Para generarlos se utilizaba el RNAi o mutagénesis química. Con la aparición de CRISPR los modelos más simples para neurobiología empiezan a ser más precisos.

Se han generado modelos de mamíferos a partir de la edición de embriones, como ratones, ratas y primates. Los modelos de ratones y ratas proporcionan un puente entre nuestra comprensión de los fundamentos moleculares del sistema nervioso obtenidos de los estudios en sistemas no mamíferos y los fenotipos complejos observados en trastornos cerebrales humanos. Sin embargo, en algunos casos, una comprensión integral del cerebro humano requerirá modelos de primates, ya que tienen cerebros mucho más similares a los humanos (Figura 25) [50].

Se van a mostrar algunos de los modelos generados para desórdenes neurológicos.

- Generación de modelos *in vivo*

La forma de liberación de la Cas9 con su sgRNA y sus posibles proteínas asociadas es una de los puntos más importantes en la generación de modelos *in vivo* en neurociencia. Hay diversos métodos entre los que se destaca la utilización de vectores AAVs que proporcionan una expresión a largo plazo sin integración genómica, son relativamente seguros y no son patógenos. El problema es que tienen un límite de 4-5kb, y el promotor y la secuencia codificante de Cas9 ya ocupan cerca de 4kb [50]. La solución desarrollada es la utilización de ratones que posean el gen Cas9 introducido en el locus ROSA26 [51]. Otra posible solución es introducir múltiples AAVs, unos contendrán únicamente la Cas9 y otros estarán cargados con las secuencias sgRNAs y las proteínas requeridas [43]. La última posibilidad es utilizar una variante de Cas9 más pequeña, como la Cas9 de *Streptococcus aureus*, que permite empaquetar dentro del vector AAV la Cas9 junto con el sgRNA y el GFP [52].

Existen otros sistemas de liberación como la electroporación in útero [53] o la transfección mediada por polietilenimina [54].

El equipo de Zhang generó con la herramienta CRISPR-Cas9 modelos murinos con deficiencias en el aprendizaje y en la memoria. Para el primer modelo se construyeron varios vectores AAV que contenían la secuencia de la Cas9 y el sgRNA con diana en el gen *Mecp2*, se infectaron los ratones y el *knockdown* generado en este gen producía deficiencias en el aprendizaje en estos ratones. Para el segundo se generaron los mismos vectores pero esta vez los genes diana eran *Dnmt3a*, *Dnmt3b* y *Dnmt1*, los ratones testeados tenían alteraciones en la memoria [43].

A parte de ratones, se han conseguido realizar con CRISPR-Cas9 modelos neurológicos de animales más complejos. El equipo de Zhao ha conseguido generar un modelo del cerdo Bama para la enfermedad de Parkinson. El cerdo muestra múltiples características superiores en anatomía, fisiología y genoma que han hecho que esta especie sea un modelo más adecuado para las enfermedades humanas, especialmente para las enfermedades neurodegenerativas, ya que tienen circunvoluciones cerebrales similares a las del neocórtex humano. Para ello se utilizó la microinyección del mRNA de la Cas9 y los sgRNAs con diana en los genes DJ-1, Parkin y PINK1 en los embriones pronucleares. Luego se introdujeron los embriones inyectados en cerdas para producir los lechones [55]. El laboratorio de Li, ha realizado con éxito un modelo primate de la enfermedad distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad neuromuscular, en primates. Este modelo se realizó al inyectar en los ovocitos, en la fase de meiosis II, el mRNA de la Cas9 y el sgRNA dirigido al exón 4 y 46 del gen de la DMD. Se dejaron en cultivo hasta la fase de blastocisto y se reinyectaron a las primates [56].

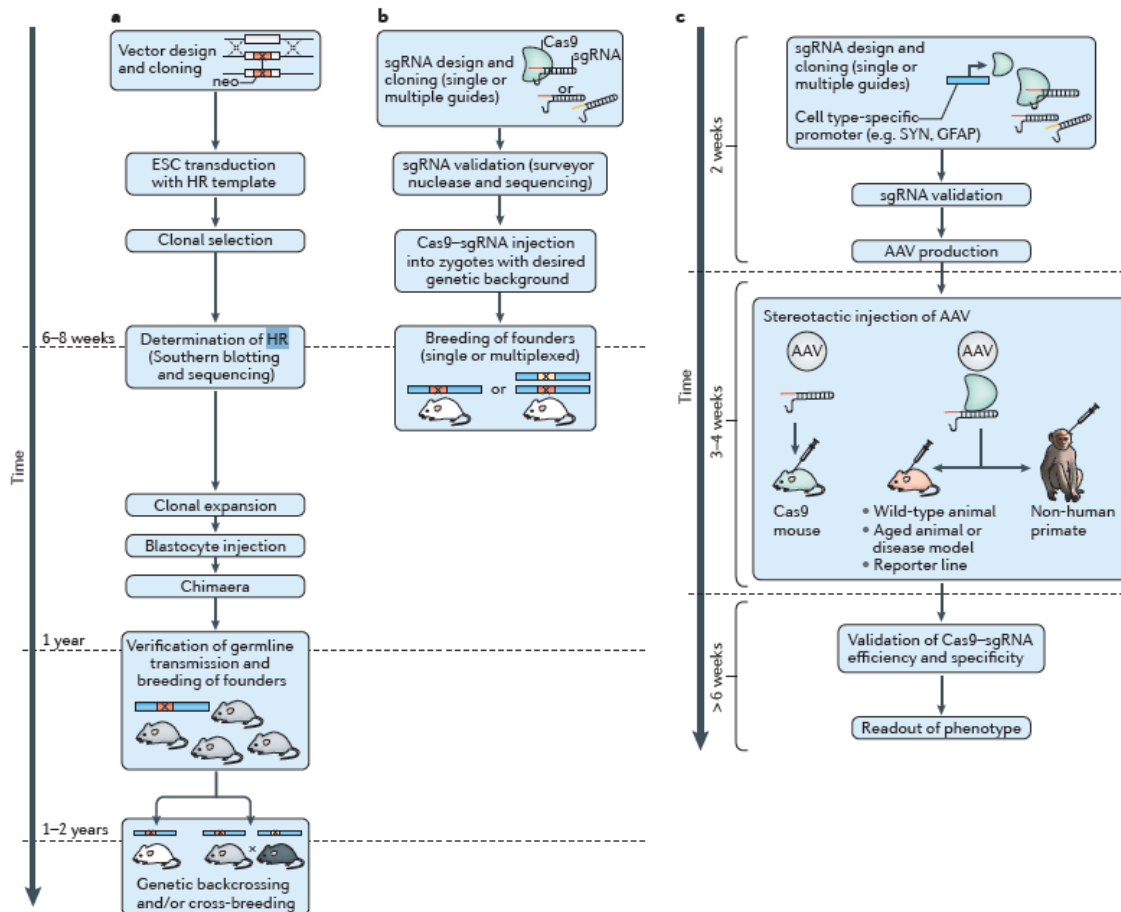


Figura 25. Comparación de los tiempos necesarios para desarrollar un modelo con recombinación homóloga (a) y CRISPR *ex vivo* (b) e *in vivo* (c) [50].

- **Edición genética en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) humanas (*in vitro*)**

La utilización de la tecnología de iPSCs junto con la de CRISPR ofrece otra manera de estudiar los desórdenes neurológicos *in vitro*. Como las iPSCs retienen toda la información genética del donante, permiten el estudio de las enfermedades más complejas, ya que variantes genéticas asociadas a estas alteraciones trabajan en conjunto con muchos otros alelos. Otra ventaja de su utilización es que muchos de los tejidos de interés en estas enfermedades son inaccesibles en los pacientes, como las neuronas y la glía; las iPSCs pueden diferenciarse en estos tipos celulares (Figura 26).

CRISPR-Cas9 aplicado a estos modelos ya diferenciados puede usarse para examinar el enlace genético entre variantes de riesgo y vías celulares implicadas en trastornos neurológicos multigénicos de una manera de alto rendimiento. Además, se pueden diseccionar con precisión las vías de señalización específicas implicadas en la patogénesis de la enfermedad para obtener una comprensión de los

mecanismos moleculares de la enfermedad e identificar nuevos objetivos de fármacos. Las modificaciones se pueden incluir en las iPSCs, lo que permite la investigación de los fenotipos que surgen durante el desarrollo neurológico [50].

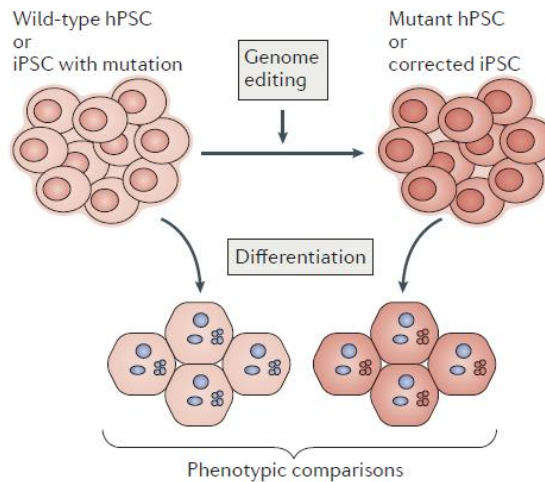


Figura 26. Uso de la edición del genoma para generar rápidamente iPSCs isogénicas y células diferenciadas. La edición del genoma se puede utilizar para introducir una mutación o para corregir una mutación en iPSCs. Las líneas celulares isogénicas resultantes pueden entonces diferenciarse en el tipo de tejido deseado [57].

Modelos de enfermedades cardiovasculares

Los métodos utilizados para generar modelos animales para enfermedades cardíacas son muy similares a los seguidos para las enfermedades neurológicas.

La utilización del multiplex CRISPR puede generar diversos tipos de ratones inmunodeprimidos por microinyección de embriones. Carroll et al. lograron generar ratones transgénicos Cas9 específicos para el corazón. Para que la edición fuera específica del corazón cambiaron el promotor de la Cas9 (CBh) por el promotor *Myh6* (solo se expresa en cardiomiocitos). La construcción *Myh6-Cas9-GFP* se inyectó en los cigotos de ratones, el resultado eran modelos que expresaban Cas9 en los cardiomiocitos únicamente. Para testear estos ratones se introdujo en el vector AAV9 los sgRNAs con diana en los exones 3 y 8 del gen *Myh6* y se inyectó intraperitonealmente. Esto inducía una dilatación masiva cardíaca y el fallo cardíaco a las 3 semanas [58].

No solo los ratones son útiles para el estudio de enfermedades cardíacas. Las malformaciones congénitas son la principal causa de mortalidad infantil en Estados Unidos y Europa. Debido a los rápidos avances en genómica, ahora podemos identificar eficientemente variantes que pueden

causar enfermedades. Hay una necesidad de desarrollar tecnologías económicas y eficientes para detectar estos genes candidatos en sistemas modelo y realizar estudios funcionales para descubrir su papel en el desarrollo (necesarios modelos con desarrollo rápido). El equipo de Khokha propone que *Xenopus tropicalis* es un modelo ideal para el estudio del desarrollo embrionario humano. Comparado con los sistemas de mamíferos, *Xenopus* es rápido y rentable, y la conservación evolutiva entre *Xenopus* y los seres humanos ofrece oportunidades para modelar la enfermedad humana en comparación con otros vertebrados acuáticos de alto rendimiento (humanos y *Xenopus* poseen estructuras del corazón similares). Se desarrolló el modelo de *Xenopus* para el estudio de desarrollo del corazón utilizando la inyección de la proteína Cas9 y los sgRNAs, con diana a genes que afectan al desarrollo del corazón (*galnt11*, *dnah9*, *ccdc40*, and *foxj1*), en los embriones [59]. Se introdujo directamente la proteína Cas9 y no el mRNA, porque el desarrollo de *Xenopus* es muy rápido, además de su cinética lenta, y puede que se divida la célula antes de que Cas9 realice la modificación (mosaicismo), y se ha visto que la introducción directa de la proteína genera más rápidamente las modificaciones [60].

Inmunodeficiencia

Huang y sus colaboradores mostraron cómo el uso de multiplex CRISPR puede generar varios tipos de cepas de ratón inmunodeficientes por microinyección de embriones con ARNm Cas9 y múltiples sgRNAs dirigidos a genes de ratón *B2m*, *Il2rg*, *Prf1*, *Prkdc* y *Rag1* [61]. Recientemente el equipo de Lieschke ha generado un modelo de *zebrafish* con una deficiencia basal persistente de neutrófilos, que permite evaluar las contribuciones de los neutrófilos en infecciones, inflamaciones y regeneración. Además, sirven como modelos de la neutropenia congénita dependiente de *CSF3R* en humanos. Utilizaron la microinyección de la proteína Cas9 junto con el sgRNA con diana al gen *csf3r* en los embriones de *zebrafish* [62].

2.5 Terapia génica

Una de las aplicaciones más prometedoras de la técnica CRISPR-Cas es su desarrollo en el campo de la tecnología terapéutica para tratar desórdenes genéticos. En la actualidad ya se ha aplicado como terapia génica en varias enfermedades en modelos animales con resultados prometedores (Figura 27); también ha sido aplicado por un equipo chino en un paciente humano que padecía cáncer de pulmón [63]. Recientemente ha sido aprobada en US la utilización de CRISPR en humanos que padezcan tipos de cáncer que necesiten la inclusión de células T [64].

En el caso de un trastorno monogénico recesivo debido a mutaciones de pérdida de función (como fibrosis quística, anemia falciforme o distrofia muscular de Duchenne), Cas9 puede utilizarse para corregir la mutación causante. Este método tiene bastante ventaja sobre el método tradicional de aumentar el gen por la liberación de copias genéticas funcionales y su sobreexpresión vía un vector viral, ya que el nuevo gen funcional se expresa en su contexto natural.

Para los trastornos negativos dominantes en los que el gen afectado es haplosuficiente (como la amiloidosis hereditaria relacionada con la transtiretina o las formas dominantes de retinitis pigmentosa), también puede ser posible usar NHEJ para inactivar el alelo mutado para lograr un beneficio terapéutico.

Algunas enfermedades monogénicas también resultan de la duplicación de secuencias genómicas. Para estas enfermedades, la capacidad de multiplexación de Cas9 puede explotarse para suprimir los elementos duplicados. Por ejemplo, trastornos relacionados con repetición de trinucleótidos podrían ser tratados utilizando dos simultáneas DSB para cortar la repetición. El éxito de esta estrategia probablemente será mayor para enfermedades como la ataxia de Friedreich, en la que se producen duplicaciones en regiones no codificantes del gen diana.

La edición genómica mediada por Cas9 podría ser utilizada para introducir mutaciones protectoras en los tejidos somáticos para combatir las enfermedades no genéticas o complejas. Por ejemplo, la inactivación mediada por NHEJ del receptor CCR5 en linfocitos puede ser una estrategia viable para eludir la infección por VIH, mientras que la delección de PCSK9 o angiopoyetina pueden proporcionar efectos terapéuticos contra la hipercolesterolemia resistente a las estatinas o la hiperlipidemia. Aunque estos objetivos pueden también ser dirigidos usando la reducción de proteínas mediada por siRNA, una ventaja única de la inactivación génica mediada por NHEJ es la capacidad de lograr un beneficio terapéutico permanente sin la necesidad de continuar el

tratamiento. Al igual que con todas las terapias genéticas, por supuesto será importante establecer que cada uso terapéutico propuesto tiene una relación beneficio-riesgo favorable.

Cas9 podría ser utilizado más allá de la modificación del genoma directo del tejido somático, como, por ejemplo, para la ingeniería de células terapéuticas. Las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) pueden modificarse ex vivo y reinfundirse en un paciente para dirigirse específicamente a determinados cánceres [6].

Disease	Mutation target	Delivery method	Target cells	Correction efficiency	References
β-Thalassaemia	Deletion in <i>HBB</i>	Electroporation	Human iPSCs	17.6%	Xie <i>et al.</i> (2014b)
		Intracytoplasmic injection	Human tripronuclear zygotes	14.3%	Liang <i>et al.</i> (2015)
Cystic fibrosis	Deletion in <i>CFTR</i>	Lipofection	Human intestinal organoids	Unknown-edited cells were selected	Schwank <i>et al.</i> (2013)
Hereditary tyrosinemia	Point mutation in <i>FAH</i>	Hydrodynamic injection	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	0.40 ± 0.12%	Yin <i>et al.</i> (2014)
HIV-1	CCR5Δ32	Electroporation	Human iPSCs	100%	Zhu <i>et al.</i> (2015)
	Inactivation of proviral DNA	Nucleofection	JLat10.6 cells	30%	Ye <i>et al.</i> (2014)
Duchenne muscular dystrophy	Exon deletion in dystrophin gene	Electroporation	Human iPSCs	50%	Li <i>et al.</i> (2015)
α1-Antitrypsin deficiency	Point mutation in <i>SERPINA1</i>	Electroporation	Human iPSCs	18.8%	Smith <i>et al.</i> (2014a)
Polycythaemia vera	Point mutation in <i>JAK2</i>	Electroporation	Human iPSCs	9.15%	Smith <i>et al.</i> (2014a)
Cataracts	Deletion in <i>Crygc</i>	Electroporation	Mouse spermatogonial stem cells	29.7%	Wu <i>et al.</i> (2014)
Epstein-Barr virus	Inactivation of viral promoter	Electroporation	Human epithelial cell lines	94.2%	Yuen <i>et al.</i> (2015)
LDL-C	Disruption of <i>Pcsk9</i>	Adenovirus	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	50%	Ran <i>et al.</i> (2015)
		Adeno-associated virus		40%	Ding <i>et al.</i> (2014)

Figura 27. Enfermedades que han podido ser corregidas total o parcialmente con CRISPR-Cas9, 2015 [65].

Uno de los últimos logros alcanzados con la técnica CRISPR-Cas9 en terapia génica es la eliminación del provirus HIV-1. El equipo de Hu realizó el siguiente experimento, utilizaron tres modelos de ratones: el ratón transgénico Tg26 que contienen una construcción de ADN de HIV proviral que lleva una delección, que abarca la mayor parte de los genes *gag* y *pol*, para hacerla no infecciosa y expresan la enfermedad renal asociada al HIV; el ratón infectado con EcoHIV-eLuc y el modelo de ratón humanizado BLT infectado. Eliminaron el HIV proviral de estos ratones utilizando la Cas9 de *Staphylococcus aureus* (saCas9) y 4 sgRNAs (diana a ambos extremos de los LTR y las proteínas estructurales Gag y Pol) y liberaron esta construcción con el vector AAV-DJ/8. Según descubrieron, el uso de sgRNAs multiplex para dirigir la saCas9 a múltiples sitios del ADN proviral del VIH simultáneamente es beneficioso para prevenir el escape potencial del VIH debido a la alta tasa de mutación durante la replicación del VIH-1. Eligieron el vector AAV porque reduce los riesgos de

mutagénesis, toxicidad y respuesta inmune severa del huésped y la utilización de esta Cas9 más pequeña permitía su utilización junto a los 4 sgRNAs.

Uno de los puntos más importantes que lograron demostrar fue la escisión de los fragmentos Gag/30-LTR y 50-LTR/Gag en células infectadas latentes dentro de múltiples órganos y tejidos de ratón mediante una sola administración de AAV-DJ/8 en ratones BLT humanizados e infectados con VIH [66].

Otro de los avances en la terapia génica está asociada a la DMD. Utilizaron el vector AAV de serotipo 8 (AAV8) para liberar los componentes del CRISPR-Cas9 en el músculo cardíaco y esquelético. En un AAV se introdujo la saCas9 y en un segundo vector dos sgRNAs que tenían como diana los intrones 22 y 23 del gen de la distrofina. Lograron con ello eliminar la mutación en el exón 24 del modelo de ratón de la DMD (ratón *mdx*) y, así recobrar parte de la expresión de la distrofina y mejorar la contractilidad del músculo [67-69].

Hay otras aplicaciones que no dirigen directamente CRISPR-Cas9 a la enfermedad, si no que se dirigen al vector que la distribuye para así disminuir los casos de infección. Valentino et al. consiguieron crear una cepa de mosquito inmune al *Plasmodium falciparum* (parásito productor de la malaria) introduciendo un gen que los hacía inmunes.

A través de la microinyección en embriones se introdujo la construcción que vemos en la Figura 28, contiene principalmente el mRNA de la Cas9, dos genes antipatógenos contra *P. falciparum* (m2A10-m1C3) y las secuencias complementarias a los extremos de la diana. El locus *kynurenine hydroxylase^{white}* (*kh^w*) es el objetivo y se introdujeron ambos genes antipatógenos en él. El resultado fueron mosquitos resistentes a este patógeno [70].

Lo que se pretende para erradicar la malaria es juntar esta tecnología con la genética dirigida para hacer que este gen sea el dominante en la población. Y una vez liberada la especie modificada, la intención es que sustituya a la WT y desaparezca el mosquito vector de *P. falciparum*.

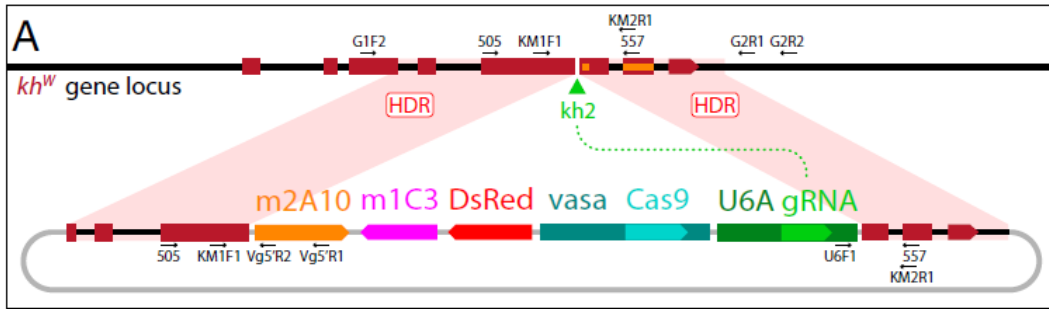


Figura 28. Construcción realizada para generar el mosquito inmune a *P. falciparum* [70].

Ética

Los avances científicos en biología molecular en los últimos 50 años han producido avances notables en medicina. Algunos de estos avances también han planteado importantes cuestiones éticas y sociales, por ejemplo, sobre el uso de tecnologías de ADN recombinante o células madre embrionarias. La comunidad científica ha reconocido constantemente su responsabilidad de identificar y afrontar estas cuestiones. En estos casos, el compromiso de una serie de interesados ha dado lugar a soluciones que han permitido obtener importantes beneficios para la salud humana y abordar adecuadamente los problemas de la sociedad.

CRISPR-Cas ha llevado recientemente al desarrollo de nuevas y poderosas técnicas que permiten realizar la edición de genes en células vivas, incluidas las de los seres humanos, con mayor precisión y eficiencia que nunca. Estas técnicas ya se utilizan ampliamente en la investigación biomédica. También pueden permitir amplias aplicaciones en medicina. Al mismo tiempo, la perspectiva de la edición del genoma humano plantea muchas cuestiones científicas, éticas y sociales importantes.

Después de la reflexión sobre estas cuestiones, los miembros del Comité Organizador de la Cumbre Internacional sobre la Edición de Genes Humanos han llegado a las siguientes conclusiones [71]:

1. *Investigación básica y preclínica.* Es evidente que es necesario realizar investigaciones básicas y preclínicas intensivas, sujetas a las normas y la supervisión éticas y jurídicas apropiadas, sobre i) las tecnologías de edición de secuencias genéticas en células humanas, ii) los posibles beneficios y riesgos de los usos clínicos propuestos y iii) comprender la biología de los embriones humanos y las células germinales. Si en el proceso de investigación, los embriones humanos tempranos o las células de la línea germinal se someten a la edición de genes, las células modificadas no deben usarse para establecer un embarazo.
2. *Uso Clínico: Edición Somática.* Muchas aplicaciones clínicas prometedoras y valiosas de la edición de genes están dirigidas a alterar secuencias genéticas sólo en células somáticas. Los ejemplos que se han propuesto incluyen la edición de genes para la anemia de células falciformes en células sanguíneas o para mejorar la capacidad de las células inmunitarias para el cáncer objetivo. Hay una necesidad de entender los riesgos, tales como edición incorrecta, y los beneficios potenciales de cada modificación genética propuesta. Debido a que los usos clínicos propuestos sólo afectan a la persona que los recibe,

pueden ser evaluados apropiadamente y rigurosamente dentro de marcos regulatorios existentes y en evolución para la terapia génica.

3. *Uso clínico: Línea germinal.* La edición de genes también podría utilizarse, en principio, para realizar alteraciones genéticas en gametos o embriones, que serán transportadas por todas las células de un niño resultante y serán transmitidas a generaciones posteriores como parte del grupo genético humano. Los ejemplos que se han propuesto van desde la eliminación de enfermedades hereditarias graves hasta el aumento de las capacidades humanas. Tales modificaciones de genomas humanos podrían incluir la introducción de variantes naturales o cambios genéticos totalmente nuevos que se cree que son beneficiosos.

La edición de la línea germinal plantea muchas cuestiones importantes, entre ellas: (i) los riesgos de la edición incorrecta y la edición incompleta de las células de los embriones en etapa temprana (mosaicismo); (ii) la dificultad de predecir los efectos nocivos que los cambios genéticos pueden tener en la amplia gama de circunstancias experimentadas por la población humana, incluidas las interacciones con otras variantes genéticas y con el medio ambiente; (iii) la obligación de considerar las implicaciones para las generaciones individuales y futuras que llevarán las alteraciones genéticas; iv) el hecho de que, una vez introducidos en la población humana, las alteraciones genéticas serían difíciles de eliminar y no permanecerían dentro de una misma comunidad o país; (V) la posibilidad de que las "mejoras" genéticas permanentes a subconjuntos de la población pudieran exacerbar las desigualdades sociales o ser utilizadas coactivamente; Y (vi) las consideraciones morales y éticas en la alteración de la evolución humana usando esta tecnología.

Sería irresponsable proceder a cualquier uso clínico de la edición de la línea germinal, a menos que (i) se hayan resuelto los problemas relevantes de seguridad y eficacia basados en la comprensión adecuada y el equilibrio de riesgos, beneficios potenciales y alternativas. En la actualidad, estos criterios no se han cumplido para cualquier uso clínico propuesto: los problemas de seguridad aún no han sido adecuadamente explorados; los casos de beneficio más convincente son limitados; y muchas naciones tienen prohibiciones legislativas o reglamentarias sobre la modificación de la línea germinal. Sin embargo, a medida que avanza el conocimiento científico y las opiniones de la sociedad evolucionan, el uso clínico de la edición de la línea germinal debe revisarse de forma regular.

4. *Necesidad de un Foro.* Si bien cada nación tiene finalmente la autoridad para regular las actividades bajo su jurisdicción, el genoma humano es compartido entre todas las naciones. La comunidad internacional debería esforzarse por establecer normas relativas a los usos aceptables de la edición de líneas germinales humanas y armonizar las reglamentaciones, a fin de desalentar las actividades inaceptables y promover la salud y el bienestar humanos. El foro debe abarcar una amplia gama de perspectivas y conocimientos - incluyendo científicos biomédicos, científicos sociales, especialistas en ética, proveedores de atención médica, pacientes y sus familias, personas con discapacidades, formuladores de políticas, reguladores, defensores del interés público, representantes de la industria y miembros del público en general.

Ejemplo de producción de un sgRNA

Como el TFM pertenece al máster de bioinformática, se ha preparado una simulación de búsqueda de un sgRNA. Utilizaremos como ejemplo la enfermedad hemocromatosis tipo I. La hemocromatosis hereditaria es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo del hierro en el que el cuerpo acumula exceso de hierro. El exceso de hierro se deposita en una variedad de órganos que conduce a su fracaso y da como resultado enfermedades graves incluyendo cirrosis, hepatomas, diabetes, cardiomiopatía, artritis e hipogonadismo hipogonadotrópico. Los efectos graves de la enfermedad por lo general no aparecen hasta después de décadas de progresiva carga de hierro. La hemocromatosis clásica (HFE) es causada lo más a menudo posible por la mutación en el gene designado HFE en el cromosoma 6 en la posición 26092913. La enfermedad se produce por el cambio del aminoácido G al A.

El primer paso es encontrar el número asociado a este cambio dentro de la página dbSNP, código rs. Se ha buscado en la página SNPedia y se ha introducido el código en la página dbSNP (Figura 29). De esta página copiamos la secuencia FASTA. La posición del cambio de nucleótido está indicada por una N en la secuencia FASTA.

The screenshot shows the NCBI dbSNP website interface. At the top, there's a search bar with 'dbSNP' selected. Below it, the 'Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1800562' is displayed. The report is divided into three main sections: RefSNP, Allele, and HGVS Names. The RefSNP section includes details like Organism (human), Molecule Type (Genomic), and Created/Updated in build (89/150). The Allele section shows the Variation Class (SNV: single nucleotide variation), RefSNP Alleles (A/G (FWD)), Allele Origin (A:germline, G:germline), and Ancestral Allele (G). The HGVS Names section lists various genomic coordinates. A red box highlights the 'Clinical Significance' section, which states 'With Pathogenic allele [ClinVar]'. Below this, there are MAF/MinorAlleleCount values for different populations: A=0.0324/3937 (ExAC), A=0.0126/63 (1000 Genomes), A=0.0475/618 (GO-ESP), and A=0.0319/928 (TOPMED).

Figura 29. Vemos que existe un alelo patógeno. El cambio de G a A.

Utilizaremos la herramienta E-CRISPR (<http://www.e-crisp.org>), se introducirá el nombre del organismo en este caso Homo sapiens GRCh38, se introducirá la secuencia FASTA con el nucleótido cambiado (N por A) y se pulsará *Start sgRNA search*. Aparecerán los resultados (Figura 30), se elegirá el primer sgRNA ya que hibrida más cerca de la mutación y tenga mayor especificidad y eficiencia (indicadas por las barras naranja y azul).

Matchstring Info for Gnl_dbSNP_rs1800562_1_0 on Target ENSG00000010704__HFE

Target: |6108*| CTGGGGAAGAGCAGAGATATACGTGCCAGGTGGAGCACCCAG|6151*|
 Matchstring: n M M M M M M M M M M M M M M X M M M M M M M M M M
 Query: GCAGAGATATACGTACCAGGNGG

*Start and End-point in the target

Close

Gnl dbSNP rs1800562_1_0	GCAGAGATACGTAC CAGG NGG	ENSG00000010704:H FE	Matchstring Info	1
Gnl dbSNP rs1800562_0_0	GTATATCTGCTCTT CCCC NGG	ENSG00000010704:H FE	Matchstring Info	2
Gnl dbSNP rs1800562_0_0	GTATATCTGCTCTT CCCC NGG	ENSG000000204011:C OL5A1-AS1	Matchstring Info	2

Figura 30. sgRNA elegido, se puede ver como hibrida sobre la secuencia diana.

Esto es solo una simulación, para la elección del sgRNA hay que tener muchas más variables en cuenta, como la longitud del sgRNA tras la secuencia PAM, porcentaje de cada uno de los nucleótidos o el propósito al que va a destinarse el sgRNA.

3. Conclusiones

La técnica CRISPR-Cas9 en solo 5 años ha supuesto un avance en todos los campos donde la edición genómica suponía una necesidad. Se han desarrollado una gran cantidad de variantes para aprovecharla en todo su potencial. Y este desarrollo ha supuesto la creación de novedosas técnicas para el estudio de enfermedades. Además, ha permitido estudiar enfermedades en modelos que no permitían ser objetivo de estas enfermedades. Ya se han descrito avances en cáncer, enfermedades neurológicas y cardíacas, y en el diseño de nuevos fármacos. No solo ha permitido poder modelizar estas enfermedades, si no hacerlo a un coste y tiempo menores que son actualmente dos características imprescindibles.

En cuanto a la terapia génica, CRISPR-Cas, promete ser el punto de inflexión para desarrollar nuevas técnicas; como se ha visto ya se ha podido eliminar los provirus del HIV-1 en modelos de ratones. El siguiente paso es dirigir estas terapias a humanos, sin descuidar los problemas éticos que supone aplicar este sistema, ya que cualquier error será imborrable en posteriores generaciones y las consecuencias son impredecibles.

También promete ser una técnica imprescindible en la producción de tejidos sintéticos u órganos compatibles desarrollados en animales, xenotransplantes.

Y no solo ha revolucionado el campo de la medicina, la agricultura y la industria alimenticia ya están aplicando CRISPR-Cas para mejorar sus productos, ya sea de forma nutricional o para mejorar la resistencia a plagas.

4. Glosario

- AAV: Virus adeno-asociado
- Cas: Proteína asociada a CRISPR
- CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
- CRISPRa: Activación transcripcional
- CRISPRi: Represión transcripcional
- crRNA: ARN CRISPR
- dCas: deactivated Cas
- DSB: double strand break
- ES: células madre
- FISH: hibridación fluorescente in situ
- GOF: cribado de ganancia de función
- HDR: Homology directed repair
- HSC: células madre hematopoyéticas
- InDels: inserciones y deleciones
- iPSC: célula madre pluripotente inducida
- kb: kilobases
- LOF: cribado de pérdida de función
- NGS: Next generation sequencing
- NHEJ: Non-homologous end joining
- nt: nucleótido
- PAM: Protospacer adjacent motif
- saCas9: Cas9 de la *Staphylococcus aureus*
- ScFv: Anticuerpo de cadena sencilla
- sgRNA: Single guided RNA
- TALEN: Transcription activator-like effector nuclease
- tracRNA: trans-activating crRNA
- WT: wild type
- ZFN: Nucleasas con dedos de zinc

5. Bibliografía

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821.
2. Barrangou R, Doudna J. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology*. 2016;933-941.
3. Sander J, Joung J. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*. 2014;32(4):347-355.
4. Doudna J, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096-1258096.
5. Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature*. 2015;522(7554):20-24.
6. Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-1278.
7. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015;117:119-128.
8. Ran F, Hsu P, Wright J, Agarwala V, Scott D, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281-2308.
9. Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823.
10. Dow L. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(10):609-621.
11. Addgene: CRISPR/Cas9 Guide [Internet]. Addgene.org. 2017 [cited 24 April 2017]. Available from: <https://www.addgene.org/crispr/guide/>
12. Kim H, Kim J. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(5):321-334.
13. Gaj T, Gersbach C, Barbas C. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(7):397-405.
14. Torres R, Martin M, Garcia A, Cigudosa J, Ramirez J, Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR–Cas9 system. *Nature Communications*. 2014;5.
15. Maddalo D, Manchado E, Concepcion C, Bonetti C, Vidigal J, Han Y et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*. 2014;516(7531):423-427.
16. Vanoli F, Jasin M. Generation of chromosomal translocations that lead to conditional fusion protein expression using CRISPR-Cas9 and homology-directed repair. *Methods*. 2017.
17. Larson M, Gilbert L, Wang X, Lim W, Weissman J, Qi L. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2180-2196.

18. Qi L, Larson M, Gilbert L, Doudna J, Weissman J, Arkin A et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*. 2013;152(5):1173-1183.
19. Gilbert L, Larson M, Morsut L, Liu Z, Brar G, Torres S et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442-451.
20. Gilbert L, Horlbeck M, Adamson B, Villalta J, Chen Y, Whitehead E et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014;159(3):647-661.
21. Shalem O, Sanjana N, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(5):299-311.
22. Maeder M, Linder S, Cascio V, Fu Y, Ho Q, Joung J. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*. 2013;10(10):977-979.
23. Gilbert L, Larson M, Morsut L, Liu Z, Brar G, Torres S et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442-451.
24. Konermann S, Brigham M, Trevino A, Joung J, Abudayyeh O, Barcena C et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2014;517(7536):583-588.
25. Zalatan J, Lee M, Almeida R, Gilbert L, Whitehead E, La Russa M et al. Engineering Complex Synthetic Transcriptional Programs with CRISPR RNA Scaffolds. *Cell*. 2015;160(1-2):339-350.
26. Chen B, Gilbert L, Cimini B, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G et al. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*. 2013;155(7):1479-1491.
27. Ma H, Tu L, Naseri A, Huisman M, Zhang S, Grunwald D et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nature Biotechnology*. 2016;34(5):528-530.
28. Hilton I, D'Ippolito A, Vockley C, Thakore P, Crawford G, Reddy T et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*. 2015;33(5):510-517.
29. Liu X, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S et al. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*. 2016;167(1):233-247.e17.
30. Fellmann C, Gowen B, Lin P, Doudna J, Corn J. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;16(2):89-100.
31. Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. 2014;509(7501):487-491.
32. Luo J. CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery. *Trends in Cancer*. 2016;2(6):313-324.
33. Smalley E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance. *Nature Biotechnology*. 2016;34(9):893-894.

34. Mou H, Kennedy Z, Anderson D, Yin H, Xue W. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Medicine*. 2015;7(1).
35. Sánchez-Rivera F, Jacks T. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(7):387-395.
36. Wang H, Yang H, Shivalila C, Dawlaty M, Cheng A, Zhang F et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-918.
37. Yang H, Wang H, Shivalila C, Cheng A, Shi L, Jaenisch R. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 2013;154(6):1370-1379.
38. Dow L, Fisher J, P O'Rourke K, Muley A, R Kastenhuber E, Livshits G et al. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*. 2017;33(4):390-397.
39. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi N et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014;514(7522):380-384.
40. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen C, Zapatka M, Northcott P, Schramm K et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nature Communications*. 2015;6:7391.
41. Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, Öllinger R, Friedrich M, Heid I et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nature Communications*. 2016;7:10770.
42. Ding Q, Strong A, Patel K, Ng S, Gosis B, Regan S et al. Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Circulation Research*. 2014;115(5):488-492.
43. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*. 2014;33(1):102-106.
44. Heckl D, Kowalczyk M, Yudovich D, Belizaire R, Puram R, McConkey M et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Biotechnology*. 2014;32(9):941-946.
45. Chen C, Liu Y, Rappaport A, Kitzing T, Schultz N, Zhao Z et al. MLL3 Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2014;25(5):652-665.
46. Aubrey B, Kelly G, Kueh A, Brennan M, O'Connor L, Milla L et al. An Inducible Lentiviral Guide RNA Platform Enables the Identification of Tumor-Essential Genes and Tumor-Promoting Mutations In Vivo. *Cell Reports*. 2015;10(8):1422-1432.
47. Geling A. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Reports*. 2002;3(7):688-694.

48. Clark I, Dodson M, Jiang C, Cao J, Huh J, Seol J et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1162-1166.
49. Wittenburg, N. et al. Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*. *Nature*. 2002; 406, 306–309.
50. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;17(1):36-44.
51. Platt R, Chen S, Zhou Y, Yim M, Swiech L, Kempton H et al. CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell*. 2014;159(2):440-455.
52. Ran F, Cong L, Yan W, Scott D, Gootenberg J, Kriz A et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186-191.
53. Straub C, Granger A, Saulnier J, Sabatini B. CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knock-Down in Post-Mitotic Neurons. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e105584.
54. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen C, Zapatka M, Northcott P, Schramm K et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nature Communications*. 2015;6:7391.
55. Wang X, Cao C, Huang J, Yao J, Hai T, Zheng Q et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
56. Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics*. 2015;.
57. Strong A, Musunuru K. Genome editing in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology*. 2016;14(1):11-20.
58. Carroll K, Makarewich C, McAnally J, Anderson D, Zentilin L, Liu N et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;113(2):338-343.
59. Bhattacharya D, Marfo C, Li D, Lane M, Khokha M. CRISPR/Cas9: An inexpensive, efficient loss of function tool to screen human disease genes in *Xenopus*. *Developmental Biology*. 2015;408(2):196-204.
60. Kotani H, Taimatsu K, Ohga R, Ota S, Kawahara A. Efficient Multiple Genome Modifications Induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 Protein Complex in Zebrafish. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0128319.
61. Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;46:49-55.
62. Pazhakh V, Clark S, Keightley M, Lieschke G. A GCSFR/CSF3R zebrafish mutant models the persistent basal neutrophil deficiency of severe congenital neutropenia. *Scientific Reports*. 2017;7:44455.
63. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*. 2016;539(7630):479-479.

64. Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature*. 2016.
65. Lockyer E. The potential of CRISPR-Cas9 for treating genetic disorders. *BioscienceHorizons*. 2016;9.
66. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Molecular Therapy*. 2017;25(5):1168-1186.
67. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J, Chew W, Widrick J, Yan W et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2015;351:407-411.
68. Nelson C, Hakim C, Ousterout D, Thakore P, Moreb E, Castellanos Rivera R et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2015;351:403-407.
69. Long C, Amoasii L, Mireault A, McAnally J, Li H, Sanchez-Ortiz E et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2015;351(6271):400-403.
70. Gantz V, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias V, Bier E et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(49):E6736-E6743.
71. Baltimore D, Baylis F, Berg P, Doudna J, Lander E, Lovell-Badge R et al. On Human Gene Editing: International Summit Statement. 2015.