

PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2020: UN PREMIO QUE SURGIÓ EN ESPAÑA Y QUE PASÓ DE LARGO

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020: A PRIZE THAT AROSE IN SPAIN AND PASSED BY

Lluís Montoliu José

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIH)

RESUMEN

Las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna han recibido el Premio Nobel de Química del año 2020 por “el desarrollo de un método de edición genética”, tal y como proclama la escueta pero suficiente justificación aportada por la Academia Sueca de Ciencias, responsable de la selección y elección de los premiados en esta categoría. La palabra CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que corresponde, en español, a las repeticiones cortas palindrómicas agrupadas y regularmente espaciadas, descritas por el microbiólogo español de la Universidad de Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, no aparece en la frase resaltada del galardón pero, inmediatamente, el mundo entero supo que este premio Nobel de Química se lo llevaban las “CRISPR”, las famosas herramientas de edición genética, descritas inicialmente por Mojica como elementos de un complejo y eficaz sistema de defensa en procariontes y que, gracias al talento y la visión de estas dos investigadoras, fueron propuestas para ser utilizadas, fuera de contexto, para la edición de cualquier gen de cualquier ser vivo. En esta revisión señalaré los puntos clave que permitieron a Charpentier y Doudna obtener, merecidamente, este premio y, por supuesto, subrayaré el papel que han jugado muchos otros investigadores, como el propio Mojica.

ABSTRACT

Two researchers, Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna, have received the 2020 Nobel Prize in Chemistry for “the development of a genetic editing method”, as proclaimed by the brief but sufficient justification provided by the Swedish Academy of Sciences, responsible for the selection and election of the winners in this category. The word CRISPR (acronym for Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), described by the Spanish microbiologist at the University of Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, does not appear in the highlighted phrase of the award but, immediately, the whole world knew that this Nobel Prize in Chemistry was won by the “CRISPR”, the famous gene editing tools, initially described by Mojica as elements of a complex and effective defense system in prokaryotes. And, thanks to the talent and vision of these two researchers, CRISPR were proposed to be used, out of context, for editing any gene of any living organism. In this review I will point out the key points that allowed Charpentier and Doudna to deserve this award and of course I will underline the role that many other researchers have played, including that of Mojica himself.

Palabras Clave:

CRISPR
edición genética
CRISPR-Cas
terapia génica
nucleasas

Keywords:

CRISPR
genome editing
CRISPR-Cas
gene therapy
nucleases



1. INTRODUCCIÓN

Emmanuelle Charpentier, microbióloga francesa que trabajó desde diversos laboratorios hasta recabar como directora de un centro Max-Planck en Berlín (Alemania), y Jennifer Doudna, bioquímica norteamericana, de la Universidad de California en Berkeley, no se conocían personalmente a principios del año 2011. En marzo de ese año tuvo lugar una reunión internacional sobre "Regulación por ARN en Bacterias" en San Juan, Puerto Rico (EE.UU.), y allí fue donde coincidieron estas dos investigadoras por vez primera. Charpentier, más joven que Doudna, que ya era una investigadora senior, con prestigio y reconocimiento, fue quien se acercó a proponer una colaboración científica para descifrar el mecanismo de acción de uno de estos sistemas CRISPR-Cas (Cas se refiere al acrónimo en inglés CRISPR-associated protein), en el que las dos habían estado investigando, desde un punto de vista de microbiología molecular (Emmanuelle Charpentier) y desde un punto de vista de bioquímica estructural (Jennifer Doudna). Quince meses después el resultado de esa colaboración aparecía publicado en la revista *Science* (1), en el primer y único artículo científico en el que estas dos investigadoras colaboraron como co-titulares de la investigación. El artículo que las llevó, ocho años y unos meses después, a conseguir el Premio Nobel de Química.

El artículo de Charpentier y Doudna (1) describía la simplicidad estructural y funcional del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, patógena para los seres humanos, causa frecuente de otitis y laringitis. En el citado estudio, publicado en el mes de junio de 2012, las dos investigadoras galardonadas, junto a sus colaboradores, describieron que la nucleasa Cas9 cortaba, in vitro, guiada por una molécula de ARN (crRNA), descrita por el laboratorio de John van der Oost (2), y que, a su vez, se apareaba con otro ARN de pequeño tamaño (tracrARN) que era quien atenazaba a la proteína Cas9. Este último ARN había sido descrito un año antes por el laboratorio de Emmanuelle Charpentier (3). El artículo seminal de las dos investigadoras (1) aportó un detalle especial, que muy probablemente contribuyó al éxito inmediato y a la expansión internacional de estas herramientas. Charpentier y Doudna optaron por fusionar las dos moléculas de ARN en una sola, a través de una secuencia de unión (linker) y el resultado fue el denominado sgARN (guía sintética de ARN) o, simplemente, gARN (guía de ARN) que convertía al sistema CRISPR-Cas9 en binario (1). Solo dos componentes eran necesarios para trasladar los posibles beneficios de las nuevas herramientas CRISPR-Cas9 a cualquier entorno: la nucleasa Cas9 y la guía de ARN (sgARN). El artículo de Charpentier y Doudna terminaba con una frase premonitoria del éxito que acom-

pañaría al nuevo método que lanzaban en 2012: "Proponemos una metodología alternativa basada en la proteína Cas9 programada por ARN que puede aportar un potencial considerable para las aplicaciones de inactivación y edición génica". No se equivocaban. En efecto, ocho años más tarde ese artículo las llevó al más alto reconocimiento que puede recibir un científico: el Premio Nobel de Química.

Es relevante indicar que el celebrado artículo de 2012 fue, en realidad, la única ocasión que colaboraron experimentalmente Charpentier y Doudna, en igualdad de condiciones. Dos años más tarde Charpentier colaboró en un artículo de biología estructural del laboratorio de Doudna, que determinaba cómo la proteína Cas9 cambiaba de conformación al interactuar con las moléculas de ARN (4). Posteriormente aparecieron juntas en dos de las primeras revisiones que se publicaron sobre el tema (5, 6), y en una obra colectiva adicional de posicionamiento sobre el impacto de la edición génica (7), pero lo cierto es que se trata en esta ocasión de un Premio Nobel basado en un único trabajo experimental, una única publicación (1), que obviamente ha tenido un impacto enorme en biología, biotecnología y biomedicina. De ahí se desprende la justificación del galardón conseguido conjuntamente por estas dos investigadoras, la primera vez que se otorga un Premio Nobel a dos investigadoras.

Todo lo anterior es cierto. Pero no es menos cierto que Charpentier y Doudna propusieron, pero no demostraron, que los sistemas CRISPR-Cas9 de procariotas podrían ser utilizados como herramientas de edición génica. Este honor les corresponde, conjuntamente, a los laboratorios de Feng Zhang (Instituto BROAD, del MIT) y de George Church (Universidad de Harvard) quienes publicaron sendos manuscritos en enero de 2013 precisamente llevando a la práctica la propuesta de las investigadoras. En efecto, en dos publicaciones que aparecieron en la revista *Science* a principios de 2013 estos dos investigadores de Boston compartieron con el mundo el éxito que habían tenido editando células de ratón y células humanas (8, 9). Fue entonces cuando empezó la revolución CRISPR, cuando el resto del mundo empezó a descubrir las poderosas herramientas CRISPR, para editar cualquier gen de cualquier organismo (10).

Sin embargo, junto a Charpentier, Doudna, Zhang y Church, siguen faltando muchos investigadores. Siguen faltando todos aquellos microbiólogos moleculares que, durante más de veinte años, antes que se descubriera la potencial aplicación de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición génica, se entretuvieron a describir este peculiar, fascinante, complejo y muy eficaz sistema de defensa que usan los procariotas para defenderse de moléculas de ADN invasoras, sean virus o plásmidos (11).



2. EL ORIGEN PROCARIOTA DE LOS SISTEMAS CRISPR-CAS

Realmente la historia de este Premio Nobel de Química 2020 se remonta al año 1987. Fue entonces cuando un equipo de microbiólogos japoneses se percató de la existencia de unas curiosas repeticiones en el genoma de la proteobacteria *Escherichia coli*, espaciadas por secuencias diversas (12). Cuatro años más tarde otros microbiólogos holandeses también las reportaron en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, las micobacterias que causan la tuberculosis en personas y en animales (13). Pero no fue hasta 1993 cuando apareció el primer trabajo publicado de un microbiólogo español, Francisco Juan Martínez Mojica, también conocido como Francis Mojica, quien, desde la Universidad de Alicante, junto a su grupo de investigación, localizó estas mismas repeticiones y espaciadores en el genoma de otro procariota, de la arquea *Haloferax mediterranei*, microorganismo habitual de las salinas, aislado anteriormente por su laboratorio en las Salinas de Santa Pola (Alicante). En esta primera publicación, Mojica describía repeticiones similares a las reportadas por los equipos japoneses y holandeses, pero esta vez en una arquea (14).

A diferencia de los microbiólogos japoneses y holandeses, Mojica se dio cuenta de la relevancia de que tres procariotas muy alejados evolutivamente, y con hábitats tan dispares (intestinos, pulmones y salinas, respectivamente), compartieran un patrón de repeticiones de secuencias en su ADN, en sus genomas. Descartada por físicamente improbable la transmisión horizontal tan solo quedaba suponer una evolución convergente en tres linajes, posible pero altamente improbable. O asumir que aquella insólita organización de un fragmento del ADN de todos estos microorganismos respondiera a que lo habían heredado de un ancestro común. Sin embargo, la consulta del árbol filogenético de los procariotas sugiere que el ancestro común más próximo de las tres especies era verdaderamente las primeras células que aparecieron en nuestro planeta, probablemente hace más de 3.500 millones de años. Y, de todo ello se deducía que una peculiar estructura genómica que se había mantenido tanto tiempo tenía que ser necesariamente funcionalmente relevante para estos seres vivos. Y por todo ello Francis Mojica decidió dedicar su carrera profesional a investigar cuál podría ser la función de estas repeticiones de secuencias de ADN (15).

La primera idea de Mojica fue pensar que estas repeticiones podrían tener algo que ver con la replicación y la partición de replicones en la arquea *Haloferax mediterranei* (16), algo que después se comprobó que no era una hipótesis correcta, aunque esta publicación recoge las primeras evidencias de que estas secuencias repetitivas eran activas, se transcribían a ARN. Mojica siguió recopilando la presencia de estos elementos repetidos en el genoma de muchos procariotas cuya secuencia se empezaba a conocer y publicó

el primer listado de secuencias repetidas de diversos microorganismos, en el que incluía algunos elementos descritos en el genoma de las mitocondrias de leguminosas (relacionado con el origen procariota de estos orgánulos subcelulares) (17). Hasta entonces, cada grupo que reportaba secuencias repetidas de estas características las denominaba de una forma distinta. Pero en noviembre de 2001 Francis Mojica le propuso a Ruud Jansen una palabra: CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que inmediatamente hizo fortuna y se usó por primera vez en un artículo de Jansen en el que describía la existencia de genes colindantes a las repeticiones, que intuía debían estar relacionados, y que, por ello, las proteínas codificadas se nombraron como Cas (acrónimo en inglés de *CRISPR associated protein*) (18).

La contribución esencial de Mojica para descifrar el significado de las repeticiones CRISPR y de los espaciadores con secuencias únicas que había entre aquellas no tardaría en llegar. En verano de 2003 Mojica se percató de que algunos espaciadores eran fragmentos de genomas de virus que infectan a bacterias (bacteriófagos). Y que, cuando esto sucedía, la bacteria que portaba ese fragmento del virus era resistente a la infección por ese mismo virus. Había encontrado la razón de ser de los sistemas CRISPR. Se trataba de un sistema inmunitario de los procariotas de base genética, de defensa contra los virus, que se podía transmitir entre generaciones y que era adaptativo, pues al ir añadiendo fragmentos de nuevos virus podía conferirles resistencia a las bacterias y arqueas a todos esos nuevos invasores. Le costó casi tres años encontrar una revista que publicara estos resultados sorprendentes, que la comunidad científica recibió con escepticismo e incredulidad, pero finalmente aparecieron publicados en 2005 en la revista *Journal of Molecular Evolution* (19), convirtiéndose, años después, en su pasaporte para ser nominado también a los Premios Nobel, tal era la relevancia de su descubrimiento.

La explicación propuesta por Mojica para dar sentido funcional a los sistemas CRISPR fue confirmada experimentalmente dos años después, por dos investigadores Rodolphe Barrangou y Philippe Horvath, y sus colaboradores, quienes pudieron llevar a la práctica los experimentos que Mojica hubiera deseado hacer, confirmando que al añadir una nueva repetición CRISPR con un espaciador derivado de un virus la bacteria se volvía resistente al mismo, y al eliminar ese mismo espaciador se tornaba sensible a la infección (20).

Las contribuciones esenciales de Mojica al universo CRISPR todavía tuvieron otra aportación fundamental al ponerle nombre a la secuencia que aparecía conservada justo al lado de la secuencia de reconocimiento del fragmento del genoma del virus, que Mojica denominó como motivo adyacente al protoespaciador, o PAM (acrónimo en inglés de *Protospacer Adjacent Motif*). Ese era el truco ge-



nético que usaban las bacterias para diferenciar el ADN del virus, contra el que debían atacar, del fragmento del ADN del virus insertado en el genoma de la bacteria entre las repeticiones CRISPR, que no debían atacar (21). La existencia de estas señales presentes directamente en el genoma de los virus, adyacentes a la secuencia de reconocimiento, ya había sido intuida por otros investigadores (22), que eran diversas según qué bacteria o arquea, o qué nucleasa Cas se tratara. Y esta es la razón biológica por la que a la hora de diseñar las guías de ARN para dirigir los sistemas CRISPR-Cas a nuestro gen favorito debamos escoger no cualquier secuencia al azar sino solamente aquellas adyacentes a la señal PAM que requiere la nucleasa que vayamos a utilizar, una labor bioinformática de la que se encargan la mayoría de programas que diseñan guías de ARN para dirigir las nucleasas Cas a los genes de elección (23, 24).

Las aportaciones de Mojica al campo de las CRISPR vinieron acompañadas de otros hallazgos, igualmente relevantes. El investigador Luciano Marraffini, de origen argentino pero afincado en EE.UU., demostró en 2008 que los sistemas CRISPR-Cas no solo iban dirigidos contra el genoma de los virus sino también contra plásmidos (25). El grupo de John van der Oost descubrió las pequeñas moléculas de ARN (crARN) que dirigían a las nucleasas a la secuencia que debía ser cortada (2). El mecanismo de actuación se fue descubriendo paulatinamente, con contribuciones importantes de la propia Jennifer Doudna, que describió la actividad ADNasa en las nucleasas Cas asociadas a CRISPR (26) y el procesamiento del ARN transcrito de las agrupaciones CRISPR en fragmentos de menor tamaño (27). Sin embargo, probablemente el trabajo fundamental que dio la pista del mecanismo de acción de los sistemas CRISPR-Cas en procariotas surgió en 2010 del laboratorio del investigador canadiense Sylvain Moineau, quienes demostraron, por vez primera, que el mecanismo de defensa que aplicaban las bacterias para inactivar los virus y plásmidos invasores mediante los sistemas CRISPR-Cas estaba basado en el corte de sus ADNs, derivado de la actividad Cas de las nucleasas asociadas (28). El mecanismo de acción se completó con el trabajo de Emmanuelle Charpentier, quien en 2011 describió la otra molécula de ARN necesaria para que la guía de ARN acabara interaccionando con la endonucleasa Cas, que denominó tracrARN (3). El colofón final de todos estos más de veinte años de investigación básica sobre los sistemas CRISPR-Cas lo puso el artículo conjunto de las premiadas Charpentier y Doudna (1), aparecido en verano de 2012, por el que recibieron el Premio Nobel de Química del año 2020.

Son muchos pues los investigadores que, capitaneados por Francis Mojica, participaron en la exploración y búsqueda de explicaciones funcionales para el sistema CRISPR-Cas, antes que Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna (11). Y muchos más los que comprobaron y usaron profusamente su propuesta de convertir este

sistema de defensa en una eficaz herramienta de edición genética (10, 11). Por ello el premio, merecido, que recibieron estas investigadoras llegó acompañado de decepciones, al ver que el comité de selección de la Academia Sueca de Ciencias había desestimado compartir el galardón con alguno de los otros investigadores mencionados, probablemente ante la difícil disyuntiva de tener que optar por uno frente a los demás. Y, con ello, España vio pasar de largo la oportunidad soñada de que Francis Mojica fuera el tercer científico español galardonado con un Premio Nobel, tras Santiago Ramón y Cajal (1906) y Severo Ochoa Albornoz (1959).

Mención especial merece un microbiólogo lituano, Virginijus Siksnys, de la Universidad de Vilnius, que, con su grupo, hizo también aportaciones fundamentales. En 2011 logró transferir con éxito un sistema CRISPR-Cas desde la bacteria gram-positiva *Streptococcus thermophilus* a *Escherichia coli*, una bacteria gram-negativa y evolutivamente muy alejada de la primera (29). La magnitud del experimento quedó eclipsada probablemente al tratarse del intercambio de secuencias entre dos microorganismos, sin reparar que estos tenían una distancia evolutiva enorme, de centenares de millones de años, tantos como los que separan un eucariota unicelular como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de nosotros. Siksnys también se percató del posible uso de los sistemas CRISPR-Cas de procariotas como posibles herramientas de edición genética y así lo plasmó tras realizar un estudio in vitro (30) análogo al realizado por las investigadoras Charpentier y Doudna. Sin embargo, Siksnys usó el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus thermophilus* y las investigadoras usaron el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus pyogenes*, del que conocían todos sus componentes, incluido el tracrARN, que desconocía y no utilizó el trabajo del investigador lituano (30). Este trabajo, que se envió a publicar antes del de las investigadoras, finalmente acabó publicado en la revista PNAS, en su número de septiembre de 2012 (30), tres meses después del artículo seminal de Charpentier y Doudna en la revista *Science* (1). Ambos trabajos describían el mecanismo de acción de sendos sistemas CRISPR-Cas en dos especies distintas del género *Streptococcus*. Ambos artículos predecían que el corte de secuencias específicas de ADN guiado por pequeñas moléculas de ARN podría tener utilidad en un sistema de edición genética universal, pero solo el trabajo de las dos investigadoras incluía la totalidad de los elementos de los sistemas CRISPR-Cas: la proteína Cas9, el crARN y el tracrARN. Esta última molécula faltaba en la receta metodológica de Siksnys. Sin embargo, creo que es necesario acreditar que fueron tres, por lo menos, los investigadores que, a lo largo de 2012, se percataron del uso de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición genética: Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna y Virginijus Siksnys (11, 15).



3. LAS HERRAMIENTAS CRISPR-CAS DE EDICIÓN GENÉTICA: APLICACIONES, VENTAJAS Y LIMITACIONES

El escueto mensaje que anunciaba el Premio Nobel concedido a Charpentier y Doudna refería que la motivación de tan alta distinción se justificaba por el desarrollo de “un” método de edición genética. La elección del artículo indeterminado “un” y no su correspondiente determinado “el” por parte de la Academia de Ciencias Sueca no era baladí. Implícito en ese mensaje se trasladaba la información de que el sistema CRISPR-Cas por el que las dos investigadoras iban a recibir el Premio Nobel no era el único sistema de edición genética que la comunidad científica conocía. En efecto, por lo menos tres sistemas análogos adicionales, totalmente diferentes en su modo de acción, habían aparecido descritos antes que las herramientas CRISPR-Cas. En primer lugar, las meganucleasas de levaduras, descritas en 1995, seguidas de las nucleasas asociadas a dominios proteicos de dedos de cinc (ZFN, acrónimo en inglés de *Zinc-finger nucleases*), que aparecieron en 2001, y finalmente las TALEN (acrónimo en inglés de *Transcription activator-like effector nuclease*) cuyo uso se popularizó a partir de 2011 (10, 31, 32). Sin embargo la irrupción de las herramientas CRISPR-Cas en 2013, tras las primeras demostraciones funcionales por parte de Zhang (8) y Church (9), seguidas de muchos otros investigadores como la propia Jennifer Doudna (33), y el laboratorio de Rudolf Jaenisch, que demostró el uso de las CRISPR para la edición de ratones (34), y muchos otros investigadores (10, 11), rápidamente demostró su versatilidad, asequibilidad y facilidad de uso, propiedades que llevaron a las herramientas CRISPR-Cas de edición genética a desbancar a todas las anteriores. En apenas ocho años ya se han publicado 22.000 artículos científicos que usan estas herramientas CRISPR-Cas, unos 6.000 solamente en el último año contabilizado, 2020. Las anteriores herramientas se siguen utilizando, y en algunos casos han permitido resolver barreras insalvables que no habían podido superar las herramientas CRISPR, como la edición del ADN mitocondrial. Recientemente, David Liu, investigador del Instituto BROAD-MIT, ha conseguido editar el genoma de mitocondrias a través de una estrategia parecida a los editores de bases, combinando la actividad citidina deaminasa con TALEN lo cual permite llevar el complejo al interior de la mitocondria y editar específicamente su genoma (35).

Todas las herramientas de edición genética, en sus diferentes versiones, realizan esencialmente la misma función: cortar el ADN en secuencias específicas. Dicho corte dispara los mecanismos endógenos de reparación. Las dos rutas más importantes para restaurar la continuidad física del cromosoma son la unión de extremos no homólogos, que ocurre en todas las células, estén dividiéndose o no; y por otro lado la reparación dirigida por homología, en la

que se puede aportar al sistema un molde (un oligonucleótido de ADN de cadena sencilla, o un fragmento bicatenario de ADN) con homología a derecha e izquierda del corte realizado y con la posibilidad de insertar secuencias de novo, que no existían en el genoma original. Esta segunda ruta de reparación solamente opera en células que están en división. La resolución del primero de los mecanismos progresa al azar, añadiendo (insertando) y eliminando (delecionando) nucleótidos hasta que se logra alguna microhomología que permita reconstituir la continuidad física del cromosoma. Normalmente el resultado de la reparación mediante unión de extremos no homólogos es la inactivación génica, y el resultado de la reparación dirigida por homología la edición génica (5, 6, 10, 15).

Las aplicaciones de las herramientas CRISPR-Cas en biología, biotecnología y biomedicina son muy numerosas. El límite de las mismas está en la imaginación de los investigadores (15). Con ellas se pueden generar deleciones, inserciones, sustituciones, inversiones, duplicaciones, traslocaciones y cualquier otro reordenamiento cromosómico que deseemos modelar en células en cultivo o en organismos vivos. La obtención de nucleasas Cas9 con los centros activos de corte de ADN mutados, en una de las cadenas, las llamadas “nिकासas”, son en las dos cadenas, las llamadas Cas9 “muertas” o dCas9 (del inglés *dead Cas9*) ha abierto igualmente un campo inmenso a las modificaciones epigenéticas, al combinarlas con dominios activadores o supresores de la transcripción, o a la modificación directa de las secuencias de ADN, combinando las Cas9 modificadas con actividades químicas deaminasas, capaces de cambiar las bases nitrogenadas, de citosinas a timinas, o de adeninas a guaninas, sin necesidad de cortar el ADN, que son las variantes denominadas editores de bases. O incluso combinando las dCas9 o las nिकासas con dominios de transposasas o transcriptasas reversas, para unas nucleasas Cas9 inactivadas pero con propiedades excepcionales y potencialmente muy interesantes para aplicaciones biotecnológicas o biomédicas (36, 37).

En biología, las aplicaciones de las herramientas CRISPR han permitido analizar funcionalmente el genoma no codificante, que representa la mayoría del genoma en mamíferos (alrededor del 98%), y está lleno de secuencias repetidas, elementos móviles (transposones y retrotransposones) y también de secuencias de ADN reguladoras. La presencia de repeticiones inhabilita el uso de estrategias tradicionales, basadas en recombinación homóloga, como las que les permitieron a Evans, Capecchi y Smithies desarrollar la técnica de inactivación dirigida de genes en células pluripotentes embrionales de ratón, por la que recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2007 (38). Sin embargo, las herramientas CRISPR-Cas apenas necesitan veinte ribonucleótidos para aparearse con los nucleótidos complementarios del gen deseado y promover el corte a través de la endonucleasa Cas9. Y si se combinan dos com-



plejos CRISPR-Cas9 para que actúen en cis se puede fomentar la delección de las secuencias que hay entre medio, siendo posible la eliminación específica de elementos reguladores, y el estudio de sus consecuencias en la expresión génica y el fenotipo del animal. Este tipo de estrategias ya ha sido aplicado con gran éxito en el estudio de los elementos reguladores del locus de la tirosinasa del genoma de ratón (39, 40, 41).

La posibilidad de inactivar múltiples genes es otra de las versatilidades de las herramientas CRISPR. Recientemente unos investigadores australianos consiguieron diseñar antídotos más efectivos contra el veneno de una medusa extremadamente venenosa, llamada avispa de mar, capaz de matar a una persona en 10 minutos al entrar en contacto con sus tentáculos. Expusieron su veneno a células humanas a las que previamente les habían transducido una biblioteca de lentivirus portadores de Cas9 y de guías ARN contra la práctica totalidad de los genes humanos (>18.000), de tal manera que cada célula tenía un gen inactivado. El veneno mató la mayoría de las células exceptuando aquellas en las que el sistema CRISPR había inactivado la ruta de entrada del veneno, lo cual permitió descubrir posibles antídotos (42).

Las aplicaciones de las CRISPR en investigación biomédica también han permitido generar los llamados ratones "avatar", en los que con el uso de estas herramientas de edición genética se puede reproducir exactamente la misma mutación encontrada en un paciente de una enfermedad congénita en el gen homólogo del genoma de ratón (15). Este nombre refiere a la película de ciencia ficción que con el mismo nombre dirigió James Cameron en 2009, en la que unos seres azules estaban de alguna manera conectados con las personas. El nombre avatar aprovecha la metáfora de esta conexión y con estos modelos animales se puede validar la seguridad y eficacia de tratamientos experimentales antes de exponerlos directamente a los pacientes.

En biotecnología animal las herramientas CRISPR se han utilizado ya con éxito en diversas intervenciones sobre genomas de animales de granja, para dotarles de características beneficiosas. La eliminación de un dominio del receptor CD163, que es el que usa el virus porcino del síndrome respiratorio y reproductor para entrar en las células y causar estragos en las granjas de cerdos, produce animales que ya no son infectables por este peligroso virus, que cada año provoca pérdidas millonarias en el sector (43). Una estrategia CRISPR también se usó para eliminar los retrovirus porcinos (PERV) que representan un peligro potencial en aplicaciones de xenotrasplantes. Primero en células porcinas (44) y luego directamente en animales (45) el uso de las herramientas CRISPR permitió generar cerdos carentes de PERV activos, eliminadas las 62 copias que contenían insertadas en su genoma, y, por lo tanto, más seguros para su utilización posterior en el desarrollo de xenotrasplantes.

En biotecnología vegetal la aplicación de tecnologías CRISPR ha permitido, por ejemplo, reproducir la domesticación del tomate, llevada a cabo tras siglos de mejora genética tradicional desde su variante silvestre a la especie actual, mediante la inactivación sistemática de apenas seis genes que permiten, entre otras funciones, aumentar el tamaño y el número de frutos por planta (46). En España, el investigador Francisco Barro (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba) aplicó las herramientas CRISPR para inactivar la mayor parte de genes de las gliadinas del trigo, principal componente del gluten, y así producir un cereal con bajo contenido en gluten cuya harina y pan resultantes pueden ser consumidos por personas con celiaquía (47). También las CRISPR se han aplicado en líneas de maíz para incorporar la mutación en el gen *waxy*, lo cual produce un cereal con un mayor contenido en amilopectina, de gran valor agroeconómico e industrial (48).

Otro de los campos que ha generado grandes expectativas con la aparición de las herramientas CRISPR es el control de las enfermedades infecciosas diseminadas por insectos, mayoritariamente mosquitos, tales como la fiebre amarilla, el dengue, el virus Zika, el chikunguya, o la malaria. Las estrategias CRISPR permiten forzar una herencia supramendeliana, gracias a desarrollos de impulso génico (en inglés *gene drive*) en los que el alelo modificado codifica para su propia modificación, lo cual garantiza que ambos alelos serán modificados a pesar de que solamente se hereda un alelo modificado de uno de los progenitores. Estas alteraciones en la distribución de alelos, mediadas por CRISPR, con objeto de interferir en el ciclo vital del mosquito, ya han sido exploradas experimentalmente en mosquitos que transmiten el plasmodio, causante de la malaria (49).

Más allá de las aplicaciones CRISPR en biología y biotecnología existen grandes esperanzas para poder aplicar estas técnicas en la clínica, con un objetivo biomédico, para curar o aliviar enfermedades de base genética que son incurables hoy en día. Naturalmente la posibilidad de usar CRISPR en personas exige una seguridad y eficacia que no necesitamos en modelos animales o vegetales, y que igualmente podemos gestionar adecuadamente en todos los seres vivos, menos en seres humanos, fundamentalmente por motivos éticos. Y es precisamente en las aplicaciones biomédicas donde se ponen de manifiesto, de forma más evidente, las limitaciones actuales de la tecnología CRISPR de edición genética, que son de dos tipos: la alteración no deseada de secuencias genómicas similares a las planeadas (en inglés los efectos *off-target*), y el mosaicismo (50, 51, 52). La primera limitación no es tan importante como parece, pues existen múltiples programas bioinformáticos que nos permiten seleccionar, cada vez mejor, guías de ARN más específicas y, además, aparecen nuevas endonucleasas recombinantes con mayor especificidad (23, 24). La segunda limitación es la fuente



de mayor incertidumbre en edición genética, pues al intentar unir un corte de doble cadena de ADN los sistemas de reparación endógenos cometen errores, nunca se acuerdan de lo que han hecho con la molécula anterior y, por ello, generan una diversidad alélica y genética que aparece sistemáticamente en todo experimento de edición genética con CRISPR (39, 40). En plantas y en animales podemos segregarse los alelos no deseados y las mutaciones inesperadas en otras partes del genoma mediante meiosis, mediante cruces, seleccionando entre la progenie resultante aquellas plantas o animales que porten solamente los alelos editados de interés. Pero obviamente este protocolo no lo podemos aplicar en seres humanos. Sería imprudente y éticamente inaceptable. Por ello hay que recomendar mucha cautela a la hora de aplicar estas tecnologías sobre seres humanos y, ante todo, fomentar el uso responsable de las técnicas de edición genética (53, 54, 55). Naturalmente existen también limitaciones de tipo legal que impiden, por ejemplo en España, modificar el genoma de la descendencia, al ser nuestro país signatario del Convenio de Asturias de 1997.

Desafortunadamente, el investigador chino He Jiankui, anunció en noviembre de 2018 que había editado embriones humanos con objeto de inactivar el gen que codifica el receptor CCR5, que es el que usa el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, causante del SIDA) para entrar en los linfocitos. El irresponsable experimento se completó y los embriones humanos editados dieron lugar tres niñas, dos gemelas y otra niña, que tenían las mismas deficiencias y alteraciones inesperadas observadas en otras especies, como el ratón: mutaciones no deseadas y mosaicismos, sin posibilidad ética de gestionar esta irresponsabilidad adecuadamente. A finales de 2019, este investigador y sus colaboradores más cercanos fueron condenados a cárcel, al pago de una fuerte suma de dinero e inhabilitados de por vida, apenas un año después de conocerse el experimento. Este desafortunado experimento ilustra que no por el hecho de poder aplicar las herramientas CRISPR en muchos proyectos lo tenemos que hacer, que debemos recapacitar y, a falta de regulación específica, evitar el uso de estas herramientas en embriones humanos mientras no controlemos los resultados de la edición genética (15).

Para completar esta revisión, con motivo del Premio Nobel de Química 2020, otorgado a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, es importante mencionar los, todavía escasos, pero incontestables éxitos que la tecnología CRISPR ha obtenido en biomedicina, en la clínica. En la actualidad (diciembre de 2020) existen más de 43 ensayos clínicos en marcha que usan las herramientas CRISPR con finalidad terapéutica y están en diferentes fases del proceso. Son fundamentalmente ensayos *ex vivo*, exceptuando un par *in vivo*. De estos últimos destaca el que se lleva a cabo en diversos hospitales de Europa y Norteamérica, encaminado a eliminar una mutación

crítica en un intrón del gen CEP290, causante de la Amaurosis Congénita de Leber de tipo 10. En este caso los pacientes, cuya degeneración progresiva de retina es irreversible, reciben una inyección intraocular y subretinal de los reactivos CRISPR-Cas incorporados en vectores virales adenoasociados (56).

En relación a los ensayos clínicos de terapia génica *ex vivo* hay que mencionar dos tipos de aproximaciones. En primer lugar el uso de las herramientas CRISPR de edición genética en pacientes con cáncer agresivo y refractario, resistentes a quimioterapia y radioterapia, como son el mieloma, el sarcoma y el melanoma. Recientemente hemos conocido unos resultados preliminares de una fase I (para evaluar seguridad) de unos pacientes a quienes se les extrajeron linfocitos que, una vez en el laboratorio, se les aplicó la tecnología CRISPR para inactivar el gen PD1 y el gen del receptor de células T, y antes de retornarlos al paciente se les añadió un nuevo receptor quimérico de células T dirigido contra antígenos de membrana de las células cancerosas (57). Y, el mayor éxito de todos, la terapia que acabamos de conocer para enfermos de anemia falciforme y beta talasemias, enfermedades graves de la sangre que requieren transfusiones constantes y comprometen la vida de los afectados. En estos casos el gen de la beta-globina está mutado pero se reactiva la copia fetal de la gamma-globina, intacta, que reemplaza la beta-globina mutada, gracias a reducir significativamente la expresión del gen del represor *BCL11*, que mantiene la copia fetal inactiva en adultos, mediante el uso de una estrategia CRISPR que permite eliminar el potenciador transcripcional del gen *BCL11* (58). El gen no se puede eliminar por completo pues es necesario para el desarrollo y la diferenciación de otros tipos celulares del sistema hematopoyético. En la mayoría de estos casos se utilizan virus adenoasociados (AAV) para vehicular los reactivos CRISPR-Cas a la célula o tejido diana, sin embargo existe también la posibilidad de usar nanopartículas para dirigir las herramientas CRISPR y todos sus componentes al lugar adecuado del cuerpo mediante nanotecnología (59).

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El Premio Nobel de Química 2020, otorgado merecidamente a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, reconoció la visión que tuvieron al plantear, en junio de 2012, que un sistema de defensa antiviral bacteriano pudiera convertirse en una eficaz y precisa herramienta de edición genética, como así ha sido. Este galardón deja fuera a muchos otros investigadores que contribuyeron significativamente a establecer la tecnología CRISPR o que, mediante la investigación básica, sentaron las bases del origen y la función de los sistemas CRISPR en procariotas, como el microbiólogo español Francis Mojica.



Son muchas las aplicaciones de la tecnología CRISPR en biología, biotecnología y biomedicina, y muchos más los usos que veremos de este revolucionario método en un futuro próximo. Estos métodos han cambiado cómo se hacen los experimentos de modificación genética en los laboratorios de biología molecular de todo el mundo. Y, gracias a su facilidad y asequibilidad, permiten avanzar a un gran número de laboratorios de muchos países que tradicionalmente se quedaban atrás con otras tecnologías que requerían equipamientos más sofisticados. También es oportuno resaltar la capacidad de adaptación de los métodos CRISPR, que pueden aplicarse para cualquier objetivo que persiga detectar, marcar o alterar cualquier material genético, sea ADN o ARN. Quizás la mejor prueba de la versatilidad de las herramientas CRISPR la tenemos en cómo han surgido aplicaciones relativas a la pandemia COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2, tanto para diagnosticar la presencia del virus mediante métodos alternativos, basados en CRISPR (60, 61), el último de ellos desarrollado por el laboratorio de Jennifer Doudna (62), como para usar estas mismas herramientas como verdaderos antivirales, con variantes específicas de nucleasas Cas, como la Cas13d, capaz de cortar específicamente ARN y con ello degradar el genoma del coronavirus y de otros virus con genoma de ARN como el de la gripe (63).

5. REFERENCIAS

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
2. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008; 321:960-4.
3. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pizada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011; 471:602-7.
4. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 2014; 343:1247997.
5. Charpentier E, Doudna JA. *Biotechnology: Rewriting a genome*. *Nature* 2013; 495:50-1.
6. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346:1258096.
7. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, Cohen R, Corn J, Doudna J, Feng G, Greely HT, Isasi R, Ji W, Kim JS, Knoppers B, Lanphier E, Li J, Lovell-Badge R, Martin GS, Moreno J, Nalini L, Pera M, Perry AC, Venter JC, Zhang F, Zhou Q. CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nat Biotechnol*. 2015; 33:478-86.
8. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339:819-23.
9. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339:823-6.
10. Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res*. 2014; 23:707-16.
11. Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol*. 2016; 24:811-20.
12. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987; 169:5429-33.
13. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun*. 1991; 59:2695-705.
14. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993; 9:613-21.
15. Montoliu L. *Editando genes: recorta, pega y coloreá. Las maravillosas herramientas CRISPR*. 2ª edición, NextDoor Publishers, Pamplona, 2020.
16. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995; 17:85-93.
17. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000; 36:244-6.
18. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002; 43:1565-75.
19. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005; 60:174-82.
20. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315:1709-12.
21. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence



- system. *Microbiology* 2009; 155:733-40.
22. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151:2551-61.
 23. Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, Pazos F. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W267-71.
 24. Torres-Perez R, Garcia-Martin JA, Montoliu L, Oliveros JC, Pazos F. We-Review: CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. *Bioengineering (Basel)* 2019; 6:63.
 25. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008; 322:1843-5.
 26. Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, Coyle SM, Ma W, Doudna JA. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure* 2009; 17:904-12.
 27. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 2010; 329:1355-8.
 28. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010; 468:67-71.
 29. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:9275-82.
 30. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:E2579-86.
 31. Josa S, Seruggia D, Fernández A, Montoliu L. Concepts and tools for gene editing. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 29:1-7.
 32. Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mamm. Genome.* 2017; 28:237-46.
 33. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2:e00471.
 34. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153:910-8.
 35. Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* 2020; 583:631-37.
 36. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 2020; 578:229-36.
 37. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:824-44.
 38. Montoliu L. La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología o Medicina de 2007. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2008; 4:81-99.
 39. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:4855-67.
 40. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Fernández-Miñán A, Gomez-Skarmeta JL, Pelczar P, Montoliu L. Boundary sequences flanking the mouse tyrosinase locus ensure faithful pattern of gene expression. *Sci Rep.* 2020; 10:15494.
 41. Seruggia D, Josa S, Fernández A, Montoliu L. The structure and function of the mouse tyrosinase locus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020 Oct 23. doi: 10.1111/pcmr.12942.
 42. Lau MT, Manion J, Littleboy JB, Oyston L, Khuong TM, Wang QP, Nguyen DT, Hesselson D, Seymour JE, Neely GG. Molecular dissection of box jellyfish venom cytotoxicity highlights an effective venom antidote. *Nat Commun.* 2019; 10:1655.
 43. Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, Stadejek T, Ait-Ali T, Lillico SG, Whitelaw CBA, Archibald AL. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *J Virol.* 2018; 92:e00415-18.
 44. Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 2015; 350:1101-4.
 45. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017; 357:1303-7.
 46. Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol.* 2018 Oct 1. doi: 10.1038/nbt.4272.
 47. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 2018; 16:902-10.
 48. Gao H, Gadlage MJ, Lafitte HR, Lenderts B, Yang M, Schroder M, Farrell J, Snopek K, Peterson D, Feigenbutz L, Jones S, St Clair G, Rahe M, Sanyour-Doyel N, Peng C, Wang L, Young JK, Beatty M, Dahlke B, Hazebroek J, Greene TW, Cigan AM, Chilcoat ND, Meeley RB. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:579-81.



49. Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2018; 36:1062-6.
50. Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014 Oct 1;83:15.7.1-27.
51. Muñoz-Santos D, Montoliu L, Fernández A. Generation of Genetically Modified Mice Using CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol.* 2020; 2110:129-38.
52. Fernández A, Morín M, Muñoz-Santos D, Josa S, Montero A, Rubio-Fernández M, Cantero M, Fernández J, Del Hierro MJ, Castrillo M, Moreno-Pelayo MÁ, Montoliu L. Simple Protocol for Generating and Genotyping Genome-Edited Mice With CRISPR-Cas9 Reagents. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2020 Mar;10(1):e69.
53. Chneiweiss H, Hirsch F, Montoliu L, Müller AM, Fenet S, Abecassis M, Merchant J, Baertschi B, Botbol-Baum M, Houghton JA, Kritikos M, Mifsud J, Bartnik E, Rath J, Druml C, Friedrich B, Carvalho AS, Lanzerath D, Saint-Raymond A. Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. *Transgenic Res.* 2017; 26:709-13.
54. Montoliu L, Merchant J, Hirsch F, Abecassis M, Jouannet P, Baertschi B, Sarrauste de Menthère C, Chneiweiss H. ARRIGE Arrives: Toward the Responsible Use of Genome Editing. *CRISPR J.* 2018; 1:128-9.
55. Hirsch F, Lemaitre C, Chneiweiss H, Montoliu L. Genome Editing: Promoting Responsible Research. *Pharmaceut Med.* 2019; 33:187-91.
56. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, Bumcrot D, Chao H, Ciulla DM, DaSilva JA, Dass A, Dhanapal V, Fennell TJ, Friedland AE, Giannoukos G, Gloskowski SW, Glucksmann A, Gotta GM, Jayaram H, Haskett SJ, Hopkins B, Horng JE, Joshi S, Marco E, Mevani R, Reyon D, Ta T, Tabbaa DG, Samuelsson SJ, Shen S, Skor MN, Stetkiewicz P, Wang T, Yudkoff C, Myer VE, Albright CF, Jiang H. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med.* 2019; 25:229-33.
57. Stadtmayer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, Mangan PA, Kulikovskaya I, Gupta M, Chen F, Tian L, Gonzalez VE, Xu J, Jung IY, Melenhorst JJ, Plesa G, Shea J, Matlawski T, Cervini A, Gaymon AL, Desjardins S, Lamontagne A, Salas-McKee J, Fesnak A, Siegel DL, Levine BL, Jadowsky JK, Young RM, Chew A, Hwang WT, Hexner EO, Carreno BM, Nobles CL, Bushman FD, Parker KR, Qi Y, Satpathy AT, Chang HY, Zhao Y, Lacey SF, June CH. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020; 367:eaba7365.
58. Haydar Frangoul, M.D., David Altshuler, M.D., Ph.D., M. Domenica Cappellini, M.D., Yi-Shan Chen, Ph.D., Jennifer Domm, M.D., Brenda K. Eustace, Ph.D., Juergen Foell, M.D., Josu de la Fuente, M.D., Ph.D., Stephan Grupp, M.D., Ph.D., Rupert Handgretinger, M.D., Tony W. Ho, M.D., Antonis Kattamis, M.D., Andrew Kernytzky, Ph.D., Julie Lekstrom-Himes, M.D., Amanda M. Li, M.D., Franco Locatelli, M.D., Markus Y. Mapara, M.D., Ph.D., Mariane de Montalembert, M.D., Damiano Rondelli, M.D., Akshay Sharma, M.B., B.S., Sujit Sheth, M.D., Sandeep Soni, M.D., Martin H. Steinberg, M.D., Donna Wall, M.D., Angela Yen, Ph.D., and Selim Corbacioglu, M.D. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, December 5, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2031054
60. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:870-4.
61. Joung J, Latha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, Barretto RPJ, Ranu A, Macrae RK, Faure G, Ioannidi EI, Krajeski RN, Bruneau R, Huang MW, Yu XG, Li JZ, Walker BD, Hung DT, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N Engl J Med.* 2020; 383:1492-4.
62. Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, Zhao C, Switz NA, Kumar GR, Stephens SI, Boehm D, Tsou CL, Shu J, Bhuiya A, Armstrong M, Harris AR, Chen PY, Osterloh JM, Meyer-Franke A, Joehnk B, Walcott K, Sil A, Langelier C, Pollard KS, Crawford ED, Puschnik AS, Phelps M, Kistler A, DeRisi JL, Doudna JA, Fletcher DA, Ott M. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 2020; S0092-8674(20)31623-8. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.001.
63. Abbott TR, Dhamdhare G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell* 2020; 181:865-76.

Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar este artículo a Francisco Juan Martínez Mojica, por todo su trabajo de investigación básica llevado a cabo desde la Universidad de Alicante, que permitió avanzar a otros muchos investigadores y posibilitó la aparición de estas herramientas CRISPR de edición genética que hoy todos disfrutamos.

Si desea citar nuestro artículo:

Juan Ramón Lacadena, Pablo Gastaminza, Lluís Montoliu

Sesión científica celebrada el 26 de noviembre de 2020 para conmemorar los premios Nobel en fisiología o medicina y en química 2020

An. Real Acad. Farm. [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 287 - 310

DOI: http://