

Celebrem el Premi Nobel de Química 2020. Les eines CRISPR-Cas d'edició genètica

Celebrating the Nobel Prize in Chemistry 2020. CRISPR-Cas genome editing tools

Lluís Montoliu

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III (CIBERER-ISCIII), Madrid

Resum: A principis del mes d'octubre passat, la Reial Acadèmia Sueca de les Ciències va decidir atorgar el Premi Nobel de Química 2020 a dues investigadores: la francesa Emmanuelle Charpentier i la nord-americana Jennifer Doudna, per haver desenvolupat un mètode d'edició genètica. No va caldre res més. Tota la comunitat científica va saber que es premiaven les eines CRISPR-Cas, derivades de sistemes de procariotes que, amb el mateix nom, havien estat descrits per Francis Mojica, un investigador de la Universitat d'Alacant que també fou qui proposà aquest acrònim que ja ha fet fortuna: CRISPR.

Paraules clau: Edició genètica, edició genòmica, edició gènica, CRISPR-Cas9, nucleases, teràpia gènica.

Abstract: In early October of last year, the Swedish Academy of Sciences awarded the 2020 Nobel Prize in Chemistry to two scientists, the French researcher Emmanuelle Charpentier and the American biochemist Jennifer Doudna, for the development of a genome editing method. The whole scientific community immediately understood that the prize was being granted for the CRISPR-Cas tools, derived from prokaryotic systems which, under the same name, had been described by a researcher at the University of Alicante, Francis Mojica, who also coined the now famous acronym CRISPR.

Keywords: Genetic editing, genome editing, gene editing, CRISPR-Cas9, nucleases, gene therapy.

Introducció

El Premi Nobel de Química 2020 va recaure en dues investigadores, Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna, per haver desenvolupat un mètode d'edició genètica. El fet que la Reial Acadèmia Sueca de les Ciències destaqués l'article *un* (en lloc del determinat *el*) ja fa pensar que el mètode CRISPR-Cas premiat no era l'únic que coneixíem. Efectivament, abans de les eines CRISPR-Cas van sorgir les meganucleases de llevat, les nucleases associades a dominis de dits de zinc (ZFN) i les anomenades TALEN (derivades de bacteris patògens de plantes) [1]. Per tant, la precisió que es tractava *d'un* i no *del* mètode d'edició genètica era ben oportuna.

Aquestes dues investigadores, de carreres professionals molt diferents, compartien, però, l'interès per la biologia dels RNA i van coincidir per primera vegada l'any 2011 en una reunió internacional de microbiologia a Puerto Rico, on van decidir començar a col·laborar. El resultat no va trigar massa a concretar-

se i el mes de juny de l'any següent, el 2012, van publicar l'únic treball experimental que les va portar, vuit anys després a Estocolm, a recollir el merescut Premi Nobel de Química. En efecte, l'article publicat a la revista *Science* va ser disruptiu en molts sentits, pel fet de proposar que uns sistemes de defensa que utilitzen els organismes procariotes, els bacteris i els arqueus, per a defensar-se dels bacteriòfags —els virus que els infecten—, també podrien servir per a promoure l'edició de qualsevol gen en qualsevol altre organisme [2]. En aquest treball, les investigadores i els seus equips respectivament descrivien els components d'un d'aquests sistemes CRISPR-Cas, derivat del bacteri patògen *Streptococcus pyogenes*, que habitualment causa otitis i laringitis. El sistema no podia ser més senzill: un enzim endonucleasa anomenat *Cas9* i dues petites molècules d'RNA, l'una per a aparellar-se amb el gen diana que es vol editar (RNAcr, o crRNA en anglès) i l'altra accessible però igualment important, que s'aparella amb la primera i es lliga a la proteïna *Cas9* (RNAtracr, o tracrRNA en anglès). Charpentier i Doudna van anar més enllà en aquest article premonitori ja que suggerien que les dues petites molècules d'RNA es podien combinar i fusionar, constituint el que van anomenar *RNA guia sintètic* (RNAgs, o sgRNA en anglès) [2].

Aquest article no demostrava que es poguessin fer servir els sistemes CRISPR-Cas com a eines d'edició genètica, només ho

Correspondència: Lluís Montoliu
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)
Campus de Cantoblanco. C. Darwin, 3. 28049 Madrid
Tel.: +34 915 854 844
A/e: montoliu@cnb.csic.es

apuntava, però va ser suficient per a capgirar la comunitat científica biomèdica, que va posar tota la maquinària a treballar i, set mesos després, el mes de gener de 2013, dos treballs publicats, també a la revista *Science*, pels laboratoris de Feng Zhang [3] i George Church [4] van demostrar que la proposta de Charpentier i Doudna era certa, que es podien editar gens en cèl·lules humanes i de ratolí, i aleshores va començar la revolució, que encara continua.

Els orígens de la tecnologia CRISPR

L'entrada de la microbiòloga francesa Emmanuelle Charpentier al camp de les CRISPR s'havia produït l'any 2011, quan va descriure precisament l'existència de la segona petita molècula d'RNA que tenien alguns sistemes CRISPR, l'RNAtacr [5]. Per contra, la bioquímica Jennifer Doudna ja feia uns quants anys que havia començat a acostar-se als sistemes CRISPR i havia pogut cristal·litzar i deduir l'estructura de diverses proteïnes relacionades amb aquest curiós sistema de defensa adaptatiu que feien servir els procarïotes [6].

El mecanisme funcional dels sistemes CRISPR-Cas no podia ser més simple. La guia d'RNA buscava la seqüència de DNA complementària en el genoma per editar i arrossegava la nucleasa Cas9 per a tallar en un lloc precís les dues cadenes de DNA. Aquest tall havia de ser reparat immediatament per la cèl·lula aprofitant algun dels sistemes de reparació endògens que tenim tots els éssers vius. D'una banda, un sistema ràpid però molt poc respectuós amb la seqüència original de DNA, que progressava afegint i esborrant nucleòtids (INDEL) fins a arribar a generar alguna microhomologia que permetés restablir la continuïtat del cromosoma (NHEJ), i de l'altra, un sistema de reparació dirigit per homologia si introduïm dins de la reacció un motlle de DNA complementari als dos costats del lloc de tall que es pogués fer servir per a restaurar la continuïtat del genoma [7].

Mitjançant aquestes dues rutes de reparació era possible virtualment modificar —editar— qualsevol gen de qualsevol genoma de qualsevol espècie, animal o vegetal, també de llevats i d'altres bacteris. Les aplicacions que es podien derivar de l'ús d'aquestes eines CRISPR-Cas depassaven el camp de la biologia per endinsar-se en la biomedicina i la biotecnologia [8, 9].

Però, quin era l'origen d'aquestes meravelloses eines CRISPR-Cas que havien revolucionat els laboratoris de biologia molecular de tot el món? Calia buscar-lo a Alacant, a les salines de Santa Pola, d'on es va aïllar l'arqueobacteri *Haloferax mediterranei*, l'organisme amb el qual va fer la tesi doctoral Francis Mojica, microbiòleg de la Universitat d'Alacant. F. Mojica va descobrir unes curioses repeticions al genoma d'aquest procarïota, que tenien una estructura regular —és a dir, mantenien un patró [10]. Aquestes mateixes repeticions, i els espaiadors entre elles, les va continuar trobant en altres procarïotes, fins que va decidir anomenar-les adientment, per posar ordre al camp, i establí l'acrònim CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, 'repeticions curtes palindròmiques agrupades i regularment espaiades') per a identificar-les [11]. Analitzant moltes d'aquestes seqüències CRISPR, va acabar descobrint que els espaiadors existents entre repeticions consecutives en realitat eren fragments de genomes de virus invasors, i que, quan això passava, el bacteri o l'arqueu eren resistent a la infecció per aquest virus. Havia descobert un veritable sistema immunitari en el món procarïota, de tipus adaptatiu i de fonament genètic, que s'heretava entre generacions. F. Mojica fou el primer a adonar-se de la funció d'aquests sistemes CRISPR-Cas com a veritables sistemes de defensa [12].

Les contribucions de Mojica per a caracteritzar els sistemes CRISPR-Cas van continuar. L'any 2009 va descriure una seqüència de DNA que sempre estava al costat de la guia d'RNA (però no la contenia) i que era la que permetia a la nucleasa Cas9 decidir si tallava o no. Aquesta seqüència senyal la va anomenar *PAM* (*protospacer adjacent motif*, 'motiu adjacent al protoespaiador') i és una de les restriccions i limitacions biològiques que ens recorda que els sistemes CRISPR-Cas tenen una raó de ser, que l'evolució els ha anat polint per a discriminar entre el DNA del virus invasor (que és el que conté la PAM) i el propi DNA del bacteri (que no conté la PAM), i evitar així que la nucleasa Cas9 s'activi contra el mateix bacteri [13].

Els experiments pioners de Mojica, junt amb els de molts altres laboratoris destacats, van permetre investigar i determinar tots els components dels sistemes CRISPR-Cas fins a arribar, vint anys després, a l'article de Charpentier i Doudna [2]. Són molts els investigadors que van contribuir decisivament en aquesta tasca, i que haurien pogut acompanyar les dues investigadores en el seu Premi Nobel, però finalment no va ser així. És important, però, conèixer els esdeveniments històrics i

les dates i les persones clau que van permetre, amb els seus treballs, fer avançar aquesta tecnologia [14].

Entre els microbiòlegs que van col·laborar en aquesta gran fita destaca també Virginijus Siksnys, de la Universitat de Vilnius (Lituània), que va arribar a la mateixa conclusió que les investigadores Charpentier i Doudna, sobre la possibilitat que els sistemes CRISPR-Cas es convertissin en eines d'edició genètica, si bé el seu article va aparèixer publicat tres mesos després i tota la glòria va recaure sobre les dues investigadores [15].

Alguns dels investigadors destacats de l'univers CRISPR han aprofitat per a fundar empreses del ram, i per a desenvolupar eines i solucions terapèutiques aplicades al tractament de malalties humanes de base genètica. És el cas, entre molts d'altres, de l'investigador Feng Zhang, vinculat a Editas Medicine; de Jennifer Doudna, amb Caribou Biosciences, i d'Emmanuelle Charpentier, amb CRISPR Therapeutics and ERS Genomics.

Tipus i aplicacions de les eines CRISPR-Cas

Les aplicacions de les eines CRISPR-Cas són gairebé infinites. Es poden fer servir per a inactivar gens; per a eliminar fragments genòmics amb precisió; per a invertir-los, duplicar-los o reorganitzar-los; per a introduir-hi mutacions puntuals, o per a introduir gens nous o qualsevol altra modificació genètica que es vulgui. La inactivació de gens és potser la funció més simple i directa d'aquestes eines CRISPR-Cas, ja que tan sols cal un d'aquests complexos dirigit contra la seqüència diana del genoma que es vol alterar. I això es pot multiplicar només augmentant el nombre de guies d'RNA que es facin servir. La mateixa nucleasa Cas9 s'unirà a cadascuna de les guies i dirigirà la inactivació de cadascun dels gens complementaris. Potser l'exemple més evident d'aquesta capacitat de mutació múltiple es troba en la publicació d'un estudi encaminat a descobrir antídots contra el verí d'una medusa a Austràlia. Els investigadors van inactivar tots els gens de cèl·lules humanes en cultiu (un gen a cada cèl·lula): el verí va matar la majoria de les cèl·lules tret d'aquelles on el gen inactivat inhabilitava l'acció del verí, fet que obria la porta al descobriment dels corresponents antídots [16].

L'ús de dos sistemes CRISPR-Cas en *cis*, sobre la mateixa molècula de DNA, afavoreix que els sistemes de reparació s'equivoquin i uneixin els extrems exteriors, de manera que eliminen les seqüències internes; és a dir, provoquen una deleció. La facilitat amb la qual es poden generar delecions ha servit per a valorar la rellevància funcional dels elements reguladors que controlen l'expressió dels gens [17, 18] o per a eliminar un fragment d'un gen que inclou una mutació, tal com diversos equips van demostrar, amb gran èxit, en un model de ratolí amb distròfia muscular de Duchenne [19].

La inactivació de l'activitat nucleasa de la Cas9 va suposar una innovació tecnològica, ja que es creà la Cas9 morta (dCas9, de l'anglès *dead Cas9*), fet que permet combinar la dCas9 amb activitats promotores o inhibidores de la transcripció, de manera que esdevenen eines de control epigenètic, amb les quals es pot controlar l'activació o la inhibició específica dels gens a voluntat [20].

Les aplicacions terapèutiques també han arribat a través dels editors de bases, una combinació creada per David Liu en què les *nickases* (Cas9 que poden tallar només una de les dues cadenes del DNA) es combinen amb activitats desaminasa, les quals, químicament, poden convertir una A en una G, o una C en una T, i o bé generen una mutació o bé la resolen [21]. Aquestes mateixes activitats desaminasa s'han aprofitat, en combinació amb les eines TALEN, per a possibilitar l'edició del genoma dels mitocondris, un dels pocs llocs on les eines CRISPR-Cas sembla que no funcionen [22].

Una variació dels sistemes CRISPR-Cas que combina una *nickasa* amb una activitat retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, també promoguda per David Liu, ha generat una de les variants CRISPR més precises. En aquest cas, una llarga guia d'RNA serveix per a centrar la nucleasa parcialment inactivada sobre el gen escollit i, també, per a sostenir la síntesi de nou DNA en la cadena complementària, fent servir la mateixa molècula d'RNA guia com a motlle [23]. Realment, són moltes les variants i els tipus d'eines CRISPR-Cas que es poden trobar actualment, cadascuna seleccionada per a una aplicació diferent [24].

Les aplicacions biotecnològiques d'aquestes eines no s'han fet esperar, tant en animals com en plantes. Per exemple, mitjançant CRISPR ha estat possible inactivar el domini d'una proteïna que serveix de porta d'entrada per al virus PRRSV, que

ataca les explotacions ramaderes de porcs i provoca pèrdues greus [25]. O, també, eliminar una gran part dels gens de les gliadines —components del gluten d'alguns cereals— per a generar farines que puguin ser consumides per persones amb la malaltia celíaca [26].

Limitacions de les eines CRISPR-Cas

No tot són aspectes positius amb les eines CRISPR-Cas9. Malgrat que poden fer el tall amb una gran precisió, també poden arribar a tallar seqüències de DNA similars no volgudes, presents en altres indrets del genoma. Per això, s'han desenvolupat nous algoritmes bioinformàtics que permeten reduir aquests efectes al mínim [27]. Altrament, la reparació mitjançant INDEL genera una gran diversitat al·lèlica i provoca que la majoria dels animals editats genèticament, nascuts com a fundadors i establerts amb CRISPR-Cas9, normalment siguin mosaics [17]. Això no representa cap problema en el cas dels models animals (o en plantes), ja que els al·lels que no interessen es poden segregar i descartar mitjançant encreuaments. Però sí que és un problema en els éssers humans, en què òbviament no hi ha aquesta possibilitat de segregació. Per aquest motiu, va ser una greu irresponsabilitat transferir aquesta incertesa, que sabem gestionar en els models animals, a nadons humans —tres nenes que van néixer a la Xina després d'un intent fallit d'inactivar el gen CCR5 per a fer-les resistents al virus VIH, causant de la SIDA. Els investigadors que hi estigueren involucrats van ser condemnats a presó i a pagar una multa i van ser inhabilitats per a treballar mai més en aquests temes.

La majoria de països no permet modificar el genoma de la descendència, però si mai s'aprova aquesta aplicació es farà amb una finalitat terapèutica, no pas amb una intenció de millora, que no deixa de ser un eufemisme de l'eugenèsia. Cal estar molt atents als aspectes ètics associats a l'aplicació d'aquestes eines CRISPR-Cas en salut humana.

Les eines CRISPR-Cas en teràpia gènica

Actualment hi ha aproximadament uns quaranta-sis assaigs clínics que estan experimentant ja estratègies terapèutiques

amb voluntaris humans. La majoria d'aquestes propostes són *ex vivo* (és a dir, s'extreuen les cèl·lules del pacient i, al laboratori, s'editen i seleccionen, abans de retornar-les al pacient). Les propostes *in vivo* estan centrades en malalties de retina, intraoculars, o en alteracions sistèmiques. Els èxits més rotunds han arribat amb les aplicacions *ex vivo*, fonamentalment per al tractament de l'anèmia falciforme i la talassèmia beta, dues malalties greus de la sang que requereixen transfusions de sang constants als pacients que les presenten. Fent servir una estratègia CRISPR-Cas d'inactivació, els investigadors van disminuir fortament l'expressió del gen BCL11A, repressor de la variant fetal de les globines, habitualment inactives en adults, i així van permetre la seva reactivació i la substitució de les unitats de beta-globina mutades. Els primers pacients tractats ja poden viure sense més transfusions [28]. També s'esperen grans èxits de l'aplicació de les eines CRISPR-Cas en la immunoteràpia del càncer, sobretot en tumors molt agressius com el melanoma, el sarcoma i el mieloma [29].

Les eines CRISPR-Cas i la pandèmia COVID-19

Si alguna aplicació il·lustra de manera clara la versatilitat que tenen les eines CRISPR-Cas aquesta és la derivació d'aproximacions diagnòstiques i terapèutiques tant per a detectar com per a lluitar contra el coronavirus SARS-CoV-2, causant de la pandèmia COVID-19.

Les aplicacions diagnòstiques deriven de noves variants CRISPR-Cas descobertes —com la nucleasa Cas13a—, que pot tallar molècules d'RNA guiada per una petita molècula d'RNA, però que quan troba la seqüència complementària perd l'especificitat i talla tots els RNA de la mostra. Aquest resultat inesperat que va trobar Feng Zhang el va convertir ràpidament en una aplicació diagnòstica per a detectar virus o qualsevol altra mutació amb una gran sensibilitat. La tècnica es va batejar amb l'acrònim SHERLOCK [30] i, tan bon punt es va conèixer la pandèmia i l'agent causal, el laboratori de F. Zhang va desenvolupar diverses aproximacions per a diagnosticar la presència del coronavirus fent servir Cas13a, que finalment va ser aprovada per la Food and Drug Administration (FDA) [31]. La investigadora Jennifer Doudna va descobrir propietats similars en una nucleasa anàloga —la Cas12a—, i també en va

derivar una aplicació diagnòstica [32]. És certament remarcable que la premiada J. Doudna hagi reconvertit l'ús de la Cas13a per desenvolupar una aplicació diagnòstica de COVID-19 que fa servir la càmera fotogràfica d'un telèfon mòbil per a captar la fluorescència indicativa d'estar infectat amb el coronavirus [33].

Més enllà de les activitats diagnòstiques, els sistemes CRISPR-Cas també es poden fer servir com a antivirals —particularment, utilitzant la nucleasa Cas13d, que permet digerir molècules d'RNA (com el genoma del coronavirus SARS-CoV-2 o del virus de la grip) i inhibir-ne la replicació, provat en models cel·lulars [34]. Una aproximació semblant s'ha provat amb la nucleasa Cas13a *in vivo* (en què no sembla manifestar la pèrdua d'especificitat) en ratolins i hámsters [35]. Totes aquestes aplicacions COVID-19, i moltes més que han aparegut, donen idea de la capacitat plàstica de les eines CRISPR-Cas9, ja que poden adaptar-se a qualsevol repte mentre hi estiguin implicades molècules de DNA o d'RNA.

Conclusions

Les investigadores Charpentier i Doudna van ser les primeres a adonar-se de la potencialitat que tenien els sistemes CRISPR-Cas bacterians i van proposar, sense poder demostrar-ho en aquells moments, que aquestes eines, fora de context, podrien emprar-se per a editar qualsevol gen de qualsevol organisme. Aquell article va aparèixer l'estiu del 2012. Al cap de pocs mesos, altres investigadors van constatar la certesa de la proposta i, vuit anys després, Charpentier i Doudna recollien merescudament el Premi Nobel de Química a Suècia.

Referències

- [1] FERNÁNDEZ, A.; JOSA, S.; MONTOLIU, L. «A history of genome editing in mammals». *Mammalian Genome. Official Journal of the International Mammalian Genome Society* [en línia], 28 (7-8) (2017), p. 237-246. <<https://doi.org/10.1007/s00335-017-9699-2>>.
- [2] JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. (2012). «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 337 (6096) (2012), p. 816-821. <<https://doi.org/10.1126/science.1225829>>.
- [3] CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. «Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 339 (6121) (2013), p. 819-823. <<https://doi.org/10.1126/science.1231143>>.
- [4] MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K. M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; CHURCH, G. M. «RNA-guided human genome engineering via Cas9». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 339 (6121) (2013), p. 823-826. <<https://doi.org/10.1126/science.1232033>>.
- [5] DELTCHEVA, E.; CHYLINSKI, K.; SHARMA, C. M.; GONZALES, K.; CHAO, Y.; PIRZADA, Z. A.; ECKERT, M. R.; VOGEL, J.; CHARPENTIER, E. (2011). «CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III». *Nature* [en línia], 471 (7340) (2011), p. 602-607. <<https://doi.org/10.1038/nature09886>>.
- [6] HAURWITZ, R. E.; JINEK, M.; WIEDENHEFT, B.; ZHOU, K.; DOUDNA, J. A. «Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 329 (5997) (2010), p. 1355-1358. <<https://doi.org/10.1126/science.1192272>>.
- [7] JOSA, S.; SERUGGIA, D.; FERNÁNDEZ, A.; MONTOLIU, L. «Concepts and tools for gene editing». *Reproduction, Fertility, and Development* [en línia], 29 (1) (2016), p. 1-7. <<https://doi.org/10.1071/RD16396>>.
- [8] DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. (2014). «Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 346 (6213) (2014), p. 1258096. <<https://doi.org/10.1126/science.1258096>>.
- [9] SERUGGIA, D.; MONTOLIU, L. «The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals». *Transgenic Research* [en línia], 23 (5) (2014), p. 707-716. <<https://doi.org/10.1007/s11248-014-9823-y>>.
- [10] MOJICA, F. J.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. «Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites». *Molecular Microbiology* [en línia], 9 (3) (1993), p. 613-621. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>>.
- [11] JANSEN, R.; EMBDEN, J. D.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L. M. «Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes». *Molecular Microbiology* [en línia], 43 (6) (2002), p. 1565-1575. <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>>.
- [12] MOJICA, F. J.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. «Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements». *Journal of Mo-*

Molecular Evolution [en línia], 60 (2) (2005), p. 174–182.

<<https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>>.

[13] MOJICA, F.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. «Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system». *Microbiology* [en línia] [Reading, Anglaterra], 155 (Pt 3) (2009), p. 733–740. <<https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>>.

[14] MOJICA, F.; MONTOLIU, L. «On the origin of CRISPR–Cas technology: From prokaryotes to mammals». *Trends in Microbiology* [en línia], 24 (10) (2016), p. 811–820. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>>.

[15] GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. «Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línia], 109 (39) (2012), p. E2579–E2586. <<https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>>.

[16] LAU, M. T.; MANION, J.; LITTLEBOY, J. B.; OYSTON, L.; KHUONG, T. M.; WANG, Q. P.; NGUYEN, D. T.; HESSELSON, D.; SEYMOUR, J. E.; NEELY, G. G. «Molecular dissection of box jellyfish venom cytotoxicity highlights an effective venom antidote». *Nature Communications* [en línia], 10 (1) (2019), p. 1655. <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09681-1>>.

[17] 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 Research* [en línia], 43 (10) (2015), p. 4855–4867. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkv375>>.

[18] SERUGGIA, D.; FERNÁNDEZ, A.; CANTERO, M.; FERNÁNDEZ-MIÑÁN, A.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L.; PELCZAR, P.; MONTOLIU, L. «Boundary sequences flanking the mouse tyrosinase locus ensure faithful pattern of gene expression». *Scientific Reports* [en línia], 10 (1) (2020), p. 15494. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72543-0>>.

[19] NELSON, C. E.; HAKIM, C. H.; OUSTEROUT, D. G.; THAKORE, P. I.; MOREB, E. A.; CASTELLANOS RIVERA, R. M.; MADHAVAN, S.; PAN, X.; RAN, F. A.; YAN, W. X.; ASOKAN, A.; ZHANG, F.; DUAN, D.; GERSBACH, C. A. «In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 351 (6271) (2016), p. 403–407. <<https://doi.org/10.1126/science.aad5143>>.

[20] NUÑEZ, J. K.; CHEN, J.; POMMIER, G. C.; COGAN, J. Z.; REPLOGLE, J. M.; ADRIAENS, C.; RAMADOSS, G. N.; SHI, Q.; HUNG, K. L.; SAMELSON, A. J.; POGSON, A. N.; KIM, J.; CHUNG, A.; LEONETTI, M. D.; CHANG, H. Y.; KAMPMANN, M.; BERNSTEIN, B. E.; HOVESTADT, V.; GILBERT, L. A.; WEISSMAN, J. S. «Genome-wide programmable transcriptional

memory by CRISPR-based epigenome editing». *Cell* [en línia], 184 (9) (2021), p. 2503–2519.e17. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.025>>.

[21] KOMOR, A. C.; KIM, Y. B.; PACKER, M. S.; ZURIS, J. A.; LIU, D. R. «Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage». *Nature* [en línia], 533 (7603) (2016), p. 420–424. <<https://doi.org/10.1038/nature17946>>.

[22] MOK, B. Y.; MORAES, M. H. de; ZENG, J.; BOSCH, D. E.; KOTRYS, A. V.; RAGURAM, A.; HSU, F.; RADEY, M. C.; PETERSON, S. B.; MOOHTA, V. K.; MOUGOUS, J. D.; LIU, D. R. «A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing». *Nature* [en línia], 583 (7817) (2020), p. 631–637. <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2477-4>>.

[23] ANZALONE, A. V.; RANDOLPH, P. B.; DAVIS, J. R.; SOUSA, A. A.; KOBLAN, L. W.; LEVY, J. M.; CHEN, P. J.; WILSON, C.; NEWBY, G. A.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. «Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA». *Nature* [en línia], 576 (7785) (2019), p. 149–157. <<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>>.

[24] ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. «Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors». *Nature Biotechnology* [en línia], 38 (7) (2020), p. 824–844. <<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>>.

[25] BURKARD, C.; LILICO, S. G.; REID, E.; JACKSON, B.; MILEHAM, A. J.; AIT-ALI, T.; WHITELAW, C. B.; ARCHIBALD, A. L. «Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function». *PLoS Pathogens* [en línia], 13 (2) (2017), p. e1006206. <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006206>>.

[26] SÁNCHEZ-LEÓN, S.; GIL-HUMANES, J.; OZUNA, C. V.; GIMÉNEZ, M. J.; SOUSA, C.; VOYTAS, D. F.; BARRO, F. «Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9». *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 16 (4) (2018), p. 902–910. <<https://doi.org/10.1111/pbi.12837>>.

[27] OLIVEROS, J. C.; 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 Research* [en línia], 44 (W1) (2016), p. W267–W271. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>>.

[28] FRANGOUL, H.; ALTSHULER, D.; CAPPELLINI, M. D.; CHEN, Y. S.; DOMM, J.; EUSTACE, B. K.; FOELL, J.; FUENTE, J. DE LA; GRUPP, S.; HANDGRETINGER, R.; HO, T. W.; KATTAMIS, A.; KERNYSKY, A.; LEKSTROM-HIMES, J.; LI, A. M.; LOCATELLI, F.; MAPARA, M. Y.; MONTALEMBERT, M. de; RONDELLI, D.; SHARMA, A.; SHETH, S.; SONI, S.; STEINBERG, M. H.; WALL, D.;

- YEN, A.; CORBACIOGLU, S. «CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia». *The New England Journal of Medicine* [en línia], 384 (3) (2021), p. 252-260. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>>.
- [29] STADTMAUER, E. A.; FRAIETTA, J. A.; DAVIS, M. M.; COHEN, A. D.; WEBER, K. L.; LANCASTER, E.; MANGAN, P. A.; KULIKOVSKAYA, I.; GUPTA, M.; CHEN, F.; TIAN, L.; GONZALEZ, V. E.; XU, J.; JUNG, I. Y.; MELENHORST, J. J.; PLESA, G.; SHEA, J.; MATLAWSKI, T.; CERVINI, A.; GAYMON, A. L.; DESJARDINS, S.; LAMONTAGNE, A.; SALAS-MCKEE, J.; FESNAK, A.; SIEGEL, D. L.; LEVINE, B. L.; JADLOWSKY, J. K.; YOUNG, R. M.; CHEW, A.; HWANG, W.-T.; HEXNER, E. O.; CARRENO, B. M.; NOBLES, C. L.; BUSHMAN, F. D.; PARKER, K. R.; QI, Y.; SATPATHY, A. T.; CHANG, H. Y.; ZHAO, Y.; LACEY, S. F.; JUNE, C. H. «CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 367 (6481) (2020), p. eaba7365. <<https://doi.org/10.1126/science.aba7365>>.
- [30] GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; LEE, J. W.; ESSLETZBICHLER, P.; DY, A. J.; JOUNG, J.; VERDINE, V.; DONGHIA, N.; DARINGER, N. M.; FREJE, C. A.; MYHRVOLD, C.; BHATTACHARYYA, R. P.; LIVNY, J.; REGEV, A.; KOONIN, E. V.; HUNG, D. T.; SABETI, P. C.; COLLINS, J. J.; ZHANG, F. «Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2». *Science* [en línia] [Nova York, NY], 356 (6336) (2017), p. 438-442. <<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>>.
- [31] PATCHSUNG, M.; JANTARUG, K.; PATTAMA, A.; APHICHO, K.; SURARITDECHACHAI, S.; MEESAWAT, P.; SAPPAKHAW, K.; LEELAHAKORN, N.; RUENKAM, T.; WONGSATIT, T.; ATHIPANYASILP, N.; EIAMTHONG, B.; LAKKANASIRORAT, B.; PHOODOKMAI, T.; NILJANSKUL, N.; PAKOTIPRAPHA, D.; CHANARAT, S.; HOMCHAN, A.; TINIKUL, R.; KAMUTIRA, P.; PHIWKAOW, K.; SOITHONGCHAROEN, S.; KANTIWIYAWANITCH, C.; PONGSUPASA, V.; TRISRIVIRAT, D.; JAROENSUK, J.; WONGNATE, T.; MAENPUEN, S.; CHAIYEN, P.; KAMNERDNAKTA, S.; SWANGSRI, J.; CHUTHAPISITH, S.; SIRIVATANAUKSORN, Y.; CHAIMAYO, C.; SUTTHENT, R.; KANTAKAMALAKUL, W.; JOUNG, J.; LADHA, A.; JIN, X.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; ZHANG, F.; HORTHONGKHAM, N.; UTTAMAPINANT, C. «Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA». *Nature Biomedical Engineering* [en línia], 4 (12) (2020), p. 1140-1149. <<https://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>>.
- [32] BROUGHTON, J. P.; DENG, X.; YU, G.; FASCHING, C. L.; SERVELLITA, V.; SINGH, J.; MIAO, X.; STREITHORST, J. A.; GRANADOS, A.; SOTOMAYOR-GONZALEZ, A.; ZORN, K.; GOPEZ, A.; HSU, E.; GU, W.; MILLER, S.; PAN, C. Y.; GUEVARA, H.; WADFORD, D. A.; CHEN, J. S.; CHIU, C. Y. «CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2». *Nature Biotechnology* [en línia], 38 (7) (2020), p. 870-874. <<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>>.
- [33] FOZOUNI, P.; SON, S.; DÍAZ DE LEÓN DERBY, M.; KNOTT, G. J.; GRAY, C. N.; D'AMBROSIO, M. V.; ZHAO, C.; SWITZ, N. A.; KUMAR, G. R.; STEPHENS, S. I.; BOEHM, D.; TSOU, C. L.; SHU, J.; BHUIYA, A.; ARMSTRONG, M.; HARRIS, A. R.; CHEN, P. Y.; OSTERLOH, J. M.; MEYER-FRANKE, A.; JOEHNK, B.; WALCOTT, K.; SIL, A.; LANGELIER, C.; POLLARD, K. S.; CRAWFORD, E. D.; PUSCHNIK, A. S.; PHELPS, M.; KISTLER, A.; DERISI, J. L.; DOUDNA, J. A.; FLETCHER, D. A.; OTT, M. «Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy». *Cell* [en línia], 184 (2) (2021), p. 323-333.e9. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.001>>.
- [34] ABBOTT, T. R.; DHAMDHERE, G.; LIU, Y.; LIN, X.; GOUDY, L.; ZENG, L.; CHEMPARATHY, A.; CHMURA, S.; HEATON, N. S.; DEBS, R.; PANDE, T.; ENDY, D.; LA RUSSA, M. F.; LEWIS, D. B.; QI, L. S. «Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza». *Cell* [en línia], 181 (4) (2020), p. 865-876.e12. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.020>>.
- [35] BLANCHARD, E. L.; VANOVER, D.; BAWAGE, S. S.; TIWARI, P. M.; ROTOLO, L.; BEYERSDORF, J.; PECK, H. E.; BRUNO, N. C.; HINCAPIE, R.; MICHEL, F.; MURRAY, J.; SADHWANI, H.; VANDERHEYDEN, B.; FINN, M. G.; BRINTON, M. A.; LAFONTAINE, E. R.; HOGAN, R. J.; ZURLA, C.; SANTANGELO, P. J. «Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents». *Nature Biotechnology* [en línia], 39 (6) (2021), p. 717-726. <<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00822-w>>.



L. Montoliu

Lluís Montoliu (Barcelona, 1963) és llicenciat (1986) i doctor (1990) en ciències biològiques per la Universitat de Barcelona. Actualment és investigador científic del CSIC al Centro Nacional de Biotecnología (CNB) a Madrid, des del 1997. Anteriorment va treballar a Heidelberg (Alemanya) (1991-1995) i a la Universitat Autònoma de Barcelona (1995-1996). També és investigador i membre del Consell Directiu del CIBERER (CIBER de Enfermedades Raras, de l'Institut de Salut Carlos III, ISCIII), president del Comitè d'Ètica del CSIC i director del node espanyol de la plataforma europea EMMA/Infrafrontier (Arxiu Europeu de Ratolins Mutants). Al CNB lidera el seu laboratori sobre models animals de malalties, centrat en l'estudi de l'albinisme. Va ser pioner en la introducció de les eines CRISPR a Espanya en animals. Presideix dues societats internacionals científiques —la European Society for Pigment Cell Research (ESPCR) i l'Association for Responsible Research and Innovation in Genome Editing (ARRIGE)— i és membre de les juntes directives d'altres societats nacionals —la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), la Sociedad Española de Genética (SEG)— i internacionals —la International Federation of Pigment Cell Societies (IFPCS). Més enllà de la recerca i l'ètica, li interessa molt la divulgació de la ciència.