



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
CRISPR, MÁS ALLÁ DE LA EDICIÓN
GENÓMICA

Autor: Andrea Pérez Matesanz

Fecha: Junio del 2019

Tutor: Elvira Román González

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN	3
3	OBJETIVOS.....	6
4	MATERIAL Y MÉTODOS	6
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
5.1	Tipos de sistema CRISPR y funcionamiento	6
5.2	Aplicaciones del sistema CRISPR en las que no interviene la edición genómica.	9
5.2.1	Regulación de la expresión genética	9
A.	Represión.....	9
B.	Activacion	12
C.	Mejoras en la regulación	14
5.2.2	Otras aplicaciones en las que no interviene la edición genómica:	17
6	CONCLUSIONES	18
7	BIBLIOGRAFÍA.....	19

1 RESUMEN

El sistema CRISPR se encuentra en la naturaleza desde los inicios de la vida en la Tierra, formando parte del sistema inmunitario de bacterias y arqueas; aunque actualmente su uso principal se centra en la edición genómica.

Con el paso del tiempo y la búsqueda de nuevos hallazgos, el sistema CRISPR comienza a usarse como herramienta en procesos en los que la edición genómica no está implicada. A lo largo del trabajo se realizó una revisión bibliográfica acerca de estas aplicaciones no relacionadas con la modificación del genoma obteniendo como resultado el uso de 3 aplicaciones principales: la regulación de genes, la visualización del genoma y la purificación de locus de interés. En las tres aplicaciones vistas se observó como el sistema CRISPR conforma la herramienta base gracias al uso de la endonucleasa Cas9 desactivada (dCas9).

El trabajo se centró en mayor medida en la regulación de la transcripción génica, observando las diferencias de su uso en procariontes y eucariotes, y viendo como la puesta en práctica en éstos últimos requiere la ayuda de dominios de activación o represión, según corresponda, además del propio sistema CRISPR. También se vio como son necesarias mejoras en las técnicas de regulación, como pueden ser Scaffold RNA, SunTag o SAM, para conseguir procesos de regulación más complejos, con mayor rendimiento y precisión.

Palabras clave: CRISPR/Cas9, aplicaciones de no edición, regulación génica

2 INTRODUCCIÓN

La ingeniería genómica ha revolucionado el mundo de la ciencia desde sus inicios, pero la edición en puntos específicos del genoma sigue teniendo grandes dificultades hoy en día. En el desarrollo de este campo, podemos destacar dos sistemas: ZFN o TALEN.

Las nucleasas de dedos de Zinc (ZFN) consisten en módulos de unión al DNA derivados de factores de transcripción naturales, y que se encuentran unidos al dominio nucleasa de la enzima FokI. Cada unidad de ZFN se encuentra formada por 3 dedos de zinc o módulos, los cuales se unen al DNA a través de 3 pares de bases cada uno. Por tanto cada sistema ZFN comprende 3 dedos de Zn, un dominio nucleasa (encargado de producir el corte) y un conector entre ambas partes (1). Este sistema tiene la peculiaridad de que el dominio nucleasa debe dimerizarse para poder ejercer el corte en ambas hebras del DNA, por lo que dos moléculas de ZFN son necesarias para poder actuar en el sitio diana (2). La mezcla y combinación de los distintos módulos permite dirigir el sistema hacia diferentes zonas del DNA.

Por su parte, las nucleasas tipo activador de transcripción (TALEN) emplean módulos de unión al DNA, derivados de factores de transcripción bacterianos, unidos también al dominio nucleasa de FokI (2). Estos módulos de unión consisten en aminoácidos, y por cada unidad de TALEN podemos encontrar alrededor de 30 aminoácidos. La característica que comparten con ZFN es la necesidad de formar un dímero del dominio de nucleasa para poder producir el corte en el sitio diana (2). Pero a diferencia de ZFN, en TALEN cada módulo se une a un solo nucleótido, lo cual aporta mayor flexibilidad al sistema a la hora de establecer el sitio de unión al DNA.

Las últimas décadas han sido clave en los avances de esta rama, ya que surge el descubrimiento del sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). El sistema CRISPR se basa en la utilización de un fragmento de RNA homólogo a un locus determinado, lo cual permite que la endonucleasa a la que se encuentra unido sea dirigida a dicho sitio específico y produzca un corte en ambas hebras del DNA. Al igual que las técnicas usadas anteriormente con el objetivo de editar un sitio específico en el genoma (ZFNs y TALENs), el sistema CRISPR emplea la reparación homóloga directa (HDR), pero presenta la diferencia de utilizar la guía de RNA (Figura 1), lo cual le aporta mayor precisión y por tanto menor gasto

económico y de tiempo (3). Además, en contraste con ZFNs yTALENs, los cuales requieren la creación de nuevo de las proteínas cada vez que se cambia el sitio diana a modificar, el sistema CRISPR únicamente requiere el cambio de secuencia de la guía de RNA (4).

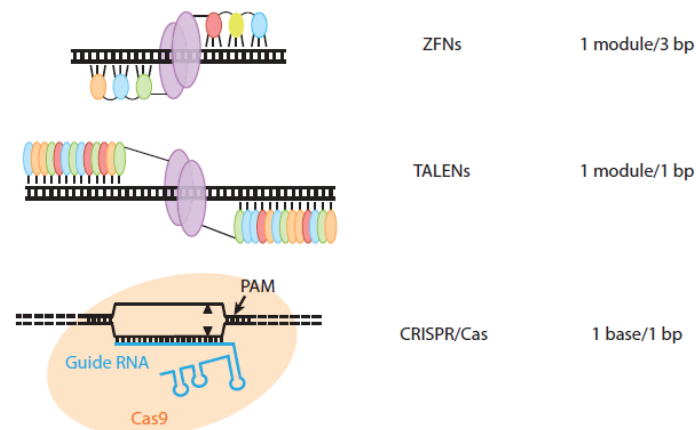


Figura 1. Ilustración de los principales sistemas utilizados en ingeniería genómica (Imagen obtenida de D.Carrol, 2014).

Aunque actualmente vemos como el sistema CRISPR sufre un desarrollo exponencial desde su descubrimiento, realmente dicho sistema forma parte de la naturaleza desde tiempos ancestrales. Hoy en día se conoce que dicho sistema interviene en la inmunidad de bacterias y arqueas, y a través de él son capaces de reconocer agentes adversos y destruirlos (3). Por tanto, la importancia del sistema CRISPR reside en la posibilidad de utilizar un sistema originario de procariontes en humanos, y además, con una finalidad totalmente distinta a la originaria: localizar proteínas en lugares específicos del genoma a través de RNA.

Para poder comprender como ha sido el desarrollo vertiginoso de este sistema, debemos remontarnos a sus inicios. El sistema CRISPR se descubre por primera vez en 1987 en el genoma de *Escherichia coli* por un grupo de investigadores japoneses mientras estudiaban la enzima *iap* (5). En este primer descubrimiento se observa la presencia de secuencias repetitivas en el genoma de *E.coli*. De forma paralela, el investigador español Francisco Mojica observa una estructura muy especial en un fragmento de DNA de la arquea *Haloferax mediterranei*: múltiples copias de una secuencia repetida de pequeño tamaño, prácticamente palindrómica, separadas por secuencias espaciadoras. Mojica y su equipo observaron que dicha estructura se encontraba en más del 40% de las bacterias secuenciadas y en el 90% de las arqueas (6). Inicialmente se le dio el nombre de SRSRs (*Short Regularly Spaced Repeats*), el cual posteriormente se cambiaría a CRISPR en 2002. En este mismo año se descubren múltiples grupos de genes asociados a CRISPR (genes *cas*) al lado de las secuencias repetitivas (7), dando lugar a la base para la clasificación del sistema CRISPR en tres tipos principales (I-III).

En 2005, el científico Alexander Bolotin estudiando el genoma de *Streptococcus thermophilus* (8) observa un locus inusual de CRISPR. Se trata de un fragmento de CRISPR que presenta nuevos genes *cas*, incluyendo genes codificantes para una proteína que predijo que tendría actividad nucleasa (9,10). Hoy en día dicha proteína es conocida como Cas9. Más allá de este hecho, también observó la presencia de una secuencia común a todos los espaciadores en su final (9,10). Esta secuencia, denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM) hoy en día sabemos que es necesaria para el reconocimiento del sitio diana y el anclaje de Cas9 que producirá el corte.

En 2003, Mojica extrajo cada secuencia espaciadora de distintas bacterias con las que había estado trabajando, y las introdujo en un programa que buscaba similitud con otras secuencias

de DNA conocidas. El resultado dio un giro a los conocimientos sobre la funcionalidad de CRISPR, ya que se elucidó semejanza entre las secuencias espaciadoras y secuencias pertenecientes a fagos invasores de *E.coli*. Lo más llamativo fue que la línea de *E.coli* en la que fueron encontradas estas secuencias pertenecientes al fago P1, era resistente a dicho fago. De manera que Mojica concluyó que los fragmentos de CRISPR podrían codificar instrucciones para un sistema inmune adaptativo que protegiese a los microorganismos frente a infecciones específicas (9,10). Pero no sería hasta 4 años después que se confirmase esta hipótesis, cuando el científico francés Horvath y su equipo (11) demuestran experimentalmente la función de inmunidad adaptativa de CRISPR, donde le confieren inmunidad a *S.thermophilus* frente a un nuevo fago gracias a la introducción de éste en el array de CRISPR (9).

A partir de este descubrimiento, los científicos comienzan a investigar los detalles de como el sistema CRISPR interfiere con los organismos invasores, centrándose en el sistema CRISPR tipo II. A partir de aquí el desarrollo de los conocimientos sobre el sistema CRISPR es vertiginoso. John van der Oost muestra en 2008 (12) que las secuencias espaciadoras en *E.coli*, las cuales derivaban de fagos, eran transcritas a pequeños fragmentos de RNA denominados CRISPR RNAs (crRNA), los cuales guiaban a las proteínas Cas hasta el DNA diana (9).

Posteriormente se descubre que CRISPR/Cas9 produce cortes de doble hebra en el DNA diana en una posición precisa: 3 nucleótidos corriente arriba de PAM. Además se confirma que Cas9 es la única proteína requerida para producir el corte en el sistema CRISPR/Cas9 (9).

Un hecho clave que termina de reconstruir el mecanismo de acción natural del sistema CRISPR/Cas9 se observa por parte del grupo de investigadores de Emmanuelle Charpentier (13). Descubren en *Streptococcus pyogenes* un segundo fragmento pequeño de RNA además del crRNA, el cual llamaron trans-activador CRISPR RNA (tracrRNA). También demostraron que tracrRNA forma un duplex con crRNA, el cual guía a Cas9 al sitio diana. En el mismo año, otro grupo de investigadores demuestra experimentalmente que el sistema CRISPR puede funcionar de forma heteróloga en otras especies, y además a través de este experimento verifican que todos los componentes del sistema tipo II ya eran conocidos (9).

Finalmente, uno de los últimos puntos clave de la historia de CRISPR se produce en 2012, cuando Charpentier en colaboración con Jennifer Doudna (14) expresan que crRNA y tracrRNA pueden ser fusionados para dar lugar a una guía sintética que simplificaría el sistema. La fusión de ambos componentes daría lugar al concepto de guía sencilla de RNA (sgRNA), el cual rápidamente comenzaría a usarse en edición genómica tras diversas modificaciones para mejorar su eficiencia in vivo (9). Por tanto, es importante recalcar que la guía de RNA (sgRNA) se trata de una fusión sintética de crRNA y tracrRNA, y que por consiguiente, no existe en la naturaleza como tal.

Gracias a los hechos históricos descritos anteriormente, hoy en día podemos formar el puzzle completo acerca de la función original del sistema CRISPR como parte del sistema inmune en procariontes. Enlazando todas las piezas, podemos decir que la inmunidad adaptativa mediante CRISPR ocurría en 3 fases:

- a) Adaptación: introducción en forma de secuencia espaciadora de una pequeña parte de DNA del agente invasor en el fragmento de CRISPR.
- b) Expresión: maduración del pre-crRNA a crRNAs individuales, compuestos por una porción de repeticiones y la secuencia diana espaciadora.

- c) Interferencia: Rotura del material genético exógeno por parte de las proteínas Cas al ser guiadas hasta los nucleótidos complementarios a la secuencia espaciadora del crRNA (4).

Aunque el sistema CRISPR como parte del sistema inmune adaptativo de procariontes parece una herramienta invencible, no es así. En experimentos iniciales con *S. thermophilus*, se vio como tras la infección con diversos fagos uno de ellos fue capaz de producir mutaciones en una de las regiones espaciadoras, y por consiguiente evitar que las nucleasas Cas consiguiesen reidentificarlo. A través de este mecanismo, el fago había conseguido evadir el proceso de inmunidad llevado a cabo por el sistema CRISPR. A partir de este experimento se intentó caracterizar los genes responsables de este hecho, pero no es hasta 2013 cuando un estudio encuentra 5 genes “anti-CRISPR” en bacteriófagos que estaban invadiendo *Pseudomonas aeruginosa*. La base del mecanismo que utilizan estos genes “anti-CRISPR” es evitar la unión del complejo CRISPR/Cas al DNA. Posteriormente se vio que estos genes solo eran capaces de evadir un subtipo de sistema CRISPR (3).

Actualmente la utilización del sistema CRISPR como herramienta de edición genómica para la curación de enfermedades genéticas se encuentra en alza, pero poco a poco se empiezan a vislumbrar también las utilidades de dicho sistema que no implican edición genómica, es decir, que no se basan en la alteración de la secuencia del ADN. Éstas últimas, como son la regulación de la expresión de genes (represión y activación), la visualización de loci de interés o la purificación de locus específicos formarán el tema central del presente trabajo.

Por tanto, se pondrá de manifiesto las aplicaciones de no edición de CRISPR, las cuales aunque actualmente se encuentran en un segundo plano, dan forma a las nuevas fronteras de la ingeniería genómica con CRISPR.

3 OBJETIVOS

El principal objetivo del trabajo presente es poner en relieve, mediante una revisión bibliográfica, las aplicaciones de CRISPR más allá de la edición genómica. A través de la revisión bibliográfica se pretende identificar cuales son las aplicaciones más desarrolladas hasta el momento, describiendo su funcionamiento, logros y posibles mejoras.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica a través de la búsqueda en revistas científicas como *Science*, *Cell*, *Nature*; y bases de datos como *PubMed*.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Tipos de sistema CRISPR y funcionamiento

El sistema CRISPR se subdivide en 2 clases: clase 1 formada por varias subunidades de proteínas cas; y clase 2, en la cual nos encontramos una única proteína efectora. Dentro de las dos clases, encontramos hasta 6 tipos en los que podemos clasificarlo y 19 subtipos (15). Pero a la hora de clasificar el sistema CRISPR nos centraremos en los 3 tipos principales: tipo I, II y III (Tabla 1).

Dentro de la clase 2 el más conocido y utilizado es el tipo II: sistema CRISPR/Cas9 procedente de *S. pyogenes* (16), en el cual se centrará el presente trabajo de aquí en adelante.

Clases	Tipos	Complejo efector	Características		Usos
Clase 1	Tipo I	Cascada, Cas 3	Presente en bacterias y arqueas.	Cascada se une a crRNA y procesa crRNA. Cas 3 degrada secuencia diana.	Defensa antiviral, regulación de genes, agente antimicrobiano, terapia génica, silenciamiento genético.
	Tipo III	Cmr/Csm	Complejo efector formado por 4-7 proteínas Cas	Puede producir la rotura de DNA (Csm) o RNA (Cmr). Complejo similar a casada. No detecta PAMs	
Clase 2	Tipo II	Cas9	Clase 2: Presente principalmente en bacterias. Complejo efector formado por una única proteína con múltiples dominios Tipo II: Cas9 participa en el procesamiento de crRNA, y rompe DNA diana ayudada por crRNA y tracrRNA.		

Tabla 1. Clasificación de los principales tipos de sistema CRISPR (17). La Clase 1 se considera el sistema ancestral de CRISPR, a partir del cual ha ido evolucionando hasta Clase 2 (18). La aplicación inicial del sistema CRISPR se basaba en la defensa antiviral, pero se han ido demostrando otros usos principalmente como herramienta genética en células eucariotas gracias al desarrollo de sgRNA (tipo II) (17). También destaca la regulación genética, principalmente el silenciamiento llevado a cabo por Cascade y dCas9 (Cas9 nucleasa deficiente).

En cuanto al funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9, de forma resumida podemos decir que se basa en la utilización de una endonucleasa no específica, cuya misión es la rotura del DNA, y un pequeño fragmento de RNA que constituye la guía de dicha endonucleasa para que actúe en el sitio diana del DNA (3).

El sistema CRISPR nativo necesitaba de una serie de proteínas para producir daños en el DNA exógeno, pero actualmente, su aplicación en la edición genómica únicamente necesita de la utilización de una única proteína: la endonucleasa Cas9 o una variante suya. Dicha proteína cumple las funciones de unión a la guía de RNA, unión al DNA diana y rotura de la doble hebra de DNA en dicho sitio (3).

Por un lado, la guía de RNA permite que la endonucleasa corte en un locus específico gracias a la teoría de complementariedad de bases de Watson y Crick (3). Para ello, la endonucleasa es guiada hasta su sitio de acción mediante la ayuda de dos fragmentos de RNA: crRNA (fragmento de RNA que contiene la secuencia homóloga al sitio diana del DNA) y tracrRNA (fragmento de RNA que conforma el andamio que mantiene unidos a crRNA y a la endonucleasa) (3,4). En el genoma bacteriano, CRISPR consistía en fragmentos repetitivos de material genético separados por secuencias únicas denominadas espaciadores. Actualmente sabemos que las secuencias repetitivas contienen la información necesaria para el procesamiento del pre-crRNA a crRNA maduro, y su posterior unión al tracrRNA. Por su parte, las secuencias espaciadoras contienen información genética del DNA exógeno, conformando así la secuencia complementaria a la secuencia diana de cada crRNA. Por tanto, la región de repeticiones junto al tracrRNA formarían el andamio de la gRNA, y la región espaciadora daría lugar a la secuencia homóloga a la diana (4). Actualmente, gracias al descubrimiento de Charpentier y Doudna, ambos fragmentos de RNA se consideran un solo complejo sintético dando lugar a la sgRNA.

Por otro lado, la unión de la endonucleasa al sitio diana del DNA está mediada tanto por la guía de RNA, como por la presencia de una secuencia de 3 pares de bases (conocida como PAM) corriente abajo al sitio diana. En el caso de *S. pyogenes* la secuencia PAM se encuentra formada por NGG. Diferentes Cas9 utilizadas actualmente también presentan diferentes requerimientos de PAM, lo cual permite poder cortar en diferentes locus de interés. Además, hay que tener en

cuenta que tanto sin la guía de RNA como sin el PAM, la endonucleasa no es capaz ni de unirse ni de cortar en el sitio diana del DNA (3).

Finalmente, el resultado es un corte en ambas hebras de DNA en el sitio diana, el cual se encontraba 3-4 nucleótidos corriente arriba de la secuencia PAM. Hay que especificar que Cas9 se encuentra formada por dos dominios nucleasa: HNH y RuvC, cada uno con una función. El dominio HNH se encarga de producir el corte en la hebra de DNA complementaria a la guía de RNA; mientras que el dominio RuvC produce el corte en la hebra opuesta de la complementaria (4).

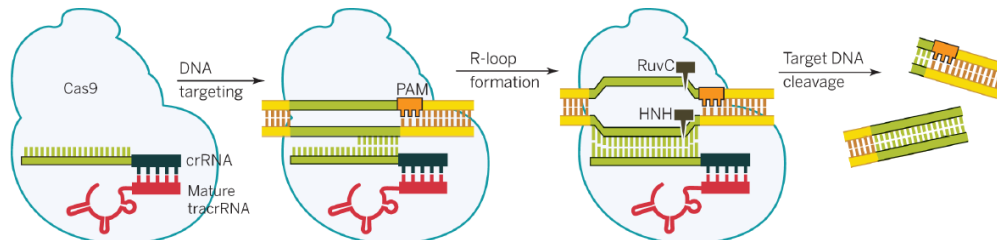


Figura 2. Esquema del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 (imagen obtenida de JA.Doudna, E.Charpentier, 2014).

La base de este proceso inmunitario se aplica en el uso de la tecnología de CRISPR para la edición genómica (Figura 2). Desde el punto de vista tecnológico, el proceso comienza con el diseño de la sgRNA con el objetivo de que sea complementaria alrededor de 20 pares de bases a la secuencia diana donde se encuentra el gen de interés, todo ello sin olvidar la presencia de la secuencia PAM. En función de la aplicación que estemos buscando y del tipo de organismo o célula a editar, el modo de liberación del complejo formado entre la guía de RNA y la proteína Cas9 puede ser muy diferente: transfección con lentivirus, transfección con plásmidos, inyección directa de DNA o RNA, transfección con ribonucleoproteínas... Una vez que la maquinaria de CRISPR llega al núcleo, la proteína Cas produce un corte en ambas hebras de DNA en el locus de interés. Esta ruptura de DNA pone en marcha los mecanismos de reparación endógena basados en la unión de extremos no homólogos o recombinación no homóloga. La recombinación no homóloga da lugar a pequeñas inserciones o deleciones (indels), lo cual provoca la alteración del marco de lectura y por tanto, la inactivación de los genes. A través de este mecanismo, la edición genómica presentaría una eficiencia de un 80% (dependiendo siempre de la forma de liberación del sistema CRISPR) y daría lugar a una población heterogénea tanto en el genotipo como en el número de células editadas.

De forma paralela, el genoma puede ser editado de manera más específica a través de la reparación homóloga directa. Para ello, es necesario la introducción de un donante de DNA junto al complejo gRNA/Cas9, de manera que la ruptura de la doble hebra es reparada mediante el patrón de DNA donado. Se ha visto que la eficiencia de este proceso es mucho menor que la recombinación no homóloga (19).

Continuando con la especificidad del sistema, se ha visto que esta comienza con un diseño adecuado de la guía de RNA, ya que el sistema CRISPR se considera más o menos específico en función de la capacidad de unión que tiene la guía a la secuencia diana respecto al resto del genoma. Un funcionamiento ideal sería aquel en el cual la guía de RNA únicamente presentase homología con la secuencia diana. Esta situación es muy difícil que ocurra, ya que siempre existe cierta homología parcial con otras partes del genoma además de con la secuencia diana. Cuando ocurre esta homología parcial con otras zonas del genoma se le doninman efectos *off-target* (3). Por tanto, la principal estrategia para evitar efectos *off-target* se basa en elegir cuidadosamente el diseño de la guía de RNA. Sumado a esto, podemos aplicar otras técnicas

que han conseguido reducir los efectos *off-target* como son las guías truncadas de RNA (17 nucleótidos de longitud) o el uso del sistema Cas9 nickasa (16).

Cas9 nickasa es una variante de Cas9 en la cual se han producido modificaciones en los dominios encargados de la acción endonucleasa (HNH y RuvC), de manera que solo mantiene activo un dominio catalítico. De esta forma, en lugar de producir un corte en ambas hebras del DNA, solo es capaz de producir el corte en una de las hebras, lo cual es conocido como *nick*. Por lo tanto, para producir un corte en ambas hebras de DNA será necesario una doble nickasa (Figura 3), es decir, necesitaremos Cas9 nickasa junto a dos guías de RNA (20). El corte en una sola hebra se repara rápidamente a través de reparación homóloga directa, tomando como molde la otra hebra intacta de DNA (3). De igual manera, se ha demostrado que el doble *nick* presenta mayor eficiencia en cuanto a reparación no homóloga frente al doble corte generado por la Cas9 original (20). Este sistema aumenta en gran medida la especificidad de corte en el sitio diana, ya que es poco probable que dos *nicks off-target* fueran generados lo suficientemente cerca como para causar un corte en ambas hebras de DNA, y un *nick off-target* aislado se repara adecuadamente a través de la reparación por excisión de la base (20).

De igual manera, el sistema nickasa puede combinarse con la reparación homóloga directa para aumentar aún más la especificidad a la hora de editar un gen (3).

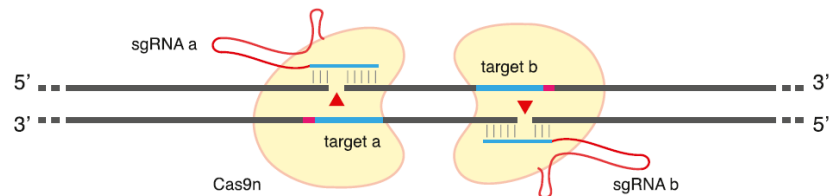


Figura 3. Ilustración del funcionamiento de una doble Cas9 nickasa (imagen obtenida de FA.Ran et al., 2013).

Las guías de RNA truncadas por su parte están formadas por menos de 20 nucleótidos de longitud, por lo que se reduce la región diana complementaria, pero todo ello sin sacrificar la eficiencia de edición en el punto deseado. Además, se ha visto que combinando gRNA truncadas junto a nickasas dobles aumenta la reducción de efectos *off-target* (21).

5.2 Aplicaciones del sistema CRISPR en las que no interviene la edición genómica.

5.2.1 Regulación de la expresión genética

A. Represión

CRISPR interferencia (CRISPRi) fue una de las primeras aplicaciones del sistema CRISPR no implicada en la edición genética. Para la formación de este sistema, se introducen una serie de mutaciones en los dominios HNH y RuvC, implicados en la actividad de nucleasa, dando lugar a la nucleasa Cas9 inactiva (dCas9). De esta forma, dCas9 sigue manteniendo su habilidad para unirse al DNA (gracias a la guía de RNA que le indica la secuencia diana) pero no producirá corte. El objetivo del sistema CRISPRi se basa en evitar la unión de la RNA polimerasa (RNAP) al promotor o actuar como un terminador de la transcripción bloqueando el avance de la RNAP (22). Esta estrategia, por tanto, variará en función del sitio diana reconocido por el complejo dCas9-gRNA (4). De esta manera, conseguimos impedir la transcripción de los genes que nos interesen, y por consiguiente impedimos su expresión.

i. Procariontas

Se ha demostrado que en bacterias, simplemente la unión de dCas9 al sitio de inicio de la transcripción (promotor) ya es suficiente como para bloquearla, y por tanto, reprimirla o

disminuirla (*knock-down*) (3). La represión se puede conseguir con un mínimo de homología de 12 nucleótidos frente a los 20 nucleótidos que conforman la guía de RNA. Estos requerimientos de menor homología hacen que sea más sencillo la construcción de la guía de RNA y, además, son los responsables de la menor probabilidad de efectos off-target (16).

Un ejemplo del uso del sistema CRISPRi en procariontas lo encontramos en un experimento llevado a cabo por Lei S. Qi et al. (23), en el cual se establecen las principales características de dicho sistema. Para ello, transfieren el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* a *E.coli*. El sistema CRISPRi utilizado en dicho experimento va a estar compuesto por Cas9 con dos mutaciones en los dominios RuvC y HNH (dando lugar a dCas), y una sgRNA (Figura 4).

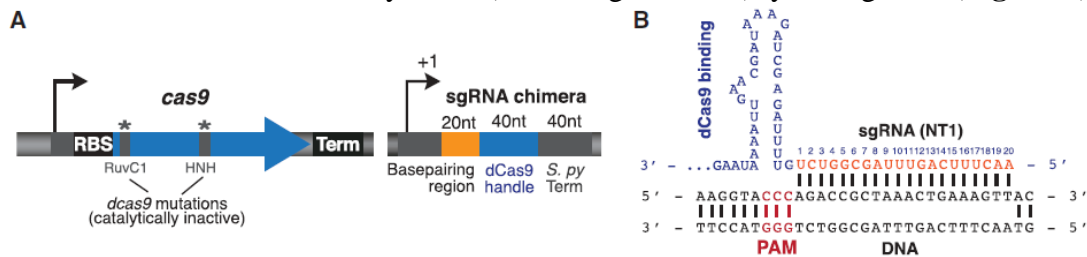


Figura 4. Componentes del sistema CRISPRi (imagen obtenida de LS.Qi et al.,2013). (A) Cas9 presenta dos mutaciones en los dominios RuvC1 y HNH dando lugar a dCas9. La sgRNA se encuentra formada por 3 dominios: los 20 nucleótidos complementarios a la región diana, un segundo dominio de 42 nucleótidos que forma la horquilla de unión a dCas9, y el tercer dominio de 40 nucleótidos que constituye un terminador de la transcripción derivado de *S.pyogenes*. (B) Esquema de unión del sistema CRISPRi al DNA diana.

Para poder visualizar los efectos de CRISPRi se construye un sistema señalizador a través de un proteína roja fluorescente (mRFP) que se inserta en el genoma de *E.coli*. Para ver la capacidad de represión del sistema CRISPRi, el experimento se divide en 2 posibles secuencias diana: la secuencia codificante de mRFP y la región que constituye el promotor de mRFP.

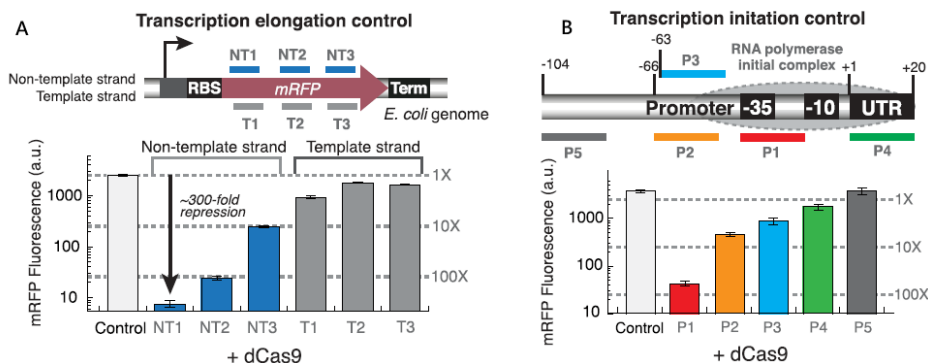


Figura 5. Resultados de la represión mediada por CRISPRi en *E.coli* (imagen obtenida de LS.Qi et al., 2013). (A) Control de la enlongación transcripcional: Secuencia diana constituida por la hebra codificante de mRFP. (B) Control del inicio de la transcripción: Secuencia diana constituida por el promotor de mRFP.

Por un lado, diseñan sgRNAs complementarias a diferentes regiones de la secuencia codificante de mRFP, capaces de unirse tanto a la hebra molde de DNA como a la hebra codificante. Los resultados obtenidos indican que las guías que tenían como diana la hebra codificante de DNA producen una represión genética efectiva; mientras que las que tenían como diana la hebra molde muestran un efecto pequeño (Figura 5.A). Esto es debido a que el bloqueo de la transcripción se debe a una colisión física entre la enlongación de la RNAP y el complejo dCas9/sgRNA; mientras que cuando el complejo se une a la hebra molde, la represión casi es inexistente ya que la RNA polimerasa es capaz de leer en esta orientación.

Por otro lado, cuando la región diana está constituida por el promotor, también se consigue un silenciamiento genético efectivo (**Figura 5.B**). En función de la distancia entre la secuencia diana y el promotor, la represión será más o menos efectiva. Cuando la secuencia diana se encuentra 100 pares de bases corriente arriba del promotor no muestra ningún efecto. A diferencia de lo que ocurriría cuando dirigíamos el sistema CRISPRi a la secuencia codificante, en este caso la eficiencia del proceso es independiente de la hebra de DNA.

En dicho experimento también se demostró que la regulación genómica llevada a cabo por el sistema CRISPRi es altamente específica y que no presenta efectos *off-target* significantes (**23**).

ii. Eucariotas

Uno de los principales problemas que presenta el sistema CRISPRi es que es mucho menos efectivo en las células eucariotas que en las procariotas (**24**). En procariotas se ha visto como dirigiendo dCas9 a la región codificante de un gen, es capaz de bloquear eficazmente la unión o la enlongación de la RNAP, dando lugar a la represión de la transcripción bacteriana. A diferencia de esto, en células de mamífero únicamente se advierte un ligero bloqueo de la transcripción (**25**).

Debido a esto, en eucariotas se puede aumentar el bloqueo de la transcripción de genes mediante la unión de dCas9 a un represor transcripcional (**Figura 6**), como por ejemplo, los efectores KRAB o SID los cuales promueven el silenciamiento epigenético (**24**). El complejo formado será dirigido hacia un locus específico mediante la guía de RNA (**19**).

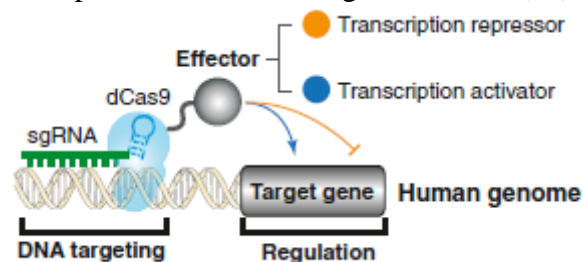


Figura 6. Esquema de un sistema de regulación genómica usado en células humanas (imagen obtenida de LA.Gilbert et al.,2013).

Todas estas afirmaciones son demostradas en un experimento llevado a cabo por Luke A. Gilbert et al. (**25**). En este ejemplo de uso del sistema CRISPRi en eucariotas examinan como dCas9 puede ser unida a dominios de proteínas que son conocidas por reclutar complejos represivos de cromatina para mejorar el silenciamiento de la transcripción en células humanas. Para ello se crea un gen que codifica para dCas9 de *S.pyogenes* unido a dos copias de una secuencia de localización nuclear, a HA tag (*Human influenza hemagglutinin tag*), y a una proteína fluorescente azul (BFP). Además, se termina uniendo dicho gen con diferentes dominios represores cuyo mecanismo se basa en la modificación de histonas (como puede ser KRAB).

Para comprobar si dCas9 es capaz de reclutar los complejos represores de la transcripción, dCas9 o cada dCas9 unido al dominio represor fueron transfectados a células HEK293 +GFP, junto a una sgRNA dirigida a GFP.

Los resultados encontrados fueron que células que expresaban dCas9-KRAB mostraron una reducción de 5 veces de la señal de GFP, mientras que aquellas que expresaban dCas9 solo o dCas9 junto a otro dominio represor que no fuese KRAB mostraron una disminución de 2 veces de la señal de GFP, lo cual demuestra como KRAB es capaz de reclutar diferentes complejos encargados de la modificación de histonas aumentando la potencia de represión que tiene el sistema CRISPRi.

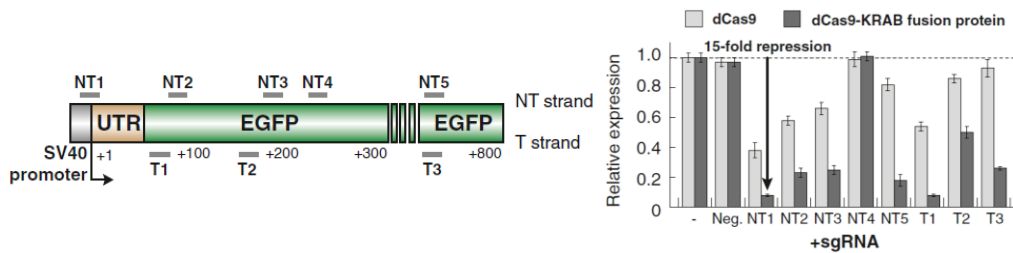


Figura 7. Resultados del experimento llevado a cabo con dCas9-KRAB frente a dCas9 estabilizando la expresión de éstas (imagen obtenida de LA.Gilbert et al.,2013).

Una vez demostrada la eficacia de la unión de KRAB a dCas9, se quiso mejorar la utilidad del sistema CRISPRi, por lo que se testó si la expresión estable de dCas9 o dCas9-KRAB podría silenciar la expresión de genes de forma efectiva. Para ello se clonó dCas9 y dCas9-KRAB en un constructo lentiviral. Con los lentivirus generados se infectaron las células HEK293 + GFP, separando posteriormente la población de células que había conseguido expresar dCas9 o dCas9-KRAB. Tras una semana de crecimiento, se transfectaron las sgRNA dirigidas a diferentes zonas del promotor de GFP, y se midió el nivel de GFP expresado a los 3 y 6 días tras dicha transfección. Los resultados encontrados indicaron que la expresión estable de dCas9 es suficiente para conseguir un silenciamiento considerable de GFP a los 3 días de la transfección y un silenciamiento fuerte a los 6 días (**Figura 7**). Se observó que 6 de 8 sgRNA dirigidas a GFP, disminuyeron la expresión de GFP al menos un 75%, destacando la guía dirigida a la posición NT1 con una disminución de la expresión del gen GFP de 15 veces.

Con el objetivo de mejorar el funcionamiento de CRISPRi, al igual que se había comprobado como aumentaba la eficacia de represión al tener una expresión estable de dCas9-KRAB, se investigó si esta eficacia aumentaría y se mantendría en el tiempo si también estabilizásemos la expresión de las guías de RNA. De esta manera se transdujeron células HEK293 + GFP, que tenían una expresión estable de dCas9 o dCas9-KRAB, con un lentivirus con el objetivo de estabilizar la expresión de las sgRNA dirigidas a GFP. Pasados 14 días de la infección viral se midieron los niveles de expresión de GFP, y observan como se encuentra altamente silenciada la expresión de GFP (**Figura 8**). Por tanto se confirma que la represión se ve mejorada cuando tanto la proteína dCas9 junto a KRAB y las guías de RNA presentan una expresión estable dentro de las células. Aún así existe un 5% de células que todavía siguen manteniendo cierta expresión de GFP, lo cual lleva a suponer que estas células quizá expresen bajos niveles de sgRNA o quizá presentan sitios específicos de integración retroviral refractarios al silenciamiento.

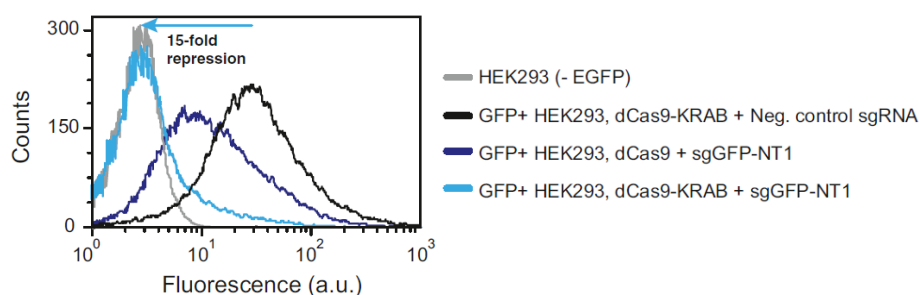


Figura 8. Resultados del sistema CRISPRi al tener una expresión estable de dCas9-KRAB y sgRNA (imagen obtenida de LA.Gilbert et al.,2013).

B. Activación

Otra forma de controlar la expresión de los genes se basa en la activación CRISPR (CRISPRa). El funcionamiento de CRISPRa tiene la misma base que CRISPRi, es decir, utiliza la proteína Cas9 inactivada (dCas9) pero con la diferencia de que el complejo gRNA/dCas9 va unido a un

activador transcripcional en lugar de a un represor para aumentar la expresión de los genes que queramos (16).

i. *Procariontas*

En cuando a la activación de genes tanto en eucariotas como en procariontas, la fusión entre la subunidad ω de la RNAP y dCas da lugar al aumento de la expresión de los genes de interés (16). En *E.coli* se demostró como la subunidad ω de de la RNA polimerasa es capaz de actuar como un activador transcripcional cuando se une covalentemente a proteínas de unión al DNA (26). De manera que la unión entre la subunidad ω de la RNAP y dCas9, dirigida hacia zonas corriente arriba de promotores, puede conseguir una activación programable de la transcripción (22).

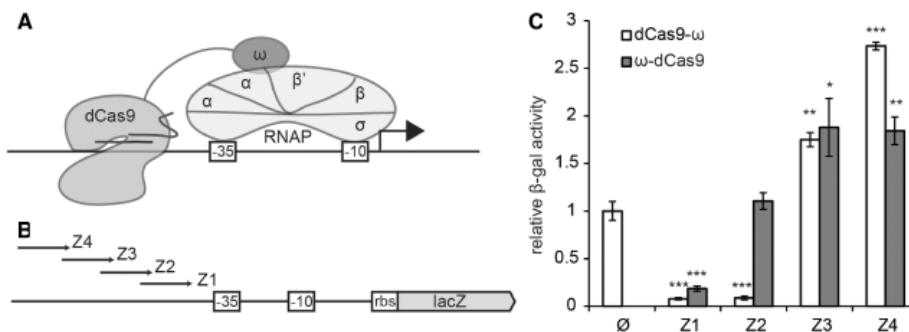


Figura 9. Ilustraciones del experimento realizado por D.Bikard et al. en *E.coli* (imagen obtenida de D.Bikard et al., 2013). (A) Ilustración de la fusión entre dCas9 y la subunidad ω de la RNA polimerasa. (B) Esquema de las zonas diana dentro del promotor de *lacZ*. (C) Resultados obtenidos tras la fusión de dCas9 a la subunidad ω .

Un ejemplo de este proceso de activación genética en procariontas lo lleva a cabo David Bikard y su equipo en *E.coli* (22). Para ello fusionan dCas9 a la subunidad ω , la cual interactúa con la RNAP a través de la subunidad β (Figura 9.A). De igual manera se diseñan distintas sgRNA capaces de guiar dicha fusión hacia 4 posiciones diferentes del promotor encargado de controlar el gen *lacZ* en *E.coli* (Figura 9.B). Como indicador de la expresión genética miden la actividad de la beta-galactosidasa.

Finalmente, determinan que el efecto del complejo dCas9- ω -RNAP depende del sitio de unión, pudiendo incluso causar represión cuando la unión se produce muy cerca del promotor. Cuando la unión del complejo se produce en zonas alejadas del promotor se observa un aumento relativo de la actividad de la beta-galactosidasa, llegando como máximo casi a triplicar la activación (Figura 9.C).

Al observar dicha característica, deciden investigar sobre cómo afectaría el dirigir el complejo formado por dCas9 y la subunidad ω a regiones más alejadas del promotor, y teniendo como diana ambas hebras de DNA. Para ello, utilizan un plásmido de GFP con el gen *gfp-mut2*, el cual se encuentra bajo el control de un promotor precedido por una secuencia rica en NGG (PAM característica del sistema CRISPR/Cas9 de *S.pyogenes*) en ambas hebras de DNA.

De las 10 posiciones diferentes que tenía como diana el experimento, encontraron dos que aumentaban en gran medida la expresión de *gfp-mut2*, cada una de ellas en una hebra de DNA. Las posiciones se encontraban a 80 y 96 nucleótidos corriente arriba del inicio de la transcripción, provocando un aumento de la inducción de ésta de 7,2 y 23 veces más respectivamente.

De igual manera se comprobó que la fuerza del promotor también intervenía en el grado de activación producido por el sistema testado, viendo como la inducción de la transcripción disminuía a medida que aumentaba la fuerza del promotor. Por lo que mostraron que dCas9

puede ser usada en la activación de genes con la posibilidad de conseguir un mayor o menor nivel de esta activación en función de la fuerza del promotor diana.

Las conclusiones obtenidas de este experimento afirman que la activación puede ser mejorada cambiando la proteína que une dCas9 con el dominio activador, o incluso probando diferentes dominios de activación.

ii. Eucariotas

En eucariotas también se ha demostrado la eficacia del sistema CRISPRa mediante la unión de dominios activadores como son VP16/VP64 o p65 (**Figura 10.A**). El aumento de la expresión de los genes diana es mucho mayor cuando se unen múltiples activadores a la región del promotor (**16**).

Los factores de transcripción sintéticos, como los anteriormente mencionados, han sido diseñados para controlar la expresión genética en múltiples aplicaciones en mamíferos, como puede ser la estimulación de la regeneración de tejidos, la compensación de defectos genéticos, la activación de represores de tumores, el control de la diferenciación de células madre y la generación de circuitos sintéticos de genes (**27**).

Las bases del proceso de activación de genes en eucariotas se demuestran en un estudio llevado a cabo por Pablo Perez-Pinera et al. (**27**). En dicho estudio unen dCas9 al dominio de transactivación VP64, y dicho complejo es transfectado a células HEK 293T. Además generan cuatro sgRNA dirigidas hacia diversas regiones del promotor del gen *IL1RN*. En este estudio comparan la capacidad de activación de sgRNA frente a crRNA. Tras realizar la transfección, aunque se observa cierta inducción de la expresión de *IL1RN* mediante el uso de crRNA, los niveles de activación conseguidos con sgRNA son mucho mayores (**Figura 10.B**). Como se supuso inicialmente, no se observaron cambios en los niveles de expresión de *IL1RN* en las células tratadas con sgRNA junto a dCas9 sin la unión de VP64.

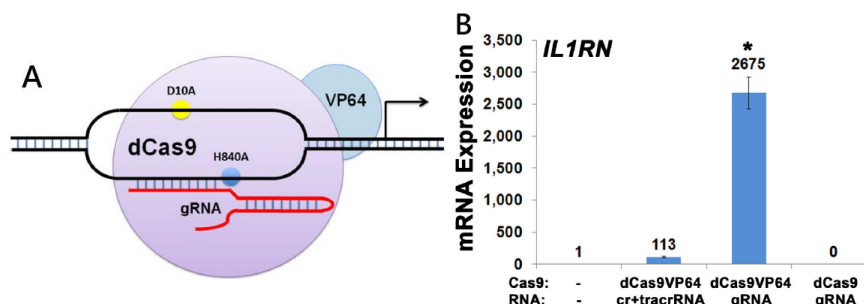


Figura 10. Ilustraciones del experimento realizado por P.Perez-Pinera et al. (imagen obtenida de P.Perez-Pinera et al.,2013).

A través de este estudio, consiguieron demostrar un nuevo mecanismo de activación de expresión de genes endógenos en mamíferos mediante el uso de RNA unido a activadores transcripcionales dirigidos a un promotor. Además, en el estudio se experimenta con múltiples sgRNA dirigidas a un único promotor observando un aumento de la expresión genética, pero se hipotetiza sobre la idea que dirigiéndolas a múltiples promotores de forma simultánea puede mejorar la técnica de activación. Sumado a esto, tras la secuenciación del material genético del estudio se comprobó que no existían efectos de activación genética off-target.

C. Mejoras en la regulación

A pesar de todas las ventajas que suponen los mecanismos explicados anteriormente, la regulación a través de dCas9 debe ser mejorada, ya que, aún con la ayuda de dominios

funcionales, solo se consigue una represión parcial (24). Basándose en esta idea, surgen mejoras en las técnicas implicadas en la regulación, abriendo nuevas fronteras al sistema CRISPR.

i. Scaffold RNA

En los organismos eucariotas podemos ver como existen programas de regulación en los que genes específicos son regulados de diversas maneras simultáneamente. Este hecho forma la base del sistema CRISPR RNA *Scaffolds*, el cual consiste en la generación de programas transcripcionales sintéticos dirigidos a múltiples loci de manera simultánea, pero con distinto tipo de regulación en cada locus (28).

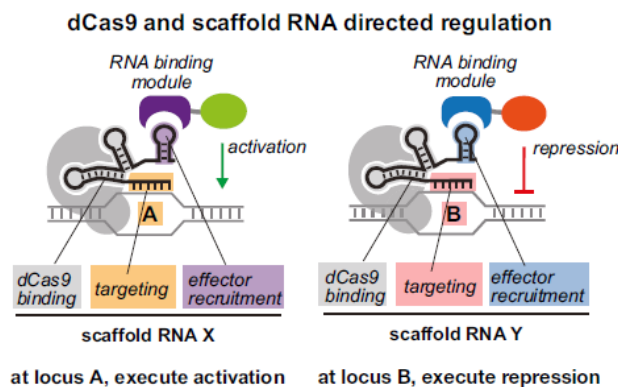


Figura 11. Esquema del funcionamiento de CRISPR RNA Scaffolds (imagen obtenida de JG.Zalatan et al.,2015).

Mediante el sistema CRISPRi o CRISPRa hemos podido ver ejemplos sobre como disminuir o aumentar la expresión de diferentes genes respectivamente, pero esto solo nos permitía regular la expresión genética en una dirección. De manera que el sistema CRISPR RNA *Scaffolds* supone una novedad en este ámbito. Para ello, necesitamos modificar la estructura del sistema CRISPRi: extendemos la secuencia de la sgRNA mediante un dominio de RNA (IncRNA) capaz de reclutar proteínas fusionadas a efectores funcionales (represores, activadores...). Esta modificación convierte a la sgRNA en *scaffold* RNA (scRNA), la cual presenta actividad de unión al DNA y de reclutamiento de proteínas (**Figura 11**). De manera que scRNA codifica la información tanto para la identificación del locus diana como para las instrucciones sobre el tipo de regulación a aplicar en dicho locus (28).

Esta nueva estrategia permite la activación y represión simultánea en diferentes genes diana como parte de un mismo programa de regulación.

ii. SunTag

SunTag consiste en un sistema sintético capaz de reclutar múltiples copias de proteínas en una cadena polipeptídica diana. Este sistema puede ser usado para modular la expresión de genes a través del reclutamiento de múltiples copias de dominios reguladores a la proteína dCas9, dirigida hacia secuencias específicas del genoma (29).

Anteriormente se expuso un ejemplo en el cual se conseguía aumentar la expresión del gen *IL1RN* al fusionar el dominio activador VP64 al sistema CRISPR/dCas9 (27). Pero en dicho estudio se vio como el aumento de la expresión del gen era mínimo, y además se comprobó cómo dirigiendo múltiples sgRNA al promotor se conseguía un aumento de dicha activación. Debido a estos resultados, se llega a la conclusión que quizá la unión de múltiples dominios de VP64 a una única molécula de dCas9 a través del uso de SunTag, podría mejorar los resultados

obtenidos por Perez-Pinera y su equipo. Esta idea surge del estudio llevado a cabo por Tanenbaum et al (29).

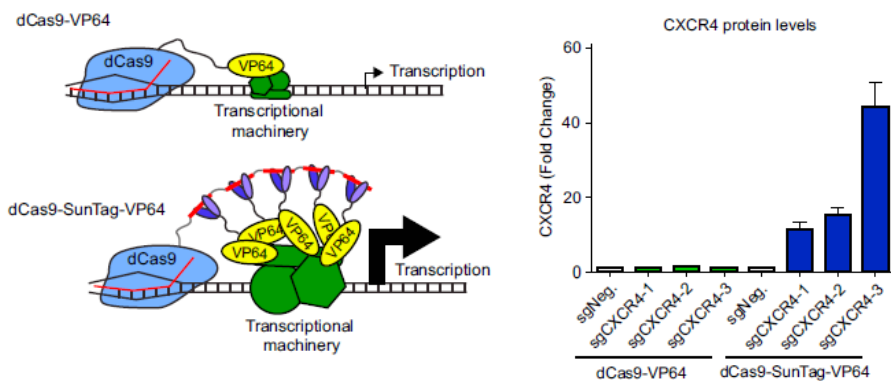


Figura 12. Ilustraciones del sistema SunTag (imagen obtenida de ME.Tanenbaum, LA.Gilbert, LS.Qi, JS.Weissman, RD.Vale, 2014). (A) Esquema del sistema inicial de activación frente al sistema SunTag. (B) Niveles de *CXCR4* obtenidos a los 5 días tras la introducción del sistema SunTag.

Para poner en práctica esta idea, usaron células K562 en las cuales generaron la expresión de ambos sistemas: dCas9-VP64 y dCas9-SunTag-VP64 (Figura 12.A). El gen diana del cual se buscaba el aumento de su expresión fue *CXCR4*, dirigiendo hacia él 3 guías de cada tipo de sistema. Los niveles de *CXCR4* fueron medidos 5 días después de la infección con el lentivirus que transportaba la maquinaria necesaria. Se encontró una mínima activación de la expresión de *CXCR4* mediante el uso de dCas9-VP64 con las 3 guías probadas. Por otro lado, se observó un aumento de la expresión del gen de hasta 50 veces con el uso del sistema dCas9-SunTag-VP64 (Figura 12.B).

Por tanto Tanenbaum et al. demuestran que se puede conseguir una alta activación de la expresión de genes con el uso del sistema SunTag reclutando múltiples dominios activadores a una única guía.

iii. SAM

En la naturaleza, la activación transcripcional se consigue a través de factores endógenos de transcripción que actúan de forma sinérgica con cofactores (30). Basándose en esta idea se desarrolla una técnica de mejora de la activación genética mediada por dCas9: SAM (*Synergistic Activation Mediator*).

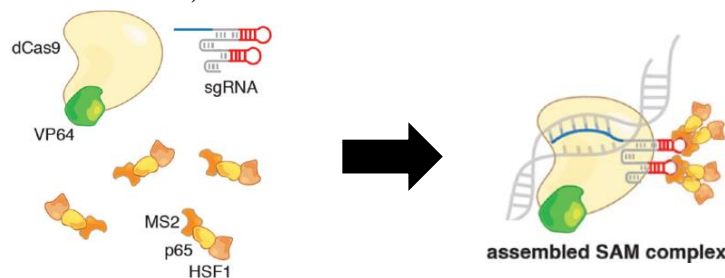


Figura 13. Componentes y estructura del complejo SAM (imágenes obtenida de S.Konermann et al., 2015).

Esta técnica se desarrolla en un estudio llevado a cabo por Konermann et al. (31). En dicho estudio, tras analizar la estructura de la sgRNA, determinan dos puntos de unión potenciales para la fusión de dominios efectores al complejo formado con dCas9. En esos puntos de unión se produce la fusión con proteínas de unión MS2, ya que se vio que la capacidad de éstas para reclutar activadores como VP64 producía un mayor aumento de la activación transcripcional

de los genes que la fusión de dCas9-VP64. El objetivo de estos descubrimientos es formar un hetero-efector, de manera que las proteínas de unión MS2 reclutarán un dominio activador, mientras que unido a dCas9 se encontrará otro activador transcripcional distinto (**Figura 13**). Para ello, Konermann y su equipo, utilizan como dominios activadores p65 y VP64, con el objetivo de aumentar la activación transcripcional de los genes *ASCL1* y *MYOD1*. Tras la formación del hetero-efector (dCas9-VP64 junto a MS2-p65 o dCas9-p65 junto a MS2-VP64), observan como éste produce 2,5 veces más activación transcripcional que la estructura de homo-efector (dCas9-VP64 junto a MS2-VP64 o dCas9-p65 junto a MS2-p65).

Una vez comprobado el funcionamiento de la hipótesis inicial, deciden añadir un tercer dominio activador, ya que según los resultados anteriores aumentaría aun más la activación transcripcional. Siguiendo el esquema anterior introducen un tercer dominio activador al conjunto MS2-p65, dando lugar a MS2-p65-HSF1. Los resultados obtenidos indican que la introducción de un tercer dominio activador aumenta en mayor medida la activación transcripcional de *ASCL1* (12%) y de *MYOD1* (37%).

Por tanto se desarrolla esta nueva estrategia de mejora de la activación transcripcional basada en la activación sinérgica producida por la actuación de varios dominios activadores a la vez.

5.2.2 Otras aplicaciones en las que no interviene la edición genómica:

A. Visualización del genoma

La organización espaciotemporal y la dinámica de la cromatina son características esenciales en el funcionamiento de la regulación genómica, pero la visualización de loci específicos en células vivas supone un reto a día de hoy (**32**). Pese a la existencia de técnicas como FISH (hibridación fluorescente in situ) o la captura de cromosomas, ambas presentan baja resolución y no pueden ser usadas in vivo. Algunos investigadores también han utilizado proteínas de unión al DNA fluorescentes con el objetivo de marcar determinados loci, pero esta técnica no es aplicable para cada locus (**3**).

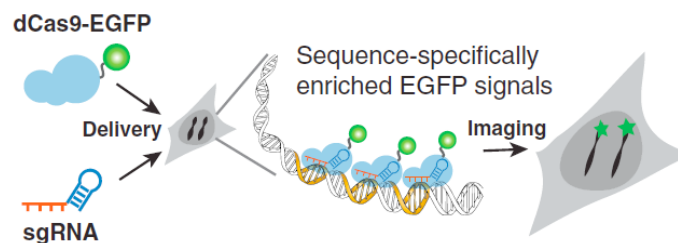


Figura 14. Ilustración de la estructura del sistema CRISPR utilizado por Chen et al. para la visualización de los telómeros. dCas9 en este caso se encuentra unida a la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) (imagen obtenida de B.Chen et al., 2013).

Por ello, se ha puesto en práctica la utilización del sistema CRISPR tipo II. Anteriormente se ha visto como dCas9 podía ser utilizada para la regulación de la expresión genética a través del control de la RNA polimerasa y la unión de factores de transcripción. Más allá de las utilidades ya comentadas, el sistema CRISPR actualmente también es usado como una herramienta flexible para la visualización de elementos genómicos específicos en células vivas de mamíferos (**32**). Los materiales necesarios para poner en práctica esta técnica se limitan a dos componentes: la proteína dCas9 unida a un marcador fluorescente, y la sgRNA complementaria a la secuencia que queremos visualizar (**3**). Esta técnica es usada por Chen et al. para monitorizar la dinámica de los telómeros a lo largo del ciclo celular (**Figura 14**).

B. Purificación

La purificación de regiones genómicas específicas es necesaria para llevar a cabo su análisis bioquímico, y por consiguiente elucidar los mecanismos moleculares implicados en las funciones del genoma (33).

En este sentido se desarrolló una técnica capaz de purificar regiones genómicas *in vivo*: inmunoprecipitación de cromatina mediante inserción (iChIP). Dicha técnica consistía en el marcaje del locus de interés mediante la inserción de secuencias de reconocimiento de una molécula de unión al DNA exógena, y la posterior purificación por afinidad de dicha proteína de unión al DNA, la cual se encontraba marcada, una vez haya reconocido las secuencias insertadas (33). Aunque iChIP es una técnica efectiva para purificar regiones específicas del genoma, necesita insertar al lado del locus de interés la secuencia de reconocimiento de la molécula de unión al DNA.

Recientemente, se han desarrollado otras técnicas que no implican la inserción de secuencias exógenas en el DNA: inmunoprecipitación de la cromatina mediada por ingeniería de moléculas de unión al DNA (enChIP). Esta técnica se basa en el uso del sistema CRISPR. El sistema enChIP se encuentra compuesto por la proteína de fusión (3xF-dCas9) y por la guía de RNA. La proteína de fusión consiste en 3xFLAG-tag (antígeno específico para el cual se han desarrollado anticuerpos monoclonales para poder realizar la purificación mediante cromatografía de afinidad), la señal de localización nuclear (NLS) y dCas9. Una vez expresado el sistema en las células apropiadas, éstas son lisadas y fragmentadas, y los complejos formados son inmunoprecipitados mediante el anticuerpo anti-FLAG. De esta forma, las moléculas asociadas a la región diana del genoma son aisladas y caracterizadas (33).

6 CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo se ha podido ver como las aplicaciones de CRISPR no implicadas en la edición genómica se encuentran actualmente en su máximo desarrollo. Se ha demostrado la utilización del sistema CRISPR tipo II (CRISPR/Cas9) como herramienta en tres aplicaciones que conforman la base de la ingeniería genética: regulación de la expresión de genes, visualización de loci específicos y purificación.

En lo que respecta a la regulación de la expresión de genes, podemos concluir que de las tres aplicaciones vistas, es la que presenta un mayor número de estudios de técnicas para su puesta en práctica. Dentro de la regulación de genes existen dos vertientes, la represión y la activación, las cuales presentan un nexo en común: el uso de la endonucleasa Cas9 desactivada (dCas9). Tanto en represión como en activación se ha demostrado que ambas aplicaciones se desarrollan con mayor facilidad en procariontes que en eucariotes, y que en estos últimos para mejorar del proceso es necesario el reclutamiento de dominios efectores transcripcionales, como pueden ser KRAB en el caso de la represión y VP64 en el caso de la activación.

Otra conclusión que podemos obtener de la regulación de genes, es la necesidad del desarrollo de nuevas técnicas que mejoren el rendimiento del proceso. Más allá del rendimiento, también se ha podido ver cómo los sistemas originales limitan las posibilidades de regulación de la expresión génica a una única acción: represión o activación. Gracias al desarrollo de nuevas técnicas de regulación, se ha conseguido aumentar el rendimiento del proceso, y además se han traspasado los límites que presentaban las técnicas originales, consiguiendo la regulación simultánea de distintos loci al combinar represión y activación transcripcional. Por tanto, podemos concluir que los principales objetivos de las mejoras en regulación se basan tanto en la mejora de los resultados obtenidos, como en la generación de técnicas más complejas que permitan la obtención de un sistema de regulación genético simultáneo, tomando como molde

las redes de regulación existentes en la naturaleza. En este sentido se ha podido comprobar que existen 3 técnicas principales para llevar a cabo los objetivos anteriormente expuestos: *Scaffold RNA*, *SunTag* y *SAM*.

Otra aplicación de CRISPR en la que no interviene la edición genómica es la visualización del genoma. Se ha podido comprobar como la utilización de dCas9 marcada con EGFP junto a la sgRNA solucionan los problemas existentes en el campo de la visualización de loci específicos: la baja resolución de las técnicas usadas y la incapacidad de aplicarlas in vivo.

Por último, la tercera aplicación del sistema CRISPR más allá de la edición genómica es la purificación de secuencias específicas del genoma. De igual manera que las dos aplicaciones comentadas anteriormente, se podido observar como la purificación a través de CRISPR se basa en el uso de dCas9, lo cual ha dado lugar al sistema enChIP. Se ha demostrado diversas ventajas de la utilización del sistema CRISPR frente a técnicas anteriores de purificación, entre las que destaca la alta especificidad del sistema y la no necesidad de introducción de secuencias exógenas.

Por tanto, podemos concluir que las aplicaciones del sistema CRISPR más allá de la edición genómica son múltiples, destacando principalmente su uso en la regulación de la transcripción. Aunque el estudio de este campo surge en un segundo plano tras la edición genómica, se ha podido comprobar como los avances en él se desarrollan a una velocidad vertiginosa, ofreciéndonos posibilidades inimaginables sin modificar una sola secuencia del genoma; como puede ser el aumento de productos de interés a través de la activación de rutas metabólicas secundarias.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* [Internet]. 2011;188(4):773–82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176093/>
2. Carroll D. Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2014;83(1):409–39. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>
3. Addgene. CRISPR 101: A Desktop Resource. 2016.
4. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 2014;346(6213):1258096.
5. Makino K, Nakata A, Ishino Y, Amemura M, Shinagawa H. Nucleotide sequence of the *iap* gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *J Bacteriol* [Internet]. 1987;169(12):5429–33. Disponible en: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
6. Mojica FJM, 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* [Internet]. 2000;36(1):244–6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760181>
7. Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002;43(6):1565–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
8. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.

- Microbiology [Internet]. 2005;151(8):2551–61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079334>
9. INSTITUTE B. CRISPR TIMELINE [Internet]. 2018 [14 abril 2019]. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline>
 10. Lander ES. The Heroes of CRISPR. Cell [Internet]. 2016;164(1–2):18–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>
 11. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science [Internet]. 2007;315(5819):1709–12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379808>
 12. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. Science [Internet]. 2008;321(5891):960–4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703739>
 13. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature [Internet]. 2011;471(7340):602–7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455174>
 14. Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, Emmanuelle Charpentier. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science [Internet]. 2012;337(6096):816–21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249>
 15. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? Cris J [Internet]. 2018;1:325–36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31021272>
 16. Tarasava K, Oh EJ, Eckert CA, Gill RT. CRISPR-Enabled Tools for Engineering Microbial Genomes and Phenotypes. Biotechnol J. 2018;13(9):1–13.
 17. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. Biochimie [Internet]. 2015;117:119–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
 18. Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin E V., Van Der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. Science (80-) [Internet]. 2016;353(6299). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493190>
 19. Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the Biologist’s Toolkit with CRISPR-Cas9. Mol Cell [Internet]. 2015;58(4):568–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
 20. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell [Internet]. 2013;154(6):1380–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992846>
 21. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotechnol [Internet]. 2014;32(3):279–84. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3988262/>

22. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013;41(15):7429–37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23761437>
23. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* [Internet]. 2013;152(5):1173–83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3664290/>
24. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* [Internet]. 2014;157(6):1262–78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906146>
25. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* [Internet]. 2013;154(2):442–51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849981>
26. Dove SL, Hochschild A. Conversion of the ω subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes Dev* [Internet]. 1998;12(5):745–54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316573/>
27. Perez-pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi M, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. 2013;10(10):973–6.
28. Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La Russa M, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* [Internet]. 2014;160(1):339–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>
29. Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* [Internet]. 2014;159(3):635–46. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
30. Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* [Internet]. 2002;14(20):2551–69. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040209>
31. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* [Internet]. 2015;517(7536):583–8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494202>
32. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* [Internet]. 2013;155(7):1479–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
33. Fujita T, Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;439(1):132–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.013>