



Sistemas CRISPR-CAS: una perspectiva histórica y estructural

CRISPR-CAS systems: a historical and structural perspective

CARLA NAVARRO^{*1}, MARÍA P. DÍAZ^{*2}, ANDREA DÍAZ^{*3}, PABLO DURAN^{*4}, ANA CASTRO^{*5}, EMMA GUTIÉRREZ^{*6}, CLÍMACO CANO^{*7}, ANA-KARINA CARBONELL-ZABAETA^{**8}, VALMORE BERMÚDEZ^{**,**9}

Resumen

Hace 40 años comenzó el viaje de la edición genética a través de las zinc-finger nucleasas (ZFN) y las nucleasas de tipo activador de la transcripción (TALENs). El camino parecía largo y lleno de obstáculos debido a los potenciales efectos secundarios y limitaciones de dichas técnicas. No obstante, en el año 2002, después de años de interrogantes en la comunidad científica con respecto a la existencia de secuencias genéticas repetidas en distintos microorganismos, se nombra a dichas secuencias como *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR). Desde ese momento, no se ha detenido la investigación determinando sus funciones, clasificación y potenciales usos en la edición de material genético de cualquier organismo, proveyendo ventajas con respecto a las técnicas utilizadas con anterioridad. En años recientes, su aporte a la medicina ha ganado cada vez más atención, suscitando el descubrimiento de nuevas aplicaciones siempre en constante actualización. Por ello, es necesario entender qué es el sistema CRISPR-Cas desde sus bases, estando atentos a sus avances en el futuro.

Palabras clave: Sistema CRISPR-Cas, edición génica, tecnología genética

Abstract

Forty years ago, the journey of gene editing through zinc finger nucleasas (ZFNs) and transcription activator-like nucleasas began; the road seemed long and full of obstacles due to these techniques' potential side effects and limitations. However, in 2002, after years of questioning in the scientific community regarding the existence of repeated genetic sequences in different microorganisms, these sequences were named clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). Since then, their research has not stopped, determining their functions, classification and potential uses in the editing of genetic material of any organism, providing advantages with respect to the techniques previously used. In recent years, its contribution to medicine has gained more and more attention, leading to the discovery of new applications that are constantly being updated. The potential of CRISPR-Cas systems in medicine is immense, inspiring hope and excitement for the future of healthcare. Therefore, it is necessary to understand what the CRISPR-Cas system is from its bases and be attentive to its future advances.

Keywords: CRISPR-Cas system, gene editing, gene technology

*Endocrine and Metabolic Diseases Research Center. School of Medicine. University of Zulia. Maracaibo, Venezuela.**Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Barranquilla, Colombia.***Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Vida. Barranquilla, Colombia.

Correspondencia: cpm24@gmail.com

Orcid: [10000-0002-1321-9568](https://orcid.org/0000-0002-1321-9568)

[20000-0001-6295-0229](https://orcid.org/0000-0001-6295-0229)

[30000-0002-3570-3860](https://orcid.org/0000-0002-3570-3860)

[40000-0002-8030-1780](https://orcid.org/0000-0002-8030-1780)

[50000-0003-0417-0210](https://orcid.org/0000-0003-0417-0210)

[60000-0002-9394-6764](https://orcid.org/0000-0002-9394-6764)

[70000-0002-8103-3714](https://orcid.org/0000-0002-8103-3714)

[80009-0001-3690-9721](https://orcid.org/0009-0001-3690-9721)

[90000-0003-1880-8887](https://orcid.org/0000-0003-1880-8887)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.2](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.2)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 15/02/2024

Aprobación: 20/05/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 05-38. 2024

Introducción

Los CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, o *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), son el típico ejemplo de una herramienta que surge inesperadamente de un descubrimiento no dirigido precisamente a su desarrollo en particular (Ishino y col., 1987). Desde sus comienzos como una intrigante repetición de secuencias en el genoma de ciertos organismos, como arqueas y bacterias, aportando resistencia a patógenos específicos (Brouns y col., 2008), hasta el inédito recurso biotecnológico que es actualmente (Moon y col., 2019), CRISPR ha demostrado ser un tema presto a debates científicos y éticos, abriendo paso a novedosas soluciones y sus problemáticas implicaciones a futuro (Brokowski y Adli, 2020).

CRISPR es una naciente herramienta de edición génica que ha ido tomando forma y tracción con el pasar de los años. Su uso no se limita a un único campo de las ciencias, facilitando la ingeniería genética de plantas en la agricultura (Xing y col., 2014; Chen y col., 2019), identificando y validando los mecanismos de enfermedades genéticas y sus blancos terapéuticos, contribuyendo al diseño de modelos animales de enfermedades (Zhou y col., 2014) y en algunos casos llegando hasta el área de lo clínico, con estudios en humanos en curso para el tratamiento de cáncer, VIH y algunos trastornos hematológicos (Institut de Recherche Internationales Servier, 2021; Sangamo Therapeutics, 2021; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 2021).

La necesidad de lograr la mayor exactitud posible con este tipo de herramientas para evitar las complicaciones catastróficas que

podría implicar la edición génica (Baltimore y col., 2015; Check, 2002), ha llevado al desarrollo de sistemas de precisión como lo es el CRISPR/Cas9, por nombrar alguno, haciendo posible señalar y actuar con exactitud sobre los genes blancos reales (Mali y col., 2013). Por supuesto, de la mano con el interés general de comunidad científica y la cantidad astronómica de nuevos estudios al respecto, el uso de CRISPR trae consigo serias limitaciones éticas y técnicas que siguen y seguirán en discusión en los años venideros (Brokowski, 2018; Olson y col., 2016), entrando en los debates morales sobre la experimentación humana en embriones, con comités internacionales conviniendo sobre su uso en células somáticas, mientras que limita su uso en células germinales citando el desconocimiento sobre sus posibles efectos a futuro (Matthews y Iltis, 2019).

El futuro en la biotecnología anuncia grandes cambios enmarcados dentro del contexto de CRISPR, incentivando nuevas líneas de estudio, buscando consolidar los conocimientos ya obtenidos y su aplicación práctica, delineando de manera clara sus limitaciones técnicas y áreas de mejoría. De esta manera, el objetivo de esta revisión es presentar la información actual sobre CRISPR como herramienta desde sus inicios hasta sus nuevos horizontes, haciendo hincapié en la descripción profunda de su funcionamiento y aplicabilidad en el ámbito médico.

CRISPR: DE SECUENCIA INTRIGANTE A HERRAMIENTA POTENCIAL

Durante la década de los 80 surgieron por primera vez tecnologías de edición génica como los *zinc-finger nucleases* (ZFN) o nucleasas de tipo activador de la

transcripción (TALENs) con la finalidad de modificar el material genético. A pesar del gran avance que supuso su descubrimiento en el campo de la genética, la falta de especificidad y con ello el gran margen de efectos secundarios potenciales supuso una gran limitación en su implementación, generando a su vez la necesidad de diseñar nuevas tecnologías más seguras y eficaces (Miller y col., 1985; Miller y col., 2011; Shao y col., 2013).

De esta forma, el descubrimiento de las primeras secuencias CRISPR se remonta a décadas atrás. Ishino y col. (1987) realizaron un trabajo de investigación cuyo objetivo era estudiar el gen *iap* en *E. coli* K12. Durante su desarrollo, los autores reportaron que, cerca del gen *iap*, se encontraban secuencias genéticas desconocidas de ADN de 29 nucleótidos repetidas y separadas por intervalos aleatorios de 32 nucleótidos. Sin embargo, en ese momento no se determinó su importancia biológica. Dos años después, se observaron resultados similares que podrían reproducirse en especies *Shigella* y *Salmonella* (Nakata y col., 1989), mientras que en 1991, estas secuencias fueron identificadas en bacterias Gram positivas como *M. tuberculosis*. Por otro lado, no fue hasta 1993 que Mojica y col. observaron dichas secuencias en archaeas, específicamente, en *H. mediterranei*. Luego en 1995, se descubrió una clase distinta de repeticiones de ADN presente en numerosas archaeas, así como la funcionabilidad de las mismas en estos microorganismos; sin embargo, aún faltó mucho por dilucidar (Mojica y col., 1995).

Los estudios de estas secuencias extrañas fue incrementando, siendo Mojica y col. (2000) quienes evidenciaron que estas secuencias se repetían en gran diversidad de bacterias (>40%) y

archaeas (>90%), además de encontrarse funcionalmente relacionadas. En esta oportunidad, dichas secuencias fueron denominadas repeticiones cortas espaciadas regularmente (SRSR) y se pensaba que poseían funciones biológicas que aún no habían sido esclarecidas. Luego, en el año 2002, Jansen y col. (2002) le acuñaron a esta secuencia desconocida el nombre de CRISPR, aunado a la identificación de los genes asociados a CRISPR (Cas) adyacentes a los elementos repetidos (Cas1-Cas4).

Asimismo, Mojica y col. (2005) demostraron que las secuencias espaciadoras que separaban las repeticiones idénticas coincidían con fragmentos del genoma de fagos, resultados similares a los observados por Pourcel y col., 2005. En este sentido, Bolotin y col. (2005) mediante un estudio en *S. thermophilus*, reveló genes codificadores de Cas distintos a los descritos previamente, en este caso, los genes de una proteína de mayor tamaño que predijeron podría presentar actividad nucleasa, denominada Cas9. A su vez, evidenciaron que en los distintos espaciadores había cierta secuencia ubicada en sus extremos que se repetía, lo que actualmente se conoce como motivo adyacente al protoespaciador (PAM).

A partir de estos hallazgos, comenzaron a desarrollarse las hipótesis de que CRISPR cumplía un papel importante en los sistemas de defensa bacterianos. Sin embargo, no fue hasta 20 años posterior a su descubrimiento que Barrangou y col. (2007) establecieron a CRISPR como un sistema de inmunidad adaptativa bacteriana. En dicho estudio, se evaluó la respuesta de *S. thermophilus* ante el ataque de fagos, una problemática común en las industrias de lácteos, observándose que esta bacteria incorporaba a su locus

CRISPR nuevos espaciadores derivados del ADN extraño proveniente de fagos, sirviendo como memoria para el reconocimiento y ataque de secuencias homólogas en próximas reinfecciones, en las que destacó Cas9 como la única proteína requerida para dicho proceso.

Al año siguiente, se fueron dilucidando los modelos de cómo podía ocurrir este proceso de inmunidad adaptativa y mediante cual maquinaria bacteriana. Así, Brouns y col. (2008), en un modelo de *E. coli* K12, demostraron que las procariontas adquieren resistencia a los virus integrando fragmentos cortos de ácido nucleico viral en grupos de repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas (CRISPR). Las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) del huésped utilizan las secuencias derivadas de virus contenidas en CRISPR para mediar una respuesta antiviral que contrarresta la infección. Después de la transcripción de CRISPR, un complejo de proteínas Cas denominado Cascade, escinde un precursor de ARN CRISPR (ARNcr) en cada repetición y retiene los productos de escisión que contienen la secuencia derivada del virus. Con la ayuda de la helicasa Cas3, estos ARN CRISPR maduros sirven como pequeños ARN guía que permiten a Cascade interferir con la proliferación del virus. Esto demostró que la formación de ARN guía maduros, por la subunidad de endonucleasa de ARN CRISPR de Cascade, es un requisito mecanicista para la defensa antiviral. Estos autores concluyeron que la transcripción de regiones CRISPR y la escisión del pre-ARNcr en ARNcr maduros mediante proteínas Cas, es la base molecular de la etapa de defensa antiviral del sistema CRISPR/cas, que permite a los procariontas prevenir eficazmente la depredación de fagos. De manera similar, Marraffini y col. (2008) descubren la existencia del sistema CRISPR

subtipo III-A y reportan que la diana de los sistemas CRISPR era el ADN, ya que este interfirió con la transferencia horizontal de secuencias de ADN de plásmidos en un modelo de *S. aureus*. En contraste con estudios previos, Hale y col. (2009), dilucidaron que el ARN también podía ser diana de esta maquinaria de inmunidad adaptativa, y describieron el complejo Cmr del sistema tipo III-B de *P. furiosus*, el cual demostró actividad ARNsa dirigida por ARNcr.

El incremento de la evidencia referente a los sistemas CRISPR vino acompañado de un auge en la investigación sobre los mismos durante la última década. Garneau y col. (2010) demostraron que el sistema *Streptococcus thermophilus* CRISPR1/Cas también puede adquirir espaciadores de forma natural a partir de un plásmido autorreplicante que contiene un gen de resistencia a los antibióticos, lo que provoca la pérdida de plásmido. También mostraron evidencia *in vivo* que el sistema CRISPR1/Cas escinde en sitios específicos el ADN bihelical de plásmidos y bacteriófagos dentro del protoespaciador. Así, describen el mecanismo de interferencia CRISPR-Cas a través de proteínas Cas (*Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, y *Csn2*), que cortan el ADN diana en sitios precisos. La unión de la Cas9 requiere la presencia de una secuencia *motif* adyacente al protoespaciador (PAM, *Protospacer Adjacent Motif*) en la secuencia blanco que funciona como una suerte de asa molecular a la que se sujeta la nucleasa. Una vez que la Cas9 se une al sitio blanco con una coincidencia en secuencia entre el crARN y el ADN blanco, corta el ADN tres bases 5' o corriente arriba (*upstream*) del sitio PAM.

Posteriormente, el año 2011 estuvo lleno de sorpresas y descubrimientos

transcendentales, ya que Deltcheva y col. (2011) al realizar una secuenciación del ARN bacteriano de *S. pyogenes*, observaron que aunado al crARN, existía otro ARN pequeño con el que este formaba un dúplex que era necesario para guiar a Cas9 hacia su objetivo, el cual sería llamado ARN trans-activador (ARNtracr). En efecto, el tercer elemento del locus CRISPR es la secuencia tracr ARN (*trans-activating* CRISPR RNA, por sus siglas en inglés) cuyo transcrito representa, sorprendentemente, el tercer ARN más abundante después de rARN y tARN. El transcrito ARNtracr es un pequeño ARN no codificante que posee una secuencia de 24 nucleótidos de casi perfecta complementariedad con las secuencias repetidas del arreglo CRISPR que también son transcritas como un precursor largo pre-crRNA (CRISPR ARN).

En mayo del mismo año, Makarova y col. (2011) propusieron la primera clasificación de los sistemas CRISPR-Cas, basada en las semejanzas y evolución de los mismos, dividiéndose en 3 tipos: sistemas tipo I, II y III, cada uno con diversos subtipos. Dos meses después, Saprunauskas y col. (2011) evidenciaron como los sistemas CRISPR podían funcionar de manera heteróloga entre otras especies, puesto que se clonó el sistema CRISPR de *S. thermophilus* (sistema tipo II) y se transfirió a una especie de *E. coli*, confirmando a ésta resistencia a los plásmidos, considerándose así a los sistemas CRISPR como unidades autónomas y posiblemente manipulables.

No obstante, no fue hasta 2012 que esto pudo ser comprobado por Jinek y col., quienes demostraron como el crARN y el tracrARN podían ser fusionados para crear una única guía sintética para el ataque de los ácidos nucleicos dianas, es decir, dicho sistema podía ser reprogramado. También,

se observó que la alteración de algunos de los genes que codifican Cas9 podían alterar su funcionamiento y caracterizaron los mecanismos de acción bioquímicos y mecánicos de los sistemas CRISPR tipo II; resultados similares fueron reportados por Gasiunas y col. (2012).

Dichos hallazgos fueron la piedra angular para las subsecuentes investigaciones referentes a los sistemas CRISPR como herramienta de edición genética, abriendo así las puertas a una nueva era en este campo. En este sentido, en enero del 2013, diversos equipos de investigación independientes comunicaron la exitosa edición del genoma bacteriano y de mamíferos entre los que destacan Cong y col. (2013), quienes fueron los primeros en adaptar CRISPR-Cas9 para la edición del genoma de las células eucariotas. Para ello, diseñaron 2 ortólogos Cas9 distintos, uno para *S. thermophilus* y otro para *S. pyogenes*, y se demostró que estos podían ser programados para escindir múltiples locus genéticos y reparar secuencias dirigida por homología en células humanas y de ratón *in vitro*. Aunque la reprogramación del sgARN no era un descubrimiento para ese tiempo, dicho artículo y el de Mali y col. (2013) fueron la base que brindó a la comunidad científica el conocimiento acerca de cómo este sistema podía ser implementado fácilmente para la edición del genoma.

Desde ese momento, CRISPR-Cas9 ha sido considerado una nueva herramienta de edición genética, aparentemente para cualquier organismo, capaz de conferir una capacidad inimaginable para editar y controlar el genoma (Xing y col., 2014). La gran aplicabilidad y auge en la utilización de los sistemas CRISPR en comparación con herramientas de edición genéticas previas,

radica en la accesibilidad económica a esta, aunado a su especificidad, simplicidad de ejecución y adaptabilidad (Cox y col., 2015; Fellmann y col., 2017; Adli, 2018). Es por ello que, los sistemas CRISPR han cambiado la investigación en muchas áreas de las ciencias biológicas, ya sea permitiendo la realización de estudios epigenéticos más complejos (Vora y col., 2016; Xie y col., 2018), facilitando la ingeniería genética en las plantas (Raitskin y Patron, 2016), además de utilizarse para el tratamiento de enfermedades genéticas (Papasavva y col., 2019), inmunológicas (Xiong y col., 2016; Ferdosi y col., 2019) infecciosas (Kennedy y Cullen, 2017), así como ser considerado una posible herramienta contra el cáncer (Huang y col., 2018).

Ahora bien, Makarova y col., en el año 2015, actualizaron la clasificación evolutiva de los sistemas CRISPR. Esta nueva clasificación engloba a 2 clases (Clase 1 y 2) – que difieren sustancialmente en el modelo estructural de sus complejos de procesamiento y ataque –, 5 tipos (I, II, III, IV, y V) y 16 subtipos. Sin embargo, Shmakov y col. (2015), mediante un análisis computacional de secuencias, describieron una nueva proteína efectora correspondiente a la Clase 2 (C2n2), dando como resultado la caracterización del sistema CRISPR tipo VI. En diciembre de ese año, la tecnología CRISPR fue designada como “descubrimiento del año” por la revista Science (Travis, 2015), y en el 2016, Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna, Roudolphe Barrangou, Philippe Horvath y Feng Zhang fueron galardonados con el Premio Internacional Canadá Gardiner, por sus aportes a la investigación relacionada a CRISPR y su impacto en el campo de la medicina (“2016 *Canada Gairdner Award Winners*”). Y en octubre del año 2020, se

le otorgó el premio Nobel de Química a las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, por haber desarrollado un método para la edición del genoma (*The Nobel Prize in Chemistry* 2020).

Durante los últimos años, los descubrimientos referentes a la evolución, mecanismos, utilidad y clasificación de los sistemas CRISPR siguieron avanzando. Según las últimas actualizaciones relacionadas a la clasificación de dichos sistemas, existen 2 clases, 6 tipos y 33 subtipos (Koonin y col., 2017). A pesar del gran crecimiento de la ciencia con respecto a los sistemas CRISPR y su papel en la edición genética, aún queda un largo camino que recorrer para terminar de explorar la clasificación y mecanismos relacionados a los mismos, así como el desarrollo de estrategias para poner en práctica esta maravillosa herramienta.

CRISPR-CAS: BASES ESTRUCTURALES Y CLASIFICACION

Estructura General de los Sistemas CRISPR-Cas

CRISPR/Cas es un sistema basado en una endonucleasa guiada por RNA que permite llevar a cabo edición génica en numerosos organismos, que está revolucionando el campo de la ingeniería genética y que ha logrado un desarrollo sorprendente de aplicaciones. Con CRISPR/Cas es posible cambiar bases, un gen o incluso varios genes a la vez. CRISPR/Cas, de sus siglas en inglés Repeticiones Palindrómicas Cortas Regularmente Interespaciadas y Agrupadas (CRISPR), y de Asociados a CRISPR (Cas), es un sistema inmune adaptativo de origen bacteriano basado en dos RNA (tracrRNA,

crRNA) y una endonucleasa (típicamente Cas9 o sus ortólogos), con capacidad para rastrear y cortar secuencias de ácidos nucleicos invasores, procedentes de fagos o elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones.

El sistema CRISPR/Cas está formado por las secuencias genómicas que codifican los componentes del nivel efector. Un locus CRISPR/Cas típico contiene una agrupación de secuencias CRISPR (CRISPR array) y los genes asociados Cas. Las CRISPR son secuencias compuestas de repeticiones palindrómicas cortas de ADN que separan regularmente secuencias únicas denominadas espaciadores no homólogos (Haft y col., 2005). Asimismo, las repeticiones van desde los 24 a 48 pares de bases aproximadamente. Estos espaciadores (21-22 bp) derivan de ácidos nucleicos invasores (protoespaciadores) y actúan como huella dactilar que le permiten a un huésped procariótico recordar a qué invasiones ha estado expuesto, las cuales a diferencia de las repeticiones palindrómicas sí poseen homología con genes existentes, en su mayoría derivados de fagos y otros elementos extra cromosómicos (Bolotin y col., 2005). Adicionalmente, el locus CRISPR codifica productos ribonucleicos no codificantes necesarios para las funciones inmunitarias del sistema (Perez-Pinera y col., 2015). Las CRISPR codifican un precrRNA que es procesado para rendir un crRNA. El crARN es una molécula ribonucleica presente en todos los sistemas y complementaria a uno o varios protoespaciadores presentes en el locus, en consecuencia, el crARN actúa como una guía para los elementos proteicos efectores, conduciéndolos hasta el fragmento de material genético complementario a la molécula (Liao y col., 2019). El crRNA, a través de homología de

secuencias, guía a la nucleasa Cas9 hacia los ácidos nucleicos a silenciar. Los genes Cas codifican varias nucleasas implicadas en la adquisición de nuevos espaciadores, en el procesado del precrRNA y en el corte y destrucción de elementos genéticos enemigos. De forma similar el locus CRISPR de algunos sistemas contiene el gen CRISPR ARN transactivador (tracrARN), el cual genera una molécula esencial para el procesamiento de pre-crARN así como su posterior conversión a crARN maduros en sistemas tipo II y tipo VI principalmente (Scott y col., 2019). Generalmente, el crARN-tracrARN se asocian a proteínas Cas, formando un complejo denominado RNP (*Ribonucleoprotein Particle*) (Foster y col., 2018). De la misma manera, adyacente al locus CRISPR se encuentra el operón de los genes Cas, estos loci codifican al segundo componente característico del complejo, las proteínas Cas (Liu y col., 2020). Dichas proteínas poseen funciones y estructuras diversas según su tipo, asimismo, la ausencia o presencia de estos elementos varía según el tipo de CRISPR-Cas específico, siendo esta una de las principales bases para la clasificación de los sistemas (Makarova y col., 2018).

Mas allá de la gran variabilidad de estas moléculas, las proteínas efectoras individuales poseen un modelo canónico compuesto por 2 lóbulos, el lóbulo de reconocimiento alfa helicoidal (REC), compuesto por dominios alfa helicoidales y el lóbulo nucleasa (NUC), el cual a pesar de su gran variabilidad contiene típicamente alrededor de 3 dominios (Jinek y col., 2014), el primero se refiere al HNH, que tiene actividad similar a una endonucleasa, por ende, escinde el ADN de la secuencia de ARN guía; en segundo lugar se encuentra la nucleasa Ruv-c-like, que se encarga

de escindir la hebra de ADN contraria a la hebra complementaria, finalmente, el dominio C-terminal (CTD) que interactúa con PAM (Chen y col., 2014; Sternberg y col., 2014). Asimismo, en algunos tipos el lóbulo NUC posee dominios PI encargados del reconocimiento de secuencias PAM en sistemas cuyo blanco sea ADN o bien RRM en el caso de sistemas orientados a la escisión de ARN (Koonin y Makarova, 2013).

Mecanismo de Adaptación en Sistemas CRISPR-Cas

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) y las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) constituyen un sistema inmunológico adaptativo en procariontes. El sistema preserva recuerdos de infecciones anteriores mediante la integración de segmentos cortos de ADN extraño, denominados espaciadores, en la matriz CRISPR en un proceso denominado adaptación.

La mayoría de las arqueas y muchas bacterias codifican sistemas CRISPR-Cas que confieren inmunidad adaptativa contra elementos genéticos móviles (*mobile genetic elements*, MGE) (Makarova y col., 2015). Los mecanismos que participan en la inmunidad dependen de pequeños ARN CRISPR (crARN) que guían a las proteínas Cas para escindir ácidos nucleicos extraños complementarios de una manera específica de secuencia (Barrangou y col., 2007; Brouns y col., 2008; Garneau y col., 2010; Hale y col., 2009; Marraffini y Sontheimer, 2008). El sello distintivo de los sistemas CRISPR-Cas es la matriz CRISPR, que consiste en secuencias cortas repetidas (repeticiones) intercaladas por elementos de secuencia únicos (espaciadores), que

frecuentemente derivan de MGE como plásmidos y virus (bacteriófagos/fagos) (Pourcel y col., 2005; Bolotin y col., 2005). La matriz está precedida por un líder rico en AT que contiene un promotor. La transcripción de la matriz CRISPR genera moléculas de ARN precursoras que se procesan aún más para generar ARNcr maduros. En este contexto, las secuencias espaciadoras proporcionan la especificidad de secuencia para la interferencia con ácidos nucleicos invasores.

Los genes Cas, ubicados proximales a la matriz CRISPR, codifican las proteínas Cas que desempeñan funciones en las diferentes etapas de la inmunidad.

Tras la invasión de un MGE, el sistema CRISPR-Cas actúa en tres fases: (1) adaptación (o adquisición), en la que se inserta un nuevo espaciador derivado de una secuencia invasora en la matriz CRISPR; (2) biogénesis de crARN, en la que se transcribe la matriz CRISPR y el crARN precursor resultante se procesa en crARN maduros; e (3) interferencia, en la que el ácido nucleico extraño es atacado y degradado por un complejo de ribonucleoproteína Cas-ARNcr (Marraffini, 2008).

La fase de adaptación, es el proceso por el cual la bacteria adquiere secuencias protoespaciadoras nuevas (McGinn y Marraffini, 2019). Todo se inicia cuando un motivo PAM es reconocido en una molécula de ADN invasora. Con acción de las proteínas Cas1 y Cas2 en hexámeros, una serie de ataques nucleofílicos, uniones covalentes y el trabajo de una ADN polimerasa que completa las secuencias, se logra la inserción de un nuevo protoespaciador al genoma del procarionte, eximiendo de este a la secuencia PAM (McGinn y Marraffini, 2019). En el caso de que el protoespaciador sea de

ARN, se añade a los pasos una transcripción inversa por una enzima también codificada en el locus CRISPR-Cas para que el ARN sea convertido a ADN (Makarova y col., 2020). La fase dos, que es la fase de expresión, ocurre cuando el locus completo de CRISPR-Cas es transcrito como un solo pre-ARN de CRISPR (pre-ARNcr). En este punto es necesaria la maduración del pre-ARNcr a través de escisiones que culminan en el ARN de CRISPR (ARNcr), que se compone de la secuencia palindrómica complementaria en su conformación secundaria tipo horquilla, y la secuencia protoespaciadora, que será la guía hacia la secuencia del ADN invasor (Makarova y col., 2020). Finalmente, la fase de interferencia se refiere al proceso por el cual el sistema CRISPR-Cas encuentra la secuencia de ácido nucleico foráneo guiado por el ARNcr, al ser reconocido, el ácido nucleico foráneo es escindido e inactivado por complejos proteicos de nucleasas Cas u otras nucleasas, dependiendo del tipo de sistema del cual se trate (Makarova y col., 2020).

Algunos sistemas de CRISPR-Cas pueden escindir ADN y otros ARN (Hale et al., 2009; Marraffini y Sontheimer, 2008). Los sistemas con actividad ADNasa tienen la encomienda de detectar de manera temprana la inserción de una molécula de ADN proveniente, por ejemplo, de un virus. Por otro lado, los sistemas con actividad ARNasa pueden frenar la infección en una fase tardía, cuando el virus ha logrado expandirse al realizar la transcripción a ARN, que posteriormente se pueda traducir a nuevas partículas virales. Los sistemas ARNasa tienen la característica de hacer cortes colaterales, escindiendo las moléculas a su alrededor y no solo aquella inicialmente detectada, y de esta manera pueden cortar todo el ARN viral que se

encuentre a su alrededor (van Beljouw y col., 2023).

Barrangou y col. (2007) fueron los primeros en demostrar la naturaleza adaptativa de la inmunidad CRISPR-Cas, confirmando las hipótesis anteriores que el sistema CRISPR-Cas transmite inmunidad contra MGE (Makarova y col., 2006; Mojica y col., 2005; Pourcel y col., 2005). Desafiar a la bacteria *Streptococcus thermophilus* con fagos dio como resultado la adquisición de espaciadores que se originan en fagos en la matriz CRISPR, lo que proporcionó resistencia a los fagos coincidentes en caso de una infección adicional. La identificación de la absorción del espaciador tras la exposición a fagos demostró ser una medida eficaz para analizar la dinámica de la población. Los experimentos de co-cultivo a largo plazo, combinados con enfoques metagenómicos mostraron que la absorción del espaciador es un factor clave que impulsa la evolución de los fagos (Sternberg y col., 2016) (Figuras 1 y 2).

Se han identificado dos modos de adaptación para los sistemas tipo I: (1) *naïve* y (2) *primed*. Durante la adaptación *naïve*, el organismo obtiene un espaciador de una fuente de ADN extraña. Por el contrario, la adquisición cebada (*primed*) se basa en un espaciador preexistente (cebado) que permite una captación sesgada y mejorada de nuevos espaciadores. Ambos modelos se basan en la acción de dos proteínas clave, Cas1 y Cas2. La adaptación *naïve* requiere solo Cas1 y Cas2, mientras que la adaptación *primed* requiere adicionalmente el complejo de interferencia tipo I Cascade (complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral) y la nucleasa Cas3. Otros tipos de CRISPR-Cas codifican proteínas adicionales que parecen estar involucradas en la adquisición del

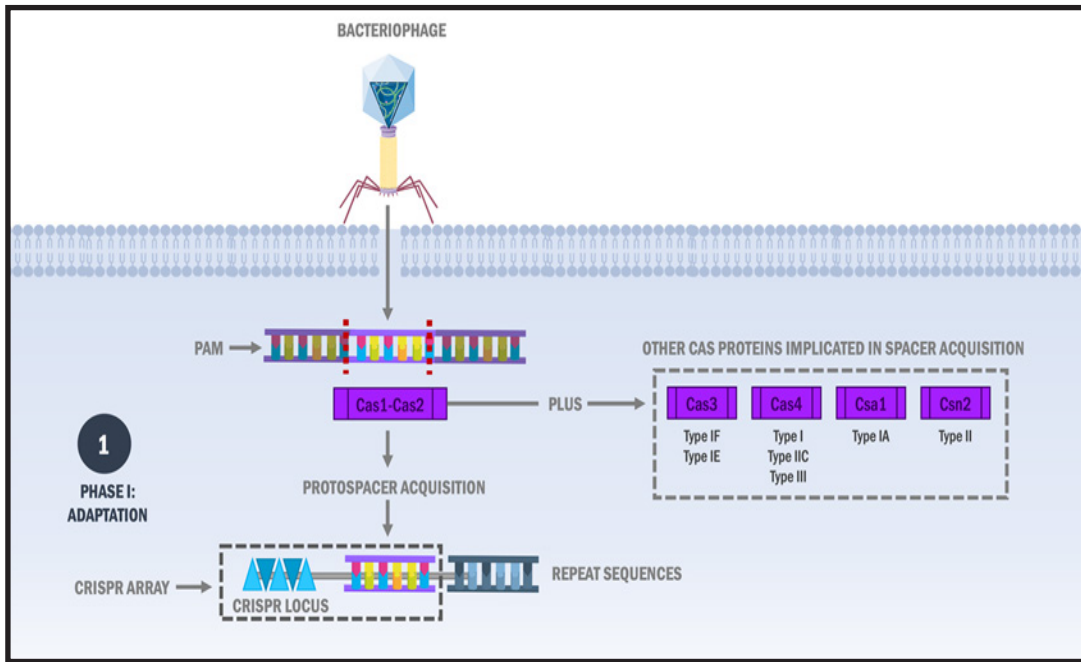


Figura 1. Mecanismo de adaptación en los Sistemas CRISPR-Cas

Posterior a la inclusión de material genético extraño al interior de la bacteria, las proteínas Cas1 y Cas2 se encargan de reconocer y escindir una porción específica de esta: el protospaciador. Luego, este es incluido dentro de la secuencia CRISPR para llevar a cabo los siguientes pasos de la inmunidad adaptativa bacteriana. Algunos subtipos de CRISPR utilizan otras proteínas Cas para la adquisición de dicho protospaciador

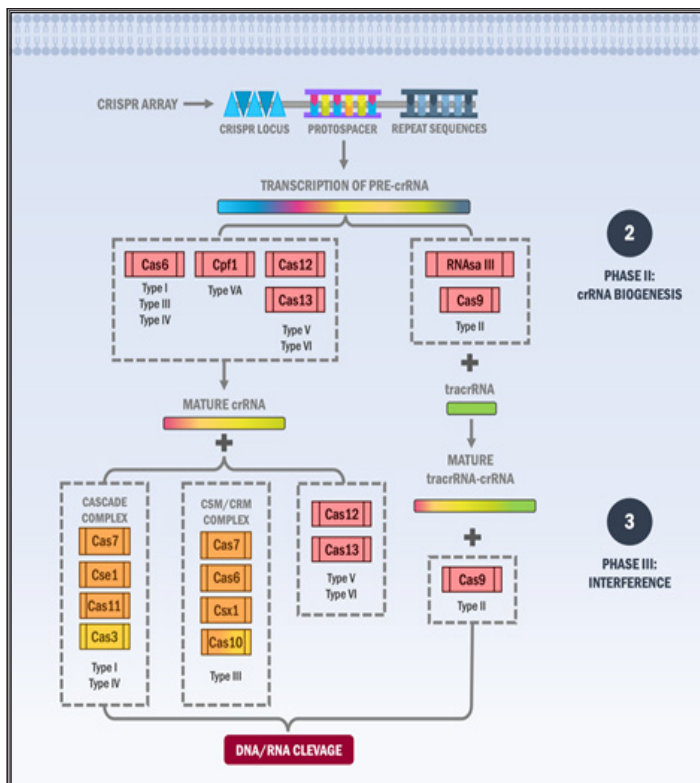


Figura 2. Mecanismo de Biogénesis e Interferencia de los Sistemas de crARN

espaciador. En el sistema tipo I-A de *Thermoproteus tenax*, se demostró *in vitro*, un complejo más grande formado por Cas1, Cas2, Cas4 y Cas1. La adquisición *in vivo* en el sistema tipo I-B de *Haloarcula hispanica* demostró la participación directa de Cas4 en la adaptación. Además de Cas1 y Cas2, las dos proteínas Csn2 y Cas9 desempeñan funciones esenciales para la adquisición tipo II-A de *S. thermophilus* y *Streptococcus pyogenes* (Sternberg y col., 2016) (Figuras 1 y 2).

Clasificación de Sistemas CRISPR-Cas

La clasificación de sistemas CRISPR-Cas ha resultado todo un desafío debido a la gran variabilidad existente entre los complejos, en consecuencia

se ha propuesto una clasificación politética en la cual se definen tipos de sistemas, así como subtipos y ortólogos según criterios filogénicos con respecto a la proteína Cas 1 (la proteínas más conservada de la familia Cas), presencia de genes Cas distintivos y la organización de los genes en el loci CRISPR-Cas, resultando en la clasificación actual de los sistemas que establece en la actualidad 2 grandes clases, 6 tipos y 33 subtipos (Makarova y col., 2018). Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 constan de un conjunto de complejos efectores, mientras que los sistemas de clase 2 contienen una sola proteína. Cada clase incluye tres subtipos: tipo I, III y IV en el sistema de clase 1 y tipo II, V y VI en el sistema de clase 2 (Figura 3).

Sistemas CRISPR-Cas Clase 1

El Sistemas CRISPR-Cas Clase 1 comprende los sistemas tipo I, III y IV, estos se distinguen por la existencia de complejos multiproteicos efectores, comúnmente conocidos como complejos "Cascada", conformados por diversas proteínas Cas, las cuales intervienen principalmente durante la fase de interferencia escindiendo el material genético blanco (Tang, 2019).

Sistema CRISPR-Cas tipo I

El sistema tipo I de CRISPR Cas se reconoce como uno de los primeros en ser descubiertos, así como por ser el sistema a partir del cual diversos tipos de CRISPR han

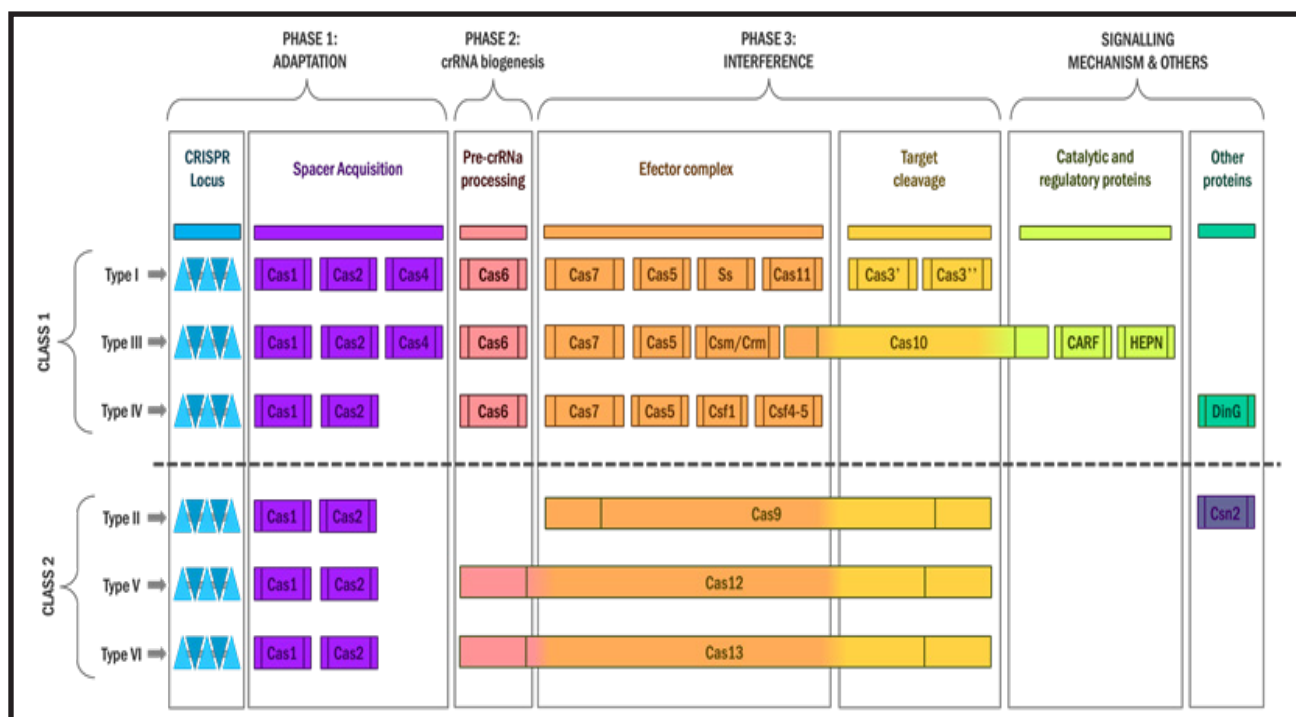


Figura 3. Clasificación de los Sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas se pueden clasificar en clase 1 y clase 2 dependiendo de la presencia o ausencia de la proteína Cas1 y otros genes cas distintivos y organización de loci. Los sistemas de clase 1 comprenden CRISPR tipo I, tipo III y tipo IV, que se distinguen por la existencia de complejos efectores multiproteicos o "cascada". Por el contrario, los tipos II, V y VI se clasifican como sistemas de clase 2, caracterizados por un módulo efector más simplista compuesto por una proteína singular (Cas9, Cas12 y Cas13, respectivamente). Además, muchos genes Cas son comunes en múltiples tipos de sistemas (Cas1, Cas2, Cas6 o Cas4, entre otros), mientras que algunos genes son exclusivos de tipos específicos (proteína DinG en sistemas de tipo IV, Csn2 en sistemas de tipo II), en general el módulo La configuración de cada sistema CRISPR-Cas difiere según los tipos, como se observa anteriormente, lo que le da a cada uno sus propias características específicas.

evolucionado. El sistema de clase 1 consisten en un conjunto de complejos efectores con 4 a 7 proteínas Cas y por la presencia de la proteína Cas3 en cada uno de los subtipos (van der Oost y col., 2014). Al ser parte de la clase 1, dicho sistema está compuesto por múltiples componentes proteicos que se encargan de la escisión del material genético, en contraste con la relativa simplicidad y minimalismo que caracteriza a los sistemas clase 2 (Zheng y col., 2020).

De manera general cada sistema perteneciente a esta clasificación posee elementos característicos propios de todo sistema tales como el locus CRISPR, el cual a su vez contiene regiones codificantes al igual que protoespaciadores, esenciales para la generación del crARN, adicionalmente contiene proteínas Cas distintivas que diferencian a los sistemas tipo I y permiten su clasificación (Lander, 2016). Una vez codificada, la molécula guía de estos sistemas consta generalmente de un extremo 5' en forma de asa compuesto por 8-nt destinado a la unión de proteínas efectoras, seguido por una región variable complementaria al ADN foráneo o protoespaciador de 32-nt y alrededor de 20-nt en el extremo 3' de la molécula que forman una estructura tipo "hairpin" para facilitar la unión de proteínas del complejo cascada encargadas del procesamiento de pre-crARN (Chen y col., 2020).

El gen Cas3 es el componente más característico, este codifica una proteína de gran peso molecular perteneciente a la familia de las helicasas, con actividad ADNasa, que produce el desenrollamiento del fragmento de ADN blanco a través de la estimulación de una enzima ATPasa unida a duplas de ADN o bien de ARN-ADN y cuyos dominios nucleasa HD se encargan seguidamente de escindir la pieza de

material genético (Li y col., 2016; Makarova y col., 2018; Cameron y col., 2019). En adición a esta helicasa los sistemas tipo I se diferencian por la presencia de diferentes genes localizados generalmente en la periferia del operón CRISPR que provienen del módulo RAMP (*Repaire-Associated Mysterious Protein*) (Makarova y col., 2002), mas tarde *repeated associated mysterious protein* (Makarova y col., 2006) y que codifican una amplia y variada familia de proteínas denominadas RAMP (Makarova y col., 2011). Esta superfamilia incluye a proteínas como Cas5, Cas6 y Cas7, entre otras, las cuales forman parte del complejo "Cascada" de los sistemas clase 1. El complejo Cascada incluye una proteína RAMP con actividad endonucleasa que cataliza procesamiento del pre-crARN maduro (Brouns y col., 2008; Haurwitz y col., 2010). En la mayoría de los casos esta proteína RAMP es Cas6 o versiones Cas6e y Cas6f. Dada la gran diversidad estructural de las RAMP su funcionalidad varía, entre estas, es notable la acción catalítica ejercida por dichas proteínas en el proceso de síntesis y maduración del crARN (Koonin y col., 2017).

De esta forma, el sistema puede subdividirse en 7 categorías o subtipos según su mecanismo de escisión, arquitectura del complejo efector, así como las combinaciones específicas de genes distintivos ya que no puede un gen singular para cada clasificación (Koonin y col., 2017). Asimismo, cabe destacar la presencia de un operón individual en los subtipos el IC, ID, IE y IF, el cual contiene genes ubicuos en los sistemas CRISPR como Cas1 y Cas2, al igual que el gen distintivo del tipo I Cas3 y los genes que codificarán diferentes componentes del complejo Cascada. En contraste los subtipos IA y IB poseen alrededor de dos o más operones donde

se distribuyen los genes Cas (Makarova y Koonin, 2015).

Sistema CRISPR-Cas tipo III

Los sistemas tipo III poseen cierta similitud estructural con respecto a los sistemas tipo I, ambas moléculas están formadas principalmente por complejos efectores multiproteicos conocidos como "Cascada" y especializados en la escisión del material genético, así como por el crARN maduro cuya función invariable consiste en guiar complejos o unidades proteicas hacia la localización específica de las secuencias blanco. A pesar de estas similitudes fundamentales los sistemas I y III se diferencian en múltiples aspectos tanto mecánicos como estructurales (Whitaker y Vanderpool, 2016; Mulepati y col., 2014).

Por un lado, el locus CRISPR alberga protoespaciadores de longitudes variables (37-53 nt) los cuales se encuentran separados entre sí por secuencias cortas idénticas cuya extensión oscila entre los 24-48 nt (Hatoum-Aslan y col., 2014; Hrle y col., 2013; Staals y col., 2014). La transcripción de dicho locus genera uno de los elementos principales del sistema, conocido como crARN, este fragmento de ARN se caracteriza por contener la secuencia genética derivada de uno de los protoespaciadores contenidos en el locus CRISPR en el extremo 3' (Nickel y col., 2013; Behler y col., 2018). Mientras que el extremo 5' de esta molécula denominado "*psi-tag*" permite la discriminación entre el ADN o ARN del huésped y el invasor, evitando fenómenos autoinmunitarios potenciales gracias a la presencia de 8 nucleótidos provenientes de las repeticiones cortas del genoma huésped (Hrle y col., 2013).

Adyacente al locus CRISPR se localiza el operón de genes Cas, cuyos productos conformarían los complejos efectores que actuarán durante la fase de interferencia además de intervenir en diferentes procesos que permiten la acción del sistema (Samai y col., 2015). Si bien los sistemas tipo III se caracterizan por la presencia del gen Cas10 el cual se encuentra en todos los subtipos, existen diferencias en cuanto al resto de genes Cas que determinan la existencia de 2 subtipos (III-A, III-B). Aunque ciertas investigaciones recientes apuntan al descubrimiento de las variedades III-C y III-D, gran parte de la estructura y mecanismos de estos sistemas permanecen sin dilucidar (Kazlauskienė y col., 2016).

En lo referente al sistema III-A, ampliamente distribuido en bacterias y archaea, este se compone por la molécula de crARN maduro y un complejo RNP, conocido como Csm cuyo blanco es la hebra complementaria del ADN vírico durante la transcripción (Niewoehner y col., 2017). Este complejo efector está formado por 5 tipos de subunidades proteicas (Csm 1- Csm 5) y ocasionalmente una proteína adicional (Csx1/Csm 6) (Numata y col., 2015; Elmore y col., 2016). Análisis realizados mediante micrografías electrónicas han logrado la visualización del complejo, el cual se ha descrito como una estructura elongada por la presencia de dos filamentos entrecruzados que rodea el crARN, uno de los filamentos posee una longitud mayor y está compuesto por múltiples subunidades de la proteína Csm 4, la cual forma una especie de columna o esqueleto de ensamblaje para el complejo de manera similar a la proteína Cas7 en sistemas tipo I (Hale y col., 2009; Zhang y col., 2016). Por otro lado, el filamento de menor longitud está conformado por

subunidades de Csm 2, mientras que la base de la estructura, similar a un pie, se compone por subunidades Csm 1, también conocida como Cas10, finalmente el complejo está coronado por una cabeza conformada por múltiples Csm 5 (Cannone y col., 2013).

Al ser el único complejo cuyo mecanismo de acción no se ha visualizado *in vitro*, las acciones individuales de estas proteínas no se han dilucidado totalmente, sin embargo, estudios recientes indican que, por un lado subunidades como Csm 3, Csm 4, Csm 6 y Csm1 podrían estar directamente involucradas en la fase de interferencia a través de la escisión directa de la hebra complementaria del ADN, degradación del ARNm y actividad de ribonucleolítica, respectivamente (Numata y col., 2015). En adición a estas funciones, la subunidad Csm 3 y proteínas del complejo actúan durante el procesamiento del crARN, de esta forma Csm 3 en conjunto con Csm 2 y Csm 5 se encarga de promover la maduración de la molécula posterior a su unión con la misma mediante inserciones en el dominio RRM (RNA *Recognition Motif*), actuando como un medidor que regula la extensión del extremo 3' del crARN precursor (You y col., 2019).

A diferencia del sistema III-A el subtipo III-B se distingue por ser la única variedad con la capacidad de escindir fragmentos de ARN. El complejo efector, denominado Cmr posee cierta similitud estructural con el Csm, ambos complejos se unen a las moléculas de crARN maduro, poseen una configuración elongada y una subunidad grande con actividad nucleolítica (Cas10), denominada Cmr 2 en el caso de sistemas III-B; asimismo el complejo Cmr está conformado por 6 subunidades proteicas (Cmr 1-6) (Zhang y White, 2015). Múltiples subunidades Cmr

4 y Cmr 5 conforman el dúo de filamentos helicoidales que se dispone alrededor del crARN. Adicionalmente la cabeza de la estructura se compone por las proteínas Cmr 2 y Cmr 3, ubicadas en el extremo 5', mientras que las subunidades Cmr 1 y Cmr 6 se localizan en el extremo 3' (Cannone y col., 2013). Si bien la estructura de ambos complejos tiene cierto grado de homología el complejo Cmr se caracteriza por presentar una configuración más compacta, atribuible a la flexibilidad de los sustratos de ARN en contraste con la rigidez de la doble cadena de ADN (Tamulaitis y col., 2014).

Ciertas interrogantes persisten en cuanto al papel funcional individual de estas proteínas, sin embargo, investigaciones recientes apuntan al papel de Cmr 2, Cmr 3, Cmr 4 y Cmr 5 como moléculas necesarias para el procesamiento del crARN. Adicionalmente Cmr 4, al igual que otras subunidades como Cmr 1, Cmr 6 y Cmr 3, se han asociado al reconocimiento de las secuencias nucleotídicas por la presencia común de un pliegue de ferredoxina característico de la superfamilia de las RAMPs, conocido como RRM, el cual actúa de forma similar al PAM (Estrella y col., 2016). Finalmente, estudios *in vitro* han reportado las acciones de Cmr 2, Cmr 4, Cmr 1 y Cmr 6 en la captura y escisión del ARN blanco, mientras que Cmr 3 se encarga de reconocer el *psi-tag* del crARN, Cmr 4 produce la ruptura de la hebra complementaria, simultáneamente Cmr 1 en conjunto con Cmr 6 median interacciones entre el extremo 3' del crARN y el ARN blanco necesarias para la culminación exitosa de la interferencia (Hale y col., 2014).

Sistema CRISPR-Cas Tipo IV

El sistema CRISPR-Cas tipo IV es una variante minimalista dentro de la Clase

1 de sistemas CRISPR, cuya presencia es infrecuente y se limita a diferentes plásmidos o profagos contenidos en ciertos microorganismos bacterianos y especialmente en aquellos que pertenezcan a especies termofílicas (Faure y col., 2019a; Newire y col., 2020). Debido a su escasa ocurrencia y las numerosas diferencias filogenéticas que presenta con respecto al resto de los sistemas, las características mecánicas y estructurales del mismo no se han esclarecido en su totalidad, lo cual ha llevado a la formulación de hipótesis que proponen la existencia de funciones defectuosas o alteradas en sistemas tipo IV, orientadas al mantenimiento o movilidad de plásmidos en lugar de la defensa adaptativa tradicional (Crowley y col., 2019; Pinilla-Redondo y col., 2020).

La estructura general del sistema está compuesta por un crARN guía y el complejo RNP característico de los sistemas clase 1 (Newire y col., 2020; Özcan y col., 2019). Similar a otros tipos de sistemas la molécula de crARN contiene una etiqueta o *tag* de 7 nucleótidos en su extremo 5', mientras que en el extremo 3' posee una estructura cuya longitud oscila entre los 7-22 nucleótidos, denominada "*hairpin*" debido a la configuración que adquiere al rodear ciertos componentes proteicos del complejo efector (Özcan y col., 2019). En relación a las proteínas Cas, se cree que el complejo efector formado por estas moléculas se ensambla alrededor del crARN, adquiriendo una forma de medialuna y sus dimensiones son comparables a los complejos cascada de otros sistemas (Özcan y col., 2019).

Característicamente los sistemas tipo IV carecen del módulo de adaptación (Cas1 y Cas2), ubicuo en el resto de los sistemas CRISPR-Cas, así como de las proteínas Cas

involucradas en la unión y escisión del blanco (Cas3 y Cas10) (Koonin y Makarova, 2013; Makarova y col., 2017). Por otro lado, el complejo efector está conformado por una subunidad grande denominada Csf1 (Cas-8-like), la cual es considerada formalmente como la proteína distintiva de estos sistemas, no obstante, los niveles elevados de variabilidad de esta subunidad entre los subtipos y variantes ha generado controversias, en consecuencia, se ha propuesto como reemplazo la proteína Csf2 (Cas7) que actúa como una especie columna helical para el ensamblaje del complejo RNP. Finalmente, las subunidades Csf3 (Cas5) forman la cola del complejo (Taylor y col., 2019; Pinilla-Redondo y col., 2020).

Numerosas variaciones estructurales y génicas en este tipo de sistemas han originado la división del mismo en dos subtipos principales: IV-A y IV-B, subtipos secundarios (IV-C, IV-D, IV-E) sobre los cuales no existe información considerable y cuya clasificación no se ha oficializado por completo, así como múltiples subgrupos y variantes que difieren en cuanto a sus arreglos genéticos y orientación del loci Cas (Makarova y col., 2020; Newire y col., 2020). El subtipo IV-A se distingue por la presencia del gen DinG (o RECD en ciertas variantes) que codifica la proteína Csf4, esta actúa como una DEAH-box (*Asp-Glu-Ala-Asp, or DEAD in one-letter code*) helicasa al desacoplar la doble hélice de ácidos nucleicos utilizando energía proveniente de NTP (*nucleotide-triphosphate*, NTP). Adicionalmente, este subtipo contiene diferentes tipos de la proteína Cas6, tales como Cas6e, Cas6f y el subtipo específico del sistema IV-A, Csf5 (Voloshin y col., 2003; Voloshin y Camerini-Otero, 2007). Estas se disponen en el extremo 3' del crARN y su presencia sugiere que estos sistemas son

capaces de procesar su propio crARN a través escisiones mediadas por la acción nucleolítica de Cas 6 (Taylor y col., 2019).

Por último, el sistema IV-B posee una gran diversidad de clados arquitectónicamente similares, aunque filogenéticamente divergentes (Pinilla-Redondo y col., 2020). A diferencia del sistema IV-A, este subtipo no presenta la formación CRISPR adyacente al operón Cas, las subunidades Csf4 o Csf5, en su lugar el operón Cas contiene el gen CysH el cual codifica enzimas de la familia 5-adenosina-fosfosulfato reductasa (PAPS) o bien de la familia ADP-ribosiltransferasa, así como otras proteínas no identificadas que constituyen parte del módulo de transducción puesto que se les atribuyen funciones ancilares que vinculan el sistema CRISPR con redes reguladoras celulares (Faure, y col., 2019a; Makarova y col., 2020).

SISTEMAS CRISPR-CAS CLASE 2

Los sistemas pertenecientes a esta clase se caracterizan por presentar una estructura más simple en comparación a la Clase 1, por el contrario, los miembros de esta clase conformada por CRISPR-Cas tipo II, V y VI, poseen una proteína efectora individual encargada de la escisión de la secuencia de ácidos nucleicos en lugar de complejos multiproteicos (Tang y Fu, 2018).

Sistema CRISPR-Cas Tipo II

El sistema CRISPR-Cas tipo II es reconocido no sólo por el ser el modelo más ampliamente utilizado sino también por poseer una estructura minimalista en comparación con otros sistemas CRISPR (Lee y Bae, 2016). En este sentido los sistemas tipo II se distinguen en gran parte

por la presencia de la proteína Cas 9, la cual constituye el único elemento encargado de la escisión del ADN blanco y procesar el pre-crARN (Gong y col., 2018). El locus CRISPR en estos sistemas se caracteriza por presentar una secuencia líder con abundantes bases nitrogenadas de tipo adenina/timina y múltiples repeticiones en tándem de secuencias cortas que oscilan entre los 25-26 pb. Entre cada secuencia corta se encuentran fragmentos de ADN denominados "protoespaciadores" cuyas bases nitrogenadas son parcial o totalmente complementarias a una porción de "material genético móvil". De esta forma, cada uno de los fragmentos espaciadores proviene de encuentros con elementos génicos extraños y supone la base de la inmunidad adaptativa, así como el sistema de reconocimiento de los sistemas CRISPR (Nicholson y col., 2018).

Los diferentes componentes del locus CRISPR tipo II codifican elementos tales como el crARN, este tipo de ARN presente también en otros sistemas es producto de la transcripción de las secuencias protoespaciadores y tiene por función servir como guía para la maquinaria enzimática hacia el ADN blanco (Ipoutcha y col., 2019). Adicionalmente, el locus codifica otro elemento ribonucleico, el tracrARN responsable de la maduración del crARN y el silenciamiento génico, así como los loci de las proteínas Cas (Ran y col., 2015). El operón de los sistemas tipo II resulta mucho más simple en comparación con otros tipos de sistema, posee genes que codifican a las proteínas universales para los sistemas CRISPR, Cas1 y Cas2 al igual que proteínas distintivas como Cas9, Casn2 y Cas4 (Nishimasu y col., 2014).

Entre estos elementos la proteína Cas9 ejerce un papel clave en el sistema al actuar

de manera individual en la escisión de ácidos nucleicos (Lewis y Ke, 2017). Esta enzima pertenece a la familia de las endonucleasas y se presenta con frecuencia en bacterias, su tamaño es variable y similitud escasa con respecto a otros tipos de CRISPR-Cas. A pesar de esto, todas las Cas9 poseen una arquitectura bilobular común, el lóbulo de reconocimiento α -helical denominado REC y el lóbulo nucleasa o NUC (Wilkinson y col., 2019). A su vez el lóbulo de reconocimiento está compuesto por los dominios REC1 y REC2. Mientras que el lóbulo NUC está compuesto por los dominios NHN, RuvC y el dominio de reconocimiento PAM (Jiang y Doudna, 2015; Skeens y col., 2021). Los dominios NHN y RuvC se encargan de la escisión de la cadena del ADN blanco y la hebra complementaria, respectivamente, utilizando mecanismos catalíticos un-metal-ion en cuanto al dominio NHN y dos-metal-ion en el caso del segundo. Por otra parte, el dominio PAM cuya función consiste en el reconocimiento de la secuencia blanco se localiza en el extremo C del lóbulo NUC (Anders y col., 2014; Nishimasu y col., 2018).

Mas allá de las características comunes, los sistemas CRISPR-Cas tipo II presentan 3 subtipos: II-A, II-B y II-C, los cuales difieren entre sí en cuanto a dimensiones, longitud de repeticiones, orientación y composición del crARN (Fonfara y col., 2014). El subtipo II-A ha sido el más caracterizado en la actualidad gracias a su identificación en microorganismos como *Streptococcus pyogenes* (Spy), *Streptococcus thermophilus* (Sth), o *Staphylococcus aureus* (Meijers y col., 2020; Meshalkina y col., 2020; Sieber y col., 2020). Dichos estudios revelan un crARN de 36-nt de longitud, cuyo inicio o secuencia líder puede definirse con

facilidad gracias a la presencia de bases nitrogenadas degeneradas en el extremo final (Kim y col., 2019).

En lo referente a Cas9 esta puede subdividirse en dos variantes en los sistemas II-A, una corta con una longitud de 1100 aminoácidos de extensión y una larga de 1300 aminoácidos, la arquitectura tridimensional de la proteína corresponde a la estructura general de los sistemas CRISPR-Cas tipo II, no obstante existen variaciones, particularmente en cuanto dominio PI y lóbulo REC, lo cual podría explicar la existencia de diferentes secuencias PAM según el ortólogo específico de Cas9, el más común es la secuencia 5'-NGG-3' reconocida por el ortólogo SpyCas (Guo y col., 2019; Van Orden y col., 2020). Por el contrario, el dominio catalítico, así como el motivo BH (*Bridge Helix*) se encuentran altamente conservados en las diferentes variantes (Briner y Barrangou, 2016). Asimismo, el subtipo II-A se caracteriza por la presencia de la proteína Cns2, a la cual se le atribuyen funciones integradoras a través de su unión a los extremos de la doble cadena de ADN gracias a la formación "P-loop" ATPasa de la proteína capaz inactivar el sitio de unión a ATP para proteger los extremos del dsADN (Ka y col., 2018).

Por otro lado, los subtipos II-B y II-C no se han documentado de forma extensiva hasta la fecha. La longitud del crARN es variable y oscila entre los 36-nt típicos de sistemas tipo II hasta 47-nt, en cuanto a la orientación no puede identificarse mediante la presencia de bases nitrogenadas degeneradas por lo cual deben utilizarse métodos de secuenciación génica (R). El tamaño de Cas9 en estos subtipos es muy variable (1100-1600-nt aproximadamente) según la especie bacteriana (Chylinski y col., 2014).

Cada subtipo puede diferenciarse mediante la presencia o ausencia de ciertos elementos proteicos distintivos (Jiang y Doudna, 2017). De acuerdo a lo establecido previamente la proteína asociada Cns2 es el componente característico de los sistemas II-A y asimismo el sistema II-B cuenta con la presencia de Cas4 como producto distintivo, esta proteína pertenece a la familia de las nucleasas PDxK y su función en los mecanismo de acción de CRISPR-Cas9 no ha sido dilucidada por completo, sin embargo, se cree que esta podría desempeñar un papel importante en la inmunidad asociada a CRISPR-Cas (Shiimori y col., 2018). Finalmente, los sistemas II-C representan el subtipo más minimalista ya que su locus sólo contiene los genes de adaptación Cas1 y Cas2, así como el gen distintivo de los sistemas tipo II Cas9, sin proteínas adicionales asociadas (Mir y col., 2018).

Sistema CRISPR-Cas Tipo V

El sistema tipo V pertenece a la clase II de CRISPR-Cas, caracterizada por la presencia de una proteína efectora individual en lugar de un complejo multiproteico (Wang y col., 2020). En consecuencia, dicho sistema ha sido comparado con CRISPR-Cas9, especialmente en relación al potencial terapéutico de la proteína efectora distintiva Cas12, la cual posee ciertos rasgos tales como la escisión escalonada del fragmento de ADN blanco en contraposición a los cortes abruptos que realiza Cas9, niveles superiores de especificidad con respecto a dicha endonucleasa, así como la ausencia de tracrARN en algunos subtipos, lo cual supone un modelo más minimalista del complejo CRISPR-Cas, que podrían convertir este sistema en una herramienta comparable e inclusive superior al reconocido CRISPR-Cas9 (Dong y col., 2019).

Estructuralmente, los sistemas tipo V son complejos formados por una molécula individual o dual de ARN según el subtipo (Yu y Marchisio, 2020). La secuencia guía crARN se encuentra presente en todas las variedades del complejo y se asocia en algunos subtipos con una molécula de tracrARN que facilita el proceso de maduración de la secuencia guía, mientras que en otros subtipos es notoria la ausencia del mismo. Adicionalmente, las moléculas de ARN se unen a la proteína Cas12, ésta al igual que el resto de las proteínas efectoras clase II presenta una arquitectura bilobulada compuesta por un lóbulo de reconocimiento (lóbulo REC) y un lóbulo nucleasa (lóbulo NUC) el cual posee un dominio Ruv C-like que diferencia este tipo de sistemas de otros integrantes de la clase II; finalmente ambos lóbulos se unen mediante el motivo BH (*bridge helix*), originando una estructura similar a la pinza de un cangrejo, cuya cavidad central aloja el fragmento de ADN blanco durante la fase de interferencia (Liu y col., 2020; Phan y col., 2019; Stella y col., 2017; Yan y col., 2019). Mas allá de estas similitudes, los sistemas tipo V ostentan múltiples diferencias estructurales que han llevado a la clasificación y reconocimiento de 4 subtipos: V-A, V-B, V-C y V-U. Entre los cuales destacan V-A y V-B, debido a la ausencia de información tanto estructural como mecánica de los dos últimos. Asimismo, algunos estudios han reportado la existencia de inclusive 10 subtipos diferentes desde el V-A hasta el subtipo V-K (Paul y Montoya, 2020).

No obstante, el subtipo más estudiado hasta la fecha es el V-A, identificado por primera vez en *Francisella novicida* (Bayat y col., 2018). Este complejo binario está conformado por un crARN guía transcrito a partir de dos porciones de repeticiones y una secuencia espaciadora, el cual

reconoce secuencias PAM ricas en timina, 5" TTTV 3", donde V representa cualquier base nitrogenada diferente a la timina, marcando así otra de las diferencias que distinguen no sólo el subtipo V-A sino todos los sistemas V, puesto que otros sistemas CRISPR reconocen secuencias PAM ricas en guanina (Faure y col., 2019a). Por otro lado, se ha identificado que el crARN posee una longitud y complejidad menores (42-44 nucleótidos) en comparación a otros sistemas clase II lo cual podría atribuirse parcialmente a la ausencia del tracrARN, pues en este subtipo la proteína efectora Cpf1 o Cas12a actúa como una ADNsa así como ARNsa procesando su propio crARN de acuerdo a las características estructurales y secuencia específica del mismo, originando una molécula compuesta por una región en forma de asa o "pseudonudo" en el extremo 5' (20 nucleótidos) y una región guía variable y complementaria al fragmento de ADN blanco (23 nucleótidos) en el extremo 3' (Fonfara y col., 2016; Li y col., 2017; Stella y col., 2018; Zhang y col., 2019; Li y col., 2020).

El otro componente del dúo CRISPR-Cas12a, es la proteína distintiva del subtipo V-A, Cas12a (Cpf1), se presume que tanto Cas12a como Cas9 han evolucionado a partir de un ancestro común, explicándose la similitud estructural y funcional con respecto a otras endonucleasas clase II (Murugan y col., 2020; Li y col., 2021; Vlot y col., 2018). Cpf1 es una proteína monomérica de arquitectura bilobulada, conformada por los lóbulos α -REC y NUC, unidos a través del motivo BH ubicado en el lóbulo NUC (Zhang y col., 2019). Por un lado, el lóbulo de reconocimiento está formado por los dominios REC 1 y REC 2 localizados en el extremo amino terminal de la molécula, mientras que el lóbulo

nucleasa posee los dominios Ruv-C like, PI (PAM interacting), WED y un lóbulo Nuc no identificado (Liu y col., 2017). La existencia de un dominio Ruv-C-like dividido en tres regiones discontinuas al cual se le atribuye la actividad nucleolítica, en lugar de dos, se ha señalado como una característica distintiva de los sistemas tipo V y el subtipo V-A no es la excepción. Se ha sugerido el papel potencial del dominio Nuc no identificado como el segundo dominio efector, sin embargo, dicha hipótesis no ha sido constatada hasta la fecha (Safari y col., 2019; van Aelst y col., 2019). Asimismo, el dominio PI se encarga del reconocimiento de la secuencia PAM, por su parte, el sub-dominio WED-III perteneciente a WED posee actividad ARNasa necesaria la biogénesis del pre-crARN (Paul y Montoya, 2020; Zhang y col., 2019).

De manera similar a otras proteínas efectoras Cpf1 modifica su arquitectura luego de unirse al crARN, pasando de tener una configuración dinámica a una estructura más compacta y triangular, mediante la formación de puentes entre los residuos Arg883 y Arg887 del motivo BH y Glu939 de la región superior de la molécula, lo cual facilita la transición del residuo catalítico Glu925 de cerrado hacia abierto, permitiendo el alojamiento del ADN blanco en la hendidura delimitada por los dominios REC, Ruv-C-like y WED, así como su posterior escisión, la cual a diferencia de sistemas tipo II suele efectuarse de manera gradual o escalonada, dejando un *overhang* de 4-5 nucleótidos distal al PAM (Kim y col., 2020).

Por otra parte, el subtipo V-B es una variedad conformada por la secuencia guía de crARN y la proteína efectora Cas12b, previamente conocida como C2c1 (Stella y col., 2017). Este sistema

posee similitudes con V-A en cuanto a la ausencia del dominio NHN, escisión escalonada de ácidos nucleicos, así como el reconocimiento de secuencias ricas en timina presentes en el PAM. Sin embargo existen ciertas diferencias fundamentales en cuanto al locus CRISPR, este no sólo codifica una secuencia de ARN guía similar a la molécula empleada por el subtipo V-A, sino que también un tracrARN formado por dos secuencias discontinuas que contiene antirrepeticiones en su extremo 3' (Faure y col., 2019b). Los productos ribonucleicos del locus se ensamblan entre sí para luego unirse a Cas12b creando una estructura tetrahelical donde el crARN se localiza en el canal central de C2c1, mientras que el tracrARN reside en la superficie del complejo (Liu y col., 2017).

Con respecto a Cas12b, esta es una proteína de naturaleza monomérica y la arquitectura bilobulada típica de las proteínas clase 2, comparable a la tenaza de un cangrejo (Yang y col., 2016). Al igual que otras proteínas efectoras Cas12b, está constituida por el lóbulo de reconocimiento o REC y el lóbulo efector o NUC (Teng y col., 2018). Por un lado, el lóbulo REC está constituido por el dominio Rec1 o helical I, el cual consiste en 11-14 α -hélices dispuestas en forma de mancuerna, donde cada extremo abultado o "bundle" α -helical contiene 5 α -hélices, vinculándose entre sí gracias a una α -hélice larga próxima al dominio PI, la cual discurre entre la parte proximal del dominio hasta la distal (Yang y col., 2016). El dominio Rec2 (helical II), situado en el mismo lóbulo, está conformado por 6 α -hélices e interactúa con regiones distales de PI. El motivo BH, está localizado entre la hélice α 1 y hélice α 2 del dominio helical II, lo cual establece una diferencia estructural con respecto a la

disposición de dicha secuencia en Cpf1. En contraste, el dominio OBD (*Origin Binding Domain*) compuesto por 9 β -láminas y 2 α -hélices es similar a su contraparte en Cas12a (Yang y col., 2016).

El lóbulo NUC de la proteína se ubica en el extremo C-terminal y contiene dos regiones Nuc separadas por el motivo RuvC III, la región Nuc1 posee una configuración similar a un barril formado por 5 β -láminas y rodeado por 3 α -hélices (Yan y col., 2019). Por su parte, la región Nuc2 contiene 3 β -láminas y un 6 α -hélices. El dominio efector Ruv-c-like posee 8 β -láminas, entre las cuales β -7 y β -8 conforman un β -*hairpin* similar a la estructura presente en Cpf1, así como 6 α -hélices (Wu y col., 2017).

Sistema CRISPR-Cas tipo VI

Los sistemas CRISPR-Cas tipo VI se distinguen por ser el único tipo cuya función está destinada específicamente al reconocimiento y escisión de ARN (Jing y col., 2018). Al igual que otros sistemas clase II, CRISPR VI es un complejo binario conformado por un crARN guía y una proteína efectora distintiva denominada Cas13 (Lin y col., 2020). Adicionalmente, el complejo se caracteriza por la presencia de proteínas accesorias las cuales no pueden ser clasificadas como proteínas Cas y cuyas funciones moduladoras tienen la facultad de potenciar o inhibir la fase de interferencia (Smargon y col., 2017).

La molécula guía del sistema está constituida por una repetición directa (DR) e invariable, presente en todos los sistemas tipo VI, así como una región guía variable o sgARN flanqueada bilateralmente por repeticiones cortas que contiene la secuencia del protoespaciador en cuestión (Wessels y col., 2020). Es notable en estos

sistemas la ausencia general del módulo de adaptación conformado por Cas1 y Cas2; sin embargo, ciertos estudios han comprobado la presencia de dichos módulos en diferentes subtipos, en consecuencia, se presume que estos sistemas obtienen sus protoespaciadores a partir de otros locus CRISPR situados en el mismo genoma o bien que los mismos han perdido la capacidad de adaptación y por lo tanto no pueden adquirir nuevos protoespaciadores (O'Connell, 2019).

Por otra parte, la proteína efectora Cas13 se caracteriza por tener dimensiones notablemente menores en comparación a sus contrapartes en sistemas CRISPR-Cas tipo II o tipo V, no obstante, su arquitectura general coincide con el resto de las proteínas efectoras al tener una configuración bilobulada, formada por los lóbulos REC y NUC (O'Connell, 2019). De esta forma, el lóbulo de reconocimiento contiene el dominio N-Terminal (NTD), el dominio Helical I y un fragmento del dominio HEPN1, mientras que el lóbulo NUC está conformado por el fragmento restante de HEPN1, el dominio Helical II y el segundo dominio efector HEPN2 (Koner mann y col., 2018). En relación a la acción ribonucleolítica de Cas13 los dominios HEPN (HEPN *domain*, *higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain*) son especialmente relevantes ya que éstos se encargan de las actividad ARNsa del complejo (East-Seletsky y col., 2017). Por un lado, uno de los centros activos lleva a cabo el procesamiento del pre-crARN, lo cual explica la ausencia de tracrARN en estos sistemas, y por otro, el centro activo restante realiza la escisión del material genético (Toro y col., 2019). Curiosamente, Cas13 ejecuta estas escisiones de manera específica (cis)

al eliminar el fragmento de ARN blanco, pero también escinde el material genético adyacente a estas secuencias (trans), induciendo de esta forma la activación de vías apoptóticas o promotores del fenotipo senescente como medio de defensa contra la acción de bacteriófagos (Meeske y col., 2020).

Según las características filogenéticas del complejo, la estructura de Cas13 y la presencia de ciertas proteínas asociadas los sistemas tipo VI pueden dividirse en 4 subtipos: VI-A, VI-B, VI-C y VI-D (Lin y col., 2020). De los cuales, VI-A, VI-B y VI-D poseen una caracterización estructural y funcional más amplia (Yin y col., 2020). El subtipo VI-A, identificado inicialmente en *Leptotrichia shahii* posee las características convencionales del sistema VI, tales como la escisión cis/trans del ARN blanco, el par de dominios catalíticos HEPN y ausencia de tracrARN (Watanabe y col., 2019).

Adicionalmente el componente ribonucleico de este subtipo contiene 41-51 nucleótidos aproximadamente, de los cuales, 28 forman parte del extremo 5' de la molécula, adoptando forma de pseudonudo o *hairpin*, estructura descrita por otros autores como un tallo de 5-6 nucleótidos de longitud interrumpido por un bulbo invariante de dos nucleótidos con la secuencia AC o AA, que podría adoptar una configuración de hebra en algunas especies, asimismo algunos homólogos de VI-A presentan un lazo de 7-9 nucleótidos de longitud (Meeske y col., 2020; O'Connell, 2019).

Cas13a corresponde a la estructura general planteada para la proteína Cas13, ya que posee la típica arquitectura bilobular que deriva de la presencia de los lóbulos NUC y REC, los cuales se localizan en los

extremos C-terminal y N-terminal de la molécula, respectivamente (Aman y col., 2018). Mediante técnicas como SAD (*Single Anomalous Dispersion*) y Cryo-EM (*Cryogenic electron microscopy*) se ha determinado la naturaleza predominantemente α -helical de la molécula, visualizándose 6 dominios, de los cuales el dominio NTD, helical I y la porción N-terminal de HEPN1 forman el lóbulo REC, mientras que los dominios helical II, helical III, el fragmento C-terminal de HEPN1 y HEPN2 conforman el lóbulo NUC (Liu y col., 2017). Ambos lóbulos, así como los dominios que contienen se disponen alrededor del crARN, alojando la molécula en el interior de un canal central, positivamente cargado, dentro del cual el extremo 5' del crARN se une a los dominios NTD y helical I, a su vez el extremo 3' reside en el interior del lóbulo NUC, proporcionándole a la proteína una configuración general en forma de U donde los dominios catalíticos HEPN se ubican en la superficie del complejo (Knott y col., 2017).

Por su lado, el subtipo VI-B presenta un crARN cuya longitud de 41 nucleótidos es similar a aquella presentada por VI-A, sin embargo, los DR de estas moléculas suelen ser más largos, abarcando alrededor de 36 nucleótidos y dando lugar a una región guía corta de unos 5 nucleótidos aproximadamente (O'Connell, 2019). Los detalles estructurales de esta molécula no se conocen, no obstante, análisis de predicción indican que las regiones DR extensas con secuencias complementarias 5'-GUUG y CAAC-3' podrían estar acompañadas por secuencias irregulares sin emparejar, formaciones abultadas y zonas en forma de nudo o lazo en forma de U en el extremo 3' (Smargon y col., 2017).

En relación a Cas13b, esta variante parece ser más robusta en comparación a otros subtipos, su constitución general se caracteriza por la presencia de los lóbulos NUC y REC, así como 5' dominios contenidos en dichos lóbulos (Cui y col., 2020). Similar a Cas13a este subtipo posee dos dominios HEPN (HEPN1 y HEPN2), dos dominios helicales (helical I y helical II) y finalmente un dominio de interacción con la proteína lamina (LID, *Lamin Interaction Domain*), adyacente al extremo 3' del crARN (Slaymaker y col., 2019). Los dominios HEPN son principalmente α -helicales, ya que HEPN1 está formado por 12 α -hélices conectadas entre sí mediante lazos flexibles y vinculado a Helical-I mediante un motivo altamente conservado denominado IDL (enlace entre dominios), HEPN2 está compuesto por 9 α -hélices, múltiples β -láminas, así como un β -*hairpin* con residuos cargados orientados en dirección al sitio activo de la proteína. Estos dominios se superponen, HEPN2 sobre HEPN1, de tal forma que los residuos activos R0168, N1069, H1073, R156, N157 y H161 se ensamblan en los sitios catalíticos de los dominios efectores (Slaymaker y col., 2019).

Asimismo, el dominio helical-II está formado por 11 α -hélices y se conecta a los dominios LID mediante el β -*hairpin* y HEPN (Wang y col., 2020). El dominio LID posee una estructura tanto helical como β , obtiene un nombre a partir de la estructura ubicada en el extremo 3' y formada por 2 β -*hairpins* que contactan con el lazo de ARN y helical-I, formando una especie de tapa para el extremo 3' del crARN y un canal lateral entre el lazo del extremo 3' y los dos HEPN (Bandaru y col., 2020).

Adicionalmente, los sistemas VI-B se caracterizan por la presencia de proteínas

asociadas que dividen este subtipo en dos variantes: VI-B1 y VI-B2 principalmente. La variante VI-B1 se asocia Csx27, una proteína transmembrana presente en la mayoría de estos complejos y cuya función se cree que consiste en la represión de las actividades efectoras durante la fase de interferencia a través de la degradación de transcritos de ARN foráneo (Makarova y col., 2019). En contraste, Csx28 es un componente anciliar proteico, perteneciente a la misma familia de proteínas transmembrana, este se encuentra presente en las variantes VI-B2 y posee facultades que potencian las acciones nucleolíticas durante la fase de interferencia (Smargon, 2018).

Por último, el sistema VI-D localizado principalmente en especies bacterianas como *Eubacterium* y *Ruminococcus* sp. es el subtipo más pequeño con una estructura proteica conformada por unos 190-300 aminoácidos aproximadamente, lo cual represente dimensiones entre un 20-30% menores a otros subtipos, en adición a esto dichos sistemas no poseen estrecha homología con otros subtipos (Zhang y col., 2018). El componente guía de VI-D tiene un longitud que varía entre los 30-52 nucleótidos, de los cuales 8-10 nt pertenecen al tallo de la molécula ubicado en el extremo 3' conformado por DRs e interrumpido por una formación abultada (2 nt) seguida por un lazo (4-6 nt) y una región guía variable de 5-10 nt en el extremo 5' (O'Connell, 2019).

En referencia a la proteína efectora Cas13d, ésta posee una arquitectura bilobular gracias a la presencia de los lóbulos NUC y REC, así como 5 dominios que se disponen alrededor del crARN: NTD, HEPN1, HEPN2, RHH, HTH y helical-II (Yan y col., 2018). La mayoría de los dominios son de naturaleza α -helical a excepción de NTD

y la estructura general se asemeja a una pinza semi-abierta que aloja el crARN en su centro (Zhang y col., 2018). Al igual que VI-B este subtipo exhibe una proteína accesoria, este componente proteico, denominado WYL (designado así debido a la presencia de una secuencia conservada Trp-Tyr-Leu), se ha relacionado a sistemas defensores en organismos procariontes y para algunos es considerado un dominio putativo de Cas13d más que un componente aislado de la proteína y cuya finalidad es la regulación de la actividad efectora, mediante la potenciación de Cas13d de manera dosis dependiente (Zhang y col., 2019).

Consideraciones finales

Como se comentó previamente, el sistema CRISPR-Cas constituye un sistema de defensa de arqueas y bacterias. Este sistema permite cortar secuencias conocidas de ADN y ARN que provienen de virus y plásmidos y así evitar la infección. Esta capacidad para cortar ADN y ARN es lo que ha permitido ampliar el arsenal de herramientas disponibles para el diagnóstico de enfermedades en seres humanos y animales, pero su principal y más emocionante aplicación es la edición génica (Reyes Mata y col., 2023).

De las proteínas Cas que se han adaptado a aplicaciones en la ciencia, la Cas9 es la más utilizada para edición genética. CRISPR-Cas9 es una herramienta más versátil que TALEN y ZNF, ya que permite modificar de forma eficiente y económica líneas celulares animales, plantas y parásitos. Esta versatilidad ha permitido la creación de modelos animales *knock out* (animales a los cuales se les bloquea la función específica de un gen modificando la secuencia de ADN de dicho gen) y plantas

genéticamente modificadas, y en el área médica ha revolucionado el tratamiento de enfermedades hematológicas y cáncer (Gupta y col., 2019).

La edición génica con CRISPR-Cas9 ha tenido un rápido avance en aplicaciones médicas y actualmente se ha empleado *ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo del paciente, para tratar enfermedades. En septiembre de 2023, en la base de datos *Clinical Trials* se tienen registrados 51 ensayos clínicos en diversas fases (I a III) utilizando esta tecnología para tratar diversas enfermedades, como infección por VIH, mieloma múltiple, betatalasemia, carcinoma renal, enfermedad de células falciformes, tumores sólidos de comportamiento carcinoma, COVID-19 y leucemias. Estas aplicaciones abarcan desde la corrección génica en precursores hematopoyéticos en betatalasemia, la terapia celular Car-t, y las células pancreáticas autólogas, hasta variantes de terapia génica que emplean vectores adenovirales o microesferas, para el transporte de la tecnología CRISPR/Cas (NIH - ClinicalTrials.gov, 2023). La primera enfermedad en ser tratada con la tecnología CRISPR-Cas9 fue la anemia de células falciformes. La anemia de células falciformes es una enfermedad monogénica que causa anemia, dolor y daño orgánico debido a cambios en un nucleótido en el gen de la β -globina. La técnica implica la edición genética de precursores hematopoyéticos del paciente, donde se transfiere el gen sano mediante CRISPR-Cas9 y se verifica la correcta inserción y viabilidad de las células editadas antes de ser trasplantadas nuevamente al paciente. Este enfoque autólogo fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2021 como tratamiento curativo para la anemia de células falciformes, ofreciendo una alternativa a los trasplantes de donantes

relacionados, que son limitados a un 15 % de pacientes debido a la baja compatibilidad (Frangoul y col., 2021; Ma y col., 2023; Park y Bao, 2021). La aproximación del tratamiento de células *ex vivo* está siendo estudiada en otras enfermedades hematológicas monogénicas, como la β -talasemia (Mohammadian Gol y col., 2023), así como para el trasplante de células β de páncreas diferenciadas *in vitro* a partir de células precursoras aisladas de islote pancreático en pacientes con diabetes mellitus (Maxwell y Millman, 2021) y en lesiones corneales por herpes virus (Li y col., 2022).

La terapia inmunológica del cáncer también se ha visto revolucionada por CRISPR-Cas9. La terapia Car-t (por sus siglas en inglés, *Chimeric Antigen Receptor - T-cell therapy*). La terapia Car-t consiste en adquirir linfocitos T del propio paciente, modificar *ex vivo* su receptor antigénico y posteriormente infundirlos en la circulación del paciente, o bien, obtener donantes compatibles con el paciente para la obtención de los linfocitos T (Khan y Sarkar, 2022). Una aplicación muy interesante ha sido en el tratamiento contra el cáncer, sin embargo, tiene muchos efectos adversos a lo largo de los linfocitos T para favorecer la expresión de citocinas que ayuden a reducir o eliminar el tumor. Para la cuarta generación de linfocitos Car-t se ha usado ingeniería genética para su modificación. A partir de 2017, se ha utilizado CRISPR-Cas9 para modificar el receptor de células T, bloquear señales supresoras y favorecer la expresión de interleucinas (IL) 12, 18 y 15 que favorecen la actividad antitumoral (Khan y Sarkar, 2022).

Hasta ahora no existen tratamientos aprobados con aplicación *in vivo*, es decir, directamente en el paciente. Si bien se

ha propuesto transpolar algunas técnicas usadas en terapia génica, como los vectores adenovirales o liposomas, actualmente el uso clínico del sistema CRISPR-Cas9 está limitado a la optimización de la terapia celular (Zhang y col., 2021). Sin embargo, ya hay estudios en fase clínica de enfermedades oculares para la aplicación directamente de CRISPR-Cas.

La edición genética con fines médicos está en constante crecimiento y sus aplicaciones se están diversificando. Su potencial para mejorar la calidad de vida y la salud de las personas es innegable. Sin embargo, hay que tener muy claros los límites éticos de su uso y las limitaciones de esta tecnología (Reyes Mata y col., 2023).

Conclusiones

En las últimas décadas las tecnologías de edición génica se han convertido en una alternativa viable para el tratamiento de múltiples patologías y particularmente los sistemas CRISPR-Cas han revolucionado el campo de la genética gracias no sólo a su especificidad y eficacia en comparación a tecnologías anteriores sino también su relativa simplicidad, haciéndola una opción terapéutica más accesible, rápida y eficaz para la población general. No obstante, el conocimiento actual sobre estos sistemas aún es incipiente, la vasta cantidad de variaciones tanto funcionales como estructurales del locus CRISPR y sus proteínas asociadas ha generado constante descubrimientos en los últimos tiempos y dichos avances están lejos de terminar. Por el contrario, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos elementos que permitan la comprensión de estos sistemas en su totalidad, así

como esclarecer la información sobre los componentes existentes y sus mecanismos de acción para lograr avances significativos que permitan hacer de CRISPR-Cas una herramienta terapéutica estándar en numerosas enfermedades crónicas de origen genético.

Lista de Abreviaturas

- CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease
- ZFN: Zinc Finger Nucleases
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- SRSR: Repeticiones Cortas Espaciadas Regularmente
- ARN: ácido ribonucleico
- crARN: CRISPR ARN
- NUC Lobe: Nuclease Lobe
- REC: Recognition Lobe
- RNP: Ribonucleoprotein Particle
- tracrARN: Trans-Activating crARN
- CTD: C-terminal Domain
- PAM: Protospacer Adjacent *Motif*
- RRM: ARN Recognition *Motif*
- RAMP: *Repair-Associated Mysterious Protein*
- mARN: ARN mensajero
- PAPS: 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

- PI Domain: PAM *Interacting Domain* Adli M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications* 9(1): 1911.
- BH: Bridge Helix Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M. 2018. ARN virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biology* 19(1):1.
- dsDNA: Double Strand DNA
- HEPN Domain: Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-Binding Domain Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513(7519): 569–573.
- NTD: N-Terminal Domain Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. 2015. *Biotechnology*. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science (New York, N.Y.)* 348(6230):36–38.
- RHH: Ribbon-Helix-Helix
- HTH: Helix-Turn-Helix Domain
- MGE: Mobile Genome Express Bandar S, Tsuji MH, Shimizu Y, Usami K, Lee S, Takei NK, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T, Ito T. 2020. Structure-based design of gARN for Cas13. *Scientific Reports* 10(1):11610.
- ssDNA: Single-Stranded DNA
- IHF: Integration-Host Factor Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)* 315(5819):1709-1712.
- ATP: Adenosine Triphosphate Bayat H, Modarressi MH, Rahimpour A. 2018. The Conspicuity of CRISPR-Cpf1 System as a Significant Breakthrough in Genome Editing. *Current Microbiology* 75(1):107–115.
- ABE: Adenine Base Editors Behler J, Sharma K, Reimann V, Wilde A, Urlaub H, Hess WR. 2018. The host-encoded RNase E endonuclease as the crARN maturation enzyme in a CRISPR-Cas subtype III-Bv system. *Nature Microbiology* 3(3): 367-377.
- CBE: Cytidine Base Editors Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(Pt 8): 2551-2561.
- pegARN: Prime Editing Guide ARN Briner AE, Barrangou R. 2016. Guide ARNs: A Glimpse at the Sequences that Drive CRISPR-Cas Systems. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(7).
- CRISPRi: CRISPR Interference Brokowski C. 2018. Do CRISPR Germline Ethics Statements Cut It? *The CRISPR JouARNI* 1: 115–125.
- CRISPRa: CRISPR Activation Brokowski C, Adli M. 2020. Ethical Considerations in Therapeutic Clinical Trials Involving Novel Human Germline-Editing Technology. *The CRISPR J* 3(1): 18-26.
- DNMT3A: DNA Methyltransferase 3 Alpha Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ,
- TET: Ten-Eleven Translocation
- ChyMeRa: Cas Hybrid for Multiplexed Editing and Screening Application

Referencias Bibliográficas

2016 Canada Gairdner Award winners. 2016. Gairdner Foundation. CRISPR-CAS and HIV/AIDS Researchers Recognized. <https://gairdner.org/2016-canada-gairdner-award-winners/?lang=fr>

- Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. 2008. Small CRISPR ARNs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 321(5891):960-964.
- Cameron P, Coons MM, Klompe SE, Lied AM, Smith SC, Vidal B, Donohoue PD, Rotstein T, Kohrs BW, Nyer DB, Kennedy R, Banh LM, Williams C, Toh MS, Irby MJ, Edwards LS, Lin C-H, Owen ALG, Künne T, van der Oost J, Brouns SJJ, Slorach EM, Fuller CK, Gradia S, Kanner SB, May AP, Sternberg SH. 2019. Harnessing type I CRISPR-Cas systems for genome engineering in human cells. *Nature Biotechnology* 37(12):1471-1477.
- Cannone G, Webber-Birungi M, Spagnolo L. 2013. Electron microscopy studies of Type III CRISPR machines in *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical Society Transactions* 41(6):1427-1430.
- Check E. 2002. It was a tragic setback. *Nature* 420(6912): 116-118.
- Chen H, Choi J, Bailey S. 2014. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 ARN-guided endonuclease. *J Biol Chem* 289(19):13284-13294.
- Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70:667-697.
- Chen Y, Liu J, Zhi, Zheng, Q, Ma W, Huang J, Liu Y, Liu D, Liang P, Songyang Z. 2020. Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional activation tool in human cells. *Nature Communications* 11(1):3136.
- Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. 2014. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42(10): 6091-6105.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)* 339(6121): 819-823.
- Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. 2015. Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nature Medicine* 21(2): 121-131.
- Crowley VM, Catching A, Taylor HN, Borges AL, Metcalf J, Bondy-Denomy J, Jackson RN. 2019. A Type IV-A CRISPR-Cas System in *Pseudomonas aeruginosa* Mediates ARN-Guided Plasmid Interference *in vivo*. *The CRISPRJ* 2(6): 434-440.
- Cui J, Techakriengkrai N, Nedumpun T, Suradhat S. 2020. Abrogation of PRRSV infectivity by CRISPR-Cas13b-mediated viral ARN cleavage in mammalian cells. *Scientific Reports* 10(1): 9617.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR ARN maturation by trans-encoded small ARN and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602-607.
- Dong L, Guan X, Li N, Zhang F, Zhu Y, Ren K, Yu L, Zhou F, Han Z, Gao N, Huang Z. 2019. An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 26(4):308-314.
- East-Seletsky A, O'Connell MR, Burstein D, Knott G., Doudna JA. 2017. ARN Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes. *Molecular Cell* 66(3):373-383.e3.
- Elmore JR, Sheppard NF, Ramia N, Deighan T, Li H, Terns RM, Terns MP. 2016. Bipartite recognition of target ARNs activates DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas system. *Genes & Development* 30(4):447-459.
- Estrella MA, Kuo F-T, Bailey S. 2016. ARN-activated DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes & Development* 30(4), 460-470.
- Faure G, Makarova KS, Koonin EV. 2019a. CRISPR-Cas: Complex Functional Networks and Multiple Roles beyond Adaptive Immunity. *J Molecular Biology* 431(1):3-20.
- Faure G, Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Crawley AB, Barrangou R, Koonin EV. 2019b. Comparative genomics and evolution of trans-activating ARNs in Class 2 CRISPR-Cas systems. *ARN Biology* 16(4):435-448.
- Fellmann C, Gowen BG, Lin P-C, Doudna JA, Corn JE. 2017. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery* 16(2):89-100.
- Ferdosi SR, Ewaisha R, Moghadam F, Krishna S, Park JG, Ebrahimkhani MR, Kiani S, Anderson KS. 2019. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. *Nature Communications* 10(1):1842.
- Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lécivain A-L, Bzdrenga J, Koonin EV, Charpentier E. 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-ARN and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42(4):2577-2590.
- Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. 2016. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR ARN. *Nature* 532(7600):517-521.
- Foster AJ, Martin-Urdiroz M, Yan X, Wright HS, Soanes DM, Talbot NJ. 2018. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and

- counterselection in the rice blast fungus—*Scientific Reports* 8(1):14355.
- Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, Foell J, de la Fuente J, Grupp S, Handgretinger R, Ho TW, Kattamis A, Kernytsky A, Lekstrom-Himes J, Li AM, Locatelli F, Mapara MY, de Montalembert M, Rondelli D, Sharma A, Sujit Sheth, Soni S, Steinberg MH, Wall D, Yen A, Corbacioglu S. 2021. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England Journal of Medicine* 384(3):252-260.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468(7320):67-71.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9-crARN ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(39):E2579-2586.
- Gong S, Yu HH, Johnson KA, Taylor DW. 2018. DNA Unwinding Is the Primary Determinant of CRISPR-Cas9 Activity. *Cell Reports* 22(2):359-371.
- Guo M, Ren K, Zhu Y, Tang Z, Wang Y, Zhang B, Huang Z. 2019. Structural insights into a high-fidelity variant of SpCas9. *Cell Research* 29(3):183-192.
- Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, Kazi TA, Gupta R, Sinharoy S, Acharya K, Chattopadhyay D, Ravichandiran V, Roy S, Ghosh D. 2019. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences* 232:116636.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1(6):e60.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. 2009. ARN-Guided ARN Cleavage by a CRISPR ARN-Cas Protein Complex. *Cell* 139(5):945-956.
- Hale CR, Cocozaki A, Li H, Terns RM, Terns MP. 2014. Target ARN capture and cleavage by the Cmr type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes & Development* 28(21):2432-2443.
- Hatoum-Aslan A, Maniv I, Samai P, Marraffini LA. 2014. Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system. *J Bacteriology* 196(2):310-317.
- Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329: 1355-1358.
- Hrle A, Su AA, Ebert J, Benda C, Randau L, Conti E. 2013. Structure and ARN-binding properties of the Type III-A CRISPR-associated protein Csm3. *ARN Biology* 10(11):1670-1678.
- Huang C-H, Lee K-C, Doudna JA. 2018. Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection. *Trends in Cancer* 4(7):499-512.
- Institut de Recherches InteARNtionales Servier. 2021. Long-term Follow-up Study of Patients Who Have Previously Been Exposed to UCART19 (Allogeneic Engineered T-cells Expressing a Lentiviral-based Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor) (Clinical trial registration NCT02735083). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02735083](https://clinicaltrials.gov/show/NCT02735083)
- Ipoutcha T, Tsarmpopoulos I, Talenton V, Gaspin C, Moisan A, Walker CA, Brownlie J, Blanchard A, Thebault P, Sirand-Pugnet P. 2019. Multiple Origins and Specific Evolution of CRISPR/Cas9 Systems in Minimal Bacteria (Mollicutes). *Frontiers in Microbiology* 10:2701.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriology* 169(12):5429-5433.
- Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6):1565-1575.
- Jiang F, Doudna JA. 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology* 30:100-111.
- Jiang F, Doudna JA. 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46:505-529.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-ARN-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816-821.
- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavaronen AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal ARN-mediated conformational activation. *Science* 343(6176):1247997.
- Jing X, Xie B, Chen L, Zhang N, Jiang Y, Qin H, Wang H, Hao P, Yang S, Li X. 2018. Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and

- its repurposing for precise ARN editing. *Nucleic Acids Research* 46(15):e90.
- Ka D, Jang DM, Han BW, Bae E. 2018. Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Research* 46(18):9805-9815.
- Kazlauskienė M, Tamulaitis G, Kostiuk G, Venclovas Č, Siksnys V. 2016. Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with the Target ARN Recognition. *Molecular Cell* 62(2):295-306.
- Kennedy EM, Cullen BR. 2017. Gene Editing: A New Tool for Viral Disease. *Annual Review of Medicine* 68:401-411.
- Khan A, Sarkar E. 2022. CRISPR/Cas9 encouraged CAR-T cell immunotherapy, reporting efficient and safe clinical results towards cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* 33:100641.
- Kim JG, Garrett S, Wei Y, Graveley BR, Terns MP. 2019. CRISPR DNA elements controlling site-specific spacer integration and proper repeat length by a Type II CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research* 47(16):8632-8648.
- Kim YS, Kim GR, Park M, Yang SC, Park SH, Won JE, Lee JH, Shin HE, Song H, Kim HR. 2020. Electroporation of AsCpf1/RNP at the Zygote Stage is an Efficient Genome Editing Method to Generate Knock-Out Mice Deficient in Leukemia Inhibitory Factor. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 17(1):45-53.
- Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, Holton JM, Charles E, O'Connell MR, Doudna JA. 2017. Guide-bound structures of an ARN-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology* 24(10):825-833.
- Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD. 2018. Transcriptome Engineering with ARN-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell* 173(3):665-676.e14.
- Koonin EV, Makarova KS. 2013. CRISPR-Cas: Evolution of an ARN-based adaptive immunity system in prokaryotes. *ARN Biology* 10(5):679-686.
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 37:67-78.
- Lander ES. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell* 164(1-2):18-28.
- Lee SH, Bae S. 2016. Structural and dynamic views of the CRISPR-Cas system at the single-molecule level. *BMB Reports* 49(4):201-207.
- Lewis KM, Ke A. 2017. Building the Class 2 CRISPR-Cas Arsenal. *Molecular Cell* 65(3): 377-379.
- Li Y, Pan S, Zhang Y, Ren M, Feng M, Peng N, Chen L, Liang YX, She Q. 2016. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing. *Nucleic Acids Research* 44(4):e34.
- Li B, Zhao W, Luo X, Zhang X, Li C, Zeng C, Dong Y. 2017. Engineering CRISPR-Cpf1 crARNs and mARNs to maximize genome editing efficiency. *Nature Biomedical Engineering* 1(5):0066.
- Li W, Chan C, Zeng C, Turk R, Behlke MA, Cheng X, Dong Y. 2020. Rational Design of Small Molecules to Enhance Genome Editing Efficiency by Selectively Targeting Distinct Functional States of CRISPR-Cas12a. *Bioconjugate Chemistry* 31(3):542-546.
- Li H, Cui X, Sun L, Deng X, Liu S, Zou X, Li B, Wang C, Wang Y, Liu Y, Lu B, Cao B. 2021. High concentration of Cas12a effector tolerates more mismatches on ssDNA. *FASEB J* 35(1):e21153.
- Li Y, Wei Y, Li G, Huang S, Xu J, Ding Q, Hong J. 2022. Targeting nectin-1 Based on CRISPR/Cas9 System Attenuated the Herpes Simplex Virus Infection in Human Corneal Epithelial Cells *In vitro*. *Translational Vision Science & Technology* 11(2):8.
- Liao C, Ttofali F, Slotkowski RA, Denny SR, Cecil TD, Leenay RT, Keung AJ, Beisel CL. 2019. Modular one-pot assembly of CRISPR arrays enables library generation and reveals factors influencing crARN biogenesis. *Nature Communications* 10(1):2948.
- Lin P, Qin S, Pu Q, Wang Z, Wu Q, Gao P, Schettler J, Guo K, Li R, Li G, Huang C, Wei Y, Gao GF, Jiang J, Wu M. 2020. CRISPR-Cas13 Inhibitors Block ARN Editing in Bacteria and Mammalian Cells. *Molecular Cell* 78(5):850-861.e5.
- Liu L, Chen P, Wang M, Li X, Wang J, Yin M, Wang Y. 2017. C2c1-sgARN Complex Structure Reveals ARN-Guided DNA Cleavage Mechanism. *Molecular Cell* 65(2):310-322.
- Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. 2017. The Molecular Architecture for ARN-Guided ARN Cleavage by Cas13a. *Cell* 170(4): 714-726.e10.
- Liu Z, Dong H, Cui Y, Cong L, Zhang D. 2020. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories* 19:172.
- Ma L, Yang S, Peng Q, Zhang J, Zhang J. 2023. CRISPR/Cas9-based gene-editing technology for sickle cell disease. *Gene* 874:147480.
- Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. 2011. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-

- Cas systems. *Biology Direct* 6(1):38.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin A, van der Oost J, Koonin EV. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 9(6):467-477.
- Makarova KS, Koonin EV. 2015. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology* 1311: 47-75.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnabashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 13(11):722-736.
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. 2017. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell* 168(5):946-946.e1.
- Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2018. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *The CRISPR J* 1(5):325-336.
- Makarova KS, Gao L, Zhang F, Koonin EV. 2019. Unexpected connections between type VI-B CRISPR-Cas systems, bacterial natural competence, ubiquitin signaling network and DNA modification through a distinct family of membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters* 366(8):fnz088.
- Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnabashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM., Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. 2020. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology* 18(2): 67-83.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. ARN-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121):823-826.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)* 322(5909):1843-1845.
- Matthews KRW, Iltis AS. 2019. Are we ready to genetically modify a human embryo? Or is it too late to ask? *Accountability in Research* 26(4):265-270.
- Maxwell KG, Millman JR. 2021. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Reports Medicine* 2(4):100238.
- McGinn J, Marraffini LA. 2019. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology* 17(1):artículo 1.
- Meeske AJ, Jia N, Cassel AK, Kozlova A, Liao J, Wiedmann M, Patel DJ, Marraffini LA. 2020. A phage-encoded anti-CRISPR enables complete evasion of type VI-A CRISPR-Cas immunity. *Science* 369(6499):54-59.
- Meijers AS, Troost R, Ummels R, Maaskant J, Speer A, Nejentsev S, Bitter W, Kuijl CP. 2020. Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis* 124:101983.
- Meshalkina DA, Glushchenko AS, Kysil EV, Mizgirev IV, Frolov A. 2020. SpCas9- and LbCas12a-Mediated DNA Editing Produce Different Gene Knockout Outcomes in Zebrafish Embryos. *Genes* 11(7):740.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar E. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29(2):143-148.
- Miller J, McLachlan AD, Klug, A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO J* 4(6):1609-1614.
- Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. 2018. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism and Application. *ACS Chemical Biology* 13(2):357-365.
- Mohammadian Gol T, Urena-Bailen G, Hou Y, Sinn R, Antony JS, Handgretinger R, Mezger M. 2023. CRISPR medicine for blood disorders: Progress and challenges in delivery. *Frontiers in Genome Editing* 4:1037290.
- Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology* 9(3):613-621.
- Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archaea Haloferax Mediterranean* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* 17(1):85-93.

- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* 36(1):244-246.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Molecular Evolution* 60(2):174–182.
- Moon SB, Kim DY, Ko J-H, Kim Y-S. 2019. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Experimental & Molecular Medicine* 51(11):1-11.
- Mulepati S, Héroux A, Bailey S. 2014. Structural biology. Crystal structure of a CRISPR ARN-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. *Science* 345(6203):1479-1484.
- Murugan K, Seetharam AS, Severin AJ, Sashital DG. 2020. CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects. *J Biol Chem* 295(17):5538-5553.
- Nakata A, Amemura M, Makino K. 1989. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriology* 171(6):3553–3556.
- Newire E, Aydin A, Juma S, Enne VI, Roberts AP. 2020. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System Located Exclusively on IncHI1B/IncFIB Plasmids in Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology* 11:1937.
- Nicholson TJ, Jackson SA, Croft BI, Staals RHJ, Fineran PC, Brown CM. 2018. Bioinformatic evidence of widespread priming in type I and II CRISPR-Cas systems. *ARN Biology* 16(4):566-576.
- Nickel L, Weidenbach K, Jäger D, Backofen R, Lange SJ, Heidrich N, Schmitz RA. 2013. Two CRISPR-Cas systems in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 display common processing features despite belonging to different types I and III. *ARN Biology* 10(5):779-791.
- Niewoehner O, Garcia-Doval C, Rostøl JT, Berk C, Schwede F, Bigler L, Hall J, Marraffini LA, Jinek M. 2017. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature* 548(7669):543-548.
- NIH-ClinicalTrials.gov. 2023. CRISPR-Cas9. Julio. <https://clinicaltrials.gov/search?term=crispr-Cas9>
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide ARN and target DNA. *Cell* 156(5):935-949.
- Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science (New York, N.Y.)* 361(6408):1259-1262.
- Numata T, Inanaga H, Sato C, Osawa T. 2015. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J Molecular Biology* 427(2):259-273.
- O'Connell MR. 2019. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Molecular Biology* 431(1):66-87.
- Olson S. 2016. Committee on Science, Technology, and Law; Policy and Global Affairs; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. International Summit on Human Gene Editing: A Global Discussion. Olson S, editor. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Özcan A, Pausch P, Linden A, Wulf A, Schühle K, Heider J, Urlaub H, Heimerl T, Bange G, Randau L. 2019. Type IV CRISPR ARN processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nature Microbiology* 4(1): 89-96.
- Papasavva P, Kleanthous M, Lederer CW. 2019. Rare Opportunities: CRISPR/Cas-Based Therapy Development for Rare Genetic Diseases. *Molecular Diagnosis & Therapy* 23(2):201-222.
- Park SH, Bao G. 2021. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis* 60(1).
- Paul B, Montoya G. 2020. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical J* 43: 8-17.
- Perez-Pinera P, Jones MF, Lal A, Lu TK. 2015. Putting Non-coding ARN on Display with CRISPR. *Molecular Cell* 59(2):146-148.
- Phan PT, Schelling M, Xue C, Sashital DG. 2019. Fluorescence-based methods for measuring target interference by CRISPR-Cas systems. *Methods in Enzymology* 616:61-85.
- Pinilla-Redondo R, Mayo-Muñoz D, Russel J, Garrett RA, Randau L, Sørensen SJ, Shah SA. 2020. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Research* 48(4):2000-2012.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)* 151(Pt

- 3): 653-663.
- Raitskin O, Patron NJ. 2016. Multi-gene engineering in plants with ARN-guided Cas9 nuclease. *Current Opinion in Biotechnology* 37:69-75.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin E, Sharp PA, Zhang F, Yan W X, Scott DA. 2015. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520;7546: 186-91.
- Reyes Mata MP, Salazar Camarena DC, Martínez López E, Menchaca Tapia VM. 2023. CRISPR-Cas: de la investigación básica a la aplicación para la atención primaria en salud. Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Retos e innovación desde las ciencias básicas para la atención primaria en la salud *Cap10*: 210-236.
- Safari F, Zare K, Negahdaripour M, Barekati-Mowahed M, Ghasemi Y. 2019. CRISPR Cpf1 proteins: Structure, function, and implications for genome editing. *Cell & Bioscience* 9(1):36.
- Samai P, Pyenson N, Jiang W, Goldberg GW, Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. 2015. Co-transcriptional DNA and ARN Cleavage during Type III CRISPR-Cas Immunity. *Cell* 161(5):1164-1174.
- Sangamo Therapeutics. 2021. Long-Term Follow-up of HIV-Infected Subjects Treated with Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases (SB-728-T or SB-728mR-T) (Clinical trial registration NCT04201782). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04201782](https://clinicaltrials.gov/show/NCT04201782)
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 39(21):9275-9282.
- Scott T, Urak R, Soemardy C, Morris KV. 2019. Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrARN. *Scientific Reports* 9(1):16104.
- Shao Y, Coczaki AI, Ramia NF, Terns RM, Terns MP, Li H. 2013. Structure of the Cmr2-Cmr3 Subcomplex of the Cmr ARN Silencing Complex. *Structure* (London, England: 1993) 21(3):376-384.
- Shimori M, Garrett SC, Graveley BR, Terns MP. 2018. Cas4 Nucleases Define the PAM, Length, and Orientation of DNA Fragments Integrated at CRISPR Loci. *Molecular Cell* 70(5):814-824.e6.
- Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. 2015. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell* 60(3):385-97.
- Sieber RN, Overballe-Petersen S, Kaya H, Larsen AR, Petersen A. 2020. Complete Genome Sequences of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains 110900 and 128254, Two Representatives of the CRISPR-Cas-Carrying Sequence Type 630/spa Type t4549 Lineage. *Microbiology Resource Announcements* 9(41):e00891-20.
- Skeens E, East KW, Lisi GP. 2021. 1H, 13C, 15 N backbone resonance assignment of the recognition lobe subdomain 3 (Rec3) from *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9. *Biomolecular NMR Assignments* 15(1):25-28.
- Slymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Feliciano PR, Stella S, Abudayyeh O, Gootenberg J, Strecker J, Montoya G, Zhang F. 2019. High-resolution structure of Cas13b and biochemical characterization of ARN targeting and cleavage. *Cell report* 26(13):3741-3751.e5.
- Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. 2017. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated ARN-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Molecular Cell* 65(4):618-630. e7.
- Smargon AA. 2018. Discovery and characterization of Cas13b, a differentially regulated ARN-targeting CRISPR system [Thesis, Massachusetts Institute of Technology]. <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/115637>
- Staals RHJ, Zhu Y, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, Koehorst JJ, Vlot M, Neupane N, Varossieau K, Sakamoto K, Suzuki T, Dohmae N, Yokoyama S, Schaap PJ, Urlaub H, Heck AJR, Nogales E, Doudna JA, van der Oost J. 2014. ARN targeting by the type III-A CRISPR-Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell* 56(4):518-530.
- Stella S, Alcón P, Montoya G. 2017. Class 2 CRISPR-Cas ARN-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nature Structural & Molecular Biology* 24(11):882-892.
- Stella S, Mesa P, Thomsen J, Paul B, Alcón P, Jensen SB, Saligram B, Moses ME, Hatzakis NS, Montoya G. 2018. Conformational Activation Promotes CRISPR-Cas12a Catalysis and Resetting of the Endonuclease Activity. *Cell* 175(7):1856-1871. e21.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2014. DNA interrogation by the

- CRISPR ARN-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507(7490): 62–67.
- Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, Qimron U. 2016. Adaptation in CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell Review* 61: 797-808.
- Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas Č, Nwokeoji AO, Dickman MJ, Horvath P, Siksnys V. 2014. Programmable ARN shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus*. *Mol Cell* 56(4):506-17.
- Tang Y, Fu Y. 2018. Class 2 CRISPR/Cas: An expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell & Bioscience* 8(1):59.
- Tang L. 2019. Exploring class 1 CRISPR systems. *Nature Methods* 16(11):1079.
- Taylor HN, Warner EE., Armbrust MJ, Crowley VM, Olsen KJ, Jackson RN. 2019. Structural basis of Type IV CRISPR ARN biogenesis by a Cas6 endoribonuclease. *ARN Biology* 16(10):1438-1447.
- Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, Li T, Li J, Zhou Q, Li W. 2018. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discovery* 4(1):1-15.
- The Nobel Prize in Chemistry 2020. NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>
- Travis J. And Science's 2015 Breakthrough of the Year is... CRISPR genome-editing technology shows its power. *Science* 350(6267):1456-1457.
- Toro N, Mestre MR, Martínez-Abarca F, González-Delgado A. 2019. Recruitment of Reverse Transcriptase-Cas1 Fusion Proteins by Type VI-A CRISPR-Cas Systems. *Frontiers in Microbiology* 10:2160.
- van Aelst K, Martínez-Santiago CJ, Cross SJ, Szczelkun MD. 2019. The Effect of DNA Topology on Observed Rates of R-Loop Formation and DNA Strand Cleavage by CRISPR Cas12a. *Genes* 10(2):E169.
- van Beljouw SPB, Sanders J, Rodriguez-Molina A, Brouns SJJ. 2023. RNA-targeting CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 21(1):21-34.
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 12(7):479-492.
- Van Orden MJ, Newsom S, Rajan R. 2020. CRISPR type II-A subgroups exhibit phylogenetically distinct mechanisms for prespacer insertion. *J Biological Chemistry* 295(32):10956-10968.
- Vertex Pharmaceuticals Incorporated. 2021. A Long-term Follow-up Study of Subjects With β -thalassemia or Sickle Cell Disease Treated With Autologous CRISPR-Cas9 Modified Hematopoietic Stem Cells (CTX001) (Clinical trial registration NCT04208529). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04208529](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04208529)
- Vlot M, Houkes J, Lochs SJA, Swarts DC, Zheng P, Kunne T, Mohanraju P, Anders C, Jinek M, van der Oost J, Dickman MJ, Brouns SJJ. 2018. Bacteriophage DNA glucosylation impairs target DNA binding by type I and II but not by type V CRISPR-Cas effector complexes. *Nucleic Acids Research* 46(2):873-885.
- Voloshin ON, Vanevski F, Khil PP, Camerini-Otero, RD. 2003. Characterization of the DNA damage-inducible helicase DinG from *Escherichia coli*. *J Biological Chemistry* 278(30):28284-28293.
- Voloshin ON, Camerini-Otero RD. 2007. The DinG protein from *Escherichia coli* is a structure-specific helicase. *J Biological Chemistry* 282(25):18437–18447.
- Vora S, Tuttle M, Cheng J, Church G. 2016. Next step for the CRISPR revolution: ARN-guided epigenetic regulators. *The FEBS J* 283(17):3181–3193.
- Wang, J, Zhang C, Feng B. 2020. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. *JouARNI of Cellular and Molecular Medicine* 24(6):3256-3270.
- Watanabe S, Cui B, Kiga K, Aiba Y, Tan X-E, Sato'o Y, Kawauchi M, Boonsiri T, Thitiananpakorn K, Taki Y, Li F-Y, Azam AH, Nakada Y, Sasahara T, Cui L. 2019. Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus *Leptotrichia*. *Frontiers in Microbiology* 10:2838.
- Wessels H-H, Méndez-Mancilla A, Guo X, Legut M, Daniloski Z, Sanjana NE. 2020. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide ARN design. *Nature Biotechnology* 38(6):722-727.
- Whitaker RJ, Vanderpool CK. 2016. CRISPR-Cas Gatekeeper: Slow on the Uptake but Gets the Job Done. *Cell Host Microbe* 19(2):135-7.
- Wilkinson M, Drabavicius G, Silanskas A, Gasiunas G, Siksnys V, Wigley DB. 2019. Structure of the DNA-Bound Spacer Capture Complex of a Type II CRISPR-Cas System. *Molecular Cell* 75(1):90-101.e5.
- Wu D, Guan X, Zhu Y, Ren K, Huang Z. 2017. Structural basis of stringent PAM recognition by CRISPR-C2c1 in complex with sgARN. *Cell Research* 27(5):705-708.
- Xie N, Zhou Y, Sun Q, Tang B. 2018. Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR/Cas9 System.

- Stem Cells IntenARntional 2018:7834175.
- Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, Wang X-C, Chen Q-J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14:327.
- Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi L. S. 2016. CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 17:131-154.
- Yan F, Wang W, Zhang J. 2019. CRISPR-Cas12 and Cas13: The lesser-known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biology and Toxicology* 35(6):489-492.
- Yan WX, Chong S, Zhang H, Makarova KS, Koonin EV, Chen DR, Scott DA. 2018. Cas13d is a Compact ARN-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein. *Molecular Cell* 70(2):327-339.e5.
- Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, Carte JM, Keston-Smith E, Sothiselvam S, Garrity AJ, Chong S, Makarova KS, Koonin EV, Cheng DR, Scott DA. 2019. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science* 363(6422):88-91.
- Yang H, Gao P, Rajashankar KR, Patel DJ. 2016. PAM-Dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas Endonuclease. *Cell* 167(7):1814-1828.e12.
- Yin L, Zhao F, Sun H, Wang Z, Huang Y, Zhu W, Xu F, Mei S, Liu X, Zhang D, Wei L, Cen S, Hu S, Liang C, Guo F. 2020. CRISPR-Cas13a Inhibits HIV-1 Infection. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 21:147-155.
- You L, Ma J, Wang J, Artamonova D, Wang M, Liu L, Xiang H, Severinov K, Zhang X, Wang Y. 2019. Structure Studies of the CRISPR-Csm Complex Reveal Mechanism of Co-transcriptional Interference. *Cell* 176(1-2):239-253.e16.
- Yu L, Marchisio MA. 2020. Types I and V Anti-CRISPR Proteins: From Phage Defense to Eukaryotic Synthetic Gene Circuits. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:575393.
- Zhang J, White MF. 2015. Expression and Purification of the CMR (Type III-B) Complex in *Sulfolobus solfataricus*. *Methods in Molecular Biology* 1311:185-194.
- Zhang J, Graham S, Tello A, Liu H, White MF. 2016. Multiple nucleic acid cleavage modes in divergent type III CRISPR systems. *Nucleic Acids Research* 44(4):1789-1799.
- Zhang C, Konermann S, Brideau NJ, Lotfy P, Wu X, Novick SJ, Strutzenberg T, Griffin PR, Hsu PD, Lyumkis D. 2018. Structural Basis for the ARN-Guided Ribonuclease Activity of CRISPR-Cas13d. *Cell* 175(1):212-223.e17.
- Zhang H, Dong C, Li L, Wasney GA, Min J. 2019. Structural insights into the modulatory role of the accessory protein WYL1 in the Type VI-D CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 47(10):5420-5428
- Zhang H, Li Z, Dackowski CM, Gabel C, Mesecar AD, Chang L. 2019. Structural Basis for the Inhibition of CRISPR-Cas12a by Anti-CRISPR Proteins. *Cell Host & Microbe* 25(6):815-826.e4.
- Zhang Y, Zhang Y, Qi Y. 2019. Plant Gene Knockout and Knockdown by CRISPR-Cpf1 (Cas12a) Systems. *Methods in Molecular Biology* 1917:245-256.
- Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. 2021. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* 11(2): 614-648.
- Zheng Y, Li J, Wang B, Han J, Hao Y, Wang S, Ma X, Yang S, Ma L, Yi L, Peng W. 2020. Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:62.
- Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, Wei W. 2014. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 509(7501):487-491.