

En las últimas décadas, se han secuenciado por completo los genomas de cientos de organismos vivos diferentes. La descodificación de esta gran cantidad de información genética promete desvelar los secretos moleculares de la vida en nuestro planeta, así como la base molecular de las enfermedades humanas. Sin embargo, esto dista mucho de ser trivial, ya que en muchas especies las secuencias que codifican las proteínas (es decir, los genes) solo representan una pequeña fracción de su genoma, mientras que el resto de las secuencias no codificantes desempeñan funciones reguladoras. Además, dentro de los organismos multicelulares, el genoma se utiliza de forma exclusiva en cada tipo de célula introduciendo modificaciones epigenéticas o adoptando conformaciones tridimensionales particulares que pueden afectar a la actividad y expresión de los genes sin cambiar las secuencias de ADN subyacentes. A pesar de esta complejidad, los recientes avances en diversas tecnologías *ómicas* y de edición del genoma han mejorado notablemente nuestros actuales conocimientos sobre la función del genoma. Por consiguiente, ahora estamos en una disposición única para secuenciar, analizar y modificar los genomas y, de ese modo, mejorar no solo nuestra calidad de vida sino también la de nuestro planeta.

VOLUMEN 3 PALABRAS CLAVE

genómica	epigenética	epigenómica	epitranscriptómica	arquitectura del genoma
edición del genoma	genoma no codificante	medicina de precisión	metagenómica	
microbiota	estilo de vida	genómica medioambiental		

Los autores de este volumen sobre genoma y epigenética dedican esta publicación a la memoria de José Luis Gómez Skarmeta (1966-2020), profesor de investigación del CSIC en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD).

CAPÍTULO 1

RESUMEN

Nuestra capacidad para conocer los sistemas biológicos se ve limitada por nuestra capacidad para identificar, manipular y controlar la información genética. Sin embargo, en los últimos años, los grandes avances técnicos han ampliado nuestras capacidades para predecir, influenciar y *comprender* la información genómica en prácticamente todos los organismos vivos. La capacidad de identificar las enfermedades y los rasgos genéticos y epigenéticos deletéreos redefinirá la investigación biológica y biomédica. Asimismo, los posibles usos de esta revolución técnica y científica y la información que esta genere tendrán consecuencias sobre el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades y sobre el proceso de adopción de decisiones de biología reproductiva.

PALABRAS CLAVE

edición genética edición epigenética
tecnologías de célula única ómicas
bioinformática

MÉTODOS PARA ANALIZAR Y MODIFICAR EL GENOMA

Coordinadores

María Domínguez
(IN, Alicante, coordinadora)
Pablo Huertas
(CABIMER, Sevilla, coordinador adjunto)

Investigadores y centros de investigación participantes (por orden alfabético)

Marta Casado
(IBV, Valencia)
José Pascual López Atalaya
Martínez
(IN, Alicante)
Alberto M. Pendás
(CIC, Salamanca)
Lluís Montoliu José
(CNB, Madrid)
Marian Ros
(IBBTEC, Santander)

RESUMEN EJECUTIVO

En las dos últimas décadas, hemos asistido a importantes avances tecnológicos que han anunciado el advenimiento de la era genómica. Ha habido notables iniciativas a escala internacional que no solo nos han brindado la información genómica de muy diversas especies, sino que ahora también de diversos individuos de una misma especie. El desarrollo de las técnicas *ómicas* (genómicas, transcriptómicas, epigenómicas, proteómicas, metabolómicas, etc.) también nos aporta varias capas de información que analizar. Y, por último, se ha producido un gran avance al materializarse la posibilidad de transformar prácticamente cualquier genoma de cualquier especie a voluntad gracias a la identificación y popularización de las herramientas de modificación genómica. Por lo tanto, actualmente estamos a punto de ser capaces, por vez primera, de comprender a ciencia cierta la información genómica y manipularla para la investigación básica o aplicaciones concretas.

En este capítulo, repasaremos el estado actual de los métodos disponibles para analizar y modificar el genoma. Además, identificaremos cuáles son los principales desafíos a los que nos enfrentamos en este ámbito y que convendría acometer en los próximos años. Entre ellas, destacaremos la necesidad de implantar y mejorar herramientas para extraer y leer la información procedente de los datos *ómicos*, así como para modificar el genoma.

Por último, analizaremos los puntos fuertes y débiles del CSIC para la investigación en este ámbito. El CSIC se halla en una posición excepcional para contribuir a este propósito, gracias a su dilatada experiencia en ciencias muy diversas, desde la física hasta la biología y desde la informática hasta la química, así como en una amplia gama de modelos experimentales; y esta disposición tan multidisciplinar favorecerá el desarrollo de las herramientas mencionadas. Asimismo, nos consta que en el CSIC existen institutos y laboratorios específicos que son expertos y referentes mundiales en materias concretas que resultan imprescindibles para entender el funcionamiento de estas tecnologías y mejorarlas aún más.

1.1 INTRODUCCIÓN Y DESCRIPCIÓN GENERAL

En el presente capítulo, expondremos nuestra percepción actual y los desafíos que plantearán en el futuro las distintas herramientas de investigación, entre las que cabe destacar las siguientes:

- Las estrategias computacionales y los procedimientos bioinformáticos
- Las herramientas de modificación genética y epigenética
- Los nuevos métodos: por ejemplo, las tecnologías de célula única

Uno de los mayores desafíos que plantea la secuenciación del genoma completo reside en la exactitud del ensamblaje de genes grandes y complejos, las regiones repetitivas, y la anotación y ensamblaje de todas las variantes genéticas. Todos estos pasos resultan esenciales para analizar exhaustivamente genomas completos, transcriptomas, epigenomas y la organización tridimensional del genoma. Los métodos computacionales deben optimizarse para permitirnos acceder de forma inmediata y sencilla a todos estos datos *ómicos*. Para que podamos comprender el funcionamiento de la biología, la salud y la enfermedad, es imprescindible definir las secuencias y marcas epigenéticas funcionalmente importantes a partir de datos genómicos y epigenómicos sin procesar.

Para ser capaces de extraer información pertinente de conjuntos de datos de tan magnas proporciones e interpretarlos, es preciso que se produzcan avances determinantes y radicales en los procedimientos bioinformáticos y computacionales de los análisis genómicos funcionales de alto rendimiento, las tecnologías *ómicas* de célula única y las metodologías de modificación genómica. Al mejorar e incrementar su exactitud, las tecnologías de modificación genómica, de modificación genética y epigenética de célula única, y de obtención de imágenes de superresolución a escala de célula única y orgánica nos brindan oportunidades para cumplir el objetivo de hacer avances notables en la investigación genética en humanos y otros organismos (tanto modelos como no modelos).

El progreso en las herramientas de modificación genómica está revolucionando la investigación genética y ha supuesto un estímulo notable para el avance de la genética humana y médica. La modificación del genoma humano pronto será una realidad en la terapia clínica, sobre todo en el caso de los tratamientos *ex vivo*. Además, estas herramientas de modificación también están mejorando las anotaciones funcionales del genoma. La anotación funcional requiere conocer las funciones moleculares, celulares y orgánicas de

todos y cada uno de los genes de un genoma; así como comprender el *contexto* en el que los genes funcionan y reaccionan ante los desafíos ambientales, y la relación entre la variación genética, la epigenética y, en última instancia, la fenotípica. La anotación del genoma humano y de los organismos y microorganismos modelo y no modelo (por ejemplo, la microbiota) está ofreciendo oportunidades sin precedentes para la interpretación biológica de la actividad genómica, la evolución y la diversidad, entre otras cuestiones. Hasta hace pocos años, lo que ralentizaba la anotación de los genes funcionales era la disponibilidad de mutantes. La rapidez y la eficiencia de las tecnologías de modificación genómica están potenciando nuestra capacidad para interrogar a los genomas de cualquier organismo, lo que permite realizar estudios funcionales con una perspectiva evolutiva. Dichos estudios pudieran incluir ahora especies que antes no se podían manipular genéticamente. Asimismo, en algunos casos, pudieran permitirnos llevar a cabo este tipo de experimentos de modificación génica a gran escala. Hasta la fecha, el análisis genético de los organismos no modelo ha revestido una gran complejidad, ha llevado mucho tiempo y se ha limitado a unas cuantas especies. Sin embargo, a medida que se vayan secuenciando (así como anotando y ensamblando) los genomas de especies nuevas, las nuevas herramientas de modificación genómica serán aptas de inmediato para el análisis genético funcional.

La plétora de especies que se analizarán en un futuro a corto plazo resultará útil para **comprender varios procesos biológicos**, entre los que se incluyen la **formación de patrones** (diatomeas y Stentor), la **morfogénesis ramificada** (*Physcomitrella* y *Ashbya*), la **regeneración** (ajolotes e hidras), la **pluricelularidad** (*Volvox*), el **desarrollo y la enfermedad humanos** (organoides derivados de iPS), el **envejecimiento** (kilis y ratopines), el **cáncer** (perros, gatos y ratopines), la complejidad de los **ciclos vitales de los parásitos** (malaria), **las infecciones por coronavirus** (organoides), **la hibernación** (murciélagos), la **adaptación a la hipoxia y al frío** (marmota), y desde el **estrés salino** (cultivos) hasta el **control de las plagas** más complejo mediante las estrategias más innovadoras de manipulación genética dirigida.

Durante esta actual nueva era de la investigación biológica, surgirán nuevas herramientas de manipulación genómica —con toda probabilidad, guiadas por el emparejamiento de bases de Watson y Crick— a partir de proyectos metagenómicos, o dichas herramientas se diseñarán/mejorarán sintéticamente mediante la intervención de la inteligencia artificial (IA). Por tanto,

dada la multitud de procesos que se analizarán *de novo* por primera vez, es probable que asistamos a una explosión de hitos biológicos y avances técnico-científicos sin precedentes históricos, cuyo potencial transformador resulta difícil de prever.

El proyecto **Genome Project-write** (GP-write) es uno de estos avances. El GP-write generará ingeniería del genoma completo con estirpes celulares humanas y otros organismos de relevancia para la agricultura y la salud pública. El centro de interés del proyecto Human GP-write (HGP-write) consistirá en sintetizar genomas humanos en su totalidad o en parte, y su ámbito de trabajo se circunscribirá a las células y los organoides derivados. El objetivo principal del GP-write residirá en ampliar las herramientas de ingeniería genética disponibles y en generar información que vincule la secuencia de bases de nucleótidos del ADN con sus propiedades fisiológicas y comportamientos funcionales para estudiar sus aplicaciones en el ámbito de la sanidad, la energía, la agricultura o la biorreparación. Para poder descifrar la información codificada en el genoma y el epigenoma y manipular esta información con precisión, se requieren tecnologías que trabajen a escala de célula única y a escala genómica en células únicas. Dichas tecnologías revolucionarán la capacidad de traducir la información genómica en una medicina y una asistencia sanitaria precisas y personalizadas, así como de manipular el contenido del genoma para definir y conocer el funcionamiento de los genes, las redes genéticas y las interacciones genético-ambientales.

El uso de **nuevas herramientas de modificación genómica** —tales como CRISPR-Cas9, TALENs y las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, del inglés *zinc finger nucleases*)— para la manipulación de genomas de célula única supondrá un desafío considerable, ya que puede aportar información trascendental sobre la capacidad por parte de una sola célula de influir sobre las células adyacentes dentro de los mismos tejidos, en otros tejidos o en el contexto de todo el organismo.

Las **tecnologías de célula única** se están convirtiendo en una herramienta esencial en los estudios biológicos. Estas técnicas nos están brindando la oportunidad de estudiar la heterogeneidad celular y de desenmascarar poblaciones celulares que antes estaban ocultas. Las tecnologías de célula única, unidas a las técnicas de obtención de imágenes en alta resolución —tales como la superresolución, la espectrometría de masas y la secuenciación profunda— permitirán analizar, identificar y dar a conocer subtipos celulares y tipos de células poco habituales para estudiar en profundidad la biología y

anatomía patológica de las células y los órganos. Estas tecnologías poseen el potencial de revelar los cambios dinámicos que se producen continuamente en el tipo/estado de las células a lo largo de procesos biológicos como la diferenciación, la respuesta inmunitaria o la extensión del cáncer. No obstante, los métodos de célula única y genómicos de célula única también plantean una serie de desafíos y limitaciones. Por ejemplo, están apareciendo una serie de metodologías de epigenómica de célula única, pero aún no se sabe con claridad cuál será todo su potencial. La elaboración de perfiles epigenómicos de célula única de células cancerosas, combinada con otros métodos de modificación génica y análisis genómico (secuenciación ATAC, CUT&Tag o scTrio-seq), revolucionará el análisis epigenético y también puede ser útil para modificar células poco habituales, como es el caso de las células madre cancerosas y las células metastásicas. Hay que desarrollar modelos animales validados junto con plataformas de modelos *in vitro* que ofrezcan la oportunidad de investigar las interacciones multicelulares y los procesos dinámicos de varios pasos.

En este sentido, la tecnología de **órganos en chips** (OOC, por las siglas en inglés de *organ-on-a-chip*) ha evolucionado a partir de una combinación de varias plataformas tecnológicas para solventar las dificultades de los modelos convencionales de evaluación de fármacos. Los cultivos de organoides supusieron un gran hito en el cultivo *in vitro* de células tumorales de pacientes y se están convirtiendo en la herramienta más atractiva como plataforma de cribado *in vitro*.

A continuación resumimos los principales desafíos que podemos prever, que desarrollaremos con mayor detalle en las siguientes secciones:

Desafíos de las herramientas de modificación genómica:

- i.** Los métodos tienen que ser sólidos, con una elevada eficacia y escasos efectos colaterales.
- ii.** Más allá de la modificación génica mediante CRISPR: se están dedicando esfuerzos a desarrollar sistemas de modificación genómica más innovadores y seguros.
- iii.** Es necesario que las metodologías permitan modificar cualquier *locus*, independientemente de su posición, estructura y secuencias adyacentes, así como en células aisladas o en el organismo en células somáticas y de la estirpe germinal.

Implantación de nuevos métodos:

- i.** Manipulación precisa del contenido genómico de cualquier célula, *in vivo* y en cultivo celular.
- i.** Herramientas bioinformáticas potentes para interpretar la información almacenada en los genomas, así como el efecto de la manipulación para promover la investigación sobre la biología animal y humana, el comportamiento, enfermedades como el cáncer, los trastornos metabólicos, las enfermedades degenerativas y la longevidad.
- ii.** La combinación de cultivos de organoides con desarrollos novedosos en el ámbito de la obtención de imágenes en directo, la ingeniería genética y los materiales biológicos representa una proeza que, en un futuro muy cercano, influirá en nuestra forma de estudiar el desarrollo humano y de tratar las enfermedades humanas.

1.2 REPERCUSIÓN SOBRE EL PANORAMA DE LA CIENCIA BÁSICA Y LAS POSIBLES APLICACIONES

La posibilidad de leer con precisión, analizar, interpretar y, por último, controlar a voluntad el genoma y el epigenoma de cualquier organismo parece factible en un futuro cercano. La adquisición y el posterior desarrollo de dichas capacidades darán lugar a una revolución técnica y científica trascendental que afectará por igual a las ciencias básicas y a las aplicadas. Asimismo, suscitarán inquietudes éticas sobre la posible utilidad de esta información genética y su manipulación para tomar decisiones terapéuticas, así como para identificar —y eliminar— rasgos genéticos deletéreos en las fases embrionarias iniciales. Esto último solo será posible tras mejorar los métodos actuales y decidir si convendría modificar las leyes que actualmente prohíben, en España y en muchos otros países, la modificación irreversible del genoma de un embrión humano.

Los investigadores básicos se beneficiarán enormemente de estos avances en la genómica y la epigenómica para adquirir indicios e información nuevos que ayudarán a conocer los procesos biológicos en mayor profundidad y con mayor exhaustividad. Seremos capaces de lo siguiente: interrogar genomas completos y, además, buscar y hallar por medios informáticos los genes o las secuencias genéticas con una mayor probabilidad de estar implicados en el control de procesos específicos o patológicos; extraer información valiosa de las variantes naturales existentes; y analizar y predecir cómo hacen el entorno y las experiencias para controlar la información genética e influir sobre

ella, tanto a escala de las secuencias de ADN como de la epigenética y de la organización tridimensional de la cromatina. Conocer y entender esta información genética nos ayudará a dilucidar cómo se traducen las variantes genéticas y epigenéticas en cambios en el funcionamiento, el rendimiento y el comportamiento de proteínas específicas, ARN no codificantes o su interacción. Es importante señalar que la posibilidad de secuenciar el genoma completo de un animal o una persona a costes cada vez más asequibles pudiera combinarse con la modificación genómica o epigenómica precisa, lo cual será fundamental para el desarrollo de una medicina personalizada y de precisión. La capacidad para demostrar la causa y el efecto también revolucionará y guiará los tratamientos personalizados. Asimismo, las técnicas de célula única y de alta resolución ampliarán el conocimiento actual de varios procesos biológicos o enfermedades, lo cual nos ayudará a entender las dinámicas y la heterogeneidad biológicas que se dan de forma natural y patológica. Por lo tanto, estos avances tecnológicos nos permitirán analizar en detalle procesos que hace tan solo unos años apenas podíamos vislumbrar.

La mejora de las tecnologías genómicas y epigenómicas y el análisis con una resolución de célula única ampliarán estas capacidades a prácticamente cualquier organismo, no solo a los modelo. De este modo, con las nuevas tecnologías pudieran reformularse y abordarse cuestiones biológicas nuevas y antiguas. Por ejemplo, la modificación genómica mediada por CRISPR/Cas9 ya se ha aplicado con éxito en muy diversos taxones de animales, de hongos, de plantas y de microorganismos (ElMounadi *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020; Schuster y Kahmann, 2019; Sun *et al.*, 2017; y Zhang *et al.*, 2018).

Además, los nuevos desarrollos permiten ahora manipular las regiones reguladoras del genoma, el epigenoma y el genoma no codificante; identificar las interacciones de la cromatina; y etiquetar *loci* específicos para obtener imágenes de células vivas y analizar el genoma (Pickar-Oliver y Gersbach, 2019). La información de las interacciones físicas entre los *loci* y otras regiones genómicas loacalizadas distalmente, que se obtiene a través de las interacciones de la cromatina de largo alcance, también resulta esencial para entender las dinámicas de la organización tridimensional de la cromatina durante la diferenciación y en respuesta a la proliferación, a los factores de diferenciación y a las hormonas (Gutiérrez *et al.*, 2019). El mapeo sistemático de las interacciones de las proteínas y la ARN-cromatina (Sridhart *et al.*, 2017) y la facilidad para adaptar las tecnologías a las pruebas de cribado del genoma (o epigenoma) completo conformarán una herramienta potente para la investigación

de fenotipos complejos. El uso generalizado de estas novedosas metodologías también pondrá a disposición de la comunidad una enorme biblioteca de herramientas de investigación. Por ejemplo, el ya mencionado proyecto Genome Project-write (GP-write) supondrá uno de los muchos avances en esa dirección. Este proyecto de investigación internacional pretende minimizar el coste de la ingeniería genómica a gran escala utilizando tanto la modificación genómica como la síntesis a gran escala con estirpes celulares de varios organismos. Tanto la tecnología desarrollada al amparo del proyecto GP-write como las estirpes celulares constituirán un recurso muy valioso para la comunidad. Otras propuestas internacionales semejantes aportarán una sólida reserva de variantes genéticas para la investigación.

En cuanto a las posibles aplicaciones de dichas herramientas, la única limitación reside en la imaginación de los investigadores. La mejora de las metodologías de análisis del genoma nos ayudará a comprender la salud y las enfermedades humanas; la forma en que las plantas repercuten sobre el medioambiente y se adaptan a él; la interacción entre el huésped y los patógenos; la biología de la microbiota en el suelo y el intestino; y la aparición y evolución de nuevas enfermedades como el SARS, el MERS y la pandemia por la COVID-19. La facultad de predecir y controlar la información genómica y epigenómica dependerá de nuestra capacidad para modular el genoma con precisión, lo cual ofrece posibilidades prometedoras en lo referente a la reparación o el restablecimiento de la actividad genética asociada a determinadas enfermedades (Doudna, 2020; Piccar-Oliver y Gersbach, 2019); la edición del microbioma (Menchaca *et al.*, 2020); la creación de cultivos mejorados mediante modificación genética (Doudna, 2020); y la mejora de los tratamientos veterinarios, lo cual repercutirá positivamente sobre el bienestar y la salud de los animales de compañía y el ganado (Menchaca *et al.*, 2020); entre otras oportunidades. Asimismo, facilitará la generación de animales mutantes para comprender los procesos biológicos y crear modelos de las enfermedades humanas. Estas aptitudes también requerirán acuerdos internacionales para actualizar las normas éticas que regulan la investigación en genómica, que deberán tener en cuenta los posibles riesgos y beneficios para la sociedad humana y el medioambiente.

En general, estamos asistiendo a la aparición de nuevas herramientas que aumentarán drásticamente nuestra capacidad para descifrar y modificar la información genética y epigenética, lo cual revolucionará indudablemente varios campos de investigación que se tratarán con mayor detalle en los siguientes capítulos.

1.3 PRINCIPALES PUNTOS PROBLEMÁTICOS

1.3.1 Estrategias computacionales y procedimientos bioinformáticos

Hacia una definición más exacta de lo que es un gen: desde que se acuñó el término *gen* hace más de cien años, su definición ha ido evolucionando para adaptarse a nuestros conocimientos: desde la representación inicial y abstracta de una unidad hereditaria empleada por Johannsen a principios del siglo XX, pasando por la de «un gen, un ARNm, un polipéptido» de los años 60 hasta el concepto más molecular de una secuencia localizada de nucleótidos del ADN que codifica un ARN, independientemente de que se traduzca o no en uno o varios polipéptidos. De este modo, el término *gen* se ha flexibilizado y su actual definición molecular se ha vuelto más compleja. Uno de los mayores desafíos en materia de análisis bioinformático consistirá en adquirir la capacidad de detectar y definir genes a partir de una secuencia genómica en bruto, y buscar y localizar sus elementos críticos (los puntos de activación y finalización de la transcripción, los intrones y exones, y los elementos reguladores), lo cual se complica aún más en el caso de los genes anidados y de los genes comprendidos por varios genes no codificantes y elementos genéticos móviles. Estos análisis deben posibilitar la descripción de todas las variantes de ARN producidas por cualquier gen, predecir su(s) secuencia(s) codificante(s) (en el caso de los ARNm), sus estructuras (en el caso de los ARN estructurales) o sus funciones (en el caso de los ARNm y los ARN no codificantes [ARNnc]).

Hacia la creación de herramientas que mejoren el conocimiento sobre el control de la expresión génica: las reacciones del sistema biológico dependen en gran medida de cómo se regulen los distintos loci genómicos de forma intrínseca y en respuesta a los estímulos ambientales. Por consiguiente, resulta esencial desarrollar nuevas herramientas que nos permitan —a partir de los datos genómicos en bruto— no solo extraer las secuencias reales de los genes, sino también predecir cómo estos pudieran regularse. La información sobre la secuencia se deberá complementar con una caracterización total de las proteínas de la cromatina y sus modificaciones. El desarrollo y la combinación de técnicas que abarcan todo el genoma como, por ejemplo, ChIP-seq, ATAC-seq y BisSeq, nos están ayudando a catalogar las proteínas de la cromatina y sus modificaciones. El desarrollo de análisis computacionales novedosos para estos datos permite segregar esta complejidad en un número discreto de estados de la cromatina que, a su vez, revelan cómo la cromatina dirige funciones tales como la transcripción y el ARN, el procesamiento y, algo que

es crucial, la contribución de la biología de la cromatina a la enfermedad. Los nuevos métodos con resolución de célula única pudieran discriminar aún más los estados transcripcionales entre células individuales (véanse los capítulos 4 y 5 para conocer más detalles sobre estos temas).

Hacia un análisis de datos genómicos en tiempo real potenciado por herramientas bioinformáticas fáciles de usar: el uso de herramientas bioinformáticas se está extendiendo rápidamente en la investigación biológica y biomédica. Sin embargo, su uso presenta limitaciones profundas. En primer lugar, los experimentos *ómicos* generan una cantidad ingente de información que hay que almacenar de forma segura, en un formato y un soporte que se puedan recuperar de forma rápida y sencilla. Con esta pronunciada y constante acumulación de datos, dichos experimentos requerirán una mejora del *hardware* y el *software* en los próximos años, y estos avances deberían provenir esencialmente de los ingenieros informáticos. En segundo lugar, una de las restricciones de muchas herramientas bioinformáticas consiste en que requieren una pronunciada curva de aprendizaje. Aunque algunas herramientas son fáciles de conseguir y de utilizar, muchas de ellas están en desarrollo continuo y requieren unos profundos conocimientos informáticos. En el futuro, prevemos que esos métodos y estas herramientas de *software* evolucionarán hacia opciones más eficientes y flexibles, así como a protocolos más fáciles de usar, gracias a lo cual se propagará el uso de herramientas bioinformáticas en la investigación. Estos temas se tratarán exhaustivamente en el capítulo 2.

1.3.2 Herramientas de modificación genómica

Hacia métodos consistentes, eficientes y específicos: las herramientas de modificación genómica deben ser muy eficientes y específicas, y lo ideal es que sus efectos colaterales sean escasos o nulos. Estos son los principales desafíos a los que nos enfrentamos en la actualidad en lo relativo a la modificación genómica eficiente, y se están dedicando muchos esfuerzos a la búsqueda de soluciones. La mejora de estos aspectos requiere un conocimiento más profundo de los procesos de reparación del ADN, ya que la modificación genómica se basa en engañar a la célula para alterar secuencias genómicas concretas durante tales procesos. Se ha propuesto o se está produciendo un sinnúmero de modificaciones de las tecnologías CRISPR/Cas para modificar el sistema con el fin de aumentar su eficacia y/o consistencia. Estas modificaciones son muy diversas, y entre ellas se incluyen las del propio sistema CRISPR/Cas9 original (Kleinstiver *et al.*, 2016), la fusión con proteínas específicas de reparación del

ADN (Charpentier *et al.*, 2018; Jayavaradhan *et al.*, 2019; y Rees *et al.*, 2019), y la manipulación temporal de los procesos de reparación (Jinek *et al.*, 2013; Wienert *et al.*, 2020; y Xu *et al.*, 2020a). Asimismo, actualmente se ha enfatizado mucho el desarrollo de nuevas herramientas, ya sea mediante la búsqueda de nuevos sistemas de modificación genómica naturales y más eficientes (véase más adelante) o mediante la alteración directa *in vitro* de las enzimas de modificación genómica, como sucede al crear derivados de CRISPR/Cas9 que no rompen el ADN (Anzalone *et al.*, 2019; y Komor *et al.*, 2016).

Más allá de la modificación génica mediante CRISPR: antes de la aparición de la tecnología de CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012), se implantaron otros métodos, como es el caso de las proteínas con dedos de cinc (ZNF) o las nucleasas TALEN, para la modificación genética (Xu *et al.*, 2020b). Todos ellos tienen en común la explotación de herramientas de biología molecular ya disponibles en la naturaleza o derivadas de nuestros conocimientos sobre el funcionamiento de algunas proteínas nucleares. Por lo tanto, es previsible que en los próximos años descubramos nuevas opciones con solo buscar en distintos organismos. De hecho, ya se utilizan alternativas a la enzima Sp-Cas9 modificada de *Streptococcus pyogenes* que se emplea de forma más generalizada (Jinek *et al.*, 2012; y Kleinstiver *et al.*, 2016). Se han detectado proteínas Cas9 más cortas, procedentes de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9), *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9) o *Brevibacillus laterosporus* (BlatCas9), que se han aplicado con éxito para la modificación génica (Xu *et al.*, 2020b). Además, a partir de otras bacterias, se han aislado ortólogos de esta familia de proteínas que también se pudieran aplicar a tal efecto. Aparte de los distintos ortólogos de Cas9, también se han descubierto otras proteínas Cas, entre las que se incluyen la Cpf1 (CRISPR de *Prevotella* y *Francisella 1*, también conocida como Cas12a), y las diversas variantes de Cas13 y Cas14 (Abudayyeh *et al.*, 2016; Konermann *et al.*, 2018; Strecker *et al.*, 2019; y Zetsche *et al.*, 2015), algunas de las cuales propician nuevas aplicaciones innovadoras como es el caso del diagnóstico genético (Gootenberg *et al.*, 2017). Además, se ha propuesto que otras enzimas no relacionadas con las proteínas Cas, como es el caso de las enzimas CasX, pudieran llevar a cabo la modificación genómica guiada por ARN (Liu *et al.*, 2019). Así pues, la incorporación de enzimas del tipo Cas9 alternativas o incluso la detección de sistemas completamente nuevos para llevar a cabo la modificación génica darán lugar en un futuro cercano a una infinidad de herramientas de modificación genómica con capacidades distintas.

Hacia unas herramientas de modificación genómica más flexibles y generales: las metodologías deberían posibilitar la modificación de cualquier *loci*, independientemente de su posición, estructura y secuencias adyacentes, así como en células somáticas o de la estirpe germinal de organismos enteros. Uno de los mayores desafíos para las herramientas de modificación génica ha sido ampliar su campo de aplicación más allá del cultivo de células *in vitro*, de forma que resulten útiles en aplicaciones médicas y para la creación de organismos modificados genéticamente (Doudna, 2020; Lee *et al.*, 2020; Menchaca *et al.*, 2020; Seruggia *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019; y Zhang *et al.*, 2018). En vista del desarrollo y las ventajas que aportan las tecnologías de modificación genómica, en los últimos años ha aumentado considerablemente el número de estudios en los que se emplea la modificación genómica para mejorar los cultivos hortícolas. La combinación de esta tecnología de modificación genómica en rápido avance con los cruces genéticos aumentará en gran medida la producción y la calidad de dichos cultivos (Xu *et al.*, 2019). En organismos modelo como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), la capacidad por parte de los investigadores para diseñar modificaciones del genoma dirigidas en estudios de genes y elementos genéticos se ha visto transformada significativamente por la generación de moscas transgénicas que expresan las variantes Cas9 y Cas9 modificadas (Gratz *et al.* 2013; y Ewen-Campen *et al.* 2017) y de transgenes a fin de expresar ARN guía sintéticos (ARNgs) para la interrupción, eliminación o activación de los genes. En un futuro cercano, se dispondrá de herramientas que permitan realizar modificaciones genómicas en animales de forma cada vez más precisa (Lino *et al.*, 2018). No obstante, las herramientas de modificación genómica siguen sufriendo de un componente secuencia-contexto muy acusado que limita las secuencias que se pueden delimitar de forma eficiente. Por ello, habrá que poder relajar o romper dichas restricciones con el fin de modificar cualquier secuencia dada, independientemente del contexto genómico. En este sentido, también será pertinente el desarrollo de nuevos métodos bioinformáticos para mejorar el diseño y la selección de guías de ARN únicas y más eficientes que se emplearán en combinación con las tecnologías de CRISPR-Cas (Oliveros *et al.*, 2016; y Torres-Pérez *et al.*, 2019).

1.3.3 Nuevos métodos de análisis y visualización del genoma

Cultivos tridimensionales y de organoides: un *organoide* es una estructura tridimensional derivada de células troncales y contiene tipos celulares de órganos específicos que se autoorganiza y se asemeja a la característica fisiológica de dicho órgano (Clevers, 2016; y Yin *et al.*, 2016). La importancia de estos

cultivos de órganos *en placas* es que pueden recapitular y, con el tiempo y al ir mejorando, simular el microambiente natural de un órgano, lo que permite a los investigadores plantear preguntas más complejas sobre el funcionamiento del (epi)genoma humano durante el desarrollo o en reacción a diversos estímulos. Además, en la investigación biomédica, tienen el potencial de crear modelos más exactos de las enfermedades humanas mediante células troncales pluripotentes derivadas de pacientes (Yin *et al.*, 2016) o, en el futuro, de ser una fuente de órganos para trasplantes en la medicina regenerativa. Los organoides humanos también pueden superar las diferencias genéticas y de dosificación génica que a veces existen entre los humanos y los organismos modelo y que pueden complicar el estudio de determinados trastornos humanos. **Sin embargo, el verdadero desafío consiste en crear los propios organoides. Aunque en el laboratorio se han creado con éxito organoides de varios órganos, estos carecen de la complejidad y organización de los órganos reales.** Por lo tanto, la mejora de los organoides supone un desafío importante en el futuro cercano. Además, trabajar con los organoides continúa resultando difícil, exigiendo mucho tiempo y esfuerzo y teniendo un coste superior al de los cultivos bidimensionales tradicionales, y su estudio mediante técnicas estándar sigue resultando más complejo (por ejemplo, se complica al tratar de aplicar dispositivos de obtención de imágenes) (Jensen y Teng, 2020).

Nuevos desarrollos en el ámbito de la obtención de imágenes en directo: aunque la relación entre las técnicas de adquisición de imágenes y las herramientas genómicas no es obvia, existen entre ellas sinergias interesantes que conviniere explorar en el futuro. Como ya se ha mencionado, la modificación genómica puede aportar nuevas herramientas para la obtención de imágenes en directo al ayudar a etiquetar y visualizar regiones específicas del ADN, lo que, por ejemplo, puede mejorar el conocimiento actual de la organización tridimensional del genoma y superar algunas de las limitaciones de los métodos genómicos masivos (por ejemplo, la heterogeneidad y la dinámica) (revisado en Pickar-Oliver y Gersbach, 2019). Por otra parte, el desarrollo de la microscopia celulómica de alto rendimiento pudiera complementar a la perfección los datos obtenidos mediante técnicas *ómicas* de célula única. Además, resultará pertinente para racionalizar los procedimientos que vinculan los cribados del genoma completo con los resultados obtenidos mediante microscopia.

Ómica de célula única: la gran ventaja de efectuar análisis *ómicos* de células sueltas es que permite a los investigadores tener en cuenta la heterogeneidad natural de los sistemas biológicos, ya que, en lugar de promediar la señal de

varias células en un solo resultado, se conserva la información de cada una de las células. En la actualidad, poseemos la capacidad de interrogar a células de manera individual para diversas capas *ómicas*, ya se trate del genoma, el transcriptoma, el epigenoma o el genoma tridimensional (Chappell *et al.*, 2018). A pesar de ello, aún quedan desafíos por resolver en el futuro. Todavía cuesta efectuar algunas tecnologías *ómicas* con una resolución de célula única debido al escaso material biológico, por lo que todavía hay margen de mejora en esa dirección. Se están implantando métodos de reciente desarrollo para posibilitar un mapeo de alto rendimiento de la expresión génica a escala de célula única dentro de los tejidos (transcriptómica espacial). Además, el coste de dichas tecnologías sigue siendo elevado, y habrá que mejorar el componente computacional para mejorar el análisis. Por último, la combinación de varias de estas tecnologías en la multiómica de célula única experimentará un mayor desarrollo en un futuro cercano (Chappell *et al.*, 2018).

CAPÍTULO 1 BIBLIOGRAFÍA

- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I.M., Cox, D.B.T., Shmakov, S., Makarova, K.S., Semenova, E., Minakhin, L. *et al.* (2016). C2c2 is a single-component programmable RNAGuided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353, aaf5573.
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. *et al.* (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149-157.
- Bastida, M.F., Pérez-Gómez, R., Trofka, A., Zhu, J., Rada-Iglesias, A., Sheth, R., Stadler, H.S., Mackem, S. y Ros, M.A. (2020). The formation of the thumb requires direct modulation of Gli3 transcription by Hoxa13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117, 1090-1096.
- Caburet, S., Arboleda, V.A., Llano, E., Overbeek, P.A., Barbero, J.L., Oka, K., Harrison, W., Vaiman, D., BenNeriah, Z., García-Tuñón, I. *et al.* (2014). Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* 370, 943-949.
- Chappell, L., Russell, A.J.C. y Voet, T. (2018). Single-Cell (Multi) omics Technologies. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 19, 15-41. doi: 10.1146/annurev-genom-091416-035324.
- Charpentier, M., Khedher, A.H.Y., Menoret, S., Brion, A., Lamribet, K., Dardillac, E., Boix, C., Perrouault, L., Tesson, L., Geny, S. *et al.* (2018). CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* 9, 1-11.
- Chneiweiss, H., Hirsch, F., Montoliu, L., Müller, A.M., Fenet, S., Abecassis, M., Merchant, J., Baertschi, B., Botbol-Baum, M., Houghton, J.A. *et al.* (2017). Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. *Transgenic Res.* 26, 709-713.
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165, 1586-1597.
- Doudna, J.A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578, 229-236.
- El-Mounadi, K., Morales-Florian, M.L. y García-Ruiz, H. (2020). Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9. *Front. Plant Sci.* 11, 1-16.
- Ewen-Campen, B., Yang-Zhou, D., Fernandes, V.R. *et al.* (2017). Optimized strategy for in vivo Cas9-activation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114(35):9409-9414.
- Gratz, S.J., Wildonger, J., Harrison, M.M. y O'Connor-Giles, K.M. (2013). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly* 7(4), 249-255. doi: 10.4161/fly.26566. Publicación electrónica: 2 de octubre de 2013.
- Fernández-Albert, J., Lipinski, M., López-Cascales, M.T., Rowley, M.J., Martín-González, A.M., Del Blanco, B., Corces, V.G. y Barco, A. (2019). Immediate and deferred epigenomic signatures of in vivo neuronal activation in mouse hippocampus. *Nat. Neurosci.* 22, 1718-1730.
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O.R., Ramos, I., García-Tuñón, I., de Rooij, D.G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J.L. *et al.* (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat. Commun.* 7, 13298.
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Condezo, Y.B., García-Valiente, R., Ramos, I., Suja, J.A., Barbero, J.L., Roig, I., Sánchez-Martín, M., de Rooij, D.G. *et al.* (2019). The PSMA8 subunit of the spermatoproteasome is essential for proper meiotic exit and mouse fertility. *PLoS Genet.* 15, e1008316.
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N.M., Freije, C.A. *et al.* (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 356, 438-442.
- Gutiérrez-Pérez, I., Jordan-Rowley, J., Lyu, X., Valadez-Graham, V., Vallejo, D.M., Ballesta-Illán, E., López-Atalaya, J.P., Kremsky, I., Caparrós, E., Corces, V.G., Domínguez, M. (2019). Ecdysone-Induced 3D Chromatin Reorganization Involves Active Enhancers Bound by Pipsqueak and Polycomb. *Cell Rep.* 28, 2715-2727.e5.

- Hellmuth, S., Gutiérrez-Caballero, C., Llano, E., Pendás, A.M. y Stemmann, O. (2018). Local activation of mammalian separase in interphase promotes double-strand break repair and prevents oncogenic transformation. *EMBO J.* 37(22), e99184.
- Hirsch, F., Lemaitre, C., Chneiweiss, H. y Montoliu, L. (2019). Genome Editing: Promoting Responsible Research. *Pharmaceut. Med.* 33, 187-191.
- Inserte, J., Mollá, B., Aguilar, R., Través, P.G., Barba, I., Martín-Sanz, P., Boscá, L., Casado, M. y García-Dorado, D. (2009). Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 160-168.
- Jayavaradhan, R., Pillis, D.M., Goodman, M., Zhang, F., Zhang, Y., Andreassen, P.R. y Malik, P. (2019). CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nat. Commun.* 10, 1-13.
- Jensen, C. y Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* 7, 1-15.
- Jimeno, S., Mejías-Navarro, F., Prados-Carvajal, R. y Huertas, P. (2019). Controlling the balance between chromosome break repair pathways. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 4, 95-134.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. y Charpentier, E. (2012). A programmable dualRNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (6096), 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. y Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013, 1-9.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. y Joung, J.K. (2016). Highfidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490-495.
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. y Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brindeau, N.J., Oki, J., Shokhirev, M.N. y Hsu, P.D. (2018). Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell* 173, 665-676.
- Lee, H., Yoon, D.E. y Kim, K. (2020). Genome editing methods in animal models. *Animal Cells Syst. (Seúl)*. 24, 8-16.
- Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P. y Timlin, J.A. (2018). Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 25, 1234-1257.
- Lipinski, M., Muñoz-Viana, R., Del Blanco, B., Márquez-Galera, A., Medrano-Relinque, J., Caramés, J.M., Szczepankiewicz, A.A., Fernández-Albert, J., Navarrón, C.M., Olivares, R. *et al.* (2020). KAT3-dependent acetylation of cell type-specific genes maintains neuronal identity in the adult mouse brain. *Nat. Commun.* 11, 2588.
- Liu, J.J., Orlova, N., Oakes, B.L., Ma, E., Spinner, H.B., Baney, K.L.M., Chuck, J., Tan, D., Knott, G.J., Harrington, L.B. *et al.* (2019). CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature* 566, 218-223.
- López-Saavedra, A., Gómez-Cabello, D., Domínguez-Sánchez, M.S., Mejías-Navarro, F., Fernández-Ávila, M.J., Dinant, C., Martínez-Macías, M.I., Bartek, J. y Huertas, P. (2016). A genome-wide screening uncovers the role of CCAR2 as an antagonist of DNA end resection. *Nat. Commun.* 7, 12364.
- Menchaca, A., Santos-Neto, P.C., Mulet, A.P. y Crispo, M. (2020). CRISPR in livestock: From editing to printing. *Theriogenology* 150, 247-254.
- Moncayo-Arlandi, J., Guasch, E., Sanz de la Garza, M., Casado, M., García, N.A., Mont, L., Sitges, M., Knöll, R., Buyandelger, B., Campuzano, O. *et al.* (2016). Molecular disturbance underlies to arrhythmogenic cardiomyopathy induced by transgene content, age and exercise in a truncated PKP2 mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3676-3688.
- Montoliu, L., Merchant, J., Hirsch, F., Abecassis, M., Jouannet, P., Baertschi, B., Sarrauste de Menthère, C. y Chneiweiss, H. (2018). ARRIGE Arrives: Toward the Responsible Use of Genome Editing. *Cris. J.* 1, 128-129.

- Motioño, O., Francés, D.E., Casanova, N., Fuertes-Agudo, M., Cucarella, C., Flores, J.M., Vallejo-Cremades, M.T., Olmedilla, L., Pérez Peña, J., Bañares, R. *et al.* (2019). Protective Role of Hepatocyte Cyclooxygenase-2 Expression Against Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Hepatology* 70, 650-665.
- Oliveros, J.C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San León, D., Montoliu, L., Cubas, P. y Pazos, F. (2016). Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, W267-71.
- Pickar-Oliver, A. y Gersbach, C.A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 490-507.
- Rees, H.A., Yeh, W.H. y Liu, D.R. (2019). Development of hRad51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. *Nat. Commun.* 10, 2212.
- Remesal, L., Roger-Baynat, I., Chirivella, L., Maicas, M., Brocal-Ruiz, R., Pérez-Villalba, A., Cucarella, C., Casado, M. y Flames, N. (2020). PBX1 acts as terminal selector for olfactory bulb dopaminergic neurons. *Development* 147, dev186841.
- Saiz-López, P., Chinnaiya, K., Campa, V.M., Delgado, I., Ros, M.A. y Towers, M. (2015). An intrinsic timer specifies distal structures of the vertebrate limb. *Nat. Commun.* 6, 8108.
- Schuster, M. y Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 130, 43-53.
- Seruggia, D., Fernández, A., Cantero, M., Pelczar, P. y Montoliu, L. (2015). Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 43, 4855-4867.
- Soria-Bretones, I., Cepeda-García, C., Checa-Rodríguez, C., Heyer, V., Reina-San-Martín, B., Soutoglou, E. y Huertas, P. (2017). DNA end resection requires constitutive sumoylation of CtIP by CBX4. *Nat. Commun.* 8(1), 113.
- Sridhar, B., Rivas-Astroza, M., Nguyen, T.C., Chen, W., Yan, Z., Cao, X., Hebert, L. y Zhong, Sheng (2017). Systematic Mapping of RNA-Chromatin Interactions. *Vivo. Curr. Biol.* 27 (4), 610-612.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y. y Zhang, Y. (2017). Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Front. Physiol.* 8, 1-22.
- Strecker, J., Jones, S., Koopal, B., Schmid-Burgk, J., Zetsche, B., Gao, L., Makarova, K.S., Koonin, E. V. y Zhang, F. (2019). Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat. Commun.* 10(1), 112.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y. y Zhang, Y. (2017). Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Front. Physiol.* 8, 1-22.
- Torres-Pérez, R., García-Martín, J.A., Montoliu, L., Oliveros, J.C. y Pazos, F. (2019). CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. *Bioeng. (Basilea, Suiza)*, 6(3), 63.
- Vicente García, C., Villarejo Balcells, B., Irastorza Azcárate, I., Naranjo, S., Acemel, R.D., Tena, J.J., Rigby, P.W.J., Devos, D.P., Gómez-Skarmeta, J.L. y Carvajal, J.J. (2017). Regulatory landscape fusion in rhabdomyosarcoma through interactions between the PAX3 promoter and FOXO1 regulatory elements. *Genome Biol.* 18, 106.
- Wienert, B., Nguyen, D.N., Guenther, A., Feng, S.J., Locke, M.N., Wyman, S.K., Shin, J., Kazane, K.R., Gregory, G.L., Carter, M.A.M. *et al.* (2020). Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair. *Nat. Commun.* 11, 2109.
- Xu, J., Hua, K. y Lang, Z. (2019). Genome editing for horticultural crop improvement. *Hortic. Res.* 6, 113.
- Xu, S., Kim, J., Tang, Q., Chen, Q., Liu, J., Xu, Y. y Fu, X. (2020a). CAS9 is a genome mutator by directly disrupting DNA-PK dependent DNA repair pathway. *Protein Cell* 11, 352-365.
- Xu, X., Hulshoff, M.S., Tan, X., Zeisberg, M. y Zeisberg, E.M. (2020b). Crispr/cas derivatives as novel gene modulating tools: Possibilities and in vivo applications. *Int. J. Mol. Sci.* 21(9), 3038.
- Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M. y Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* 18, 25-38.
- Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., Van Der Oost, J., Regev, A. *et al.* (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* 163, 759-771.
- Zhang, Z.-T., Jiménez-Bonilla, P., Seo, S.-O., Lu, T., Jin, Y.-S., Blaschek, H.P. y Wang, Y. (2018). Bacterial Genome Editing with CRISPR-Cas9: Taking *Clostridium beijerinckii* as an Example. En *Synthetic Biology: Methods and Protocols*, J.C. Braman, ed. (Nueva York, NY: Springer New York), 297-325.