

© Del Autor:

Lluís Montoliu

© Next Door Publishers

Primera edición: febrero 2019

Segunda edición: abril 2020

Tercera edición: marzo 2021

ISBN: 978-84-122556-8-3

ISBN eBook: 978-84-122556-9-0

DEPÓSITO LEGAL: DL NA 367-2021

Reservados todos los derechos. No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea mecánico, electrónico, por fotocopia, por registro u otros medios, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del *copyright*.

Next Door Publishers S.L.

c/ Emilio Arrieta, 5, entlo. dcha., 31002 Pamplona

Tel: 948 206 200

E-mail: [info@nextdooreditores.com](mailto:info@nextdooreditores.com)

[www.nextdoorpublishers.com](http://www.nextdoorpublishers.com)

Impreso por Liberdúplex

Impreso en España

Diseño de colección: Ex. Estudi

Autora del sciku: Laura Morrón

Dirección de la colección: Laura Morrón

Editora: Laura Morrón

Corrección y composición: NEMO Edición y Comunicación



**Colección**  
El Café Cajal

*A Montserrat, mi amada Silveria*

# Índice

## Prefacio

## Prólogo

**Capítulo 1. Introducción a las CRISPR: un regalo de las bacterias**

**Capítulo 2. De la edición de textos a la edición de genes**

**Capítulo 3. Mi primer encuentro con Francis**

**Capítulo 4. ¿Quién es quién en el mundo CRISPR?**

**Capítulo 5. ¿Qué sabemos hoy en día y qué es lo que todavía no controlamos de la edición genética?**

**Capítulo 6. Descubriendo la parte oculta de nuestro genoma**

**Capítulo 7. Hacia el tratamiento de las enfermedades congénitas raras, que no son tan raras**

**Capítulo 8. Los ratones avatar**

**Capítulo 9. Vacas sin cuernos y ovejas para carne y para lana**

**Capítulo 10. Póngame por favor este riñón porcino de talla XXL**

**Capítulo 11. Este mosquito ya no me va a picar**

**Capítulo 12. Sobre champiñones, repollos y tomates editados**

**Capítulo 13. ¿Curamos al enfermo o al bebé que todavía tiene que nacer?**

**Capítulo 14. ¿Todo lo que podemos hacer lo debemos hacer?**

**Capítulo 15. ¿Podemos usar las CRISPR, que provienen de las bacterias, para modificar otras bacterias?**

**Capítulo 16. La imaginación de los investigadores no tiene límites**

**Capítulo 17. El futuro de la edición genética**

## Agradecimientos

## Bibliografía

# Prefacio: Serendipia de principio a fin

La serendipia está presente en cualquier avance científico. Es una palabra muy utilizada en inglés (*serendipity*) que puede también traducirse al español como «chiripa», pero que va más allá de la suerte o la fortuna, conceptos con los que habitualmente se confunde. Buena suerte es pasar por debajo de un balcón, que se descuelgue un tiesto de geranios y que caiga justo delante o detrás de nosotros, sin tocarnos ni rompernos la cabeza. Eso es la buena fortuna. La serendipia o chiripa va mucho más allá. Es darse de bruces con algo inesperado y percatarse de que es relevante, de que tiene interés. Es pasear por un jardín contemplando el césped y descubrir un trébol de cuatro hojas, detenerse a observarlo y darse cuenta de que es una rareza (la mayoría de tréboles tienen tres hojas) y preguntarse cómo puede ser que este trébol tenga una hoja más que el resto, lo que puede llevar a comprender cómo se desarrollan las hojas del trébol y, quizás, algún patrón de desarrollo global de las plantas que permita explicar el mecanismo que emplean para crecer no solamente esa especie vegetal sino muchas otras, o todas ellas.

La definición de serendipia que aparece en el diccionario de la Real Academia Española es muy elocuente: «Hallazgo valioso que se produce de manera accidental o casual». En esta definición están todos los elementos importantes para entender este término y su relación tan directa con la ciencia, con el avance científico. En primer lugar, es un «hallazgo», algo que no conocíamos. Por lo tanto, un elemento característico de cualquier descubrimiento científico. En segundo lugar, dice que es «valioso». Es decir, probablemente permita acceder a otras ideas, a otros conceptos u otros conocimientos que, sin este empujón inicial, no habríamos podido

descubrir. Valioso también en el sentido del valor que puede tener su trascendencia, lo que nos puede permitir llegar a conocer o desarrollar. Y, en tercer lugar, dice la definición que se produce «de manera accidental o casual». Es decir, que no lo esperamos, que nos lo encontramos de forma imprevista, sorpresiva. Y en lugar de desecharlo o simplemente ignorarlo, optamos por centrar nuestra atención en este hecho, intentando entender cómo se ha producido, por qué ha ocurrido, qué podemos aprender o derivar de todo ello.

El descubrimiento de las herramientas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) de edición genética tiene por supuesto su buena dosis de serendipia, como intentaré desgranar en los diferentes capítulos de este libro. Pero también hay serendipia en cómo llego yo a trabajar en mi laboratorio con estas herramientas y en cómo conozco a un investigador fundamental en este campo, Francisco Juan Martínez Mojica (Francis Mojica, para colegas y amigos). Y, finalmente, en cómo llego a escribir este libro que tienes en las manos.

Vayamos por partes.

En el año 2011, me planteo seguir estudiando en mi laboratorio una parte importante, pero compleja, de nuestro genoma, del material genético que tenemos en todas nuestras células, llamada «genoma no codificante», es decir,

que no contiene genes, frente a la parte del genoma donde se agrupan los genes, que solemos denominar «genoma codificante» y que apenas ocupa un 2 % de todo el genoma, que contiene los aproximadamente 20 000 genes que tenemos los humanos (y los ratones). El genoma no codificante también puede llamarse «intergénico». O, de forma mucho más prosaica, «basura» o «materia oscura», por lo inservible, ignoto e inaccesible que ha sido durante muchos años. Para ello, decidimos acudir a unas herramientas

**La serendipia está presente en cualquier avance científico.**

de edición genética anteriores a las CRISPR, llamadas TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*, nucleasas efectoras parecidas a activadores transcripcionales), que por aquel entonces habían sido descritas no hacía mucho y a las que me referiré posteriormente en este libro. En septiembre de 2012, empezamos a utilizarlas en mi laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Y todo ello gracias a otra agradable serendipia, a un joven investigador italiano, Davide Seruggia, que decide dejar su Milán natal para realizar su tesis con nosotros, en Madrid. Davide, uno de los estudiantes más despiertos y capaces, intelectual y técnicamente, que he tenido el placer de dirigir y supervisar, lo intentó de todas las formas posibles, sin éxito. No había manera de generar una TALEN que hiciera lo que queríamos, que cortara en un determinado lugar del genoma del ratón, la especie animal que usamos en el laboratorio como modelo experimental para entender nuestro genoma.

Hartos y desesperados después de tantos fracasos experimentales (el fracaso es el estado habitual en ciencia, donde predominan los experimentos que no salen como uno espera o, simplemente, no funcionan de ninguna manera), decidimos pedir ayuda a algún colega internacional que nos echara una mano y nos permitiera superar el bloqueo en el que nos encontrábamos. En enero de 2013 contactamos con Pawel Pelczar, investigador de origen polaco que en aquel momento trabajaba en Zúrich, y en pocos meses organizamos una estancia de Davide con su equipo, famoso por ser uno de los laboratorios de referencia en las herramientas TALEN, para que nos iluminaran y nos ayudaran a salir del agujero en el que parecíamos haber caído. Davide programó su viaje a Suiza y aterrizó en Zúrich en abril de 2013.

En la primera semana de mayo de 2013, aparece la primera publicación científica que refiere el uso de las herramientas de edición genética CRISPR (que desconocíamos completamente hasta ese momento) para generar ratones editados genéticamente. Este sorprendente hallazgo no pasa desapercibido para Pawel, quien se percata de la importancia de estas nuevas herramientas y decide dejar las TALEN a un lado y poner inmediatamente

a todo el grupo a trabajar con las CRISPR, incluido Davide, que era el estudiante visitante. A finales de mayo de 2013, Davide me envía emocionado unos primeros resultados que indican que las herramientas CRISPR son por lo menos diez veces mejores que las TALEN. Por lo tanto, nuestro laboratorio se beneficia inesperada e indirectamente de una revolución que apenas se estaba gestando. Yo había enviado a Davide a Suiza para aprender sobre TALEN y regresó a Madrid al cabo de pocos meses siendo ya un experto en CRISPR. ¡Sorprendente! A veces uno está en el sitio correcto en el momento adecuado. Eso nos pasó a nosotros durante la primera mitad del año 2013.

En efecto, tras regresar Davide en el verano de 2013, empezamos a constatar en primera persona todo lo que maravillaría poco después al mundo entero: la tremenda capacidad y eficacia de las herramientas de edición genética CRISPR para generar modificaciones genéticas complejas en genomas que, hasta entonces, había sido imposible abordar.

La serendipia también estuvo presente en mi primer encuentro con Francis Mojica, que relataré en detalle en el capítulo correspondiente de este libro. A finales de 2014, cuando ya llevábamos un año y medio de alegrías y éxitos con las herramientas CRISPR en el laboratorio, conozco de forma inesperada a Francis en el Ministerio de Economía y Competitividad, del cual dependía la ciencia hasta hace poco en España (mientras escribo este libro, ha habido un cambio de gobierno y de partido político al mando que ha llevado a recrear el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades). Por aquel entonces yo estaba trabajando para la ANEP (la hoy extinta Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva, que ha sido sustituida por la AEI, la Agencia Estatal de Investigación) y nos encargábamos de revisar lo que otros investigadores habían hecho con las ayudas económicas recibidas desde el gobierno en años anteriores. Mientras evaluábamos presencialmente a diferentes investigadores del país, de repente aparece Francis Mojica y yo oigo hablar a alguien de las CRISPR en primera persona, de su trabajo. Fue toda una sorpresa. Desconocía por completo la existencia de Francis y todo su trabajo esencial como descubridor de estas

herramientas genéticas y de su función biológica como sistema de defensa en las bacterias. Tras ese primer encuentro con Francis siguieron otros muchos, hasta nuestra relación actual no solamente de colaboración científica, sino de amistad.

Finalmente, ¡cómo no!, la serendipia también tiene un papel principal en la escritura de este libro, el primero que escribo en solitario tras haber colaborado en muchos otros libros con capítulos, entrevistas y comentarios. A principios de 2017 contacta conmigo el periodista Antonio Martínez Ron, a quien conocí a través de otro investigador joven y emprendedor, Lucas Sánchez, que había realizado su tesis doctoral en el laboratorio vecino al nuestro en el CNB. Con Antonio ya había comentado en el pasado diferentes noticias de ciencia y también alguna de nuestras publicaciones o descubrimientos. Antonio conocía nuestras investigaciones sobre enfermedades raras humanas (las que afectan a menos de 1 de cada 2000 personas), y en concreto sobre una de ellas, la condición genética del albinismo, que es la que investigamos en el laboratorio desde hace más de 25 años, y me llamó para proponerme una entrevista que le había encargado la editorial Next Door Publishers para incluirla en un libro de alguien que había escrito su autobiografía como persona con una de estas enfermedades raras. Apenas me dio más información sobre el libro en el que íbamos a participar y, cuando vino al CNB, empezamos a hablar de nuestros experimentos, de esto y de aquello... y se nos pasó el tiempo en un santiamén.

Yo veía que Antonio desplegaba todos sus artilugios electrónicos para grabar audio, para tomar imágenes y se le veía muy interesado en todo lo que le contaba. Debía de estarlo. De esa reunión en el CNB no solamente salió un estupendo capítulo en forma de entrevista que Antonio escribió para el libro *Retrón*, de Raúl Gay, sino ideas para el episodio 16, «Raro», del fabuloso podcast *Catástrofe Ultravioleta* (premiado en 2017 con un Ondas), que realiza con Javier Peláez y Javier Álvarez, y material adicional para un fantástico artículo periodístico sobre los ojos de Pepe y de su ratón avatar

que publicaría poco después en NEXT-*Vozpópuli* y por el que también sería premiado.

Laura Morrón y Oihan Iturbide, de Next Door Publishers, tuvieron a bien invitarme a la presentación del libro *Retrón* que tuvo lugar en el Espacio Telefónica de Madrid y allí conocí a una persona increíble, un verdadero fuera de serie: Raúl Gay. Sin conocernos previamente, y gracias a la magia y la pluma de Antonio, la entrevista que me hizo sobre enfermedades raras encajó como un guante en la apasionante y dura autobiografía de Raúl, que se abría de par en par para explicarnos su vida con una discapacidad. Si no has leído todavía el libro, te recomiendo que lo hagas. Puedes estar seguro de algo: no te dejará indiferente. Como dicen en el sur, esa tarde-noche en Madrid apareció el duende y quedamos todos prendados con la personalidad de Raúl. Nunca habría imaginado poder llegar a conocer a una persona como él.

Más tarde, Javier Peláez me invitó a acudir al evento Naukas 2017, en Bilbao, para explicar de una forma sencilla lo que hacemos en el laboratorio. Naturalmente había oído hablar de Naukas, pero nunca había tenido ocasión de acercarme a ninguno de sus eventos de divulgación. Siempre andaba liado en otros menesteres o coincidían con otras reuniones. Al asistir al Naukas 2017, pude comprobar lo que me había perdido al no haber presenciado antes esta explosión de conocimiento y entretenimiento organizada por un puñado de mentes talentosas de todo el país. «Permanentemente boquiabierto» sería el estado que mejor definiría mi paso por el evento. Y desde entonces quedé prendado de la plataforma Naukas y he empezado a colaborar con ellos en todo lo que he podido. Quien mejor lo expresó fue el gran neurocientífico, colega y amigo José Ramón Alonso, cuando me dijo: «Lluís, tú siempre fuiste de Naukas, solo que no lo sabías». Precioso.

Y de nuevo la serendipia. Gracias a mi participación en Naukas 2017, volví a coincidir con Laura Morrón, que no solo intervino de forma brillante en el evento, sino que también estaba a cargo del puesto de la editorial en el

Palacio Euskalduna de Bilbao, y allí pude iniciar una conversación con ella que ha terminado dando forma a este libro que ahora estás leyendo.

Serendipia de principio a fin. Como todo buen descubrimiento científico.

En las páginas que siguen descubrirás por qué califico de maravillosas estas herramientas de edición genética y entenderás también por qué me refiero a lo que podemos hacer con ellas mediante la expresión «recorta, pega y colorea».

Este libro se enfrenta al reto de intentar resumir una tecnología actual y cambiante, en constante evolución, en la que cada semana aparecen aplicaciones novedosas y sorprendentes. Por ello será difícil que pueda cubrir todos los avances publicados, aunque intentaré que su versión final sea un fiel reflejo de nuestro conocimiento sobre el tema en el momento del cierre de la edición. Pero lo importante de este libro, lo que me ha animado a escribirlo, es su contextualización y visión histórica de esta metodología fabulosa, que nos ha cambiado la vida a muchos científicos. Por muchos avances y detalles actuales que aparezcan, creo que es todavía más interesante compartir cómo desde unos hallazgos pioneros de ciencia básica, realizados hace más de 25 años en nuestro país, y a través del trabajo de muchos investigadores, se llegaron a desarrollar unos útiles cuyos beneficios y aplicaciones posibles apenas estamos empezando a descubrir.

Para esta tercera edición del libro he actualizado los hitos más importantes que han ocurrido en el universo CRISPR durante 2020 y los primeros dos meses de 2021. La segunda edición terminó con la condena del investigador chino que aplicó edición genética sobre embriones humanos y propició su gestación, de la que nacieron tres niñas. En esta tercera edición, además de algunos avances espectaculares, debo necesariamente referirme al merecido Premio Nobel de Química otorgado por la Academia de Ciencias Sueca en octubre de 2020 a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, por desarrollar un método de edición genética. Este premio dejó fuera a muchos otros investigadores, en particular a Francis Mojica, que sin embargo fue el primero en alegrarse y

en felicitar a las premiadas, contento de que los sistemas CRISPR que habían surgido de sus hallazgos recibieran tan alto reconocimiento.

Este libro lo he escrito en muchos sitios: en estaciones de tren, en aeropuertos, viajando en tren (y a pesar de las múltiples conversaciones privadas que se escuchan a voz en grito en cualquier AVE a cualquier hora) o volando en avión, en taxis, en la tranquila soledad de las noches de hotel por diversos rincones de este mundo, en bares, salas de espera y hasta incluso, a veces, en casa. Probablemente su escritura sea un fiel reflejo de la vida deliciosamente ajetreada que llevo, siempre de un lado para otro, acudiendo a reuniones y conferencias, pero sin perder el contacto con mi laboratorio en el CNB gracias a un estupendo equipo de investigadoras e investigadores con quienes comparto penas y alegrías y que me permiten disfrutar, más si cabe, de esta maravillosa profesión, la de ser y vivir como científico.

No es fácil convivir con científicos. Uno es científico a tiempo completo, siempre y en todo momento. Y a veces se hace difícil recordar las prioridades y deberes que nos atañen. Pero nuestra labor también tiene recompensas muy agradables, satisfacciones inesperadas, como cuando puedes compartir y explicar lo que haces a otras personas y percibes en el brillo de sus ojos que lo entienden y que disfrutan con la explicación. Esto es lo que intento hacer habitualmente cuando divulgo y espero lograrlo también ahora y conseguir que disfrutes igualmente con la lectura de este libro.

Me gustaría recordar en este prefacio de la tercera edición a un gran investigador, colega y amigo, José Luis Gómez-Skarmeta, con quien colaboré en múltiples ocasiones y con quien discutí muchas veces sobre ciencia y sobre genética. Su fallecimiento prematuro, acaecido en septiembre de 2020 a causa de un cáncer, nos privó de seguir disfrutando de su talento y amistad.

Quiero terminar este prefacio recordando, además de a las personas ya mencionadas, a todos los miembros de mi laboratorio, actuales y pasados, y, por supuesto, a mi familia, a mi mujer Montserrat y a nuestros hijos Mercè

y Jordi. A mis padres, a los que seguro les habría encantado poder leer este libro. A mi hermana, a mis cuñados y sobrinos y al grupo de amigos de siempre, del Julivert Meu. A todos ellos muchas gracias por su apoyo incondicional y por su infinita paciencia durante todos estos años.

Lluís Montoliu  
Febrero de 2021

# Prólogo

A principios del nuevo milenio, dos jóvenes microbiólogos intercambiaban con cierta asiduidad correos electrónicos desde sus respectivos centros de trabajo localizados a 2000 km de distancia, en la Universidad de Utrecht en Holanda y en la Universidad de Alicante en España. Ambos investigan sobre un tipo de secuencias repetidas de función desconocida, localizadas en regiones no codificantes del ADN de distintos procariotas. El grupo al que pertenece el holandés (Ruud Jansen) tiene un largo recorrido en el uso de estas regiones repetidas para discernir entre distintas cepas de la bacteria causante de la tuberculosis. El equipo del español (autor de este prólogo) aspira a averiguar la razón de ser de estas repeticiones, a encontrar una explicación a su extendida presencia tanto en bacterias como en sus parientes lejanos, las arqueas. El interés de Ruud también va más allá del uso de las enigmáticas repeticiones como dianas para diagnóstico microbiológico. Durante meses compartimos y discutimos resultados no publicados obtenidos por ambas partes. La coincidencia de opiniones e inquietudes nos llevó a plantearnos aunar esfuerzos y presentar un proyecto con el fin de abordar su estudio, intención que se frustró cuando finalizó el contrato laboral que ligaba a Ruud con su grupo de trabajo en la universidad. Ruud tuvo que buscar fortuna en otro lugar y abandonó la línea de investigación que tanto lo fascinaba. Poco antes de tan desafortunado desenlace, Ruud me hizo partícipe de su descubrimiento más significativo, uno de los grandes hitos en el desarrollo del incipiente campo CRISPR. A finales de 2001, el grupo de Ruud se percató de que, junto a las regiones de las repeticiones de su bacteria predilecta, hay hasta cuatro genes distintos que se encuentran también presentes en un puñado de otros procariotas. La observación de que los cuatro genes estaban invariablemente situados en las

inmediaciones de las repeticiones sugería que podrían estar relacionados funcionalmente con ellas. Había que dar un nombre a estos genes y, como paso previo, nos propusimos pactar un acrónimo para las repeticiones. Este tenía que ser distinto a los previamente propuestos de manera independiente por ambos grupos, los únicos aparentemente interesados en el estudio de estas secuencias desde su descubrimiento más de una década antes. Debía ser original, único y no coincidir con ningún otro término utilizado en el ámbito científico. Tras recopilar las principales características descriptivas de estas repeticiones (agrupadas, de pequeño tamaño, parcialmente simétricas —palindrómicas— y dispuestas a espacios regulares), y barajando las letras iniciales de sus términos en inglés (*repeats, clustered, short, palindromic, regularly interspaced*), surgió la combinación CRISPR. A Ruud le encantó la propuesta: «Qué buen acrónimo es CRISPR... Tiene gancho... Además, no carece de importancia el hecho de que es una entrada única en *MedLine* ». (*Med-Line* era la base de datos de bibliografía más utilizada por entonces, al menos en el ámbito de la medicina y áreas relacionadas.) Ruud y sus colaboradores en Utrecht describieron los genes vecinos de las repeticiones como «asociados a CRISPR» y los denominaron con la abreviatura «cas», por su significado en inglés (*CRISPR-associated*), en un original que publicaron en 2002 donde se utilizó por primera vez el acrónimo CRISPR. Desde entonces y hasta junio de 2018, el número de artículos que citan CRISPR en *MEDLINE/PubMed* es de casi 10 000. En aquella época no habría sospechado que ese «crujiente» acrónimo, hoy considerado por muchos «inapropiado» como término científico, llegara a hacerse tan popular en los laboratorios de todo el mundo. Ni me podía imaginar que algún día se escribiría un libro de divulgación en el que se mencionara, menos aún que fuera el actor principal. Seguro que Ruud tampoco era consciente de la trascendencia que iban a tener nuestras conversaciones: los buscadores de internet encuentran a día de hoy decenas de millones de páginas web cuando introducimos la palabra clave «CRISPR», como si se tratara del nombre de un jugador de fútbol, y eso que CRISPR no mete goles en los estadios de fútbol (aunque en cierta

manera sí lo hace en otro terreno de juego, el del conocimiento). El taxista que hace unas semanas me trasladaba de Vilna a Trakai pronunciaba perfectamente el término CRISPR y era consciente de la envergadura del trabajo que se estaba haciendo con estas secuencias; el pasajero del asiento junto al mío en un vuelo a París de hace unos meses me confesó que era un fan de las CRISPR y que retuitea habitualmente noticias sobre los últimos avances; en un popular videojuego interactivo estadounidense incluyen el significado de las siglas entre sus preguntas; se habla de CRISPR en series de televisión, en la gran pantalla, en los parlamentos, en las plazas de los pueblos...

Pero de lo que se habla no es precisamente de la función biológica que desempeñan las CRISPR. La mayor parte de los cien millones de páginas web, los 300 000 vídeos y los 10 000 artículos de investigación que citan las CRISPR están fechados en los últimos cinco años, a partir de 2013, diez años después de que averiguáramos que las CRISPR son parte esencial de los sistemas de defensa de los procariotas. La razón de este alboroto no es otra que el desarrollo, a partir de 2012, cuando se llegó a esclarecer el mecanismo del sistema de defensa CRISPR, de unas herramientas extraordinarias, denominadas genéricamente «tecnología CRISPR», que utilizan sus componentes para editar el genoma de los seres vivos, desde el de las bacterias hasta el de los humanos.

Este libro trata sobre la tecnología CRISPR, la que sacó del anonimato a algunos de los microbiólogos, bioinformáticos, genetistas, bioquímicos y biólogos moleculares, todos estudiosos de los procariotas que, desde sus respectivas especialidades, habían contribuido a gestar esta revolución tecnológica, sin ser plenamente conscientes de la repercusión que su búsqueda del conocimiento iba a tener. Entre estos afortunados se encuentra el que suscribe. Y no es precisamente por el prestigio de las revistas en las que mi grupo de investigación publica habitualmente sus hallazgos (bastante alejadas de las «top 10»), ni siquiera bastó la repercusión internacional de nuestra investigación. Tampoco ha sido por pertenecer a una de las instituciones académicas más reconocidas del mundo (los

*rankings* mundiales de universidades asignan puestos modestos a la de Alicante), ni por ocupar el más alto puesto en la escala académica (soy profesor titular de universidad). La salida a la luz de esta historia fue el resultado del empeño de unos pocos en que así fuera. El primero en intentarlo en España fue uno de mis directores de tesis, el Dr. Francisco E. Rodríguez Valera, a través de una nota que publicó en mayo de 2014 en el boletín electrónico mensual de la Sociedad Española de Microbiología, con el título «Nuestra ciencia: un triunfo español, el sistema CRISPR». Pero no tuvo mucho eco que digamos. Al segundo lo conocí a finales de ese mismo año, cuando me seleccionaron por un proyecto que el Ministerio de Economía y Competitividad me había concedido como investigador principal tres años antes para que informara sobre sus progresos en persona ante un panel de evaluadores y expertos. Unos meses más tarde recibí, redirigido por uno de sus muchos destinatarios, un correo electrónico escrito por un investigador cuyo apellido me era algo familiar. El mensaje hacía referencia al trabajo pionero de mi grupo de investigación sobre las CRISPR, ¡y el autor decía conocerme! En internet estaba la respuesta. Asociado a su nombre apareció el rostro de uno de los expertos de ANEP, el que se sentaba en la mesa justo en la esquina opuesta a la mía, el mismo que nada más terminar mi exposición formuló una de esas preguntas que evidencian un buen conocimiento del tema. Indagando, averigüé que era fundador de la Sociedad Internacional de Tecnologías Transgénicas (ISTT), miembro del Comité de Dirección del Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras e investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro Nacional de Biotecnología, en cuyo servidor tenía nada menos que una página web sobre las CRISPR (<http://www.cnb.csic.es/~montoliu/CRISPR/>). Trabajaba en genética y terapia de enfermedades raras utilizando ratones editados con CRISPR. ¡Era un usuario de la técnica, en España, ya en 2014! Este biotecnólogo de profesión es el autor de este libro, el Dr. Lluís Montoliu.

Desde nuestro primer encuentro, el incansable Lluís ha incluido entre sus prioridades contarle al mundo que es de la opinión de que el origen de la

mayor revolución genética, en ciencias de la vida y de la salud, al menos en lo que llevamos de siglo, está en el sur de Europa, concretamente en Alicante. Tras Lluís vinieron otros que compartían la misma opinión, de la Universidad de Málaga, de la Universidad Miguel Hernández, de centros de investigación del área de Boston, incluso de mi propia Universidad de Alicante y hasta del Gobierno de la Nación. Como resultado de la campaña constante de Lluís y de la acción esporádica del resto, a los que se unirían muchos otros, llegaron las entrevistas. Cuando los medios de comunicación empezaron a difundirlo, vinieron los premios, honores, nombramientos, reconocimientos, las felicitaciones, las desgarradoras consultas por parte de desconocidos sobre posibilidades de cura de enfermedades genéticas propias o de familiares y las propuestas de todo tipo (casi), hasta el punto de que resulta harto complicado encontrar un hueco para tan siquiera escribir este prólogo. No digamos las innumerables invitaciones para impartir charlas. ¿Debería estar agradecido a los responsables de esta situación? Por supuesto que sí, y lo estoy. ¿Merece la pena dedicarle el tiempo que requiere esta actividad extra, que se suma a las muchas otras ligadas a la docencia e investigación de un profesor de universidad? Sin lugar a duda. Cualquier oportunidad para que los resultados de la investigación lleguen a la calle, al público general, se debe aprovechar. Lluís lo tiene claro. Además de la investigación, le apasiona su difusión. Ni una cosa ni otra las hace para cosechar reconocimientos, pero también los recibe, sin necesidad de que lo tengan que promocionar los compañeros de profesión. Los recibe en forma de frecuentes solicitudes para escucharlo o leerlo y en forma de premios a su labor investigadora, como el que la ISTT le ha otorgado recientemente por su contribución a la mejora de la tecnología transgénica. Para la comunidad CRISPR, es un lujo contar con este generoso paladín de la ciencia y la divulgación, y una dicha para los potenciales lectores el que haya accedido a escribir este libro sobre edición genética. El resultado es un fiel reflejo de su compromiso con todo aquello en lo que se implica (que no es poco), haciendo gala de una pluma exquisita y un lenguaje claro y fluido, del rigor

y de la sensatez con que trata la información que maneja (que en el campo CRISPR es abundante y variada).

La obra proporciona una amplia visión del tema, partiendo de la biología que subyace a la tecnología CRISPR, señalando los principales precursores del campo de investigación y los artífices de su desarrollo, para pasar a continuación a presentar ejemplos de los logros más sobresalientes que se han alcanzado hasta la fecha con su utilización, en investigación básica y en agricultura, ganadería, biotecnología y salud. Precisamente en el ámbito aplicado, no evita las cuestiones más controvertidas que podrían derivar de su utilización para modificar la información genética de los seres vivos, y de humanos en particular en el contexto éticomoral. De hecho, Lluís es un experto en bioética, miembro del Comité de Ética del CSIC y del panel de ética del European Research Council, y un adalid de la investigación reflexiva que impulsa iniciativas pioneras en este sentido en el ámbito de la genética, como la constitución de la Association for Responsible Research and Innovation in Genome Editing, cuyo objetivo es promover el uso responsable de la edición genética. Más allá de limitarse a una simple descripción de lo ya acontecido, el autor se adentra en el terreno especulativo, con la prudencia que lo caracteriza, sin caer en los perniciosos brindis al sol, difíciles de evitar cuando surgen avances de la magnitud de una tecnología que podría transformar profundamente la práctica clínica. Por el contrario, nos ofrece un análisis objetivo de lo que previsiblemente acontecerá en edición genética gracias a las CRISPR, a un mejor conocimiento de los sistemas de reparación de daños en el ADN, y quizás también gracias a lo mucho que todavía queda por descubrir sobre las herramientas que los procariotas utilizan para asegurar su supervivencia desde mucho antes de que estuvieran acompañados por otras formas de vida.

El primer libro de divulgación escrito en castellano sobre CRISPR puede que no supere en número de lectores al de los *bestsellers* de Isaac Asimov. Pero, aunque lo pudiera parecer, estas maravillosas herramientas no son

ciencia ficción y, tratándose de CRISPR, a ver quién se atreve a hacer una predicción, ¿verdad, Ruud?

Francisco J. Martínez Mojica

Julio de 2018

# Capítulo 1

## *Introducción a las CRISPR: un regalo de las bacterias*

Solemos asociar las bacterias a problemas, a enfermedades, a infecciones, a alimentos podridos o en mal estado. Las bacterias suelen ser las culpables de muchas de las cosas horribles que nos pasan cuando enfermamos. Acostumbran a ser las responsables cuando sufrimos una indigestión, una diarrea, cuando nos sube la fiebre y nos duele la garganta o el oído, cuando se nos enrojece o se nos descama la piel, cuando nos duelen las muelas, atacadas por las bacterias de la caries, o cuando tenemos mal aliento o nuestro sudor huele fatal. En todas estas situaciones (que también pueden estar causadas por hongos o por virus), siempre acudimos al médico (o, erróneamente, nos automedicamos) para que nos recete un antibiótico, un medicamento especialmente diseñado para combatir y eliminar las bacterias. Y nos alegramos cuando la droga hace su efecto (si el problema estaba causado por bacterias) y, tras unos pocos días de tratamiento disciplinado, retornamos a nuestro estado normal, saludable. Hasta la próxima vez que enfermemos.

Pero las bacterias también pueden ser útiles. Viven en nuestro cuerpo, fundamentalmente en el intestino, y colaboran en la digestión y procesamiento de lo que comemos. Forman la denominada «microbiota», a la que cada vez se asocian más funciones y que cada vez parece tener más influencia en nuestro estado de salud y hasta anímico. También consumimos bacterias a millones cada vez que degustamos un yogur, una cuajada o un queso, cuya transformación desde la leche original ha sido

propiciada por diferentes tipos de estos microorganismos. Y cuando comemos embutidos o verduras fermentadas, como las aceitunas en salmuera o los pepinillos encurtidos.

Además de habitar en nuestro cuerpo y ayudar a producir estos alimentos fermentados habituales, también pueden ser útiles en biología, en investigación científica. Las bacterias, y sus primas lejanas las arqueas, muchas de las cuales viven en ambientes muy extremos (salinas, fuentes termales, fosas marinas...), son unos microorganismos que denominamos «procariotas» porque carecen de un verdadero núcleo estructurado en el interior de sus células, en contraposición al resto de organismos formados por células con núcleo (donde se encuentra la mayor parte del material genético del organismo) y denominados «eucariotas», que significa que tienen un núcleo definido. Nosotros, los humanos, somos organismos pluricelulares eucariotas, como también lo son el resto de los animales y plantas. También existen microorganismos unicelulares eucariotas, como las levaduras que usamos para fermentar el pan, el vino o la cerveza, o los parásitos que causan la malaria.

Las bacterias llevan muchos más años que nosotros sobre la Tierra, miles de millones de años. Se cree que las bacterias más antiguas existirían desde hace 3500 millones de años, mientras que los humanos apenas llevamos un millón de años por aquí. Teniendo en cuenta que la edad de nuestro planeta se calcula en unos 4500 millones de años, las bacterias han poblado la Tierra durante más de las tres cuartas partes de su historia. Se suele decir, no sin razón, que colonizaron la Tierra mucho antes que nosotros y, si alguna vez nos extinguimos como especie, ellas seguirán existiendo tras nuestra desaparición.

Las bacterias y las arqueas, a pesar de ser microorganismos muy distintos y evolutivamente muy alejados, comparten esa característica carencia de núcleo que las identifica a ambas como procariotas, aunque frecuentemente se alude a todas ellas como «bacterias», sin más. Sin embargo, hay que recordar que las arqueas no son bacterias.

Ambas llevan tanto tiempo sobre nuestro planeta que han tenido la oportunidad de inventar casi cualquier función para hacer frente a casi cualquier necesidad vital a la que tuvieran que enfrentarse. Por eso hay bacterias y arqueas en ambientes inhóspitos, inhabitables, en los que ningún otro ser vivo puede sobrevivir: en las fosas marinas, soportando presiones colosales; en las fuentes termales, con temperaturas próximas a la ebullición del agua; en las salinas, con una salinidad ambiental insufrible para cualquier otro organismo; en nuestros estómagos, bañadas en soluciones muy ácidas; conviviendo con emisiones radioactivas; en ambientes sin oxígeno y en presencia de gases que son mortales para el resto de organismos, entre otros ambientes extraños.

En su versatilidad, en su capacidad para adaptarse a casi cualquier entorno, es donde esconden las bacterias y las arqueas su fuerza y su resistencia. Por eso, siempre que nosotros, los aparentemente organismos «superiores» eucariotas (pero limitados en tantas funciones), hemos tenido algún problema o hemos tenido que desarrollar alguna herramienta o proceso para investigar los seres vivos, hemos acudido y llamado a la puerta de los procariotas, seguros de que encontraríamos alguna bacteria o alguna arquea que habría inventado esa herramienta o proceso que pudiéramos aprovechar.

Así sucedió con las enzimas de restricción, proteínas que cortan el ADN en secuencias específicas, de pocas letras, y que fueron esenciales para la explosión de las técnicas de ingeniería genética que aparecieron en los años setenta. También aprendimos de las bacterias, a principios de los años noventa, cómo encender y apagar el funcionamiento de los genes, con los sistemas inducibles de expresión génica basados en el sistema de la tetraciclina. En este caso, los investigadores aprovecharon la existencia en bacterias de un conjunto de genes que se expresan coordinadamente, dentro de lo que se denomina un «operón», para permitir el crecimiento de la bacteria en presencia de este antibiótico, que habitualmente acaba con las bacterias que no tienen este operón, y que solo se activan cuando la bacteria detecta la presencia de la tetraciclina en el medio. También aprendimos, con

herramientas derivadas de las bacterias, a identificar fácilmente las células que expresaban un gen, usando otros genes de bacterias como chivatos o indicadores.

De cara a una mejor comprensión del libro, te invito a hacer un repaso de la genética y de cómo funcionan los procesos básicos del flujo de información genética desde el ADN a las proteínas, pasando por las moléculas intermediarias llamadas ARN.

Recordemos primero lo que nos enseñó un fraile agustino llamado Gregor Mendel a finales del siglo XIX mientras cruzaba diferentes variedades de guisantes en un convento de Brno (hoy en la República Checa). Mendel investigó qué ocurría al cruzar plantas de guisantes de frutos amarillos y verdes, o plantas que producían granos lisos y rugosos, en sus diversas combinaciones, hasta percatarse de determinados patrones, predecibles, que se repetían en los cruces en función de las plantas que se elegían como progenitoras. Al color o la forma de los guisantes los llamó «caracteres» y a lo que debía transmitirse entre generaciones, de plantas parentales a sus descendientes, lo llamó «elementos». Hoy en día sabemos que en realidad Mendel estaba descubriendo las bases de la herencia genética y cómo determinados genes podían tener diferentes variantes, lo que hoy llamamos «alelos». El gen que codifica la proteína que determina el color del guisante tiene un alelo que determina el color amarillo y otro distinto que conduce a que los granos sean verdes. Un mismo gen, dos alelos distintos. Lo mismo con la forma del grano, otro gen con dos alelos: liso y rugoso.

Mendel observó que siempre que cruzaba guisantes verdes con amarillos, todos sus descendientes eran amarillos. Y si cruzaba los guisantes amarillos de esta primera generación entre sí, entonces, en la siguiente generación, volvía a obtener guisantes verdes, aunque la mayoría seguían siendo amarillos, exactamente las tres cuartas partes. Invariablemente, en esta segunda generación aparecían de nuevo solo un cuarto de guisantes verdes. Había pues caracteres «dominantes» (el amarillo), que aparecían con más frecuencia, y otros «recesivos» (el verde), cuya aparición era minoritaria.

En realidad, Mendel estaba descubriendo que cada uno de nuestros genes (también los del guisante) tiene dos copias, la que heredamos del padre y la que recibimos de la madre. Dado que de cada gen hay múltiples variantes (alelos), el carácter que manifestaremos dependerá de las dos copias heredadas. Si estas copias son iguales, entonces mostraremos el carácter que corresponde a esa copia. En los guisantes, si hereda dos alelos amarillos, el guisante es amarillo. Si hereda dos alelos verdes, el guisante es verde. Hablamos en estos casos de una situación de homocigosis, dado que los alelos son idénticos, y a los individuos portadores de estos alelos idénticos los llamamos homocigotos.

Si por el contrario se heredan alelos distintos, entonces es un caso de heterocigosis y los individuos portadores se denominan heterocigotos. En el caso de los guisantes, si los alelos del gen que determina el color son distintos, el color dependerá de cuál de los alelos es el dominante. Dado que el color mayoritario del resultado de los cruces de Mendel era el amarillo, era lógico suponer que este color era el dominante. Podemos deducir que cuando coinciden dos alelos distintos, verde y amarillo, el color que se muestra es el que corresponde al alelo dominante, el amarillo. Al cruzar estos guisantes amarillos heterocigotos, externamente de color amarillo uniforme, pero internamente con alelos distintos, uno verde y otro amarillo, estos se distribuyen al azar entre la descendencia. Cada una de las plantas parentales tiene un 50 % de probabilidad de pasar a su descendencia el alelo verde o el amarillo. Matemáticamente, podemos predecir que en un 25 % de los casos habrá guisantes que hereden los dos alelos amarillos (y serán amarillos) y otro 25 % de casos que hereden los dos alelos verdes (y serán verdes). El 50 % restante heredará un alelo verde y otro amarillo (y serán amarillos, como sus padres). Sumando los amarillos obtenemos un 75 %, mientras que los verdes representan el 25 %, la cuarta parte que se indicaba anteriormente.

Si seleccionamos los guisantes amarillos heterocigotos y los cruzamos con guisantes verdes (que solo pueden ser homocigotos), entonces los guisantes resultantes serán amarillos o verdes al 50 %. En otras palabras, un

individuo heterocigoto traslada a su descendencia cada uno de sus dos alelos distintos al 50 %.

Creo que la figura 1.1 te ayudará a comprender mejor este fenómeno.

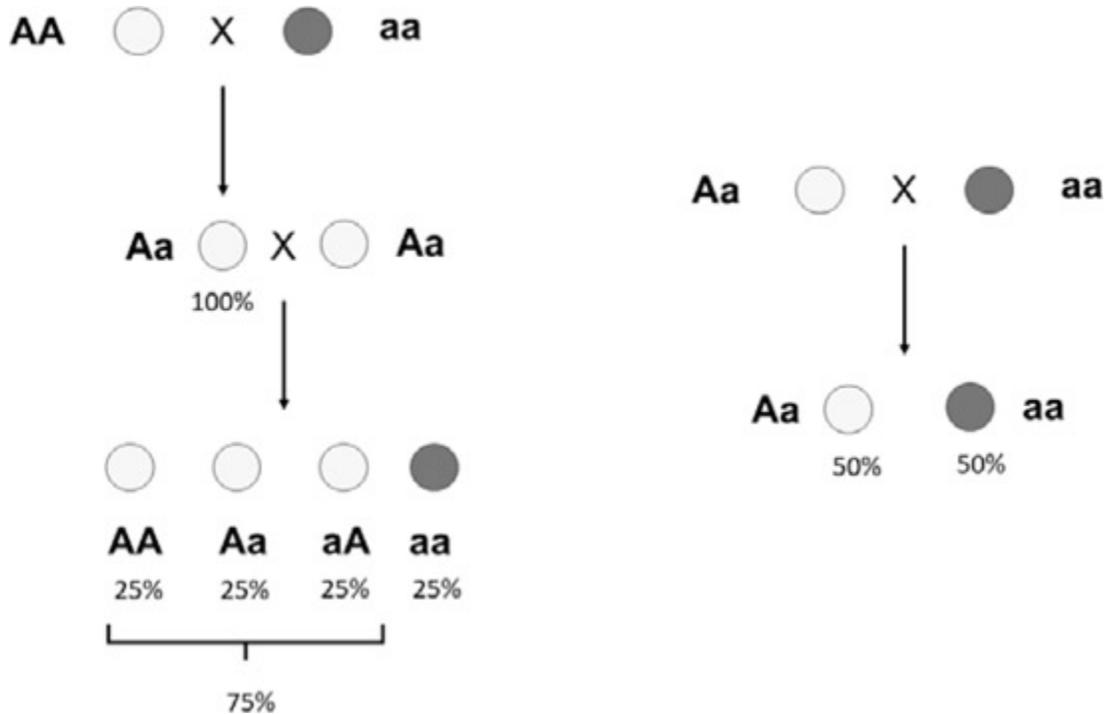


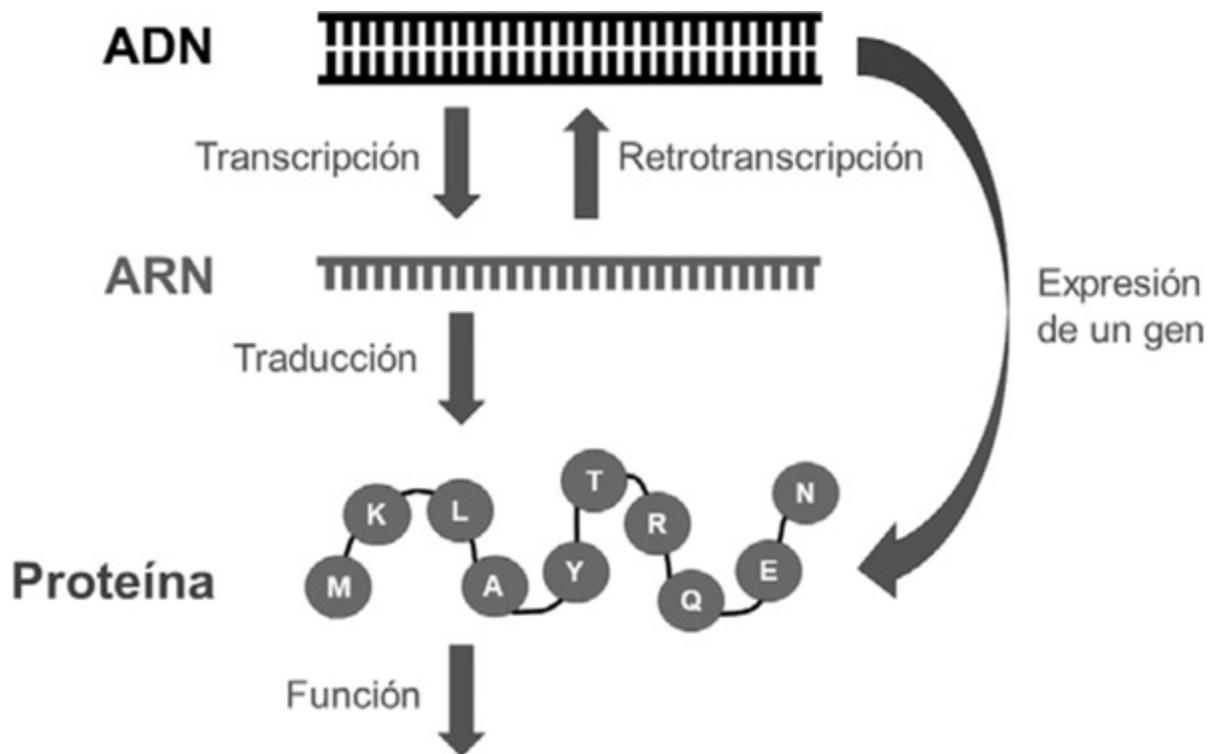
Figura 1.1. Experimentos de Mendel con guisantes. Izquierda: el cruce de dos variedades puras homocigotas de guisantes (amarilla y verde; clara y oscura en la figura) da lugar al 100% de individuos heterocigotos idénticos en la primera generación (todos amarillos), dado que el alelo amarillo (A) es dominante sobre el alelo verde (a), que es recesivo. El cruce de estos individuos entre sí da lugar a una segregación de los dos alelos y vuelven a aparecer guisantes con los dos colores en proporciones definidas. Derecha: el cruce de un guisante heterocigoto amarillo (Aa) con un homocigoto verde (aa) da lugar a guisantes amarillos y verdes al 50% en la siguiente generación. Gráfico: Lluís Montoliu

Estas observaciones, que Mendel publicó en 1865, no fueron redescubiertas y valoradas en su justa medida hasta finales del siglo XIX, cuando él ya había fallecido, y hoy se conocen como las leyes de Mendel de la herencia genética. La primera ley dice que cuando se cruzan dos variedades puras pero distintas (homocigotas para un carácter determinado), todos sus descendientes son iguales (aunque internamente sean heterocigotos, portadores de dos alelos distintos, solo que uno de ellos es

dominante sobre el otro). La segunda ley se extiende sobre la primera y dice que cuando se cruzan los individuos de la primera generación resultado del cruce de variedades distintas, entonces en la siguiente generación vuelven a aparecer los dos caracteres parentales, de lo que se deduce que hay caracteres recesivos que están presentes internamente en esa generación intermedia y que solo vuelven a manifestarse en la siguiente generación cuando se encuentran de nuevo en homocigosis. Esos guisantes amarillos de la primera generación, aunque externamente sean idénticos al progenitor amarillo, internamente no lo son, pues son portadores de un alelo amarillo (dominante) y otro verde (recesivo). Este último no lo vemos, pero sigue estando ahí.

Hay que decir que Mendel tuvo la fortuna (o, mejor dicho, la serendipia, como comentaba en el prefacio de este libro) de seleccionar caracteres (color y forma de los guisantes) gobernados por genes con alelos de dominancia completa, para que le cuadraran todas las proporciones que anotaba. No siempre es así. Existen otros genes con alelos de dominancia incompleta o intermedia. En estos casos, los individuos heterocigotos presentan un fenotipo (un aspecto) intermedio entre los característicos de las dos variedades parentales. Mendel también dedujo una tercera ley, que hablaba de la herencia combinada de múltiples caracteres, al usar guisantes en los que variaban el color y la forma simultáneamente, heredándose cada uno de ellos de forma independiente y de acuerdo a proporciones matemáticas predecibles. Claro que esta última ley solo se cumple cuando los genes están ubicados en cromosomas distintos. Cuando están en el mismo cromosoma, decimos que los genes están ligados genéticamente y tenderán a heredarse conjuntamente.

Lo que Mendel observaba y describía, atendiendo a los colores de sus guisantes, tiene su explicación también en las moléculas. Las diferentes variantes genéticas que puede tener un gen, los diferentes alelos, pueden diferenciarse también ya no en función de sus «colores» sino de su secuencia, las letras que lo forman.



*Figura 1.2. Procesos básicos del flujo de información genética desde el ADN a las proteínas, pasando por las moléculas intermediarias llamadas ARN. Gráfico: Lluís Montoliu*

Como podemos ver en la figura 1.2, la información genética de los organismos normalmente está codificada en el ADN (ácido desoxirribonucleico), en el genoma, que es el conjunto de genes y secuencias necesarias para que funcionen. El ADN es una molécula formada por dos cadenas antiparalelas (van en sentido contrario) y complementarias, donde se repiten cuatro letras (A, G, T y C), que son las iniciales de los nucleósidos adenosina, guanósina, timidina y citidina que lo forman y que aparecen agrupadas de muchas formas distintas. La A siempre se empareja con la T y la G con la C. Por eso, si conocemos la secuencia genética de una cadena de ADN, podemos inferir la secuencia de la cadena complementaria a partir de estos apareamientos. El flujo de información genética requiere que el ADN se convierta en una molécula de ARN (ácido ribonucleico), que solamente tiene una cadena, complementaria a una de las cadenas del ADN, y que está formada por cuatro letras: A, G, U y C. La letra T no forma parte del ARN, pero es sustituida por la U (uracilo) que es análogo a

la T. Esto quiere decir que la U también se empareja con la A. El proceso de conversión de ADN a ARN se denomina transcripción. El ARN puede, a su vez, convertirse en ADN a través de un proceso denominado retrotranscripción. Para continuar el flujo de información genética, el ARN debe convertirse en una proteína mediante un proceso denominado traducción. Las proteínas están formadas por ristra de aminoácidos, que pueden ser de hasta veinte tipos distintos. Dentro de un gen, en el ADN, cada grupo de tres letras (triplete) corresponde a tres letras complementarias en el ARN (codón), que a su vez se asocian a cada uno de los veinte aminoácidos distintos. Hay  $4^3 = 64$  combinaciones distintas de codones con las cuatro letras, lo cual quiere decir que hay más de una combinación para cada aminoácido, además de algunas combinaciones que actúan como señales de inicio y parada de la traducción. Las proteínas son las que realizan la función codificada en el gen (ADN) y transmitida a través del ARN. El proceso de trasladar la información codificada en el ADN hasta llegar a la proteína se conoce como «expresión de un gen».

Una vez hecho el repaso, volvamos a la materia que nos ocupa.

Entre todo lo que hemos aprendido y aprovechado de organismos procariotas, las herramientas CRISPR no podían ser una excepción. Derivan de bacterias, fueron inventadas por ellas y ahora las aprovechamos nosotros para la edición genética de cualquier genoma de cualquier organismo. Es un regalo de las bacterias que nos permite hacer experimentos que parecían imposibles hasta ese momento.

Describiré el sistema CRISPR en detalle, en lo que respecta a su aplicación como herramientas de edición genética, en capítulos posteriores, pero baste ahora reseñar que es un sistema de defensa que usan las bacterias (y las arqueas) para luchar contra los virus que las infectan, los bacteriófagos, también llamados simplemente fagos. Este sorprendente, y a su vez extraordinariamente eficaz, sistema inmunológico de las bacterias lo intuyó y describió por vez primera un investigador español, el microbiólogo de la Universidad de Alicante Francisco Juan Martínez Mojica, al que todos los que lo conocemos llamamos Francis Mojica.

El descubrimiento de los sistemas CRISPR en procariotas tiene sabor español y acento alicantino, pero no fue aquí donde se escribieron sus primeras páginas. Las primeras referencias se encuentran en Japón y en Holanda. Sin embargo, la observación más importante de todas, a pesar de ocurrir en tercer lugar, sí se haría en Alicante.

A principios de los años noventa, tras acabar el servicio militar obligatorio, andaba Mojica atareado con su tesis doctoral en la Universidad de Alicante, tratando de entender cómo podían sobrevivir unas arqueas denominadas *Haloferax mediterranei* en las salinas de Santa Pola (Alicante). Estas arqueas habían sido aisladas hacía ya algún tiempo por Francisco Rodríguez-Valera, uno de los dos directores de tesis de Francis. La otra codirectora de la tesis era Guadalupe Juez.

La salazón es uno de los procedimientos ancestrales de conservación de los alimentos precisamente porque apenas hay microorganismos que puedan vivir en presencia de grandes cantidades de sal. Sin embargo, lo que es cierto para la mayoría de las bacterias no lo es para esas arqueas, que están encantadas de vivir en presencia de cantidades enormes de sal y que además se adaptan muy bien a salinidades que varían considerablemente durante el proceso de secado y evaporación del agua acumulada en las salinas.

Inicialmente, la tesis de Francis iba a enfocarse a estudiar unas curiosas vesículas gaseosas que esas arqueas eran capaces de generar y que las ayudaban a flotar en el agua salada. Pero, como cuentan Mojica y Rodríguez-Valera en una revisión reciente de esos primeros instantes de la historia de las CRISPR, otro grupo se les adelantó, publicó un trabajo que describía el proceso de generación de esas vacuolas de gas y obligó al equipo alicantino a replantearse los experimentos. Estoy seguro de que en aquel momento Francis estaba molesto porque otro grupo les había pisado sus resultados y probablemente no se percató de que el hecho de tener que cambiar de tema de trabajo sería su oportunidad de oro para descubrir algo que muy poca gente había visto antes.

¿Qué se hacía en los laboratorios de biología molecular de España a finales de los años ochenta y principios de los noventa? Pues secuenciar

ADN, obtener secuencias de material genético de toda especie que se estuviera investigando. Las técnicas de secuenciación del ADN, desarrolladas por Frederick Sanger en 1977 y que lo llevaron a recibir su segundo premio Nobel de Química en 1980 por esta invención (su primer Nobel lo recibió en 1958 por haber obtenido la primera secuencia de aminoácidos de una proteína: la insulina), eran ya muy populares por esa época en muchos laboratorios de genética de todo el mundo. Lo sé bien pues por aquel entonces yo, que soy coetáneo de Francis, andaba también realizando mi tesis doctoral en Barcelona y no paraba de secuenciar fragmentos del genoma del maíz.

Francis empezó a obtener secuencias del genoma de *Haloférx* con la esperanza de encontrar una explicación a un hecho que se había observado en esta arquea, que determinadas zonas de su genoma parecían poder digerirse con enzimas de restricción<sup>1</sup>, o no, en función de la salinidad del medio. De hecho, esas secuencias de ADN obtenidas por el método de Sanger fueron de las primeras que se obtuvieron en la universidad de Alicante. Francis seleccionó las zonas para secuenciar y se dio de bruces con algo que no esperaba, unas secuencias que parecían repetirse a distancias regulares, como puede apreciarse en la figura 1.3 adjunta.