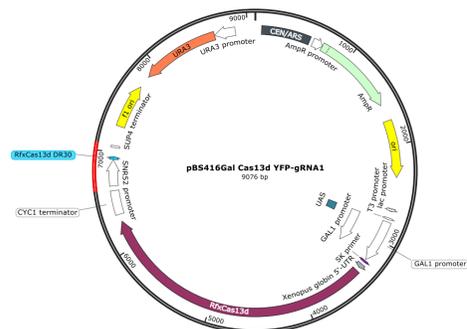


## 1. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

Los sistemas de edición basados en CRISPR que hacen uso de endonucleasas de ARN, como es el caso de Cas13d, presentan una ventaja notable respecto a los sistemas de endonucleasa de ADN más conocidos: en lugar de mediar un knock-out del gen en cuestión, modulan la expresión del mismo, lo que ofrece un mayor abanico de posibilidades tanto experimentalmente hablando como a la hora de usarlo en terapia (por ejemplo, a nivel terapéutico sus efectos off-target no implicarían perjuicios tan graves como los asociados a una endonucleasa de ADN) (1). Asimismo, esta actividad endonucleasa frente a ARNs ha llevado a plantear su viabilidad como tratamiento en infecciones por virus de ARN (2). Son todas estas posibles aplicaciones las que nos han llevado a abordar la creación y puesta a punto de un sistema basado en CRISPR/Cas13d a nivel de la levadura *S. cerevisiae* (algo no descrito hasta la fecha; a día de hoy, este tipo de ensayos se han realizado principalmente en modelos animales). Para dicha puesta a punto se trató de determinar en primer lugar la efectividad del sistema dirigiéndolo contra genes de fenotipo fácilmente observable, como es el caso de una proteína amarilla fluorescente expresada de forma exógena; y del gen nuclear *CAN1*, codificante para un transportador de membrana de arginina. De este modo, se busca demostrar la capacidad del sistema para modular la expresión génica y, en última instancia, para eliminar virus de ARN.

## 2. METODOLOGÍA

La construcción de partida, con la que se transformaron *S. cerevisiae* de la estirpe BY4741 (auxótrofas para uracilo) consistía en un plásmido pBS416 en el que se introdujo el sistema CRISPR/Cas13d y, para cada uno de los ensayos a continuación expuestos, los gRNAs requeridos (Fig.1). La funcionalidad del sistema se constató por dos vías: mediante una determinación de los niveles de fluorescencia en cepas portadoras de una proteína fluorescente amarilla (YFP) exógena; y a través de una cuantificación de los cambios de expresión del gen nuclear *CAN1*. Las cepas obtenidas son las expuestas en la siguiente tabla:

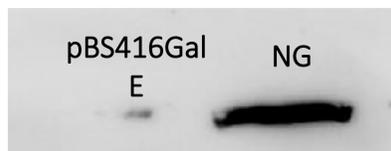


**Fig. 1.** Mapa del plásmido pBS416 Cas13d YFP-gRNA 1. Incorpora la secuencia de la endonucleasa Cas13d bajo el control del promotor GAL1, así como el marcador de selección URA3. Asimismo, en este caso podemos observar la secuencia correspondiente al gRNA 1 (bajo control del promotor fuerte SNR52) dirigido frente a la región N-terminal de YFP.

BY4741 transformada	Descripción
pBS416Gal E	Portadora del plásmido pBS416 sin el sistema CRISPR.
YFP-NG	Portadora de un plásmido con YFP y el pBS416 con el sistema CRISPR. Sin guía.
YFP-gRNA 1	Portadora de YFP y pBS416 con el sistema CRISPR y un gRNA maduro dirigido al N-terminal de YFP.
YFP-gRNA 2	Portadora de YFP y pBS416 con el sistema CRISPR y un gRNA maduro dirigido a la región central de YFP.
NG	Portadora de pBS416 con el sistema CRISPR. Sin guía.
gRNA-CAN1	Portadora de pBS416 con el sistema CRISPR y un cassette de cuatro gRNAs inmaduros dirigidos contra <i>CAN1</i> . Dichos guías inmaduros, dispuestos en tándem, deben ser procesados por la propia Cas13d previo acoplamiento al tracrNA sobre el que se une la endonucleasa.

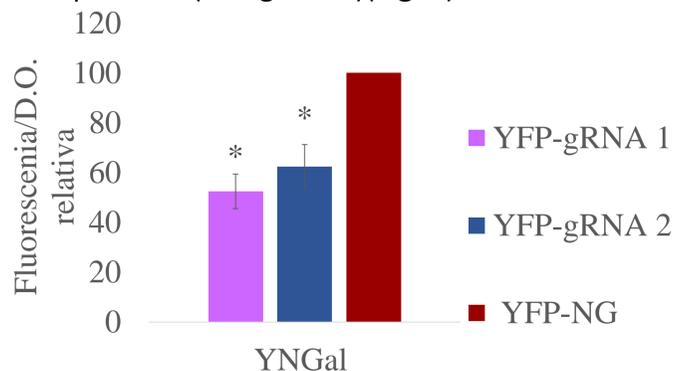
## 3. RESULTADOS

**1. Constatación de la expresión de Cas13d clonada en el plásmido pBS416 bajo el control del promotor GAL1.** Los resultados del Western blotting (Fig. 2) demostraron la expresión de la proteína Cas13d en líneas BY4741 en medio de inducción YNGal.



**Fig. 2.** Comprobación de la expresión de la endonucleasa Cas13d inducida por galactosa. Se observa una banda intensa a nivel de la cepa NG, al tiempo que dicha banda está ausente en la línea pBS416Gal E.

**2. Ensayo de fluorescencia.** Se obtuvo una caída notable en los niveles de fluorescencia a nivel de las cepas YFP-gRNA 1 e YFP-gRNA 2 respecto a la YFP-NG. Dichas bajadas alcanzan valores de hasta un 50% para la línea portadora del gRNA que hibrida en la región más cercana al N-terminal de la proteína (YFP-gRNA 1)(Fig. 3).

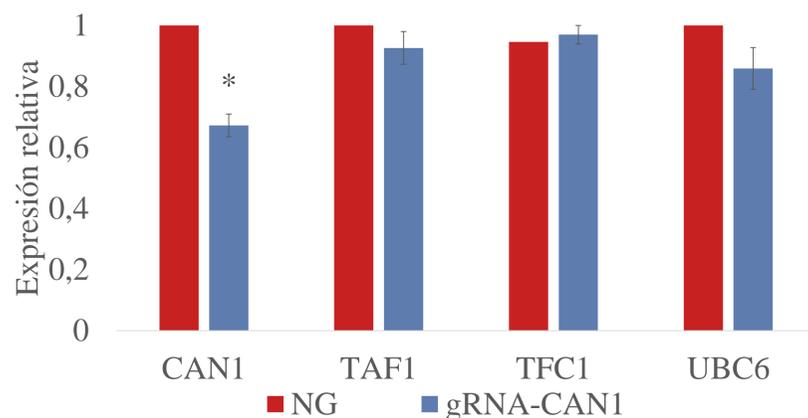


**Fig. 3. Resultados del ensayo de fluorescencia.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia en líneas BY4741 fluorescentes con y sin guías anti-YFP. Tanto la línea YFP-gRNA 1 como la YFP-gRNA 2 presentan cambios significativos (descenso) en los niveles de fluorescencia respecto a la línea YFP-NG. El asterisco sobre las barras de error estándar indica diferencias significativas entre las líneas portadoras de gRNA y la línea sin guía (p-value<0,05).

### REFERENCIAS

- Yan, Winston X. et al. 2018. "Cas13d Is a Compact RNA-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein." *Molecular Cell* 70(2): 327–339.e5.
- Uddin, Fathema, Charles M. Rudin, and Triparna Sen. 2020. "CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future." *Frontiers in Oncology* 10: 1387.

**3. Ensayo de expresión *CAN1*.** Los resultados de las RT-qPCRs realizadas muestran también un descenso en la expresión de *CAN1* a nivel de la línea gRNA-CAN1 en relación a NG (Fig. 4).



**Fig. 4. Resultados del ensayo de expresión de *CAN1*.** Determinación de la caída en los niveles de expresión de *CAN1* en línea gRNA-CAN1 respecto a NG (valores relativos). A modo de control, se cuantificaron otros tres genes (*TAF1*, *TFC1* Y *UBC6*) para los cuales no se hallaron cambios significativos entre cepas. El asterisco (\*) sobre las barras de error indica diferencias significativas entre la línea portadora de guía y la línea carente del mismo, para cada gen (p-value<0,05).

## 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En primer lugar, queda demostrada la funcionalidad del sistema CRISPR/Cas13d en *S. cerevisiae* como herramienta moduladora de la expresión génica. Asimismo, a corto plazo buscaremos poder determinar la variación de los niveles transcripcionales de YFP en los experimentos de fluorescencia, a fin de hacer dichos valores comparables a los datos aportados en los ensayos con *CAN1*. Respecto a esto último, en ensayos futuros también se tratará de determinar la relevancia del estado de maduración de los guías (inmaduros en el caso del ensayo *CAN1*) en el grado de efectividad del sistema CRISPR/Cas13d.

Como objetivo final, trataríamos de lograr mediante el uso del sistema descrito la eliminación de la infección por virus de ARN en *S. cerevisiae*, concretamente la del virus L-A de la familia *Totiviridae*.