



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Estudio del uso del sistema CRISPR-Cas13 para la  
regulación de la expresión génica in vivo y para  
aplicaciones de diagnóstico in vitro

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Soria Gonzalvo, Ángela

Tutor/a: Forment Millet, José Javier

Cotutor/a externo: RODRIGO TARREGA, GUILLERMO

Director/a Experimental: MONTAGUD MARTINEZ, ROSER

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural



INSTITUTE FOR  
INTEGRATIVE  
SYSTEMS BIOLOGY

## Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

# Estudio del uso del sistema CRISPR-Cas13 para la regulación de la expresión génica *in vivo* y para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*

Trabajo final de grado  
Grado en Biotecnología  
Curso académico: 2021-2022

**Autor:** Ángela Soria Gonzalvo  
**Tutor académico:** José Javier Forment Millet  
**Tutor externo:** Guillermo Rodrigo Tárrega  
**Cotutor externo:** Roser Montagud Martínez

Valencia, julio 2022



## **Estudio del uso del sistema CRISPR-Cas13 para la regulación de la expresión génica *in vivo* y para aplicaciones de diagnóstico *in vitro***

Los organismos procariotas presentan sistemas inmunológicos que, guiados por RNA, escinden elementos genéticos desconocidos mediante un sistema basado en repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas). Los sistemas CRISPR-Cas se clasifican según la estructura y función de las proteínas Cas en distintos tipos cuya diana es una molécula de DNA, RNA o ambas. El sistema CRISPR-Cas13 se incluye en los sistemas de tipo VI, que llevan a cabo el reconocimiento y degradación del RNA.

Los objetivos que se persiguen en este trabajo son, en primer lugar, caracterizar el silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente superfolder GFP (sfGFP) cuando el RNA diana que escinde Cas13d se encuentra próximo al RNA codificante de dicha proteína y, en segundo lugar, detectar la infección del virus SARS-CoV-2 mediante el sistema CRISPR-Cas13.

Para caracterizar el silenciamiento de la expresión de sfGFP, se requiere realizar la construcción de dos plásmidos que contengan la proteína Cas13d, el RNA guía (gRNA) y un RNA mensajero (mRNA) policistrónico codificante de las proteínas fluorescentes sfGFP (que emite fluorescencia verde) y mScarlet (que emite fluorescencia roja). Ambas proteínas sirven de reporteros. A continuación, se realiza una cotransformación bacteriana de *Escherichia coli* con ambos plásmidos y al producirse la proliferación celular, se expresa la proteína Cas13d, su RNA guía (que tiene como diana una parte de la secuencia de mScarlet) y los mRNA de sfGFP y mScarlet. El complejo efector formado por Cas13d y el gRNA de mScarlet escinde el mRNA codificante de mScarlet y posiblemente, el mRNA codificante de sfGFP, debido a su actividad nucleasa colateral. Con el estudio de la posible pérdida de la fluorescencia verde, queremos investigar si en un RNA policistrónico se produce la degradación de solo el mRNA para el que Cas13d tiene su diana o, además, debido a su actividad colateral, es también capaz de escindir secuencias codificantes contiguas.

La detección del virus SARS-CoV-2 se realiza de manera indirecta utilizando como diana para el sistema CRISPR-Cas13 un fragmento de tRNA (tRF) que se encuentra sobreexpresado en los sujetos positivos para SARS-CoV-2. Para la detección, se forma un complejo efector de ribonucleoproteína (RNP) formado por el gRNA del tRF y la nucleasa Cas13. Esta RNP reconoce y escinde específicamente el tRF diana y, además, degrada la sonda debido a su actividad colateral inespecífica, dando lugar a la emisión de fluorescencia. La diferencia entre la señal fluorescente de las muestras procedentes de sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2 constituiría una potencial herramienta de diagnóstico de COVID-19.

**Palabras clave:** Sistema CRISPR-Cas, silenciamiento, bacteria, diagnóstico, virus.

## **Study of the use of the CRISPR-Cas13 system for *in vivo* regulation of gene expression and for *in vitro* diagnostic applications**

Prokaryotic organisms have RNA-guided immune systems that cleave unknown genetic elements using a system based on regularly clustered interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated proteins (Cas). CRISPR-Cas systems are classified according to the structure and function of the Cas proteins into different types that target a DNA molecule, an RNA molecule or both. The CRISPR-Cas13 system is included in the type VI systems, which carry out RNA recognition and degradation.

The aims of this work are, firstly, to characterise the silencing of superfolder GFP (sfGFP) fluorescent protein expression when the target RNA that cleaves Cas13d is close to the RNA coding for this protein and, secondly, to detect SARS-CoV-2 virus infection using the CRISPR-Cas13 system.

To characterise the silencing of sfGFP expression, two plasmids containing the Cas13d protein, the guide RNA (gRNA) and a polycistronic messenger RNA (mRNA) encoding the fluorescent proteins sfGFP (which emits green fluorescence) and mScarlet (which emits red fluorescence) must be constructed. Both proteins serve as reporters. Bacterial co-transformation of *Escherichia coli* with both plasmids is then carried out and upon cell proliferation, the Cas13d protein, its guide RNA (which targets a part of the mScarlet sequence) and the sfGFP and mScarlet mRNAs are expressed. The effector complex formed by Cas13d and the mScarlet gRNA cleaves the mScarlet coding mRNA and possibly the sfGFP coding mRNA, due to its collateral nuclease activity. By studying the possible loss of green fluorescence, we want to investigate whether in a polycistronic RNA the degradation of only the mRNA for which Cas13d has its target occurs or, in addition, due to its collateral activity, it is also able to cleave contiguous coding sequences.

Detection of SARS-CoV-2 virus is performed indirectly by using a tRNA fragment (tRF) that is overexpressed in SARS-CoV-2 positive subjects as a target for the CRISPR-Cas13 system. For detection, a ribonucleoprotein (RNP) effector complex (RNP) formed by the tRF gRNA and the Cas13 nuclease is formed. This RNP specifically recognises and cleaves the target tRF and, in addition, degrades the probe due to its non-specific collateral activity, resulting in fluorescence emission. The difference between the fluorescent signal of samples from SARS-CoV-2 positive and negative subjects would constitute a potential diagnostic tool for COVID-19.

**Keywords:** CRISPR-Cas system, silencing, bacteria, diagnostic, virus.

## **Agradecimientos**

Este trabajo no hubiera sido posible sin Guillermo, Roser y Raúl, gracias por dedicar vuestro tiempo y ganas en ayudarme. Gracias a Roswitha, Lucas, María y Rosa por las charlas a la hora del café y por hacer de la rutina un lugar bonito.

Gracias a mi gran familia, por creer en mí cuando yo no lo hago. Por aguantar en sus propias carnes los nervios de estos cuatro años y animarme siempre a perseguir lo que quiero. A Paquita y Vicenta por las horas acompañándome en este proceso. Por fin sé lo que voy a ser de mayor.

Estos cuatro años se los debo a mis amigas de la universidad por construir un sitio donde apoyarnos cuando la vida se nos hace bola, por los viajes anuales y por el cariño. Os merecéis todo lo bueno que os pase.

Gracias a Aitor por alegrarme los días y darme la pizca de sensatez que a veces me falta. Llevo en mí nuestros bailes, acampadas, bodas de mentira y todo tu cariño. Gracias por hacerme la vida bonita.

Gracias a María, Paula y Jose. No importa lo lejos que estemos, seguiré llevando todos vuestros recuerdos en forma de lo que soy hoy.



# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. El sistema CRISPR-Cas .....	1
1.2. La nucleasa Cas13 y principales aplicaciones.....	3
1.3. El virus SARS-CoV-2 .....	4
1.4. Herramientas de diagnóstico viral empleando CRISPR-Cas .....	5
1.5. Fragmentos derivados de tRNA .....	7
1.6. Detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas13 y tRF .....	8
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>10</b>
3.1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento .....	10
3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	10
3.1.2. Medios y condiciones de crecimiento .....	10
3.1.3. Transformación de células <i>E. coli</i> electrocompetentes .....	10
3.2. Plásmidos .....	11
3.2.1. pREP2 .....	11
3.2.2. pQE-60_Cas13d .....	11
3.3. Cebadores .....	12
3.4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos .....	13
3.4.1. Amplificación por PCR.....	13
3.4.2. Digestión de plásmidos .....	14
3.4.3. Ligación.....	14
3.4.4. Purificación de plásmidos .....	15
3.4.5. Transcripción de RNA .....	15
3.4.5.1. Transcripción <i>in vivo</i> .....	15
3.4.5.2. Transcripción <i>in vitro</i> .....	15
3.5. Electroforesis de DNA .....	16
3.6. Secuenciación de DNA .....	17



3.7. Moléculas reporteras: fluoróforos .....	17
3.7.1. Proteínas fluorescentes .....	17
3.7.2. Sonda 6-FAM .....	18
3.8. Caracterización de perfiles de expresión <i>in vivo</i> .....	18
3.9. Inactivación de muestras .....	19
3.10. Formación del complejo ribonucleoproteico.....	20
3.11. Medida de la actividad colateral de Cas13 mediante fluorescencia .....	20
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>21</b>
4.1. Regulación de la expresión génica <i>in vivo</i> .....	21
4.1.1. Obtención de las construcciones .....	23
4.1.1.1. pQE-60_Cas13d_gRNA.....	23
4.1.1.2. pPoliREP .....	25
4.1.2. Análisis de silenciamiento de la expresión de la proteína sfGFP .....	28
4.2. Diagnóstico de SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> .....	31
4.2.1. Diseño y comprobación del sistema de detección.....	32
4.2.2. Detección de muestras clínicas de sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-233	
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>36</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias, temperatura de melting y diana de amplificación de los cebadores directos y reversos utilizados para la amplificación de DNA mediante PCR.....	12
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de DNA codificantes de los RNA guías. ....	15
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de los oligonucleótidos. La.....	16
<b>Tabla 4.</b> Prueba estadística t de Welch sobre las muestras crudas. ....	34
<b>Tabla 5.</b> Prueba estadística t de Welch sobre las muestras purificadas y con inhibidor de RNasa. .....	35

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas y su estructura modular (Makarova <i>et al.</i> , 2019). .....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura bilobulada de las proteínas Cas13. ....	3
<b>Figura 3.</b> Bases del sistema CRISPR-Cas13 .....	4
<b>Figura 4.</b> Ensayos SHERLOCKv2, SHERLOCK y DETECTR que emplean el sistema CRISPR-Cas para la detección de DNA o RNA (Mustafa y Makhawi, 2021). ....	7
<b>Figura 5.</b> Mapa del plásmido pREP2 .....	11
<b>Figura 6.</b> Mapa del plásmido pQE-60. ....	12
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la composición de los pocillos para la caracterización. ....	19
<b>Figura 8.</b> Esquema del silenciamiento de la expresión génica de las proteínas sfGFP y mScarlet mediante CRISPR-Cas13d .....	22
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa empleando como muestras los productos de PCR de los gRNA.....	23
<b>Figura 10.</b> Mapas de las construcciones pQE-60 con los insertos de fragmentos de DNA. ....	25
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa empleando como muestras los productos de PCR del plásmido pPoliREP .....	26
<b>Figura 12.</b> Mapa del vector pPoliREP construido mediante PCR.....	27
<b>Figura 13.</b> Gráficas de evolución de absorbancia y emisión de fluorescencia verde y roja. ....	30
<b>Figura 14.</b> Esquema de detección de SARS-CoV-2 mediante el sistema CRISPR-Cas13. ....	31
<b>Figura 15.</b> Curvas de optimización del sistema mediante el gradiente de tRNA sintético para Cas13a y Cas13d. ....	32
<b>Figura 16.</b> Gráfica de emisión de fluorescencia de muestras sin purificar.....	33
<b>Figura 17.</b> Gráfica de emisión de fluorescencia de muestras purificadas y con inhibidor de RNasa. ....	34

## ABREVIATURAS

**ACE2:** Enzima conversora de angiotensina 2, *Angiotensin Converting Enzyme 2*

**AmpR:** Gen de resistencia a ampicilina

**bp:** Pares de bases

**BSA:** Albúmina de suero bovino, *Bovine Serum Albumin*

**CARF:** Dominio de pliegue de Rossmann asociado a CRISPR, *CRISPR-associated Rossmann Fold*

**CmR:** Gen de resistencia a cloranfenicol

**CoV:** Coronavirus

**COVID-19:** Enfermedad por coronavirus, *coronavirus disease*

**C-terminal:** Extremo carboxilo-terminal

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic Acid*

**dNTP:** Deoxinucleósido trifosfato, *Deoxynucleotide Triphosphate*

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético, *ethylenediaminetetraacetic acid*

**gRNA:** RNA guía, *guide RNA*

**HF:** Alta fidelidad, *high fidelity*

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Medio de cultivo bacteriano de Luria-Bertani

**lncRNA:** RNA largo no codificante, *long non-coding RNA*

**miRNA:** microRNA

**mRNA:** RNA mensajero, *messenger RNA*

**ncRNA:** RNA no codificante, *non-coding RNA*

**nsp:** Proteínas no estructurales, *nonstructural proteins*

**nt:** Nucleótidos

**ORF:** Marco abierto de lectura, *Open Reading Frame*

**PAM:** Motivo adyacente al protoespaciador, *Protospacer Adjacent Motif*

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*

**RNA:** Ácido ribonucleico, *Ribonucleic Acid*

**rpm:** Revoluciones por minuto

**sfGFP:** Superfolder GFP

**tracrRNA:** RNA transactivador, *trans-activating crisper RNA*

**tRF:** Fragmentos derivados de tRNA, *tRNA Fragments*

**tRHs:** mitades de tRNA, *tRNA Halves*

**tRNA:** RNA transferente, *transference RNA*

**tsncRNA:** RNA pequeño no codificante derivado de tRNA, *tRNA-derived small non-coding RNAs*

**tsRNA:** RNA pequeño derivado de tRNA, *tRNA derived small RNA*

**ssDNA:** DNA monocatenario, *single-stranded DNA*

**kb:** Kilobases



# 1. Introducción

## 1.1. El sistema CRISPR-Cas

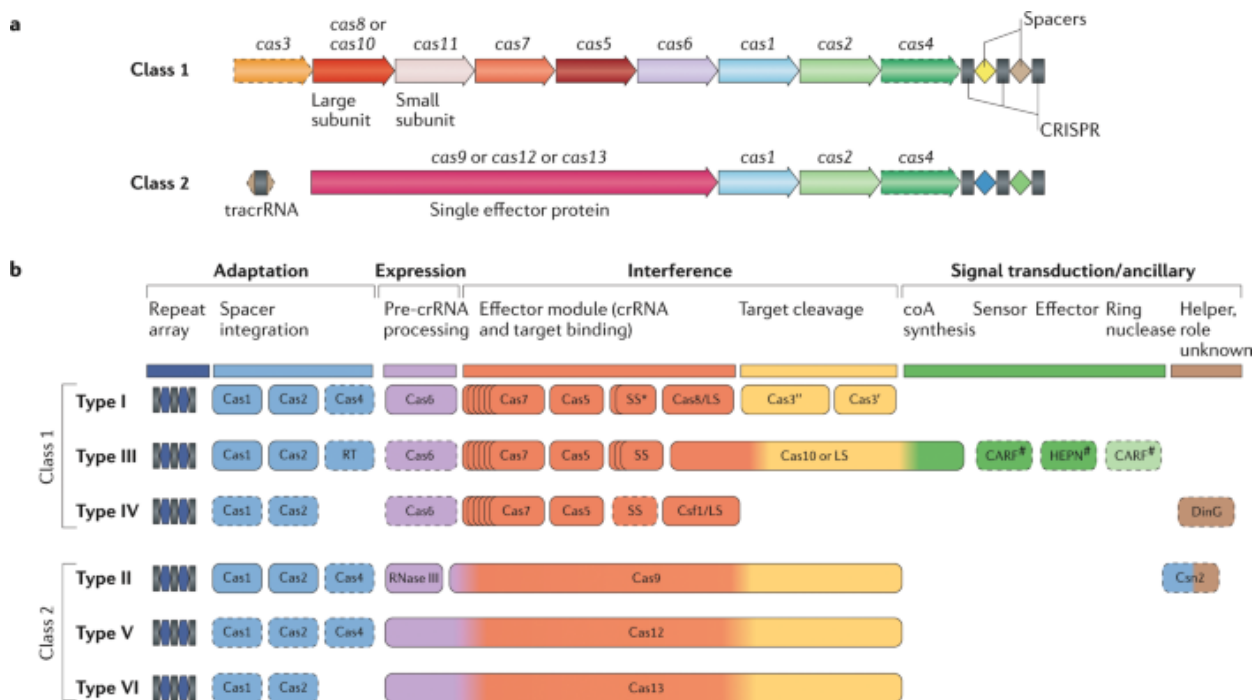
Los organismos procariotas presentan sistemas asimilables a los sistemas inmunológicos de organismos superiores que escinden elementos genéticos exógenos mediante sistemas denominados CRISPR-Cas. Estos sistemas se basan en repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas) (Jackson *et al.*, 2017). Los sistemas CRISPR-Cas protegen las bacterias del material genético foráneo mediante un mecanismo que consta de tres etapas. La adaptación es la primera fase, en la cual se asimilan las secuencias de DNA procedentes de agentes invasores y son archivadas en una matriz CRISPR, un conjunto de secuencias entre las cuales se incluyen motivos constantes. La segunda etapa es de expresión, en la que se transcribe y se procesa la matriz CRISPR, dando lugar a un RNA guía (gRNA) que se ensambla con proteínas Cas. La interferencia es la tercera y última etapa, en la cual los gRNA dirigen las Cas efectoras hacia los ácidos nucleicos exógenos para que los eliminen tras el reconocimiento (Vigouroux y Bikard, 2020).

Estos sistemas se clasifican en clase 1 y clase 2 según la estructura y función de las proteínas Cas y las secuencias de los módulos efectoras (Makarova *et al.*, 2019). Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 presentan complejos efectoras de unión a gRNA formados por varias proteínas Cas, mientras que los de clase 2 tienen una única proteína efectora Cas multidominio que desempeña las mismas funciones que los complejos efectoras de clase 1 (Makarova *et al.*, 2019).

Existen muy diversas proteínas Cas implicadas en las diferentes fases del mecanismo CRISPR, las cuales se dividen en cuatro módulos funcionales: adaptación (para adquirir espaciadores), expresión (para procesar el gRNA y asociarse a la diana), interferencia (para degradar la diana) y auxiliares (para regulación y otras funciones) (Makarova *et al.*, 2015). En la figura 1 se muestra la organización modular de las proteínas del sistema CRISPR-Cas. En función de todas estas diferencias, la clase 1 se subdivide en los tipos I, III y IV y la clase 2 se divide en los tipos II, V y VI (Mohanraju *et al.*, 2016).

El módulo de adaptación se encuentra muy conservado entre los diferentes sistemas y comprende generalmente las proteínas Cas1 y Cas2 (Makarova *et al.*, 2015), necesarias para insertar espaciadores en las matrices CRISPR. El módulo de expresión consta de complejos efectoras multiproteicos, en el caso de los sistemas de clase 1 o de una sola proteína efectora grande (Cas9, Cas12 o Cas13) en el caso de los sistemas de clase 2. La proteína o complejo efector se ensambla con el pre-gRNA y es procesado hasta formar un gRNA maduro. Este proceso de maduración es

catalizado por endonucleasas de RNA (R. Wang *et al.*, 2011) o por una RNasa III y un RNA CRISPR transactivador (tracrRNA) (Deltcheva *et al.*, 2011). El módulo de interferencia está constituido por las mismas proteínas efectoras que el módulo de expresión. El complejo formado por la proteína o complejo efector unido a gRNA reúne la actividad nucleasa y los dominios de unión a RNA (Makarova *et al.*, 2015). En la fase de interferencia, la secuencia espaciadora del gRNA se une al ácido nucleico diana y el efector degrada esta diana por diferentes vías, que vienen determinadas por del tipo de sistema CRISPR. Por otro lado, el módulo auxiliar reúne proteínas codificadas por genes generalmente externos al loci de CRISPR (Makarova *et al.*, 2013). Algunas de las funciones de las proteínas del módulo auxiliar son la muerte celular programada mediada por Cas4 (Makarova *et al.*, 2012), la posible regulación de la actividad CRISPR-Cas mediante el dominio CARF (Makarova *et al.*, 2014) o evitar las roturas en la doble hebra de DNA cromosómico a través de Csn2 inactivado (Arslan *et al.*, 2013).

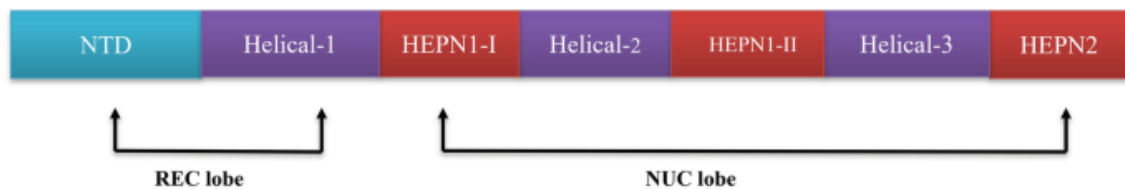


**Figura 1. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas y su estructura modular (Makarova *et al.*, 2019).**

Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 se unen a gRNA a través de complejos efectores multiproteicos, mientras que los de clase 2 tienen una única proteína efectora Cas multidominio que desempeña las mismas funciones que los complejos efectores de clase 1. (a) Estructura general de los sistemas de clase 1 y clase 2. (b) Estructura modular de los sistemas CRISPR-Cas, organizada en función de la intervención de las proteínas en la fase de adaptación, expresión, interferencia o auxiliares.

## 1.2. La nucleasa Cas13 y principales aplicaciones

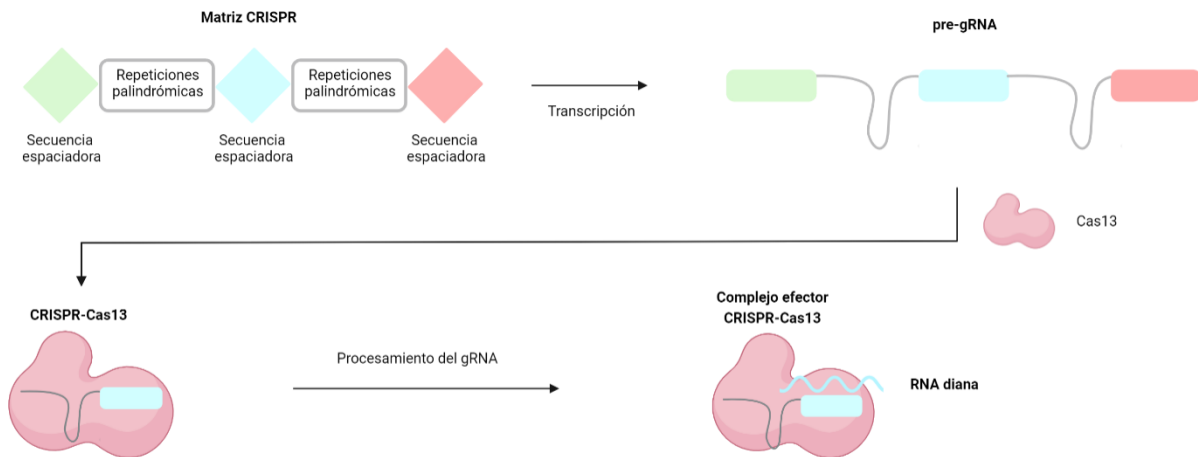
Las proteínas Cas13 son efectores de tipo VI dirigidos a los RNA exógenos. Cuentan con dos dominios HEPN (Makarova *et al.*, 2019) con actividades ribonucleasas enzimáticamente diferentes e imprescindibles para una interferencia adecuada. Un dominio RNasa procesa y madura el gRNA previamente a la interferencia y el otro degrada el RNA diana, ocasionando la interferencia. Además, todas las proteínas Cas13, después de encontrar su diana, tienen una actividad RNasa colateral con la que son capaces de degradar inespecíficamente otros RNA para los que no tienen secuencia guía (O'Connell, 2019). Las nucleasas Cas13 son proteínas multidominio con una estructura bilobulada (Ashraf *et al.*, 2022), cuya arquitectura se muestra en la figura 2.



**Figura 2. Estructura bilobulada de las proteínas Cas13. Figura modificada de Ashraf *et al.*, 2022.** Cas13 posee dos lóbulos multidominio, REC (lóbulo de reconocimiento) y NUC (lóbulo nucleasa). El lóbulo REC está formado por un dominio N-terminal (NTD) y un dominio Helical-1. El lóbulo NUC incluye dos dominios de unión a nucleótidos (HEPN1 y HEPN2) y los dominios Helical-2 y Helical-3.

El sistema CRISPR-Cas13 constituye una herramienta de regulación postranscripcional de la expresión génica. Las proteínas Cas13 emplean un gRNA que determina la especificidad del RNA diana. Estas proteínas reconocen una horquilla corta en el gRNA, ensamblándose con este para formar complejos. La especificidad de la diana viene determinada por una secuencia espaciadora de 28 a 80 nt de longitud (Behler y Hess, 2020) que presenta complementariedad con la secuencia de RNA diana. Las bases de funcionamiento de este sistema se presentan en la figura 3.





**Figura 3. Bases del sistema CRISPR-Cas13.** El pre-gRNA se forma a través de la transcripción de la matriz CRISPR. Este pre-gRNA es procesado por la proteína Cas13, que da lugar al gRNA maduro preparado para la unión al RNA diana.

El desarrollo de nuevas plataformas ideales para el diagnóstico viral que reúnan cualidades de sensibilidad, rentabilidad, velocidad, simplicidad, detección de objetivos múltiples, etc. continúa activo. El sistema CRISPR-Cas13 constituye también una herramienta de diagnóstico mediante la degradación colateral del RNA no diana marcado sintéticamente (reportero) que se encuentra adyacente al RNA diana (Bayoumi y Munir, 2021).

El sistema CRISPR-Cas13 es aplicable a numerosas áreas, como la detección prematura de marcadores específicos de cáncer (DNA tumoral, RNA procedente del tumor o proteínas obtenidas de biopsias) o bien como terapia dirigida. Este sistema permite eliminar o alterar RNA relacionados con ciertos tipos de cáncer, posibilitando la apoptosis y la represión de la proliferación de células tumorales (C. Li *et al.*, 2021). Además, existen sistemas basados en CRISPR-Cas13 para la eliminación de genes de resistencia a fármacos antimicrobianos en bacterias. Para ello, los componentes del sistema CRISPR-Cas13 son introducidos en cápsides de bacteriófagos que se dirigen a las secuencias específicas de resistencia a antimicrobianos (Kiga *et al.*, 2020).

### 1.3. El virus SARS-CoV-2

En diciembre de 2019 se informó del primer caso sintomático de la enfermedad por coronavirus (COVID-19) provocada por el virus SARS-CoV-2, que dio paso a una posterior pandemia mundial, la cual requirió la reducción de los contactos interpersonales presenciales puesto que la transmisión de este virus se producía principalmente a través de pequeñas gotas respiratorias y aerosoles (Harrison *et al.*, 2020). El número de casos totales confirmados de infección de SARS-CoV-2 asciende a 532 millones de personas, de las cuales provocó el fallecimiento de 6.3 millones de personas hasta junio de 2022 (OUR WORLD IN DATA, n.d.).

Los coronavirus (CoV) son una clase de virus que pertenecen a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales* (F. Wu *et al.*, 2020). Estos virus presentan espículas virales con estructura de corona (Muralidar *et al.*, 2020) y un genoma de RNA positivo monocatenario de unas 30 000 bases de longitud (Giovanetti *et al.*, 2021). Taxonómicamente pueden distinguirse cuatro géneros de CoVs: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*; de los cuales únicamente los *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* tienen capacidad de infección a humanos (Chan *et al.*, 2020).

El SARS-CoV-2 pertenece al género *Betacoronavirus* y posee un genoma basado en 14 marcos abiertos de lectura (ORF). La mayor parte de estos ORFs son codificantes de 16 proteínas no estructurales (nsp) que originan el complejo replicasa. El resto de los ORFs codifican 9 proteínas accesorias y 4 proteínas estructurales correspondientes a las proteínas Spike, de envoltura, de membrana y nucleocápside (Harrison *et al.*, 2020). La proteína Spike, concretamente su dominio C-terminal o dominio de unión al receptor (RBD), permite y determina el reconocimiento del receptor del huésped ACE2 (Q. Wang *et al.*, 2020). Además, la proteína Spike presenta un sitio de escisión polibásica formado por cuatro aminoácidos ubicados en la unión entre las subunidades S1 y S2 que constituye un sitio de corte potencial para la furina (Coutard *et al.*, 2020). Esta actividad proteasa en el sitio de escisión polibásica tiene un papel importante en la activación de la proteína Spike (Hoffmann *et al.*, 2020). Además, el sitio de escisión polibásica también es un sitio de corte para la proteasa TMPRSS2, que facilita la entrada del virus desde la membrana plasmática y para la catepsina L, que activa la proteína Spike en los endosomas (Harrison *et al.*, 2020).

En la actualidad se han desarrollado diversas vacunas para prevenir la infección de SARS-CoV-2, entre las cuales se encuentran las desarrolladas por Pfizer/BioNTech, Moderna, AstraZeneca, Sputnik V o Janssen (Rashedi *et al.*, 2022). Sin embargo, para evitar el contagio de algunos sujetos que presentan factores de riesgo, el desarrollo de herramientas de diagnóstico del virus SARS-CoV-2 continúa siendo necesario.

## **1.4. Herramientas de diagnóstico viral empleando CRISPR-Cas**

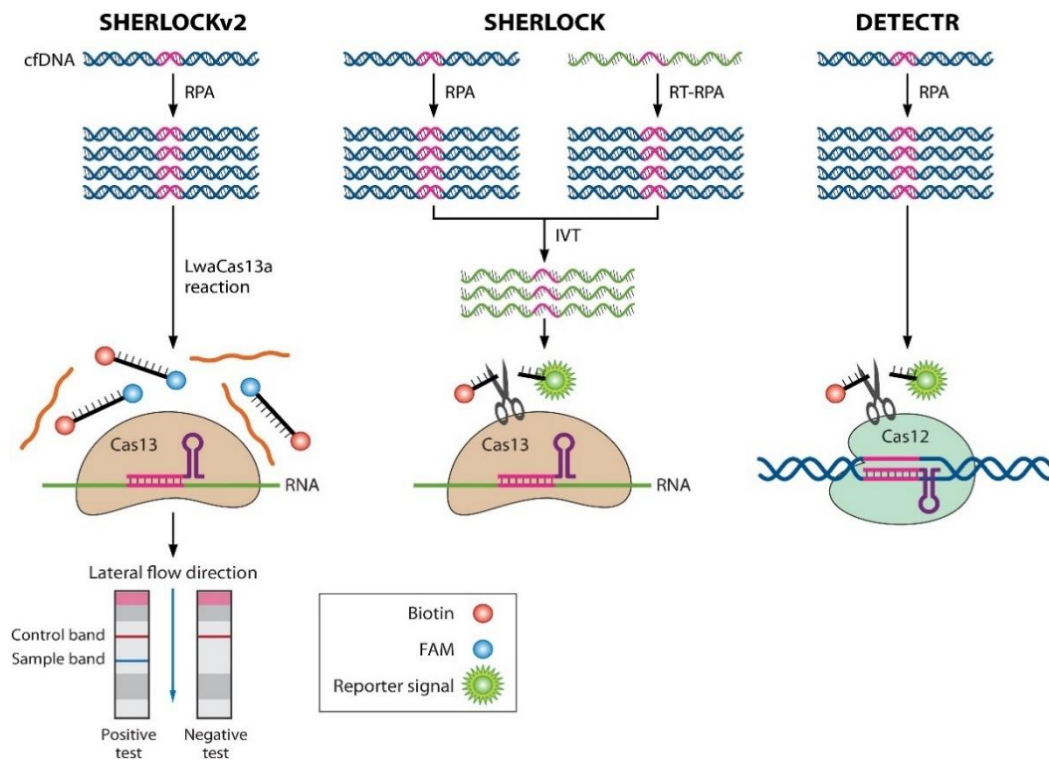
La detección de ácidos nucleicos de patógenos se ha realizado habitualmente mediante métodos como PCR que presentan desventajas tales como la complejidad de los equipos y los reactivos empleados, el tiempo requerido y la cualificación necesaria del personal. Por ello, es importante el desarrollo de herramientas de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico que presenten características optimizadas de rapidez, especificidad, sensibilidad y rentabilidad. Con esta finalidad, se han propuesto los sistemas SHERLOCKv2 (Gootenberg *et al.*, 2018), SHERLOCK

(Kellner *et al.*, 2019) y DETECTR (Chen *et al.*, 2018), cuyos mecanismos de funcionamiento aparecen esquematizados en la figura 4. Un elemento crucial para el desarrollo de estos sistemas fundamentados en CRISPR es el hallazgo de la actividad colateral que ejercen las nucleasas Cas12 y Cas13 (Chen *et al.*, 2018).

El método DETECTR se basa en la actividad colateral de la nucleasa Cas12a, de tipo V (Yan *et al.*, 2019), que se encuentra activada tras unirse específicamente al RNA diana. Una etapa previa de preamplificación isotérmica (RPA) permite el enriquecimiento de las secuencias diana para aumentar la sensibilidad de la prueba. El DNA se somete a una RPA y se mezclan con gRNA y sondas fluorescentes de RNA (Chen *et al.*, 2018). En caso de que el DNA diana se halle en la muestra analizada, el gRNA y la proteína Cas12a, que se encuentran unidos, llevan a cabo el reconocimiento y la escisión específica del DNA diana. La actividad colateral de Cas12 provoca cortes inespecíficos en las sondas fluorescentes, impidiendo la interacción fluoróforo-*quencher* y provocando la emisión de fluorescencia.

Posteriormente se presentó la tecnología SHERLOCK, fundamentada en el mismo mecanismo que DETECTR pero que emplea nucleasas Cas de tipo VI, como la proteína Cas13 (Kellner *et al.*, 2019). Cas13 reconoce y corta específicamente RNA, en contraposición a Cas12a, que realiza estas funciones con DNA. El sistema SHERLOCK es capaz de detectar el virus Zika, el virus del dengue, diversas bacterias y polimorfismos en el DNA de un único nucleótido (SNPs) con una sensibilidad a nivel attomolar (Gootenberg *et al.*, 2017).

Sin embargo, el método SHERLOCK se encuentra limitado por las medidas cualitativas en lugar de cuantitativas y el requerimiento de equipamientos de detección de fluorescencia. Estas limitaciones se extinguieron con la aparición de la plataforma SHERLOCKv2, que es 3.5 veces más sensible que SHERLOCK gracias a la unión de Cas13a con una ribonucleasa efectora auxiliar denominada Csm6 (Huang y Zhu, 2021). SHERLOCKv2 constituye un sistema de diagnóstico cualitativo altamente sensible que permite la detección colorimétrica en tiras (Gootenberg *et al.*, 2018), por lo que es sencillo y no requiere equipamientos sofisticados.



**Figura 4. Ensayos SHERLOCKv2, SHERLOCK y DETECTR que emplean el sistema CRISPR-Cas para la detección de DNA o RNA (Mustafa y Makhawi, 2021).** Con la unión a un RNA guía, la proteína Cas activa su actividad nucleasa, escindiendo los ácidos nucleicos diana (RNA para Cas13 y ssDNA para Cas12) y los ácidos nucleicos cercanos debido a su actividad colateral. Estas escisiones colaterales provocan el aumento de la señal fluorescente al cortar el oligonucleótido que une el fluoróforo (verde) al quencher (rojo). (Izquierda) Representación esquemática de la tecnología SHERLOCKv2, la cual permite la detección directa de RNA viral mediante tiras. (Centro) Representación esquemática de la tecnología SHERLOCK, la cual permite emplear DNA o RNA, realizando una transcripción inversa. (Derecha) Representación esquemática de la tecnología DETECTR.

## 1.5. Fragmentos derivados de tRNA

Los ncRNA, entre los que se encuentran el microRNA (miRNA) y el RNA largo no codificante (lncRNA), son moléculas reguladoras implicadas en numerosas funciones biológicas tales como el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Fatica y Bozzoni, 2013). El RNA de transferencia (tRNA) es un RNA no codificante (ncRNA) caracterizado por llevar a cabo la decodificación del RNA mensajero (mRNA) y su consecuente síntesis proteica.

El tRNA maduro es sometido a modificaciones postranscripcionales que permiten que adquiera la estructura adecuada y tolere las nucleasas celulares (Zhu *et al.*, 2018). Investigaciones recientes han descubierto el papel regulador del tRNA y el aminoacil-tRNA, los cuales intervienen en la

respuesta al estrés, la proliferación celular, la represión de la traducción, la estabilización del genoma y la herencia epigenética (Raina y Ibba, 2014). Tanto los tRNA íntegros como los fragmentos de pre-tRNA y tRNA maduros, denominados tsncRNA, presentan la capacidad de cumplir estas funciones de regulación. Hasta el momento, los tsncRNA habían sido considerados productos de degradación del tRNA, pero presentan numerosos dominios específicos coincidentes con tRNA maduros, por lo que se propuso que los tsncRNA pueden tener un origen no aleatorio y desempeñar funciones biológicas (Kawaji *et al.*, 2008).

Los tsncRNA pueden clasificarse en fragmentos derivados de tRNA (tRF), mitades de tRNA (tRH) y pequeños RNA derivados de tRNA (tsRNA) (Peng *et al.*, 2018). Los tRF suelen tener una longitud de entre 14 y 40 nt y son originados por cortes específicos en tRNA maduros o pre-tRNA (Lee *et al.*, 2009). Estos fragmentos derivados de tRNA se clasifican en tRF-1, tRF-3 y tRF-5 (Kim *et al.*, 2017) en función del extremo del tRNA del cual provienen. La clase tRF-1 suele provenir de las secuencias del extremo 3' de pre-tRNA y las clases tRF-3 y tRF-5 coinciden con las secuencias de los extremos 3' y 5', respectivamente, de tRNA maduros (W. Wu *et al.*, 2021).

## **1.6. Detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas13 y tRF**

Se conoce que los tRF constituyen reguladores fundamentales de las interacciones huésped-virus y mediante T4 PNK-RNA-seq se ha confirmado la existencia de diferencias significativas entre los perfiles de sncRNA de individuos positivos y negativos para SARS-CoV-2 (W. Wu *et al.*, 2021). Los sncRNA que experimentan más cambios entre sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2 son los RNA asociados a Piwi (piRNA) y los tRF. De estos últimos, la mayoría son de clase tRF-5 (W. Wu *et al.*, 2021), es decir, derivan del extremo 5' del tRNA. Este patrón diferencial permite establecer los tRF afectados como potenciales biomarcadores para el diagnóstico, ya que el perfil de tRF modificado por la infección de SARS-CoV-2 parece específico de SARS-CoV-2. Este trabajo establece el tRF5-GluCTC como diana que el sistema CRISPR-Cas13 debe detectar.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el empleo del sistema CRISPR-Cas13 para la regulación de la expresión génica y como herramienta de diagnóstico. En concreto:

- ✓ Caracterizar el silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente sfGFP cuando el RNA diana que escinde Cas13d se encuentra próximo al RNA codificante de dicha proteína.
- ✓ Detectar el virus SARS-CoV-2 en muestras mediante el sistema CRISPR-Cas13 con tRF5-GluCTC como diana, un RNA sobreexpresado con la infección de este virus.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Construir un plásmido pQE-60 recombinante con un gRNA (AntimScarlet o gRandom) y la proteína Cas13d y un plásmido pPoliREP recombinante que exprese un mRNA policistrónico codificante de dos proteínas fluorescentes.
- Cotransformar células *E. coli* con las construcciones generadas: pQE60\_Cas13d\_AntimScarlet y pPoliREP, y pQE-60\_Cas13d\_gRandom y pPoliREP.
- Analizar el silenciamiento de la expresión de la proteína sfGFP en función de la disminución de la fluorescencia verde emitida y análisis del crecimiento celular en función de la absorbancia.
- Desarrollar un sistema de detección basado en la ribonucleoproteína formada por Cas13 y un gRNA complementario a tRF5-GluCTC que produzca una fluorescencia diferencial a distintas concentraciones de la diana.
- Determinar la capacidad del sistema detector de discriminar entre sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2, dado su nivel de expresión de tRF5-GluCTC.



## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento

#### 3.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

Todas las construcciones realizadas en este trabajo se clonaron empleando cepas de *E. coli* electrocompetentes. Se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$  con las construcciones, exceptuando aquellas construcciones que contenían el DNA codificante de la proteína Cas13d. Para las construcciones que albergaban Cas13d se empleó la cepa DH5 $\alpha$ Z1. Esta cepa se eligió debido a que contiene en el *cassette* Z1 dos copias del gen *lac*<sup>iq</sup> que codifican la proteína LacI. Esta a su vez reprime la expresión de Cas13d en ausencia de su inductor (IPTG).

#### 3.1.2. Medios y condiciones de crecimiento

Para el cultivo en medio líquido de las células *E. coli* se empleó medio LB (1% tripton, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl) y para el cultivo en medio sólido, se añadió agar 2% en placas Petri. Además, se adicionaron los antibióticos necesarios en aquellos casos en los que se requería un medio selectivo. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1 atm durante 20 min. Las células *E. coli* se cultivaron a una temperatura de 37 °C, en el caso de cultivos líquidos se mantuvieron en agitación a 200 rpm.

#### 3.1.3. Transformación de células *E. coli* electrocompetentes

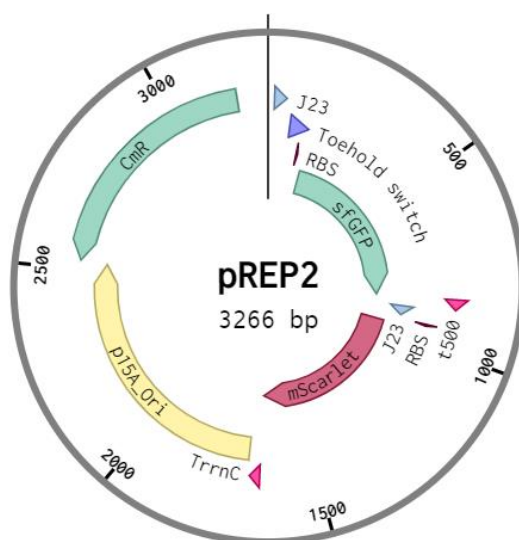
Para la transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* se mezclaron 1  $\mu$ L de cada uno de los plásmidos de interés y 40  $\mu$ L de *E. coli* electrocompetentes. La mezcla resultante se transfirió a una cubeta de electroporación estéril, tras lo cual se realizó la electroporación a 1.8 kV. Seguidamente y de manera inmediata, se resuspendieron las células en 1 mL de medio SOC (2 % de tripton, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucosa) y se transfirieron a un tubo *ependorf* estéril, el cual se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación. Por último, se sembraron en condiciones de esterilidad las células transformadas en una placa con medio selectivo LB con el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido de interés



## 3.2. Plásmidos

### 3.2.1. pREP2

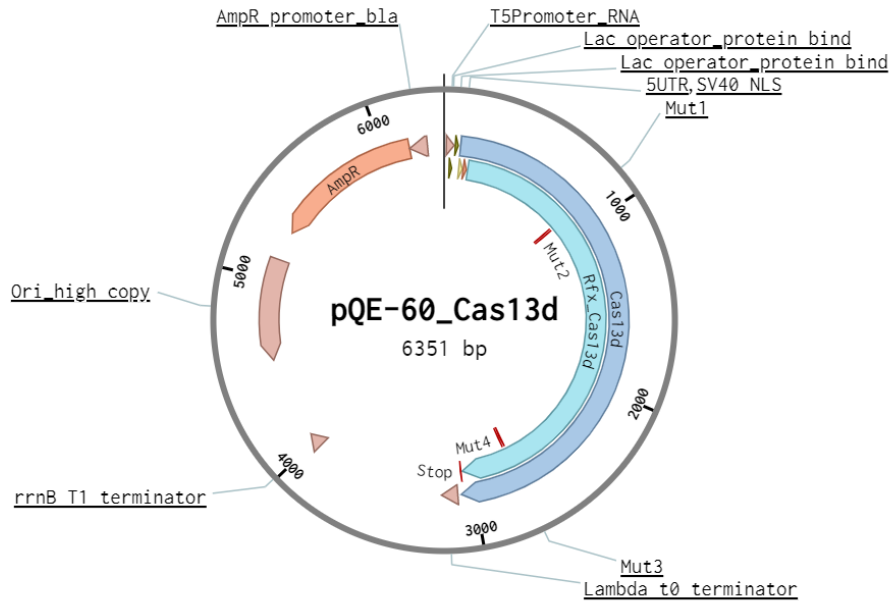
El plásmido pREP2 es un plásmido construido previamente por el grupo de investigación a partir de p15cat. p15cat se trata de un vector bacteriano de 1634 bp. Su origen de replicación p15A presenta un bajo número de copias y contiene un gen que le confiere resistencia a cloranfenicol (CmR). Para la construcción de pREP2, se realizó la clonación de los genes sfGFP y mScarlet en p15cat bajo dos promotores constitutivos J23119. El mapa del plásmido resultante se encuentra representado en la figura 5.



**Figura 5. Mapa del plásmido pREP2.** Este vector alberga un origen de replicación p15A de bajo número de copias, un gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y las proteínas fluorescentes sfGFP y mScarlet, cada una bajo un promotor constitutivo J23119.

### 3.2.2. pQE-60\_Cas13d

El plásmido pQE-60 es un vector bacteriano de 3431 bp (SNAPGENE, n.d.) que presenta un elevado número de copias. Este vector contiene un origen de replicación que permite mantener el plásmido, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), un sitio de clonación múltiple y una etiqueta de poli-histidina en el extremo C-terminal para asegurar la correcta purificación de la proteína completa (QIAGEN, n.d.). Además, cabe destacar que este vector presenta un promotor T5 que se encuentra reprimido por la proteína LacI y cuya expresión puede ser inducida mediante IPTG. El grupo de investigación insertó previamente el gen Cas13d bajo el promotor inducible T5 en el vector pQE-60. El mapa del plásmido resultante se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Mapa del plásmido pQE-60.** Se indica la presencia de un origen de replicación de alto número de copias, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y un promotor inducible T5.

### 3.3. Cebadores

Los cebadores empleados en este trabajo aparecen en la tabla 1 que se muestra a continuación.

**Tabla 1. Secuencias, temperatura de melting y diana de amplificación de los cebadores directos y reversos utilizados para la amplificación de DNA mediante PCR.**

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm* (°C)	Diana de amplificación
C13d_5_Fwd	CCTCACCGTGATCTACCACA	60.5	Inserto en el vector pQE60 para secuenciación
pQE60_Rev	TATCCAGCTGAACGGTCTGG	60.5	
gBlock_Fwd	ATGGTCATTAAGGCGCAAAGC	59.5	Fragmento de DNA sintético
gBlock_Rev	TTATCGCCCCTGAATGGCTA	58.4	
Policistronic2_Fwd	GGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACCCGATGGG	65.6	Plásmido pPoliREP
Policistronic2_Rev	GCTCTAGACGGCGGGCTTTGTTATTTGTACAG	64.4	

\*: Temperatura de *melting* de los oligonucleótidos o temperatura a la cual la mitad de las dobles hebras de DNA se encuentran disociadas.

### 3.4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.4.1. Amplificación por PCR

Se amplificó el DNA mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando la DNA polimerasa Phusion. Esta polimerasa de alta fidelidad presenta una fidelidad 52 veces mayor que la polimerasa *Taq* y cortos tiempos de extensión (15-30 s/kb). Los productos generados por la DNA polimerasa Phusion presentan extremos romos.

Para la reacción de amplificación de los fragmentos de DNA sintéticos se mezclaron, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , empleando puntas de filtro y en cabina, 4  $\mu\text{L}$  de tampón HF (x5), 0.16  $\mu\text{L}$  de dNTPs (25 mM), 0.4  $\mu\text{L}$  del cebador directo (gBlock\_Fwd, 25  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  del cebador reverso (gBlock\_Rev, 25  $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerasa Phusion (2U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde (5 ng/ $\mu\text{L}$ ) y H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ .

Se incubaron los tubos con los reactivos de PCR en un termociclador con las siguientes condiciones: la desnaturalización de la doble hélice de DNA se llevó a cabo durante 30 s a 98 °C, seguida de 30 ciclos que incluyen tres etapas; desnaturalización durante 10 s a 98 °C, alineamiento durante 15 s a la *T<sub>m</sub>* de cada fragmento y extensión durante 10 s a 72 °C y, finalmente, 2 min a 72 °C para garantizar la extensión adecuada de los productos de PCR.

En el caso del plásmido que albergaba las dos proteínas fluorescentes usadas como reporteros, la construcción se llevó a cabo mediante PCR sobre un plásmido construido anteriormente por el grupo de investigación. Este plásmido original contenía ya los reporteros de forma consecutiva, pero cada uno bajo un promotor distinto. Con esta PCR, además de introducir un sitio de corte para *Xba*I en cada uno de los extremos del DNA resultante para digerir los extremos y favorecer la ligación, se consigue eliminar el promotor de la proteína mScarlet, sin embargo, se mantiene el sitio de unión al ribosoma. De esta forma, conseguimos construir un mensajero policistrónico con los dos reporteros.

La amplificación del plásmido se lleva en las siguientes condiciones: en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , empleando puntas de filtro y en cabina, 4  $\mu\text{L}$  de tampón HF (x5), 0.16  $\mu\text{L}$  de dNTPs (25 mM), 0.4  $\mu\text{L}$  del cebador directo (Policistronic2\_Fwd, 25  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  del cebador reverso (Policistronic2\_Rev, 25  $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerasa Phusion (2U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde (5 ng/ $\mu\text{L}$ ) y H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . Una desnaturalización inicial de

98 °C, 30 segundos, seguida de 30 ciclos de amplificación de 98 °C, 7 segundos; 60 °C, de 15 segundos; 72 °C, 1 minuto y una extensión final de 2 minutos a 72 °C.

Para eliminar restos del plásmido original, se añaden directamente a las reacciones de amplificación 0.5 µL de *DpnI* por reacción de 20 µL. Esta enzima de restricción es sensible a la metilación y es capaz de degradar los restos del plásmido original usado como molde en la amplificación, pero no el producto de esta. De esta forma, al transformar posteriormente las células competentes se evitan en gran medida los falsos positivos. Tras la digestión con *DpnI*, se purificó el plásmido con el kit de Zymo DNA Clean y Concentrator<sup>TM</sup>-5.

### 3.4.2. Digestión de plásmidos

El plásmido pQE-60\_Cas13d se digirió mezclando en un tubo *ependorf* estéril 2 µL de tampón Tango (10X) (33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA), 4 µL del plásmido, 1 µL de enzima de restricción *NheI* y 13 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Tras la digestión, se rellenaron los extremos cohesivos en 3' para dar lugar a extremos romos empleando 0.5 µL de fragmento de Klenow, 20 µL del plásmido pQE-60 digerido y 0.5 µL de dNTPs. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Por último, se purificó el vector pQE-60 digerido mediante el kit Zymo DNA Clean y Concentrator<sup>TM</sup>-5.

Los productos de la PCR sobre el plásmido pREP2 se digirieron para generar extremos cohesivos y optimizar el proceso de ligación, con la enzima de restricción *XbaI*; mezclando en un tubo *ependorf* estéril 2 µL de tampón Tango (10X) (33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA), 4 µL del plásmido producto de la PCR, 1 µL de enzima de restricción y 13 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

### 3.4.3. Ligación

Tras realizar la amplificación de los fragmentos de DNA sintéticos y la digestión del plásmido pQE-60, se llevó a cabo la reacción de ligación. Se emplearon 2 µL de plásmido y 2 µL de fragmento de DNA, 1 µL de tampón ligasa T4, 1 µL de T4 DNA ligasa y 1 µL de PEG 4000 para aumentar la tasa de ligación, ya que los fragmentos de DNA sintéticos eran productos de PCR y presentaban extremos romos. Se adicionó H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 10 µL y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Tras la digestión del plásmido pPoliREP, se llevó a cabo la reacción de ligación. Se emplearon 3 µL de PCR purificada, 1 µL de tampón ligasa T4 (10X) y 1 µL de T4 DNA ligasa (5 U/µL). Se adicionó H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta un volumen de 10 µL y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

### 3.4.4. Purificación de plásmidos

El DNA plasmídico se extrajo a partir de 2 mL de *E. coli* transformadas y cultivadas en medio LB hasta la saturación durante la noche mediante el Kit Miniprep GeneJET de extracción de plásmidos. Este kit se basa en la resuspensión de las bacterias presentes en el *pellet* tras la centrifugación, lisis alcalina, neutralización del lisado, unión del DNA plasmídico a la membrana de sílice dispuesta en la columna, lavado del DNA adsorbido y elución de este. Tras la extracción, el DNA se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Scientific™).

### 3.4.5. Transcripción de RNA

Se diseñaron moléculas de RNA con secuencias específicas que sirvieran tanto de RNA guías (gRNA) para las proteínas Cas13 como de dianas para las mismas. Dichas moléculas fueron transcritas *in vivo* o *in vitro* en función del experimento.

#### 3.4.5.1. Transcripción *in vivo*

En los experimentos de silenciamiento de la expresión las moléculas de gRNA fueron transcritas por la célula huésped *in vivo*. Sus secuencias codificantes aparecen en la tabla 2.

**Tabla 2. Secuencias de DNA codificantes de los RNA guías.** La secuencia espaciadora responsable del reconocimiento de la diana aparece resaltada en negrita, mientras que el bucle de unión a Cas aparece sin resaltar. En la columna de la derecha se indica la diana de reconocimiento del gRNA.

gRNA	Secuencia (5'→3')	Diana
AntimScarlet80	CAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC <b>GCCCTCGATCTCGAACTCGTGG</b>	mScarlet (nt 80)
AntimScarlet244	CAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC <b>GACTGCTTATAGTAGTCGGGGA</b>	mScarlet (nt 244)
AntimScarlet599	CAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC <b>GTGGGAGGTGATGTCCAACCTG</b>	mScarlet (nt 599)
gRandom	CAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC <b>GTATAATTCGAGTCCAACATAG</b>	-

#### 3.4.5.2. Transcripción *in vitro*

La producción de las moléculas (gRNA y tRNA) para experimentos *in vitro* se llevó a cabo mediante el kit comercial TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoFisher).

Inicialmente se adquirieron (IDT) oligonucleótidos monocatenarios que codifican para las moléculas deseadas, por lo tanto, fue necesario un primer paso de hibridación para conseguir una doble hebra molde capaz de ser reconocida por la transcriptasa

Para la hibridación se mezclaron 4.5  $\mu\text{L}$  de oligo “T7 promoter” (100  $\mu\text{M}$ ), 4.5  $\mu\text{L}$  de oligo “Txoligo” correspondiente (100  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó en un termociclador a 95  $^\circ\text{C}$  durante 3 min para la desnaturalización, seguido de 15 min a 25  $^\circ\text{C}$ . Las secuencias de los oligonucleótidos usados (los gRNA de Cas13d y Cas13a, la secuencia diana tRNA sintético y el promotor T7) se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos.** La secuencia espaciadora responsable del reconocimiento de la diana aparece sin resaltar, mientras que el bucle de unión a Cas13 aparece resaltado en negrita. Además, la secuencia del promotor T7 se muestran en cursiva. En la columna de la derecha se indica la diana de reconocimiento del gRNA.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Diana
Txoligo_gRNA_Cas13d	GGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGTTTCAAACCCCGACCA GTTGGTAGGGGTTTACTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAGCGC	tRF5-GluCTC
Txoligo_gRNA_Cas13a	GGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGTTTTAGTCCCCTT CATTTTTGGGGTGGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGC	tRF5-GluCTC
Txoligo_tRNAsynth	CGCCGAATCCTAACCACTAGACCACCA GGGACCTATAGTGAGTCGTATTAGCGC	-
T7 promoter	<i>GCGCTAATACGACTCACTATAGG</i>	-

La transcripción se realizó mezclando 2  $\mu\text{L}$  del DNA molde, 8  $\mu\text{L}$  de ATP/CTP/GTP/UTP mix, 2  $\mu\text{L}$  de mix enzimático TranscriptAid T7, 4  $\mu\text{L}$  de Buffer TranscriptAid (5X) y  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla resultante se incubó a 37  $^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de DNasaI (1U/ $\mu\text{L}$ ) a 37  $^\circ\text{C}$  durante 15 min para degradar el DNA molde y 2  $\mu\text{L}$  de agente quelante EDTA a 65  $^\circ\text{C}$  durante 10 min para eliminar posibles contaminaciones. Por último, los gRNA y el tRNA sintético resultante se purificó mediante el kit Zymo RNA Clean y Concentrator<sup>TM</sup>-5.

### 3.5. Electroforesis de DNA

Para el análisis de la clonación en los plásmidos se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y para el análisis de los fragmentos de DNA sintéticos a insertar en vectores se realizaron

al 2%, puesto que los segundos presentan una masa molecular menor. Para ello, se virtió un volumen de 50 mL de agarosa fundida en tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) con 2  $\mu$ L de solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ y se dejó enfriar con un peine inmerso de un número de pocillos variable. Transcurridos 15 min, al solidificarse el gel, se extrajo el peine y se sumergió el gel en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE (0.5X).

A cada una de las muestras se le adicionaron 5  $\mu$ L de tampón de carga (30% glicerol, 0.25% azul Bromofenol). Se cargaron las muestras en pocillos y se llevó a cabo la electroforesis a 120 V durante 40 min. La masa molecular de las muestras se confirmó empleando un marcador de peso molecular de 100 bp – 10 Kb (Cleaver Scientific) en el caso de plásmidos y fragmentos grandes y de 10 bp – 300 bp (Thermo Scientific) para pequeños fragmentos de DNA. Por último, se visualizó el DNA bajo luz ultravioleta.

### **3.6. Secuenciación de DNA**

Para comprobar que la clonación se había producido correctamente, se secuenciaron por Sanger algunas secuencias del DNA plasmídico obtenido tras la extracción a través de un servicio de secuenciación. Se prepararon alícuotas de las muestras a secuenciar a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L. A las alícuotas se les adicionó 1  $\mu$ L del cebador pQE-60\_Rev para una concentración final de 2,5  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10  $\mu$ L.

### **3.7. Moléculas reporteras: fluoróforos**

Los fluoróforos son moléculas capaces de absorber radiación de una longitud de onda y emitirla a una longitud de onda distinta, produciendo fluorescencia de diversos colores. Se utilizan habitualmente en investigación como reporteros de diferentes actividades y procesos biológicos.

#### **3.7.1. Proteínas fluorescentes**

Las proteínas fluorescentes constituyen una herramienta muy útil en diversas áreas de la biología. Este trabajo investiga la presencia de actividad colateral desempeñada por el sistema CRISPR-Cas13d, para lo cual se requiere un mRNA policistrónico que codifica las proteínas fluorescentes sfGFP (que emite fluorescencia verde) y mScarlet (que emite fluorescencia roja) bajo un mismo promotor constitutivo. Ambas proteínas fluorescentes sirven de reporteros.

La proteína sfGFP es una proteína fluorescente verde dimérica derivada de *Aequorea victoria* que emite fluorescencia de manera constitutiva (FPBASE, n.d.). Presenta un peso molecular de 26.8 kDa y una longitud de onda de máxima excitación y emisión de 485 nm y 510 nm,

respectivamente (*FPBASE*, n.d.). Aquellas proteínas fluorescentes derivadas de la proteína fluorescente verde (GFP) son especialmente interesantes porque son pequeñas, presentan una conformación de barril  $\beta$  y un cromóforo que absorbe y emite radiación en la región visible del espectro (Tsien, 2009). La sfGFP pertenece a este grupo y presenta ventajas respecto a otras proteínas fluorescentes, que se agregan y se desnaturalizan de manera irreversible (Pédélecq *et al.*, 2006). Por el contrario, la sfGFP se pliega muy eficientemente, incluso tras la fusión con un péptido plegado erróneamente (Pédélecq *et al.*, 2006).

La proteína mScarlet es una proteína fluorescente roja monomérica de origen sintético que emite fluorescencia constitutivamente. Tiene un peso molecular de 26.4 kDa y una longitud de onda de máxima excitación y emisión de 569 nm y 594 nm, respectivamente (*FPBASE*, n.d.).

### **3.7.2. Sonda 6-FAM**

La 6-carboxifluoresceína, también conocida como 6-FAM, es un fluoróforo de 376.32 Da de peso molecular. El fluoróforo 6-FAM presenta una longitud de onda de excitación y emisión de 495 nm y 519 nm, respectivamente. 6-FAM se encuentra unido a una molécula *quencher* a través de un oligonucleótido de RNA, dando lugar a una sonda. Cuando la sonda se encuentra íntegra, el reportero se encuentra a muy poca distancia del *quencher* y se reprime la emisión de fluorescencia por parte del reportero (Butler, 2012). Sin embargo, cuando el oligonucleótido es degradado, la represión del *quencher* sobre el reportero cesa y la emisión de fluorescencia aumenta. La sonda específica empleada en este trabajo es 5'-FAM/rUrUrUrUrU/IABkFQ-3'.

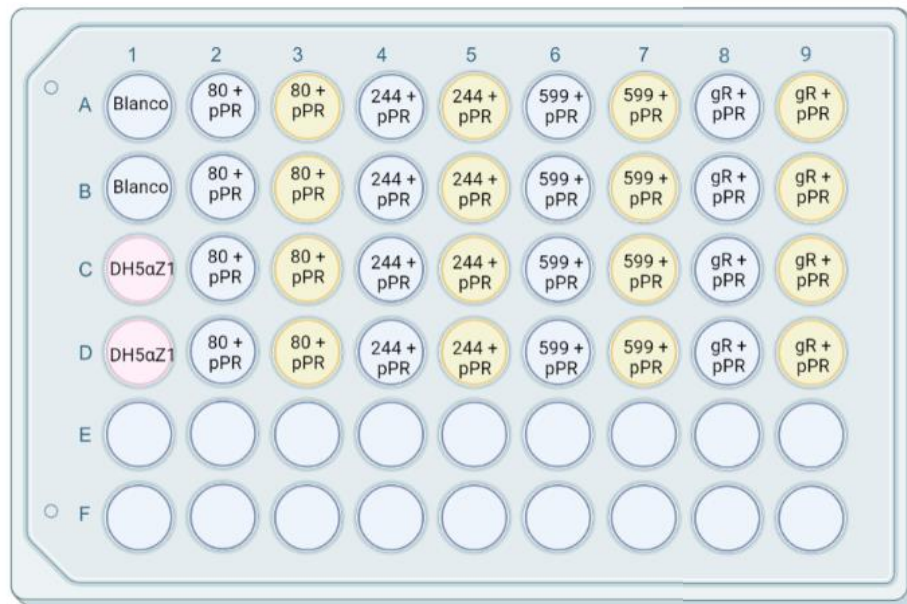
## **3.8. Caracterización de perfiles de expresión *in vivo***

Con el objetivo de medir la fluorescencia emitida por cada muestra y la absorbancia que presentaba cada una de ellas, relacionada directamente con el crecimiento celular, se realizó una caracterización. La fluorescencia de sfGFP se midió con las longitudes de onda de excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. En el caso de mScarlet, se usaron unas longitudes de onda de 570 nm y 610 nm para la excitación y emisión, respectivamente.

Las células transformadas se incubaron en LB con ampicilina y cloranfenicol a 37 °C y con una agitación de 200 rpm durante toda la noche. Se introdujeron en una placa de 96 pocillos negra y de fondo transparente 2  $\mu$ L de cada cultivo celular, así como 200  $\mu$ L de medio M9 suplementado (33.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.55 mM NaCl, 9.35 mM NH<sub>4</sub>Cl, glucosa 0.4%, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ g/mL biotina, 1  $\mu$ g/mL tiamina, 1X solución de elementos traza) con ampicilina y cloranfenicol. Dos de los pocillos incluyeron medio M9 sin antibiótico para comprobar el crecimiento de las células DH5 $\alpha$ Z1 sin plásmidos y dichos pocillos actuaron como



control negativo de fluorescencia. Se empleó medio M9 para la caracterización puesto que el medio LB emite fluorescencia verde y generaría ruido de fondo. Además, en algunos de los pocillos se adiciona IPTG 100  $\mu$ M, el cual actúa como inductor del promotor T5 de la transcripción de Cas13d. La composición de cada uno de los pocillos de la placa aparece representada en la figura 7.



**Figura 7. Representación esquemática de la composición de los pocillos para la caracterización.** Los pocillos del blanco contienen únicamente medio M9 con antibióticos. Los pocillos de color rosa contienen células DH5α1 y medio M9 libre de antibióticos como control negativo de la fluorescencia. El resto de los pocillos contienen, de izquierda a derecha, células DH5α1 transformadas con los plásmidos pPoliREP (pPR) y pQE-60 con el inserto Cas13d y AntimScarlet80 (80), AntimScarlet244 (244), AntimScarlet599 (599) o gRandom (gR). Además, los pocillos de color amarillo contienen IPTG 100  $\mu$ M para inducir la transcripción de la proteína Cas13d.

La placa de caracterización se incubó a una temperatura 37 °C en agitación. A las 3, 5, 6 y 24 horas se midieron mediante un lector de microplacas Varioskan™ LUX la absorbancia (600 nm) y la fluorescencia emitida, tanto verde como roja; para comprobar el crecimiento celular y el silenciamiento de la expresión de las proteínas fluorescentes, respectivamente.

### 3.9. Inactivación de muestras

La primera inactivación del virus SARS-CoV-2 de las muestras del tracto respiratorio de pacientes se realizó en el hospital del cual provenían. Para garantizar la completa inactivación del virus, se realizó en el laboratorio una segunda inactivación térmica consistente en una primera etapa a 60 °C durante 5 min y una segunda etapa a 98 °C durante 2 min.

### 3.10. Formación del complejo ribonucleoproteico

Las partículas de ribonucleoproteína (RNP) son complejos constituidos por RNA, tanto codificante como no codificante, y proteínas de unión a RNA (RBP) (Behler y Hess, 2020). En las reacciones *in vitro* con proteínas Cas efectoras es necesario un paso de formación de un complejo ribonucleoproteico, en este caso la proteína Cas13 y el gRNA complementario a una fracción de la secuencia del RNA diana (tRF5-GluCTC).

Para la formación de la RNP, se mezclaron 1  $\mu\text{L}$  de proteína Cas13a (100 nM) o Cas13d (150 nM), 2  $\mu\text{L}$  de tampón NEB 2.1 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  BSA), 5  $\mu\text{L}$  del RNA guía (250 nM), 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de la RNasa (20 U/ $\mu\text{L}$ ) para evitar la degradación enzimática de la sonda FAM y, por tanto, la aparición de señal inespecífica y  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . A continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min.

### 3.11. Medida de la actividad colateral de Cas13 mediante fluorescencia

La proteína Cas13 degrada el fragmento de tRNA tRF5-GluCTC gracias a su complementariedad con el gRNA. El reconocimiento de dicha diana induce la actividad colateral de Cas13, que corta la sonda. Como ya se ha indicado, dicha sonda está constituida por una molécula de 6-FAM unida a una molécula *quencher* a través de un oligonucleótido de RNA. Cuando Cas13 corta la sonda, el fluoróforo se libera del *quencher* y se emite la fluorescencia que indica la presencia de la secuencia diana.

La cuantificación se realizó mezclando 17  $\mu\text{L}$  de la incubación para la formación de RNP descrita, 2  $\mu\text{L}$  de muestra y 1  $\mu\text{L}$  de sonda (10  $\mu\text{M}$ ) e incubando la mezcla a 37  $^\circ\text{C}$  durante 30 min. A continuación, se colocaron las muestras en una placa negra de fondo transparente de 384 pocillos y se midió la fluorescencia emitida por cada una empleando un lector de microplacas CLARIOstar<sup>®</sup> *High Performance Monochromator Multimode Microplate Reader* (BMG Labtech) a una longitud de onda de excitación/emisión de 483/530 nm.

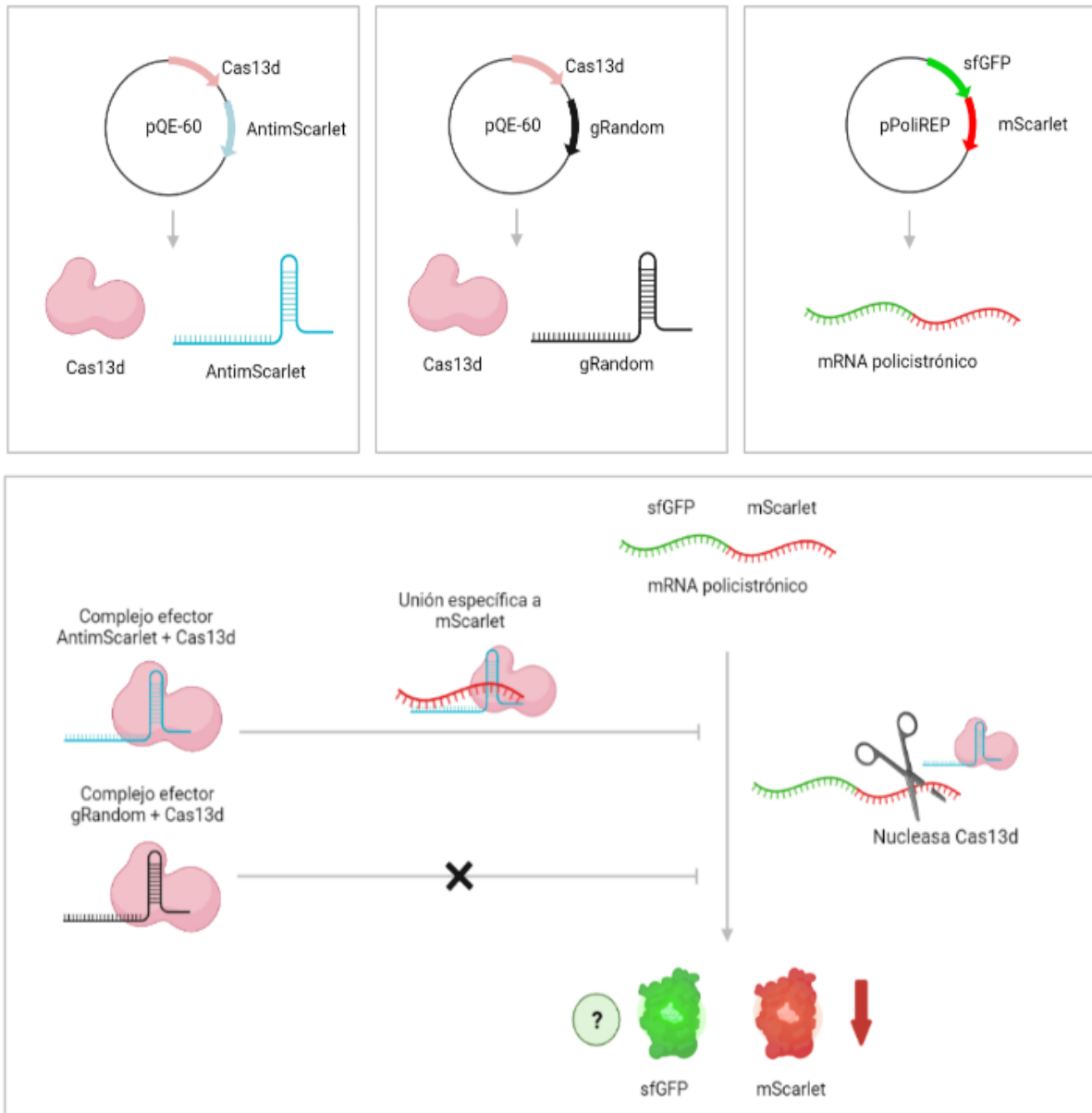


## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Regulación de la expresión génica *in vivo*

Entre los objetivos de este trabajo se encuentra el estudio del silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente sfGFP cuando su secuencia codificante se encuentra cercana a la secuencia codificante de la proteína fluorescente mScarlet en un mismo mensajero. El sistema CRISPR-Cas13d es el responsable de este silenciamiento ya que presenta actividad nucleasa colateral y realiza cortes no sólo en el RNA diana dictado por el gRNA, sino también en los RNA que se encuentran próximos. El plásmido pPoliREP se ha construido de manera que las proteínas reportero sfGFP y mScarlet se transcriban en un único mRNA policistrónico, por lo que los mRNAs codificantes de ambas proteínas son contiguos. El estudio de este caso es interesante puesto que los mensajeros policistrónicos ocurren en la naturaleza en operones (Jacob y Monod, 1961), por ejemplo, y no se tiene certeza sobre si al actuar Cas13d sobre este tipo de mensajeros es capaz de silenciar más de un gen con un solo guía.

El sistema CRISPR-Cas13d degrada el mRNA diana mediante un complejo efector constituido por el gRNA AntimScarlet y la nucleasa Cas13d que se une por complementariedad al mRNA codificante de mScarlet, tal y como se muestra en la figura 8. Esta unión activa la actividad nucleasa de Cas13d, por lo que causa cortes en la secuencia de mRNA codificante de mScarlet, disminuye su expresión y provoca una disminución en la fluorescencia roja emitida por mScarlet. La nucleasa Cas13d presenta además actividad colateral que podría degradar el RNA codificante de sfGFP, a pesar de no ser secuencia diana del gRNA, únicamente porque se encuentra cerca. Esta actividad colateral causaría la disminución adicional de la fluorescencia verde emitida por la proteína sfGFP.



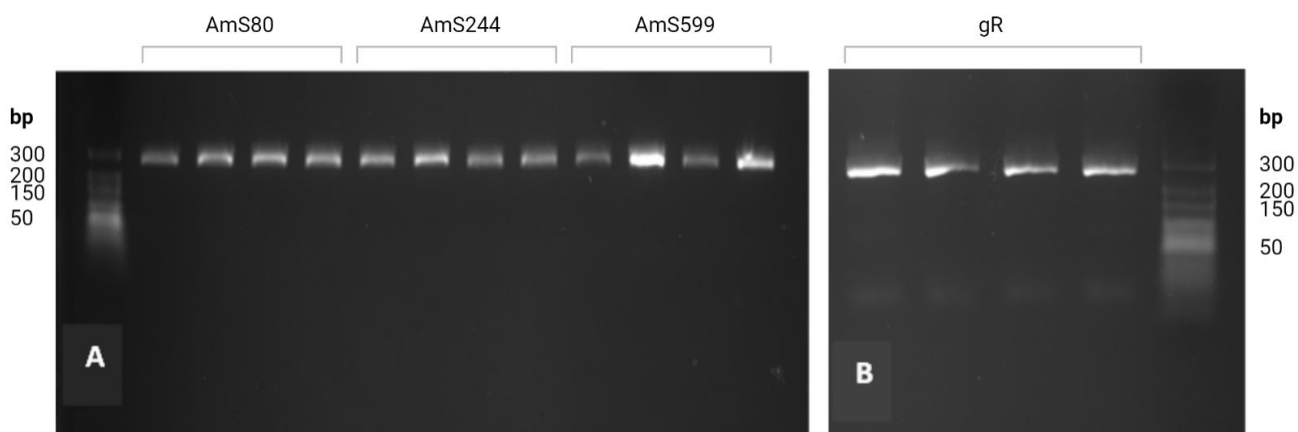
**Figura 8. Esquema del silenciamiento de la expresión génica de las proteínas sfGFP y mScarlet mediante CRISPR-Cas13d.** (A) El plásmido pQE-60\_Cas13d\_AntimScarlet codifica la nucleasa Cas13d y el gRNA AntimScarlet. (B) El plásmido pQE-60\_Cas13d\_gRandom codifica la nucleasa Cas13d y el gRNA gRandom. (C) El plásmido pPoliREP codifica bajo un mismo promotor el mRNA policistrónico de sfGFP y mScarlet. (D) La interferencia del mRNA diana ocurre cuando el complejo efector formado por AntimScarlet y Cas13d se une a la secuencia de mRNA de mScarlet, provocando escisiones en dicha secuencia y causando una disminución en la fluorescencia emitida por mScarlet (rojo). Además, la actividad colateral de la nucleasa Cas13d corta también el mRNA adyacente, de sfGFP, debiendo producir también a una disminución en la señal fluorescente emitida por sfGFP (verde). Por el contrario, el complejo efector formado por gRandom y Cas13d no tiene un RNA diana complementario al gRNA, por lo que no ha de producir disminución en la fluorescencia.

## 4.1.1. Obtención de las construcciones

### 4.1.1.1. pQE-60\_Cas13d\_gRNA

La interferencia del sistema CRISPR-Cas13d sobre el mRNA de la proteína mScarlet puede darse con cualquier gRNA que sea complementario a un fragmento de este mRNA. Sin embargo, se escogieron tres secuencias de gRNA complementarias a diferentes secciones del mRNA de mScarlet (AntimScarlet80, por coincidir con el nucleótido en la posición 80 respecto a la A del codón de inicio ATG; AntimScarlet244, con el nucleótido 244 y AntimScarlet599, con el nucleótido 599) y una secuencia de gRNA no complementaria como control negativo (gRandom), en cuyo caso el sistema no debería activarse ni producir cortes en el mRNA.

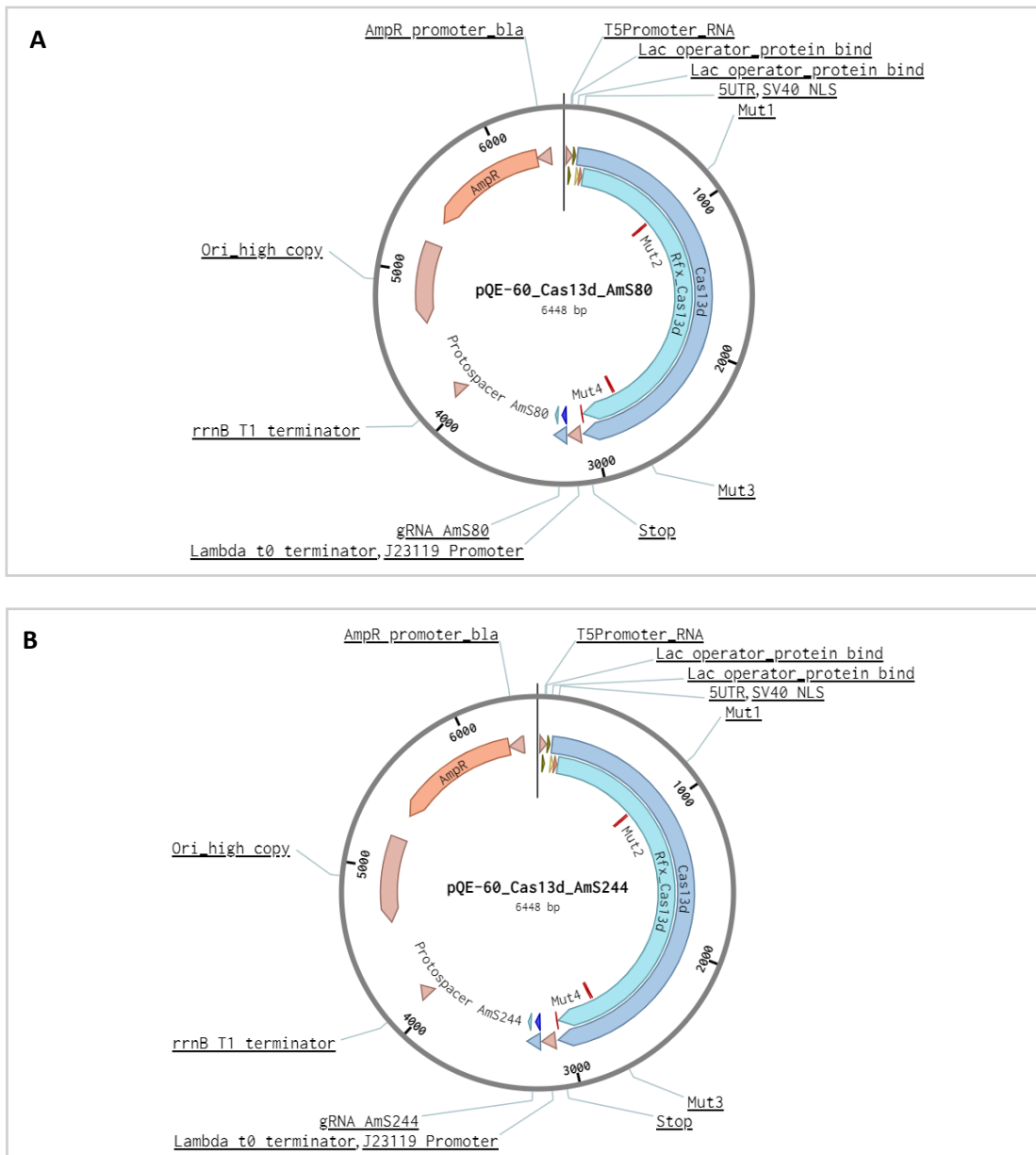
Los fragmentos de DNA codificantes de los gRNA empleados, cuyas secuencias se encuentran en la tabla 3, se clonaron individualmente por restricción-ligación en plásmidos pQE-60 que albergaban el inserto de DNA codificante de Cas13d. Para ello, se realizó la digestión del plásmido pQE-60\_Cas13d y se rellenaron los extremos cohesivos resultantes mediante fragmento de Klenow, para originar un plásmido con extremos romos que permitiera la ligación con un producto de PCR. Los insertos de DNA codificantes de gRNA AmS80, AmS244, AmS599 y gRandom se amplificaron mediante PCR a partir de DNA sintéticos adquiridos por el laboratorio. Los productos de la PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% para comprobar que se habían amplificado correctamente, puesto que los fragmentos a analizar tenían un peso molecular de 243 bp, cuyo resultado se muestra en la figura 9.

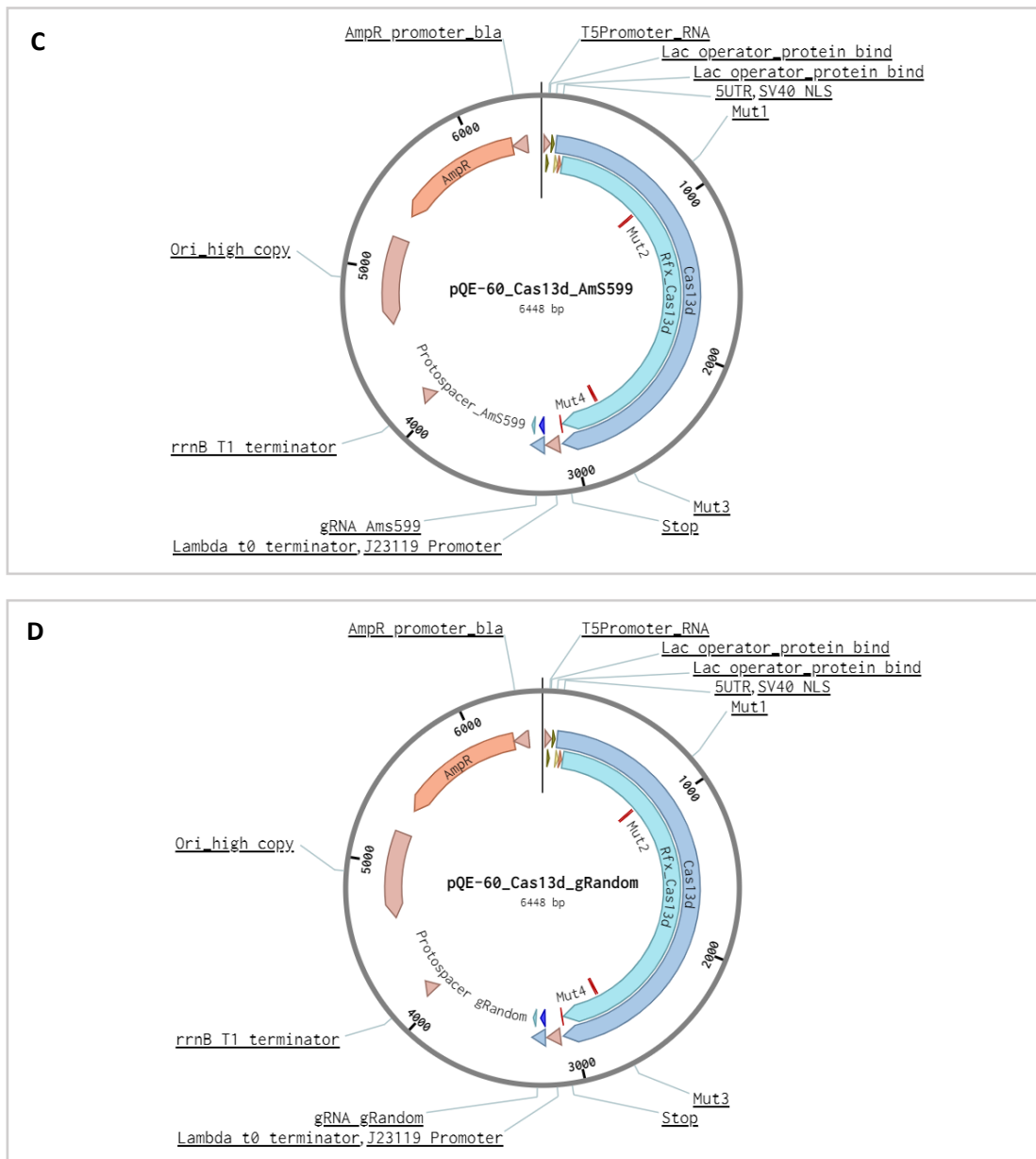


**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa empleando como muestras los productos de PCR de los gRNA.** (A) Las cuatro réplicas de los gRNA AntimScarlet80 (AmS80), AntimScarlet244 (AmS244) y AntimScarlet599 (AmS599) aparecen como un fragmento de unos 240 pb. (B) Réplicas de gRandom (gR) que se visualizan como bandas a unos 240 pb.

Tras la digestión del vector y la formación de extremos romos, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos codificantes de los gRNA (AntimScarlet80, AntimScarlet244, AntimScarlet599 y

gRandom) en el plásmido pQE-60, que contenía previamente el inserto de la proteína efectora Cas13d, y se purificaron las ligaciones. Para comprobar que el inserto se había ligado correctamente, se realizó una transformación mediante electroporación en células electrocompetentes DH5 $\alpha$ Z1, las cuales se sembraron en placa y, cuando hubieron crecido, se picaron las colonias para tener los cultivos celulares en medio líquido. El crecimiento de colonias en medio selectivo con ampicilina indica que la transformación se había producido correctamente para esas células, ya que las construcciones de pQE-60 albergaban el gen AmpR. Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico y se cuantificó para ajustar la concentración del extracto hasta la adecuada para la secuenciación. El DNA plasmídico extraído de las múltiples réplicas se secuenció por Sanger empleando el cebador pQE\_60\_Rev y se compararon con las secuencias esperadas. Las construcciones resultantes de la clonación se muestran en la figura 10.





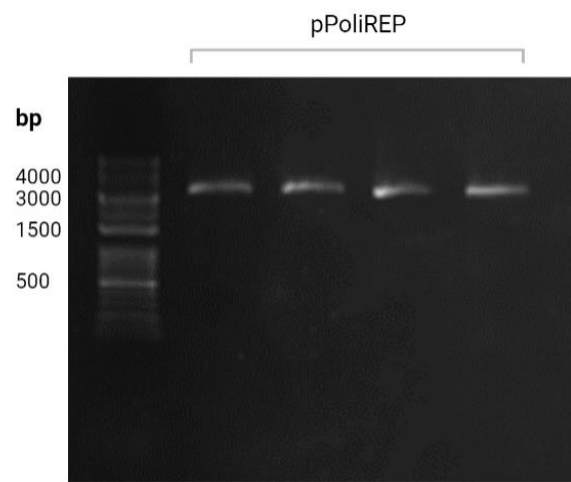
**Figura 10. Mapas de las construcciones pQE-60 con los insertos de fragmentos de DNA.** Todas las construcciones incluyen un origen de replicación de alto número de copias, la proteína Cas13d bajo el promotor inducible T5, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) bajo el promotor bla y el inserto del fragmento de DNA bajo el promotor constitutivo J23119. (A) Construcción con el inserto AntimScarlet80. (B) Construcción con el inserto AntimScarlet244. (C) Construcción con el inserto AntimScarlet599. (D) Construcción con el inserto gRandom, que actuará como control negativo.

#### 4.1.1.2. pPoliREP

Por otro lado, se construyó un plásmido que alberga las proteínas fluorescentes sfGFP y mScarlet, empleadas como reporteros. Este plásmido se denomina pPoliREP y el mRNA resultante de su transcripción debe ser reconocido y escindido por el sistema CRISPR-Cas13d, codificado por los plásmidos pQE-60\_Cas13d\_AmS. La construcción de pPoliREP se realizó mediante PCR sobre

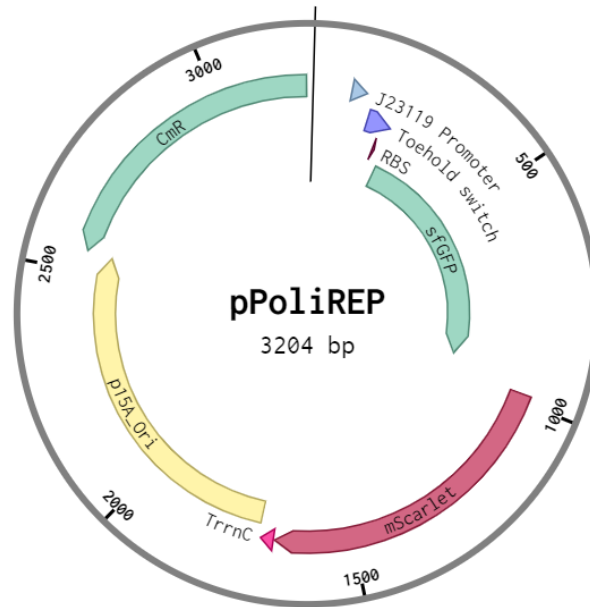


un plásmido que originalmente albergaba los reporteros sfGFP y mScarlet de manera consecutiva, pero la transcripción de cada reportero se encontraba bajo un promotor diferente. La PCR permitió eliminar el promotor del reportero mScarlet, manteniendo el sitio de unión al ribosoma, de manera que las proteínas sfGFP y mScarlet se expresaran bajo un mismo promotor y dando lugar a un mRNA policistrónico que contiene los dos reporteros. Además, la PCR permitió introducir un sitio de corte para la enzima de restricción *Xba*I en ambos extremos del DNA. Los productos de la PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tal y como se observa en la figura 11.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa empleando como muestras los productos de PCR del plásmido *pPoliREP*. Cuatro réplicas de *pPoliREP* que se visualizan como fragmentos de unas 3400 bp.

Para verificar que el plásmido se había amplificado con éxito, se transformaron células electrocompetentes DH5 $\alpha$  mediante electroporación, las cuales se sembraron en placa de LB con cloranfenicol y, cuando hubieron crecido, se picaron las colonias para tener los cultivos celulares en medio líquido. El crecimiento de colonias en medio selectivo con cloranfenicol señala que esas células se habían transformado con éxito, ya que el plásmido pREP2 original albergaba el gen CmR. Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico y se cuantificó para ajustar la concentración del extracto hasta la adecuada para la secuenciación. El DNA plasmídico extraído de las múltiples réplicas se secuenció por Sanger empleando el cebador Policistronic2\_Rev y se compararon con las secuencias esperadas. El mapa del plásmido pPoliREP resultante aparece en la figura 12.



**Figura 12. Mapa del vector pPoliREP construido mediante PCR.** pPoliREP contiene un origen de replicación p15A de bajo número de copias, un gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y los genes codificantes de las proteínas fluorescentes sfGFP y mScarlet bajo un mismo promotor constitutivo.

Cuando se obtuvieron y se comprobó que los plásmidos pQE-60\_Cas13d\_AmS80, pQE-60\_Cas13d\_AmS244, pQE-60\_Cas13d\_AmS599, pQE-60\_Cas13d\_gRandom y pPoliREP se encontraban correctamente contruidos, se realizaron cotransformaciones por electroporación de células electrocompetentes DH5 $\alpha$ Z1. Las células se cotransformaron con cada una de las construcciones de pQE-60 individualmente y el plásmido pPoliREP y se sembraron en placa. Todas crecieron correctamente, excepto aquellas cotransformadas con pQE-60\_Cas13d\_AmS80 + pPoliREP, por lo que se excluyeron de la caracterización posterior. Todas las demás se transformaron con éxito, dando lugar a células cotransformadas con las siguientes combinaciones:

- pQE-60\_Cas13d\_AmS244 + pPoliREP
- pQE-60\_Cas13d\_AmS599 + pPoliREP
- pQE-60\_Cas13d\_gRandom + pPoliREP

Las células que fueron cotransformadas con éxito crecieron en placas con los antibióticos ampicilina y cloranfenicol, puesto que los plásmidos introducidos albergaban los genes de resistencia a antibiótico AmpR y CmR. La caracterización de la fluorescencia emitida se realizó a partir de estas células.

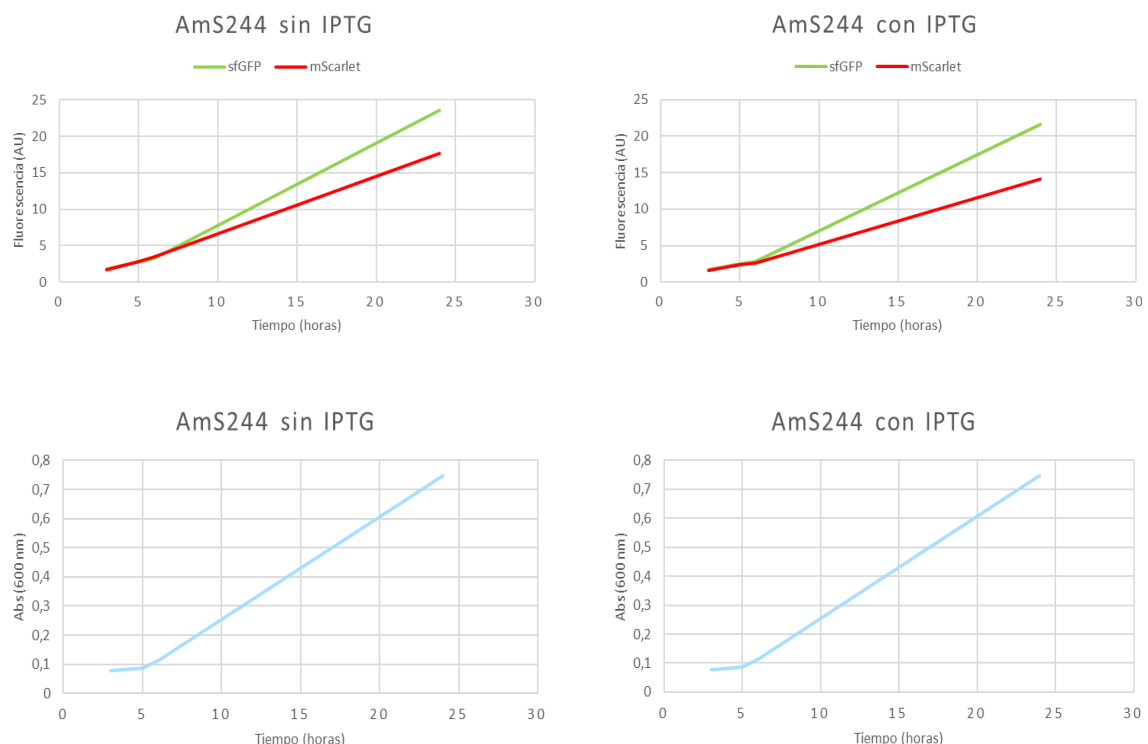
### 4.1.2. Análisis de silenciamiento de la expresión de la proteína sfGFP

El silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente verde sfGFP se caracterizó disponiendo en una placa las células transformadas con diferentes plásmidos, tal y como se describe en la figura 6. Para analizar el silenciamiento de sfGFP se realizaron medidas reiteradas (a las 3 h, 5 h, 6 h y 24 h) de:

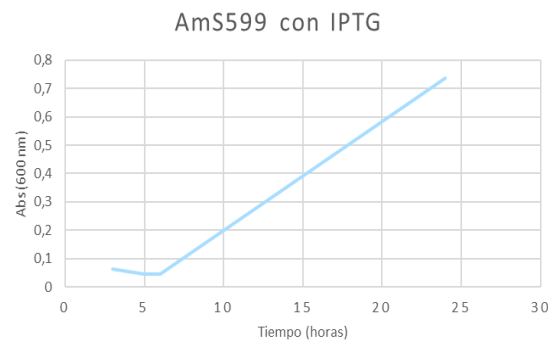
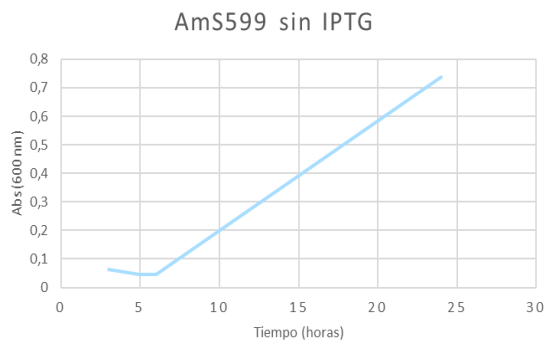
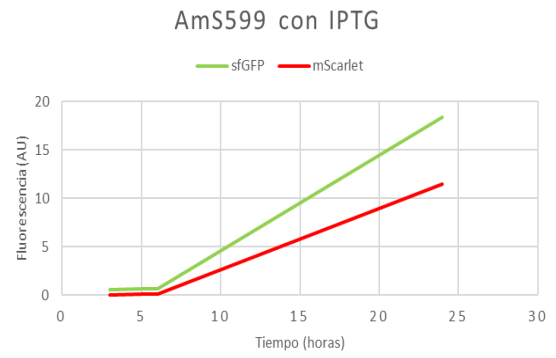
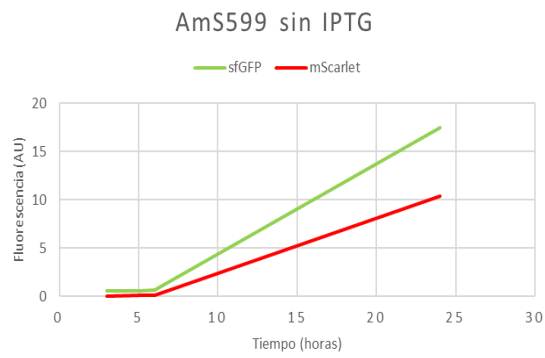
- ✓ Absorbancia, como control del crecimiento y la proliferación celular.
- ✓ Fluorescencia roja, para comprobar el silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente mScarlet, en aquellos pocillos que contienen un gRNA AntimScarlet como guía para la nucleasa Cas13d. Este silenciamiento se traduce en una disminución de la fluorescencia roja.
- ✓ Fluorescencia verde, para comprobar el silenciamiento de la expresión de la proteína fluorescente sfGFP como consecuencia de la actividad colateral de la nucleasa Cas13d, en aquellos pocillos que contienen un gRNA AntimScarlet como guía. Este silenciamiento se traduce en una disminución de la fluorescencia verde.

La evolución cronológica de los resultados obtenidos se encuentra representada en la figura 13.

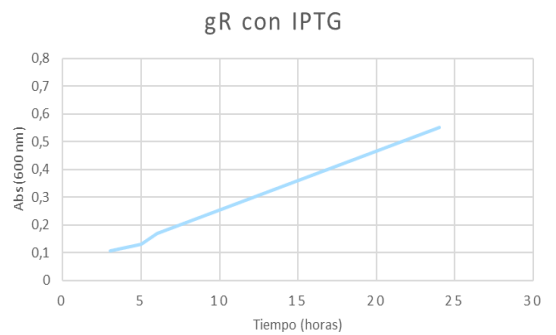
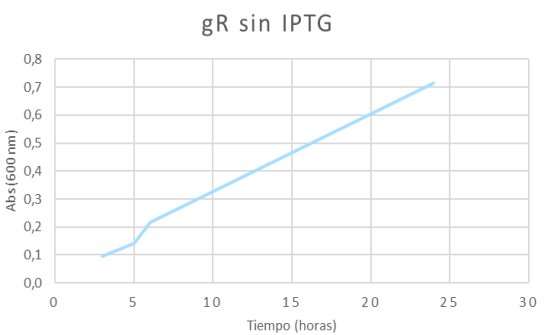
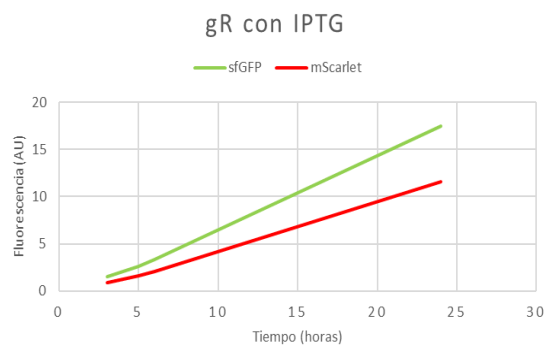
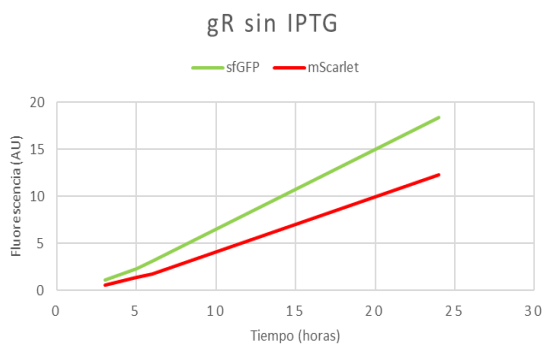
**A**



**B**



**C**



**Figura 13. Gráficas de evolución de absorbancia y emisión de fluorescencia verde y roja.** Medidas de absorbancia 600 nm y fluorescencia (unidades arbitrarias, AU) emitida por sfGFP (verde) y mScarlet (roja) en las diferentes células cotransformadas a 3h, 5h, 6h y 24h. A la izquierda se muestran las medidas de los pocillos a los que no se les añadió inductor del promotor T5 (IPTG) y a la derecha, las de los pocillos que sí contenían IPTG. (A) Medidas de células cotransformadas con los plásmidos pPoliREP y AntimScarlet244 (AmS244). (B) Medidas de células cotransformadas con los plásmidos pPoliREP y AntimScarlet599 (AmS599). (C) Medidas de células cotransformadas con los plásmidos pPoliREP y gRandom (gR).

Si el crecimiento celular fuera suficiente y permitiera apreciar las diferencias, el sistema CRISPR-Cas13d debería silenciar la expresión de mScarlet (por ser diana del gRNA) y, esperaríamos también la de sfGFP (por actividad colateral) en aquellas células que expresan el gRNA AntimScarlet. Este silenciamiento se observaría en una disminución de la fluorescencia roja y verde. En cambio, aquellas células que expresan las proteínas fluorescentes y el gRNA gRandom deberían actuar como control negativo, en el que la fluorescencia no se vería alterada puesto que no hay ningún RNA diana complementario a este gRNA.

A pesar de que se observa cierto crecimiento en las gráficas de evolución de la absorbancia a las 24 h de la caracterización, el crecimiento bacteriano no alcanza la fase exponencial en las 6 primeras horas donde esperamos estudiar correctamente el circuito. En este período de tiempo, las células de *E. coli* en medio M9 debían haber alcanzado ya la fase exponencial de crecimiento (Zhang *et al.*, 2003). Por ello, no es posible percibir la disminución en la fluorescencia roja y verde en la fase exponencial, producto del silenciamiento de la expresión génica de las proteínas mScarlet y sfGFP. En la fase de saturación, la acumulación de las proteínas en las células impide ver las diferencias en la expresión de las proteínas reporteras. Además, ha sido descrito que la sobreexpresión de proteínas recombinantes produce una carga metabólica que podría explicar las dificultades observadas en el crecimiento bacteriano (Li y Rinas, 2021; Neubauer *et al.*, 2003); sumándose, además, la posible toxicidad producida por la actividad inespecífica de Cas13d (Charles *et al.*, 2021).

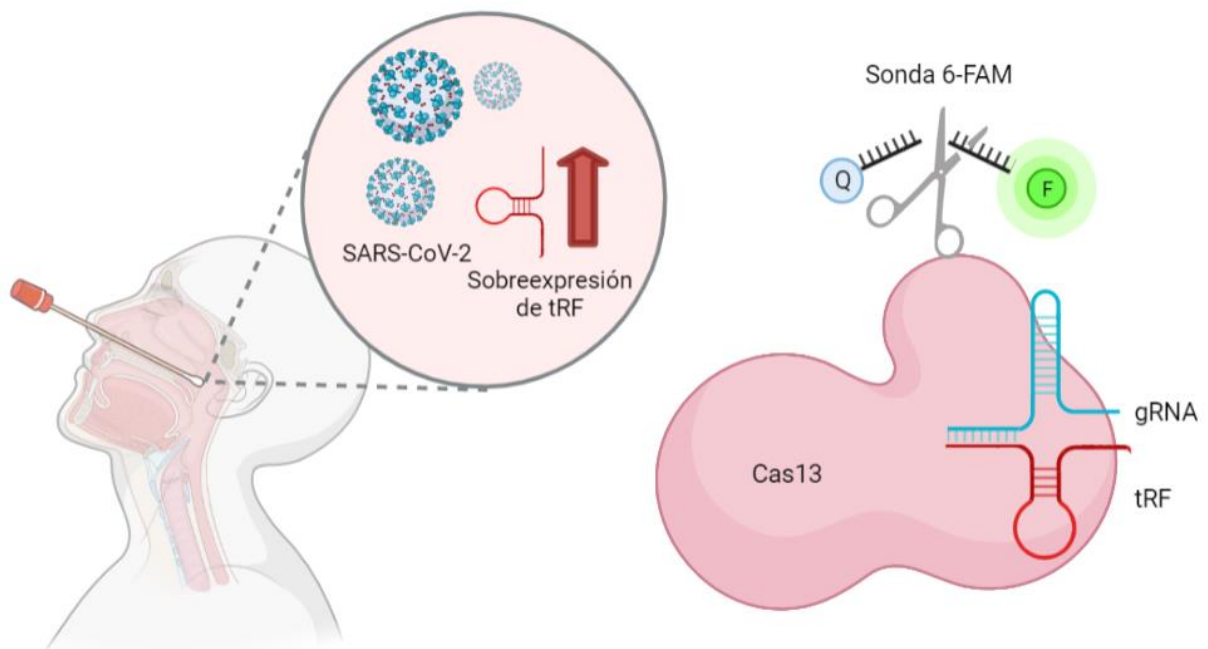
Un enfoque podría ser probar con una mayor variedad de secuencias guía (Shinoda *et al.*, 2021), para evitar que la Cas13d efectora tenga como diana algún componente celular imprescindible para el crecimiento. Sin embargo, este factor es poco probable, puesto que se probó con varias secuencias de gRNA. Posiblemente, la expresión de la proteína Cas13d esté ralentizando e incluso impidiendo el crecimiento celular (Zhang *et al.*, 2020), ya que las células cotransformadas crecían adecuadamente en placa con medio sólido. Una posible alternativa para continuar con el estudio podría ser modificar el promotor bajo el cual se encuentra la proteína Cas13d, o bien cambiar el

origen de replicación del plásmido que la alberga a un número de copias menor (Zhang *et al.*, 2020), para evitar que se exprese en exceso y el crecimiento celular cese.

## 4.2. Diagnóstico de SARS-CoV-2 *in vitro*

La infección por SARS-CoV-2 provoca una alteración en el perfil de expresión de tRNA, especialmente en los fragmentos de tRNA o tRF (W. Wu *et al.*, 2021). De entre los tRF cuyo perfil se encuentra alterado con la infección, se seleccionó como diana el tRF5-GluCTC. Esta alteración permitiría asociar la sobreexpresión de tRF5-GluCTC con la infección por SARS-CoV-2 realizando un ensayo de diagnóstico indirecto mediante el sistema CRISPR-Cas13.

Un complejo efector ribonucleoproteico (RNP) (Behler y Hess, 2020) compuesto por el gRNA de tRF5-GluCTC y la proteína efectora Cas13 produce cortes en el RNA diana, el tRF5-GluCTC. Adicionalmente, produce cortes inespecíficos en los oligonucleótidos que mantienen la unión fluoróforo-*quencher* de la sonda, desencadenando la emisión de fluorescencia. La diferencia entre la señal fluorescente de las muestras procedentes de sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2 constituiría una potencial herramienta de detección indirecta de este virus. La figura 14 expone un esquema de la prueba descrita.

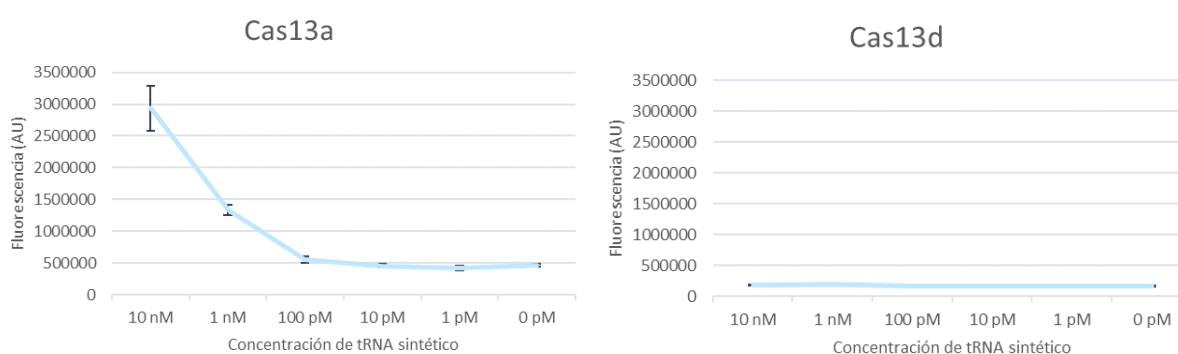


**Figura 14. Esquema de detección de SARS-CoV-2 mediante el sistema CRISPR-Cas13.** La infección por SARS-CoV-2 induce la sobreexpresión del tRF5-GluCTC. Este fragmento de tRNA es detectable y cuantificable mediante la unión a un gRNA complementario y la proteína Cas13, la cual produce cortes entre el quencher (Q) y el fluoróforo (F) de la sonda 6-FAM que provocan la emisión de fluorescencia.

### 4.2.1. Diseño y comprobación del sistema de detección

Con el objetivo de desarrollar el mejor sistema posible, se planteó el uso de dos Cas13 de subtipos distintos, Cas13a y Cas13d, para posteriormente poder escoger aquella proteína que presentase un mayor rango dinámico entre la señal más positiva y la negativa. Se diseñaron gRNA específicos para cada una de ellas y se sintetizaron mediante una transcripción *in vitro*. Como una primera aproximación, se realizó un estudio de la actividad de ambos sistemas a diferentes concentraciones de RNA diana. Para ello fue necesaria la transcripción *in vitro* y cuantificación de tRF5-GluCTC. Se realizaron reacciones con una concentración final de RNA diana de 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM y 0 pM para cada proteína Cas13.

Los resultados de dichos ensayos se muestran en la figura 15.



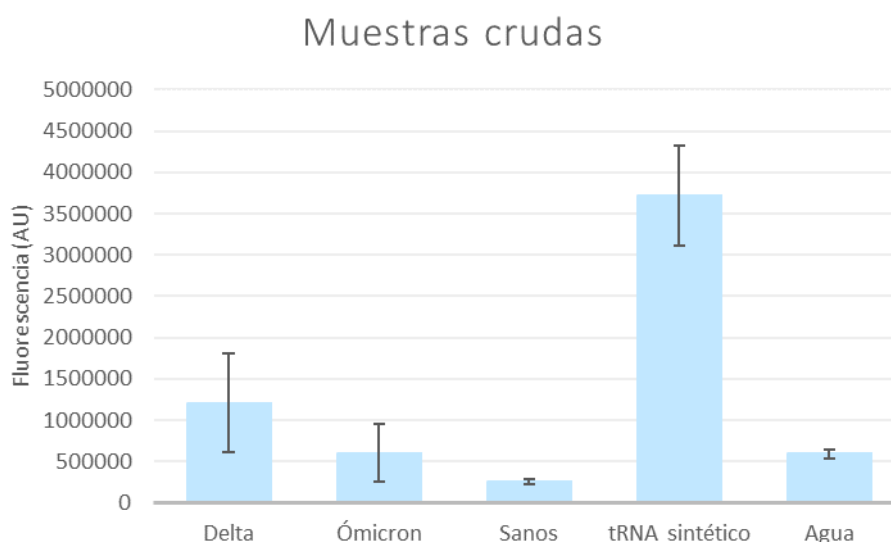
**Figura 15. Curvas de optimización del sistema mediante el gradiente de tRNA sintético para Cas13a y Cas13d.**

Como se puede observar en las gráficas de actividad obtenidas, la proteína Cas13a presentaba una señal fluorescente máxima de 2 936 030 unidades para la reacción con el tRNA sintético 10 nM y un límite de detección (LOD) de 530 710 unidades. Por otro lado, Cas13d presentaba un máximo de fluorescencia de 183 502 unidades y un LOD de 197 024 unidades, esto es, no se pudo apreciar actividad dependiente de la concentración de secuencia diana. Dado que la proteína Cas13a presentaba una actividad claramente detectable a las mayores concentraciones, con un buen rango dinámico, se concluyó que podía servir para el objetivo marcado de detección. Por lo tanto, las posteriores reacciones se llevaron a cabo empleando la nucleasa Cas13a.

El limitado rango dinámico de Cas13d podría deberse a una baja afinidad del gRNA con su RNA diana, lo que provoca un menor reconocimiento y una menor eficiencia de corte del RNA diana. Se podría realizar una comprobación del sistema de detección con gRNA que contengan diferentes secuencias homólogas al RNA diana (Shinoda *et al.*, 2021), para verificar cuál de ellas se une a la diana con mayor afinidad.

#### 4.2.2. Detección de muestras clínicas de sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2

Tras comprobar la actividad del sistema de detección basado en Cas13a se pasó a su validación con muestras clínicas. Se llevaron a cabo las reacciones de formación del complejo ribonucleoproteico, compuesto por la proteína efectora Cas13a y el gRNA. Posteriormente se incubaron la RNP, la sonda y las muestras clínicas positivas y negativas para SARS-CoV-2, el control positivo (tRF5-GluCTC) y el agua. Tras la incubación, se midió la fluorescencia emitida en cada uno de los pocillos de la placa, producto de la degradación de la sonda por la actividad colateral de la proteína Cas13a. Se realizaron 3 réplicas de 4 muestras de cada grupo, dando como resultado el patrón que se muestra en la figura 16, en el que las muestras de sujetos infectados por la variante Delta del virus SARS-CoV-2 aparentemente parecían estar relacionadas con una mayor emisión de fluorescencia.



**Figura 16.** Gráfica de emisión de fluorescencia de muestras sin purificar. Se compara la fluorescencia emitida por las muestras de variante Delta y Ómicron, las de sujetos sanos, las de tRNA sintético (control positivo) y las de agua.

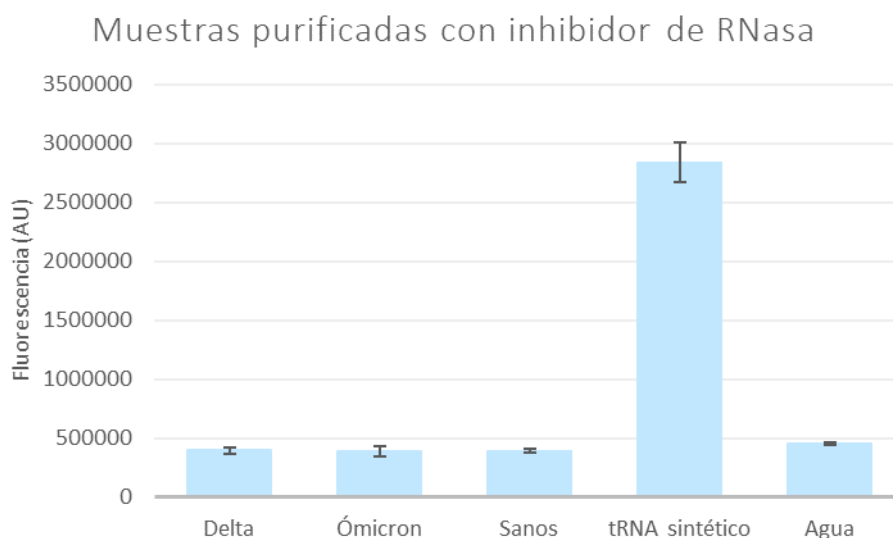
Los datos de fluorescencia de las diferentes reacciones se compararon mediante la prueba estadística t de Welch con una significancia de 0.05, tal y como se muestra en la tabla 4. Se rechazó la hipótesis nula  $H_0$  ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) para los datos de Delta vs Sanos, Ómicron vs Sanos y tRNA sintético vs Sanos, por lo que se concluyó que estas muestras eran significativamente diferentes entre sí. Es decir, este método de detección permitiría detectar diferencias entre las muestras positivas de las cepas Delta y Ómicron de SARS-CoV-2 y las negativas, y sería especialmente sensible en la detección de la variante Delta.



**Tabla 4. Prueba estadística t de Welch sobre las muestras crudas.** Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se concluye que las muestras son estadísticamente diferentes cuando presentan un p-valor inferior a 0.05.

Muestras comparadas	p-valor	Diferencia significativa
Delta vs Sanos	0.0002	Sí
Ómicron vs Sanos	0.0049	Sí
tRNA sintético vs Sanos	0.0010	Sí

Para optimizar la reproducibilidad de la prueba y eliminar las posibles variaciones debido al tampón en el que se encontraban las muestras, se purificaron todas las muestras de sujetos sanos e infectados por Delta y Ómicron. Además, se adicionó a las reacciones un inhibidor de RNasa, puesto que la presencia de este enzima en las muestras podría estar degradando el oligonucleótido de la sonda y provocando una emisión inespecífica de fluorescencia. Se repitieron las reacciones con las muestras purificadas y el inhibidor de RNasa y se observó el patrón de la figura 17.



**Figura 17. Gráfica de emisión de fluorescencia de muestras purificadas y con inhibidor de RNasa.** Se compara la fluorescencia emitida por las muestras de variante Delta y Ómicron, las de sujetos sanos, las de tRNA sintético (control positivo) y las de agua. A las muestras se les había agregado previamente inhibidor de RNasa, para evitar las señales inespecíficas debido a la degradación de la sonda.

Tras excluir los posibles factores que daban variabilidad e inconsistencia a las muestras, se observó uniformidad en la emisión de fluorescencia entre las muestras de sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2. La fluorescencia emitida por los sujetos infectados de SARS-CoV-2 era menor a la emitida por la reacción con agua. Se comparó la fluorescencia emitida entre las

muestras Delta vs Sanos, Ómicron vs Sanos y tRNA sintético vs Sanos mediante la prueba estadística t de Welch con una significancia de 0.05, cuyos resultados se observan en la tabla 5. Entre las muestras de SARS-CoV-2 y las de Sanos se aceptó la hipótesis nula  $H_0$  ( $p$ -valor  $> 0.05$ ), según la cual ambos grupos presentaban datos estadísticamente equivalentes.

**Tabla 5. Prueba estadística t de Welch sobre las muestras purificadas y con inhibidor de RNasa. Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se concluye que las muestras son estadísticamente diferentes cuando presentan un  $p$ -valor inferior a 0.05.**

<b>Muestras comparadas</b>	<b>p-valor</b>	<b>Diferencia significativa</b>
Delta vs Sanos	0.8626	No
Ómicron vs Sanos	0.6870	No
tRNA sintético vs Sanos	0.0015	Sí

Los escasos niveles de fluorescencia emitida por las muestras evidencian la necesidad de rectificar el protocolo seguido. Es posible que agregar a la reacción el gRNA a una concentración de 250 nM sea insuficiente y no se esté produciendo la formación de la RNP adecuadamente, por lo que ha de comprobarse si una concentración de gRNA de 625 nM (Shinoda *et al.*, 2021) aporta resultados más eficientes. Además, las muestras clínicas podrían encontrarse contaminadas por la presencia de RNasa. Esto provocaría la degradación prematura de los tRF5-GluCTC antes de poder ser detectados. Un posible abordaje para proseguir con el estudio podría ser la adición de inhibidor de RNasa al inicio del proceso, en el momento de la toma de muestras. Otro enfoque podría ser cambiar el RNA diana actual por otro tRF cuyo perfil se encuentre alterado (W. Wu *et al.*, 2021). En cualquier caso, se continuará el estudio del sistema CRISPR-Cas13 para la detección de SARS-CoV-2.



## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos y analizados en este trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones:

- ✓ Las construcciones del plásmido recombinante que expresa un gRNA y Cas13d y del plásmido recombinante que expresa el mRNA policistrónico codificante de sfGFP y mScarlet se llevó a cabo con éxito.
- ✓ Las células de *E. coli* cotransformadas con los plásmidos recombinantes tienen capacidad de proliferación limitadas.
- ✓ El sistema de detección basado en una RNP compuesta por Cas13 y un gRNA complementario a tRF5-GluCTC produce una fluorescencia diferencial a diferentes concentraciones del RNA diana.
- ✓ Este sistema de detección con tRF5-GluCTC como diana no ha sido capaz de distinguir entre sujetos positivos y negativos para SARS-CoV-2 en los ensayos con las muestras disponibles.

Estos resultados no fueron completamente satisfactorios, por lo que es necesario prolongar el estudio para resolver la incapacidad de crecimiento de las células en un medio con el inductor IPTG. Además, resulta interesante la posibilidad de emplear como diana del sistema de detección otra especie de RNA alterada con la infección de SARS-CoV-2, agregar un inhibidor de RNasa al inicio del proceso o diseñar nuevos gRNA. El estudio del sistema CRISPR-Cas13 para la detección de SARS-CoV-2 continuará activo, puesto que se trata de una herramienta de detección prometedora para este y muchos otros patógenos.



## 6. Bibliografía

- Arslan, Z., Wurm, R., Brener, O., Ellinger, P., Nagel-Steger, L., Oesterhelt, F., Schmitt, L., Willbold, D., Wagner, R., Gohlke, H., Smits, S. H. J., y Pul, Ü. (2013). Double-strand DNA end-binding and sliding of the toroidal CRISPR-associated protein Csn2. *Nucleic Acids Research*, 41(12), 6347. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT315>
- Ashraf, S., Ghouri, M. Z., Javed, M. A., Zafar, H., Ali, H., Qari, S. H., y Ahmad, A. (2022). RNA Editing with CRISPR/Cas13. *The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing*, 219–254. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6305-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6305-5_7)
- Bayoumi, M., y Munir, M. (2021). Potential Use of CRISPR/Cas13 Machinery in Understanding Virus-Host Interaction. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.743580>
- Behler, J., y Hess, W. R. (2020). Approaches to study CRISPR RNA biogenesis and the key players involved. *Methods*, 172, 12–26. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2019.07.015>
- Butler, J. M. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., y Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes y Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Charles, E. J., Kim, S. E., Knott, G. J., Smock, D., Doudna, J., y Savage, D. F. (2021). Engineering improved Cas13 effectors for targeted post-transcriptional regulation of gene expression. *BioRxiv*, 2021.05.26.445687. <https://doi.org/10.1101/2021.05.26.445687>
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., y Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436–439. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR6245/SUPPL\\_FILE/AAR6245\\_CHEN\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR6245/SUPPL_FILE/AAR6245_CHEN_SM.PDF)
- Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., y Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, 176. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104742>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., y Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/NATURE09886>
- Fatica, A., y Bozzoni, I. (2013). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics* 2013 15:1, 15(1), 7–21. <https://doi.org/10.1038/nrg3606>
- FPBASE. (n.d.). Superfolder GFP, Visto El 9 de Junio de 2022. Retrieved June 6, 2022, from <https://www.fpbases.org/protein/superfolder-gfp/>
- Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., y Ciccozzi, M. (2021). Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 88. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.10.102>
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., y Zhang, F. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 439–444. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAQ0179>

- 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., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. v., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., y Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM9321>
- Harrison, A. G., Lin, T., y Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.004>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., y Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, 78(4), 779–784.e5. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.04.022>
- Huang, F., y Zhu, B. (2021). The Cyclic Oligoadenylate Signaling Pathway of Type III CRISPR-Cas Systems. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3073. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.602789/BIBTEX>
- Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., y Brouns, S. J. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*, 356(6333). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL5056/ASSET/1FD5AC0E-A8C7-4D93-996E-401B15935EBE/ASSETS/GRAPHIC/356\\_AAL5056\\_F4.JPEG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL5056/ASSET/1FD5AC0E-A8C7-4D93-996E-401B15935EBE/ASSETS/GRAPHIC/356_AAL5056_F4.JPEG)
- Jacob, F., y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3), 318–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
- Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S., Daub, C. O., Kai, C., Kawai, J., Yasuda, J., Carninci, P., y Hayashizaki, Y. (2008). Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-157>
- Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., y Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols*, 14(10), 2986–3012. <https://doi.org/10.1038/S41596-019-0210-2>
- Kiga, K., Tan, X. E., Ibarra-Chávez, R., Watanabe, S., Aiba, Y., Sato'o, Y., Li, F. Y., Sasahara, T., Cui, B., Kawauchi, M., Boonsiri, T., Thitianapakorn, K., Taki, Y., Azam, A. H., Suzuki, M., Penadés, J. R., y Cui, L. (2020). Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16731-6>
- Kim, H. K., Fuchs, G., Wang, S., Wei, W., Zhang, Y., Park, H., Roy-Chaudhuri, B., Li, P., Xu, J., Chu, K., Zhang, F., Chua, M. S., So, S., Zhang, Q. C., Sarnow, P., y Kay, M. A. (2017). A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature* 2017 552:7683, 552(7683), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature25005>
- Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A., y Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes y Development*, 23(22), 2639–2649. <https://doi.org/10.1101/GAD.1837609>
- Li, C., Cao, Y., Zhang, L., Li, J., Wang, J., Zhou, Y., Wei, H., Guo, M., Liu, L., Liu, C., Zhang, S., y Liu, G. (2021). CRISPR-CasRx Targeting LncRNA LINC00341 Inhibits Tumor Cell Growth in vitro and in vivo. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.638995>
- Li, Z., y Rinas, U. (2021). Recombinant protein production-associated metabolic burden reflects anabolic constraints and reveals similarities to a carbon overfeeding response. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 94–105. <https://doi.org/10.1002/BIT.27553>
- Makarova, K. S., Anantharaman, V., Aravind, L., y Koonin, E. v. (2012). Live virus-free or die: coupling of antiviral immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes. *Biology Direct*, 7, 40. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-40>

- Makarova, K. S., Anantharaman, V., Grishin, N. v., Koonin, E. v., y Aravind, L. (2014). CARF and WYL domains: ligand-binding regulators of prokaryotic defense systems. *Frontiers in Genetics*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2014.00102>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., ... Koonin, E. v. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(11), 722. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3569>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. v. (2019). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 2019 18:2, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., y Koonin, E. v. (2013). Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*, 41(8), 4360–4377. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT157>
- Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. v., y van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR–Cas systems. *Science*, 353(6299). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD5147/ASSET/ACA8B40D-1467-4610-88D9-FA4976E3E307/ASSETS/GRAPHIC/353\\_AAD5147\\_F6.JPEG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD5147/ASSET/ACA8B40D-1467-4610-88D9-FA4976E3E307/ASSETS/GRAPHIC/353_AAD5147_F6.JPEG)
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., y Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2020.09.018>
- Mustafa, M. I., y Makhawi, A. M. (2021). Sherlock and detectr: CRISPR-cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20/ASSET/7757EC0D-1128-4DD9-9B66-6B001C04B51B/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCM.00745-20-F0002.JPG>
- Neubauer, P., Lin, H. Y., y Mathiszik, B. (2003). Metabolic load of recombinant protein production: inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(1), 53–64. <https://doi.org/10.1002/BIT.10645>
- O’Connell, M. R. (2019). Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR–Cas Systems. *Journal of Molecular Biology*, 431(1), 66–87. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.06.029>
- OUR WORLD IN DATA. (n.d.). Covid-19 Data Explorer, Visto El 6 de Junio de 2022. Retrieved June 6, 2022, from <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>
- Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., y Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24(1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/NBT1172>
- Peng, E. Y., Shu, Y., Wu, Y., Zeng, F., Tan, S., Deng, Y., Deng, Y., Chen, H., Zhu, L., y Xu, H. (2018). Presence and diagnostic value of circulating tsncRNA for ovarian tumor. *Molecular Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0910-1>
- QIAGEN. (n.d.). . . C-Terminus PQE Vector Set, Visto El 6 de Junio de 2022. Retrieved June 8, 2022, from <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/protein-purification/tagged-protein-expression-purification-detection/c-terminus-pqe-vector-set/>
- Raina, M., y Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in Genetics*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2014.00171>



- Rashedi, R., Samieefar, N., Masoumi, N., Mohseni, S., y Rezaei, N. (2022). COVID-19 vaccines mix-and-match: The concept, the efficacy and the doubts. *Journal of Medical Virology*, 94(4), 1294–1299. <https://doi.org/10.1002/JMV.27463>
- Shinoda, H., Taguchi, Y., Nakagawa, R., Makino, A., Okazaki, S., Nakano, M., Muramoto, Y., Takahashi, C., Takahashi, I., Ando, J., Noda, T., Nureki, O., Nishimasu, H., y Watanabe, R. (2021). Amplification-free RNA detection with CRISPR–Cas13. *Communications Biology* 2021 4:1, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02001-8>
- SNAPGENE. (n.d.). PQE-60 Sequence and Map, Visto El 6 de Junio de 2022. Retrieved May 29, 2022, from [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=qiagen\\_vectorsyplasmid=pQE-60](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=qiagen_vectorsyplasmid=pQE-60)
- Tsien, R. Y. (2009). Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48(31), 5612–5626. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200901916>
- Vigouroux, A., y Bikard, D. (2020). CRISPR Tools To Control Gene Expression in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(2). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00077-19/ASSET/4720EDC8-9936-42FC-964E-06E6C098D620/ASSETS/GRAPHIC/MMBR.00077-19-F0004.JPEG>
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., y Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.03.045>
- Wang, R., Preamplume, G., Terns, M. P., Terns, R. M., y Li, H. (2011). Interaction of the Cas9 ribonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. *Structure (London, England : 1993)*, 19(2), 257. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2010.11.014>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., y Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020 579:7798, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, W., Choi, E.-J., Wang, B., Zhang, K., Adam, A., Huang, G., Tunkle, L., Huang, P., Goru, R., Imirowicz, I., Henry, L., Lee, I., Dong, J., Wang, T., y Bao, X. (2021). Changes of small non-coding RNAs by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *BioRxiv*, 409, 2021.12.16.472982. <https://doi.org/10.1101/2021.12.16.472982>
- Yan, W. X., Hunnewell, P., Alfonse, L. E., Carte, J. M., Keston-Smith, E., Sothiselvam, S., Garrity, A. J., Chong, S., Makarova, K. S., Koonin, E. v., Cheng, D. R., y Scott, D. A. (2019). Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 363(6422), 88–91. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV7271/SUPPL\\_FILE/PAPV2.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV7271/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF)
- Zhang, K., Zhang, Z., Kang, J., Chen, J., Liu, J., Gao, N., Fan, L., Zheng, P., Wang, Y., y Sun, J. (2020). CRISPR/Cas13d-Mediated Microbial RNA Knockdown. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 856. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00856/BIBTEX>
- Zhang, Z., Feige, J. N., Chang, A. B., Anderson, I. J., Brodianski, V. M., Vitreschak, A. G., Gelfand, M. S., y Saier, M. H. (2003). A transporter of Escherichia coli specific for L- and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily. *Archives of Microbiology*, 180(2), 88–100. <https://doi.org/10.1007/S00203-003-0561-4>
- Zhu, L., Liu, X., Pu, W., y Peng, Y. (2018). tRNA-derived small non-coding RNAs in human disease. *Cancer Letters*, 419, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.01.015>