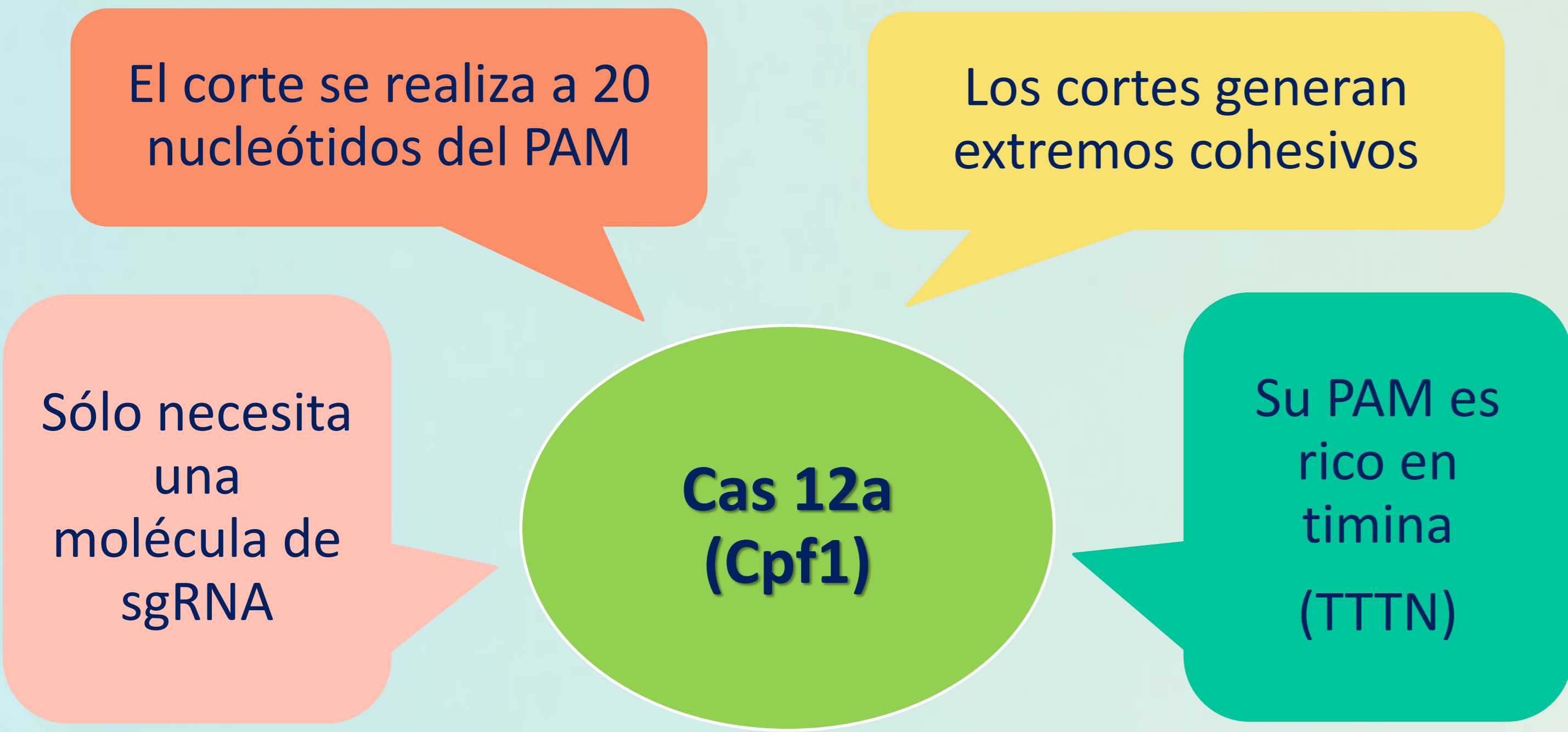


Edición por CRISPR/Cpf1 en la levadura de fisión para caracterizar la función regulatoria de los *loops* de RNA en el 3'UTR en la terminación de la transcripción.

Catalán Casas, Jesús María; Jiménez, Juan y Álvarez Tallada, Víctor
 Área de Genética, Laboratorio 122, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo
 Máster en Biotecnología Sanitaria

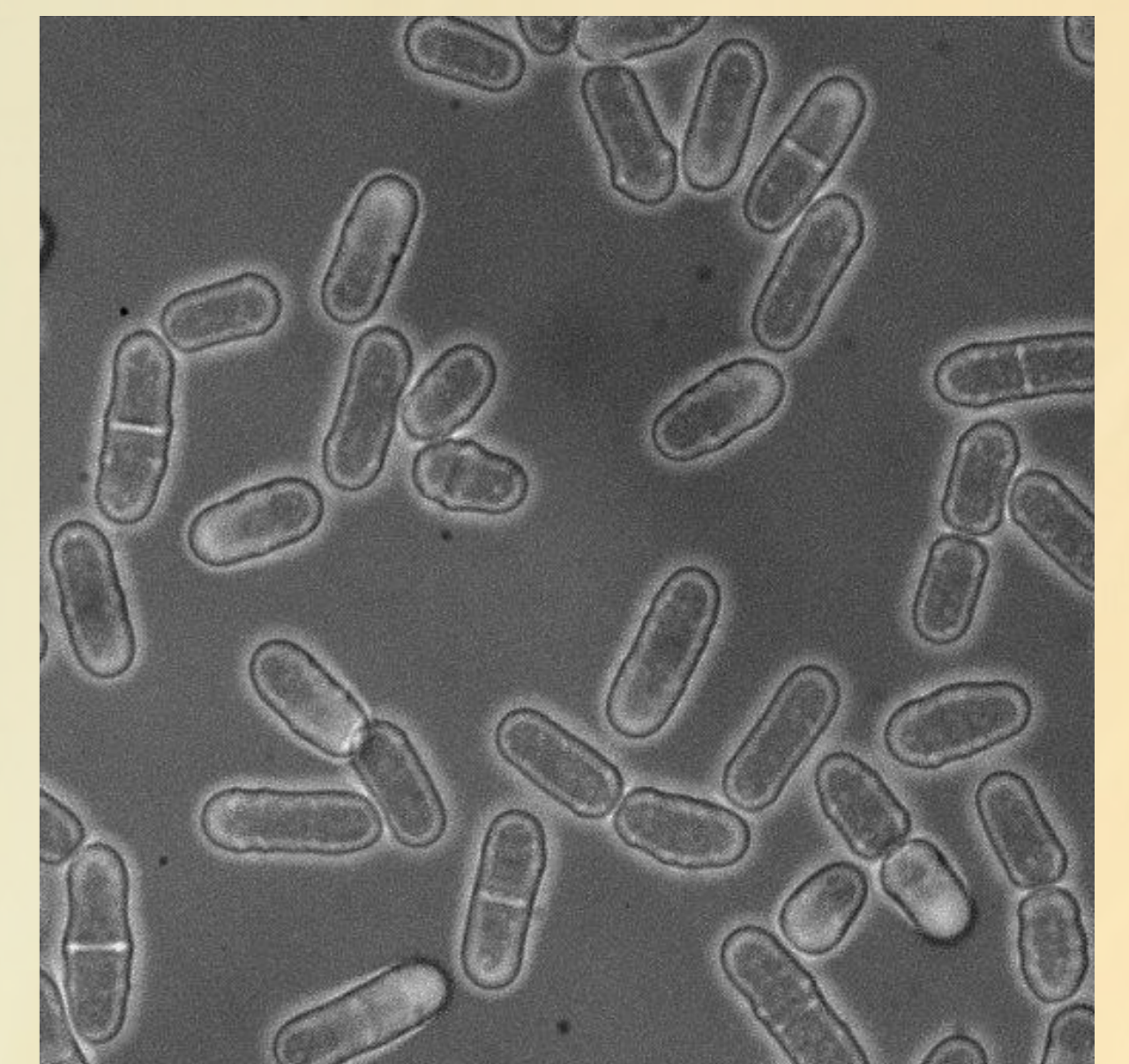
El gen *wos2* codifica la proteína p23, que actúa como co-chaperona en presencia de la proteína Hsp90. Su función es plegar proteínas durante un estrés por choque térmico. Este proceso es muy similar tanto en humanos como en la levadura de fisión *S.pombe*, nuestro organismo modelo en este proyecto. Anteriormente se descubrió que existen tres tamaños de ARNm dependiendo de la longitud de 3'UTR. Curiosamente, la abundancia de cada uno depende de la temperatura de crecimiento. Luego planteamos la hipótesis de que la estructura secundaria del ARN 3'UTR podría dictar el sitio de terminación dependiendo de la temperatura. Estamos tratando de demostrar esta suposición, así como desarrollar un "interruptor" sensible a la temperatura para controlar la expresión génica insertando el 3'UTR de *wos2* en el 5'UTR del gen *rpl42S59Q*. Este alelo es resistente a la cicloheximida mientras que la delección no lo es. De esta manera, podemos evaluar fácilmente la expresión génica. Para este fin, estamos utilizando la tecnología CRISPR/Cpf1, para diseñar la región genómica de interés. Estamos en el proceso de verificación de los candidatos.

Características singulares del sistema CRISPR/Cpf1^[3]



Schizosaccharomyces pombe como modelo^{[4],[5]}

La levadura de fisión *S.pombe* es un organismo modelo eucariota empleado para el estudio del crecimiento y el ciclo celular. Su genoma está completamente secuenciado. Posee 3 cromosomas, en los que distribuye 4979 genes. Es un modelo muy versátil para la ingeniería genética. En este modelo ya se ha implementado el sistema CRISPR/Cas9, por lo que queremos probar el funcionamiento de la nucleasa CRISPR/Cas 12^a/Cpf1 para aprovechar sus ventajas complementarias.



Fuente: Rafael Hoyos

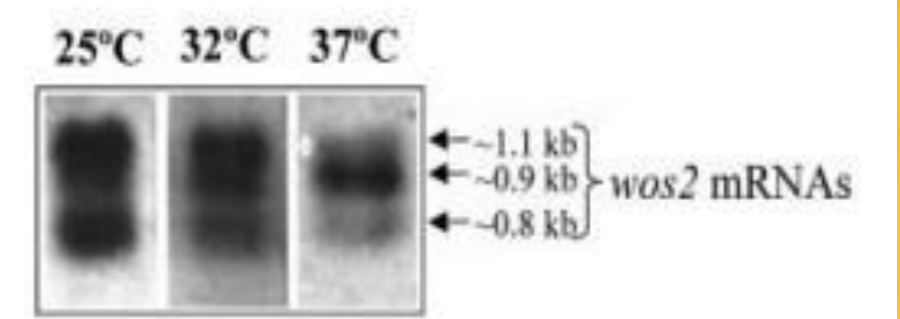
Wos2^{[1],[2]}

El gen *wos2* codifica para la proteína p23, que actúa como co-chaperona de Hsp90. Este gen está conservado en eucariotas y se activa cuando hay un estrés térmico, asistiendo al plegamiento de proteínas esenciales.

En *S.pombe*, su mRNA presenta 3 formas distintas que se diferencian en la longitud de sus extremos 3'UTR:

- *wos2* S (0,8 Kb)
- *wos2* M (0,9 Kb)
- *wos2* L (1,1 Kb)

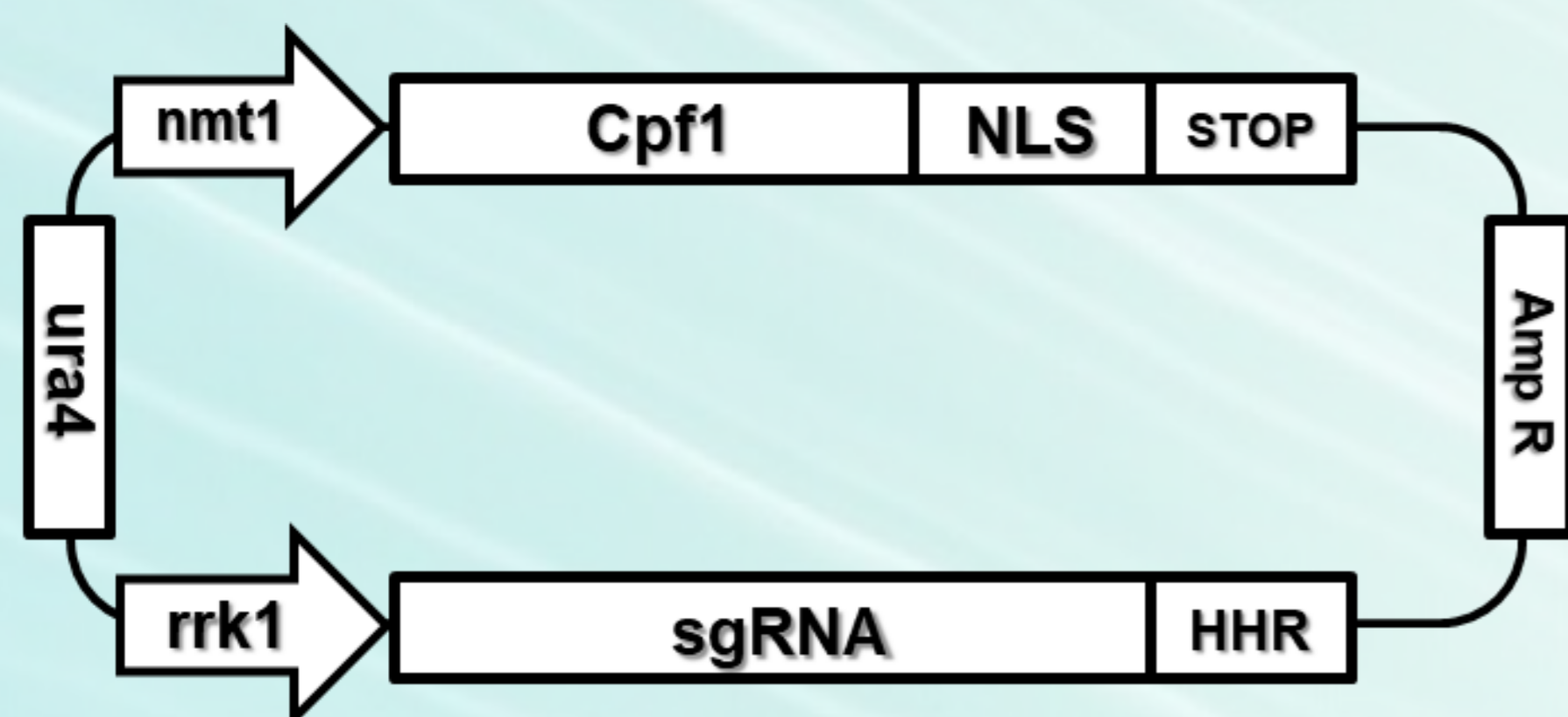
Se ha visto que estas estructuras no se regulan a nivel de promotor, sino que se debe a la estructura secundaria que adopta el mRNA.



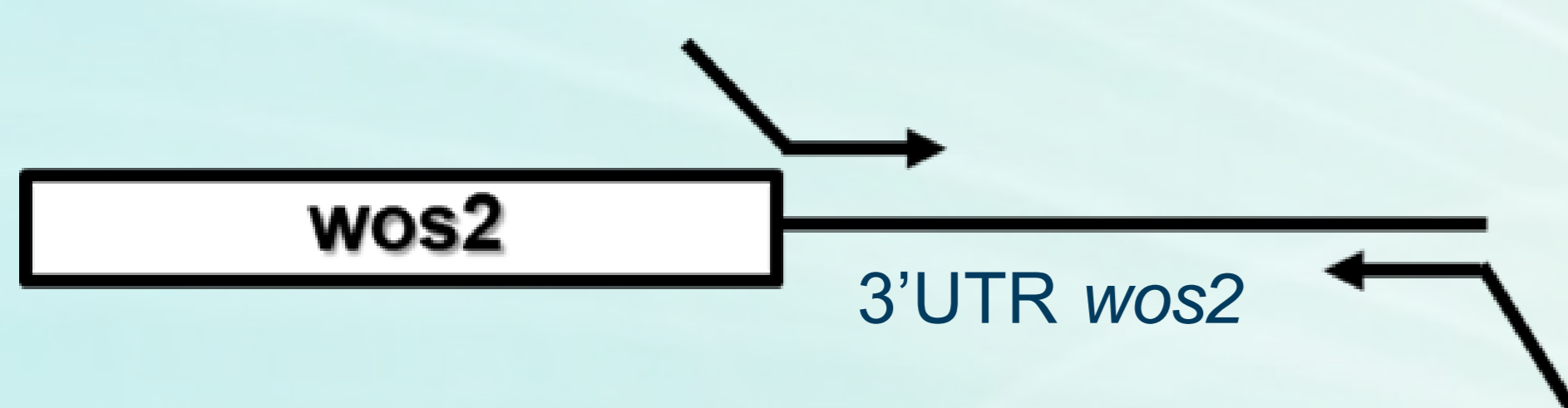
Adaptado de Muñoz et al. 2002: Poly(A) site choice during mRNA 3'-end formation in the *Schizosaccharomyces pombe* *wos2* gene.

Metodología

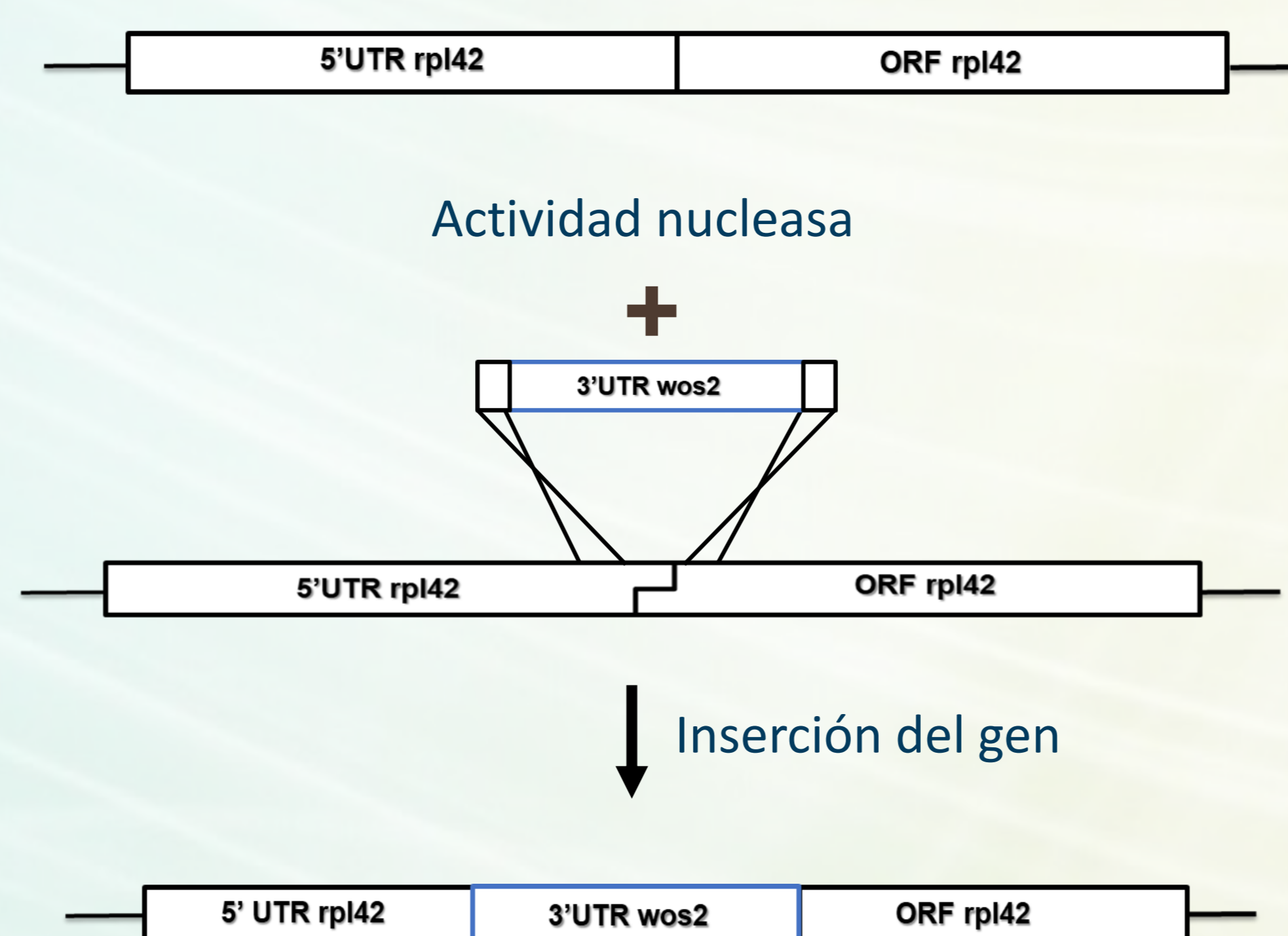
Cpf1



Fragmento HR



Esquema del proceso de inserción



A partir del PAM más cercano al sitio genómico de interés, diseñamos los oligos para generar, mediante PCR solapantes, el fragmento de inserción (3'UTR *wos2* flanqueado por regiones de homología del gen *rpl42* a ambos lados del sitio de corte). Para obtener el sgRNA se realiza una PCR usando oligos solapantes que incluyen la secuencia de los 20 nucleótidos de la secuencia guía y amplifican a su vez el plásmido que lo contiene para su expresión. Después de su recircularización a través de la transformación en *Escherichia coli*, procedemos a purificarlo y verificar la correcta clonación mediante secuenciación.

Resultados

Hemos generado con éxito, tanto el fragmento de inserción, como el plásmido de expresión simultánea de Cas12a y el sgRNA para dirigirla al sitio de corte planeado.

Conclusión

- En el tiempo que hemos tenido, hemos podido obtener las construcciones necesarias para la prueba de concepto.

Propuestas

- Una vez transformados, validarlo.
- Probar otro gen diana (*wee1*).

Referencias:

- [1] Muñoz, .M., Daga, .R., Garzón, .A. et al. Poly(A) site choice during mRNA 3'-end formation in the *Schizosaccharomyces pombe* *wos2* gene. *Mol Gen Genomics* 267, 792–796 (2002).
- [2] Muñoz, M. J., Bejarano, E. R., Daga, R. R., & Jiménez, J. (1999). The identification of *Wos2*, a p23 homologue that interacts with *Wee1* and *Cdc2* in the mitotic control of fission yeasts. *Genetics*, 153(4), 1561–1572.
- [3] Zetsche et al., Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System, *Cell* (2015)
- [4] Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, et al. (February 2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*". *Nature*. 415 (6874): 871–80. doi:10.1038/nature724. PMID 11859360
- [5] Leupold U. (1993) The origins of *Schizosaccharomyces pombe* genetics. In: Hall MN, Linder P. eds. *The Early Days of Yeast Genetics*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 125–128

Los autores agradecen a la Universidad Pablo de Olavide, al Centro Andaluz de Biología del Desarrollo y al Máster en Biotecnología Sanitaria por su contribución a la hora de realizar el presente póster.