



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN**

**TEMA: DISEÑO DE UN SISTEMA GENÉTICO PARA  
LA INACTIVACIÓN DE GENES EN BACTERIAS  
GRAM-NEGATIVAS MEDIANTE CRISPR Cas-9**

**FORMA DE TITULACIÓN: TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN CIENCIAS  
AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**LESLIE MARIA EUGENIA MARTINEZ SILVA**

**TUTOR EXTERNO: DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP**

**ASESOR EXTERNO: DR. MIGUEL ÁNGEL VENCES  
GUZMÁN**

**TUTOR INTERNO : DR. JULIO CÉSAR VEGA  
ARREGUÍN**

**LEÓN, GUANAJUATO**

**2019**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradezco a la ENES UNAM por el espacio, la oportunidad y las herramientas para cursar satisfactoriamente mi carrera. A la Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas, a sus directivos y profesores por haber formado parte de mi historia.

Agradezco también el apoyo recibido por parte del proyecto SEP-CONACyT Ciencias Básica número 237 713 denominado “Modulando los fenotipos y las características membranales de células bacterianas por ingeniería combinatoria de lípidos de ornitina”.

Quiero agradecer en especial al Dr. Christian Sohlenkamp por la confianza que pusiste siempre en mí, por la sencillez con la que te desenvuelves y por abrirme las puertas al Centro de Ciencias Genómicas. Tienes toda mi admiración.

Gracias Dr. Migue, por compartir tu conocimiento y por toda la paciencia que me tuviste, fue una gran experiencia ser tu pupila.

Gracias a toda la gente fabulosa con que me topé en el Laboratorio de Ecología Genómica, me enseñaron tanto.

A Nancy, Lore, Carlos y Rubén por haber sido tan gran serendipia y los mejores compañeros de laboratorio.

Gracias Harumi y Julio por siempre tener las palabras correctas, sin importar cuál sea la situación.

A mis compañeritos por ser tan ñoños y dar tanta guerra en clase.

Si alguien fue testigo de mi paso por la universidad, sin duda fue mi amiga Cecilia. Chula, te debo la vida entera. Mi roomie favorita y mi compañera de aventuras. Gracias por lidiar conmigo hasta en domingo y por ser la mejor cocinera de hot cakes. Sin ti, Cuernavaca no habría sido la fascinante historia que fue, los sismos a tu lado se viven más padre, vamos a volver algún día por gomitas. Y perdón por todos los golpes mientras dormíamos. De verdad, muchísimas gracias por haber compartido conmigo y por todo lo que viene. Eres una gran persona, la mejor consejera y socia.

A la familia preciosa que tengo y amo.

Mamá y papá, gracias por la vida y por la oportunidad de vivirla y disfrutarla. Su apoyo y amor fue pieza clave.

A Chris, Karol, Regi, Mateo y Sebas por el reto de inspirar una vida y por sus caritas de ilusión al verme volver. Que la vida nos permita compartir muchos logros juntos.

Y a mí, por hacer que ocurra.

# ÍNDICE

I.	Introducción.....	7
	1.1 Conceptos.....	8
	1.2 Justificación.....	8
	1.3 Hipótesis.....	9
II.	Objetivos.....	10
	2.1 Objetivo general.....	10
	2.2 Objetivos específicos.....	10
III.	Marco teórico.....	11
	3.1 Genética de bacterias.....	11
	3.2 CRISPR Cas-9.....	15
	3.3 Diseño de un sistema genético bacteriano para inactivar genes mediante CRISPR Cas-9.....	21
	3.4 Organismo y genes de interés.....	28
IV.	Metodología.....	31
	4.1 Materiales.....	31
	4.2 Métodos.....	33
V.	Resultados.....	39
	5.1 Plásmido CRISPR.....	39
	5.2 Plásmido para inactivar <i>hppD</i> de <i>B. cenocepacia</i> .....	42
	5.3 Inactivación del gen <i>hppD</i> de <i>B. cenocepacia</i> .....	44
	5.4 Recuperación del fenotipo original por parte de las mutantes putativas.....	46
	5.5 Comparación entre las secuencias de la cepa silvestre y la mutante putativa.....	48
	5.6 Inactivación del gen <i>olsB</i> de <i>B. cenocepacia</i> .....	51
VI.	Conclusiones y discusión.....	53
VII.	Bibliografía.....	58
VIII.	Anexos.....	64

<b>Anexo 1.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>68</b>

## Lista de abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNcr	ARN CRISPR
ARNm	ARN mensajero
ARNtracr	ARN CRISPR trans activado
Cas	asociadas a CRISPR
CRISPR	Clustered Randomly Interspaced Short Palindromic Repeats (inglés)
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Interespaciadas Agrupadas Aleatoriamente (español)
H#	Hipótesis número #
hpdD	hidroxifenilpiruvato decarboxilasa
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LB	Luria Broth
nt	nucleótido(s)
OLs	lípidos de ornitina
pb	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction (inglés)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (español)
sgRNA	ARN guía corto
T0	tiempo 0, 0 horas post-inducción
T1	tiempo 1, 1 hora post-inducción
T2	tiempo 2, 4 horas post-inducción
T3	tiempo 3, 16 horas post-inducción
WT	cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# I. INTRODUCCIÓN

En la última década se desarrolló un nuevo sistema de edición de genes llamado CRISPR Cas-9, el cual ha sido adaptado a gran número de procesos para optimizar protocolos ya establecidos. Tiempo atrás era difícil concebir la idea de editar el genoma de una célula viva. La edición de genes ha sido una temática con gran auge e interés por los laboratorios, en casos particulares, como la microbiología el interés es aún mayor debido a que agilizar este proceso significa agilizar el proyecto entero (Hsu, et al., 2014).

La idea principal es hacer uso de las nuevas metodologías de trabajo como CRISPR Cas-9 para optimizar el proceso de generación de mutantes bacterianas por inactivación de un gen.

El interés por abordar esta técnica surge a partir de la práctica que se observa en algunos laboratorios, donde se utilizan protocolos tradicionales para la creación de mutantes. Estos hacen uso de métodos biológicos como transposones, métodos químicos y físicos azarosos, entre los cuales destaca el hecho de que estas no son mutaciones generadas en un sitio específico del genoma de la célula.

Se plantea como objetivo principal el diseño y construcción de un plásmido de amplio rango de hospedero que tenga la facultad de inactivar genes basado en la nucleasa Cas-9, para después probarlo en distintas bacterias Gram-negativas.

La metodología propuesta en el presente trabajo consiste en introducir la nucleasa Cas-9 por medio de un plásmido a células de bacterias de interés para inactivar un gen a la vez. Se propone utilizar el plásmido como primera prueba para la generación de mutantes en la bacteria *Burkholderia cenocepacia*, ya que este organismo produce un característico halo café cuando es crecido en medio sólido lo cual facilita su detección. Con base en esta característica, se propone montar un experimento de fenotipo asociado donde el resultado sea visible y que indique la expresión o inactivación del gen. Posteriormente, se busca transpolar el experimento a otras proteobacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium tropici* y a genes con actividades y fenotipos diferentes a *hppD*, el gen involucrado en la síntesis de melanina en *B. cenocepacia*.



## 1.1 CONCEPTOS

Para fines de facilitar la lectura y comprensión, se denomina como:

Plásmido base: plásmido pBBR1MCS-3, el vector que se usó como esqueleto para generar la construcción.

Plásmido CRISPR: plásmido pBBR1MCS-3-CS02, el vector resultante de la unión del plásmido base con los fragmentos  $P_{rhaB}$ , Cas-9, sgRNA y *SacB*.

Plásmido para inactivar *hppD*: plásmido pBBR1MCS-3-CS03, el vector construido [plásmido CRISPR] y adaptado con los protoespaciadores del gen *hppD* de *B. cenocepacia* J2315.

Plásmido para inactivar *olsB*: plásmido pBBR1MCS-3-CS04, el vector construido [plásmido CRISPR] y adaptado con los protoespaciadores del gen *olsB* de *B. cenocepacia* J2315.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Ecología Genómica se han identificado varios genes que codifican para enzimas involucrados en la síntesis de lípidos de ornitina (Vences-Guzmán et al., 2015). En la revisión realizada por Sohlenkamp y Geiger (2016), se recopila una serie de clasificaciones de lípidos de membrana, estructuras y genes propuestos para modular las vías metabólicas, y se plantea la idea de que aún quedan más de estos genes por identificar en proteobacterias. En los métodos reportados por Vences-Guzmán y colaboradores (2011, 2013) destaca la creación de mutantes dirigidas por amplificaciones de PCR y métodos químicos azarosos que en manos de principiantes pueden resultar poco eficientes y que llegan a tomar hasta 6 meses para su construcción. Así como ocurre dentro de este grupo, muchos otros laboratorios generan mutantes bacterianas para sus experimentos concentrando gran parte del tiempo del proyecto en crear una sola mutante, sin ser éste el objetivo principal de su trabajo. Es por esto que se propone diseñar un sistema de inactivación

de genes que optimice el proceso mediante CRISPR Cas-9 para contribuir a reducir el tiempo de generación de mutantes en bacterias.

### **1.3 HIPÓTESIS**

Un plásmido basado en el sistema CRISPR Cas-9 puede utilizarse para la generación de mutantes en bacterias Gram negativas.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un plásmido de amplio rango de hospederos que tenga la facultad para generar mutantes por inactivación del gen basado en la nucleasa Cas-9.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✦ Realizar la construcción del plásmido pBBR1MCS-3-CS02 (plásmido CRISPR).
- ✦ Adaptar la construcción del plásmido CRISPR para inactivar diferentes genes en distintos géneros bacterianos.
- ✦ Generar cepas mutantes de *Burkholderia cenocepacia* J2315 en *hppD* y *olsB*.

## III. MARCO TEÓRICO

### 3.1 GENÉTICA DE BACTERIAS

#### 3.1.1 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que aparecieron hace 3 mil 500 millones de años (Doolittle et al. 1996). Pueden diferenciarse, por ejemplo, por su forma, tamaño, estructura, por sus actividades químicas, por los nutrientes que procesan, por la forma de energía que consumen, por las condiciones físicas en que pueden crecer o por sus reacciones con ciertos colorantes. Para el desarrollo de este texto se usa la clasificación según la reacción a la tinción Gram. A las bacterias que reaccionan fijando este colorante se les denomina Gram positivas, cuentan con una membrana citoplasmática y una pared celular gruesa de mureina (Reichmann y Gründling, 2011), mientras que las bacterias Gram negativas como las proteobacterias cuentan con dos capas membranales distintas, llamadas interna y externa, y una delgada pared celular de mureina entre ellas (Raetz y Whitfield 2002). Un ejemplo clásico es la enterobacteria *Escherichia coli*, la cual forma parte de la flora intestinal de los humanos desde las pocas horas del nacimiento (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Muchas bacterias cuentan con una molécula larga de ADN que forma un círculo cerrado, pero además algunas bacterias pueden tener uno o más plásmidos independientes. Frecuentemente tienen la capacidad de tomar material genético externo e incorporarlo a su propio genoma como mecanismo de adaptación al entorno (Wang y Taylor, 1990), y esta habilidad es ampliamente utilizada en la tecnología de ADN recombinante (García et al., 2013).

La diversidad de estos microorganismos pasa por bacterias intracelulares benéficas, exógenas e incluso patógenos oportunistas de plantas, animales y humanos. Son seres tan complejos y variados que tienen su propia rama de estudio, la microbiología. Día con día se generan y optimizan herramientas que ayudan con el proceso de estudio, se han desarrollado métodos *in vitro* para rastrear cinética y metabolismo, y más recientemente se ha trabajado sobre la edición genética para poder puntualizar en un aspecto de interés a través de mutantes (Vences-Guzmán et al., 2011).

### 3.1.2 Mutaciones

Crear modificaciones dirigidas en la secuencia de ADN, en un sitio preciso del genoma es llamado edición genética. Una mutación es un cambio estable y hereditario en la secuencia de ADN. Las mutaciones espontáneas suceden con baja frecuencia sin una causa evidente y principalmente se trata de errores en la replicación y/o reparación o son causadas por cambios químicos (Painter, 1975).

La mutagénesis es un método que puede ser aprovechado de distintas maneras. Las mutaciones pueden ser creadas para cualquiera de dos propósitos principales: (I) para inactivar un gen, de modo que el gen ya no pueda dar lugar a un producto o una función, o (II) para modificar un gen con el fin de alterar su expresión. La inactivación de un gen determinado puede ser utilizada, por ejemplo, para confirmar la función biológica del gen: las células con el gen inactivo se comparan con aquellas que poseen el gen que conserva su funcionalidad (Vences-Guzmán, 2011).

#### 3.1.2.1 Mutaciones azarosas

En una población bacteriana las mutaciones suceden con baja frecuencia al azar, afectando a diferentes genes en individuos distintos. Para aumentar la frecuencia de estas mutaciones, se pueden usar agentes mutágenos. Estos pueden ser agentes físicos como la radiación ultravioleta (Witkin, 1976) y los rayos X (Tatum, 1945), químicos como agentes alquilantes, bisulfito, hidroxilamina y ácido nitroso (Tatum y Lederberg, 1947) y agentes biológicos como los transposones (Wright, 1990). Una manera efectiva de introducir mutaciones al azar en un gen específico consiste en insertar el gen clonado en un vector e introducirlo en células de una cepa susceptible a mutaciones, es decir, una cepa con reparación de ADN defectuosa; debido a la pérdida de las funciones normales de reparación durante el crecimiento y la multiplicación de dichas células. Así se acumulan las mutaciones espontáneas en el genoma bacteriano, y de esta manera se pueden introducir mutaciones sin el uso de mutágenos (Kanner, 1970). Sin embargo, cuando se tiene un objetivo específico, estas técnicas no son funcionales al no tener la certeza del sitio donde se ha de

insertar la mutación y al tener que evaluar cientos de muestras azarosas, para ello es necesario recurrir a la inducción de mutaciones específicas.

### 3.1.2.2 Mutaciones específicas

Las mutaciones específicas pueden ser utilizadas para estudiar la expresión y función de uno o varios genes y para modificar los productos de diferentes formas mediante el cambio de un(os) nucleótido(s) particular(es) (Vences-Guzmán, 2015). La mutagénesis sitio-específica, puede ser dirigida por oligonucleótidos complementarios a las cadenas que se desean modificar, donde una polimerasa extiende las secuencias que incluyen la mutación de interés (Strizhkov, et al., 2000). Para evitar el riesgo de que no ocurra una recombinación entre la célula y los oligonucleótidos, se ha diseñado la mutagénesis por transposones donde se inserta un transposón sin promotor de la enzima fosfatasa alcalina en diferentes sitios y se evalúa en un sustrato cromogénico la presencia o ausencia de color en colonias aisladas que indican que el transposón ha caído en un marco de lectura o que ha resultado en la inactivación del gen (Vences-Guzmán, 2011).

Editar un gen en específico para determinar su efecto en el fenotipo del organismo es una herramienta indispensable en la biología molecular (Ledford, 2016). La generación de mutantes dirigidas es un proceso que en la mayor parte de los casos requiere de 2 o más meses de trabajo para estandarizar procesos, crecer cultivos e insertar las modificaciones hasta conseguir mutantes exitosas, lo cual puede causar retrasos en el desarrollo de proyectos.

Existen 3 importantes herramientas de ingeniería genética para hacer edición sobre genes.

1. Nucleasas tipo activadores de transcripción (TALENs, Transcription activator like effector nucleases), estas son un tipo de enzimas de restricción que reconocen secuencias muy específicas de ADN a las cuales se une y realiza un corte de doble cadena. Existen 4 TALENs diferentes, cada uno con la habilidad de unirse a un nucleótido distinto. Cuando un TALEN se une a un nucleótido, este se une también a una cadena de TALENs que culmina con la enzima *FOKI* al extremo 3' (Figura 1). Una vez que ambas partes de la proteína se

unen, la enzima se activa y realiza un corte sobre ambas cadenas de ADN (Osakabe y Osakabe, 2014). Es un método de gran especificidad al unirse a nucleótidos individuales que a la vez forman una cadena más compleja, sin embargo tiene la restricción de eliminar pocos nucleótidos de una secuencia sin poder eliminar regiones o genes completos.

2. Nucleasas de dedos de Zinc. (ZNF, zinc finger nucleases). Son estructuras proteicas capaces de reconocer un codón específico. Están compuestos por dos partes:

- (I) Dedos de zinc, pueden manipularse para dirigir su unión a una secuencia particular.
- (II) Nucleasa *FokI*. Es una nucleasa de *Flavobacterium okeanoikoites* que fue modificada para generar un corte de secuencia independiente.

Los dominios de los dedos de zinc se fusionan con la nucleasa *FokI* y se unen a su vez a 9 nucleótidos, 18 en total y entre ellos el sitio target. Generan cortes de doble cadena y separan el ADN (Figura 1).

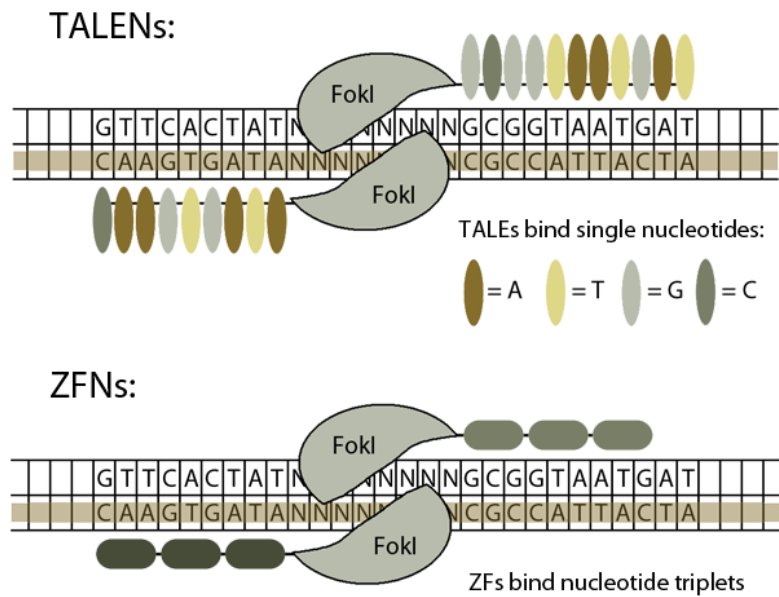


Figura 1 Herramientas de edición génica

Nucleasas tipo activadores de transcripción y Nucleasas de dedos de Zinc.

Recuperada de: VGP. (2014) *Xenbase* <https://www.xenbase.org/other/static/CRISPR.jsp>

3. Repeticiones cortas palindrómicas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR Cas-9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Está conformada por un conjunto de secuencias palindrómicas, separadas entre ellas por otras secuencias tomadas de ADN exógeno (Figura 2). Estas secuencias foráneas son adquiridas después de la invasión de un patógeno a manera de memoria para que durante un segundo ataque, la célula identifique que este material no es propio y pueda degradarlo. Las proteínas Cas reciben ese nombre por estar asociadas a CRISPR, y son necesarias para formar un complejo entre la secuencia foránea y la enzima para degradar la cadena de ADN exógeno. La enzima *Cas9* realiza un corte de doble cadena sobre la secuencia target (Thurtle y Lo, 2018).

## 3.2 CRISPR Cas-9

### 3.2.1 CRISPR en la naturaleza

CRISPR, siglas para *Clustered Randomly Interspaced Short Palindromic Repeats*, (en español, Repeticiones Palindrómicas Cortas Regularmente Espaciadas y Agrupadas) es un sistema que fue descrito como un mecanismo de defensa presente en algunas bacterias y arqueas (Mojica et al., 2000) contra elementos genéticos foráneos, principalmente contra bacteriófagos.

La primera vez que se habló de estas peculiares secuencias fue en 1987, cuando se describieron en *Escherichia coli* unas secuencias repetidas dentro del genoma (Ishino et al., 1987). Años más tarde, Dr. Francisco J. M. Mojica, de la Universidad de Alicante, España describió en sus primeros hallazgos la existencia de elementos repetidos en el genoma de procariotes, y que estos elementos eran pequeños y se encontraban agrupados (Mojica et al., 2000), el Dr. Mojica, junto con su equipo se dedicaron a buscar dentro de todos los genomas de bacterias reportados, coincidencias con estas secuencias repetidas que recibieron en ese momento el nombre de Short Regularly Spaced Repeats (SRSR por sus siglas en inglés) a lo que encontraron que estos SRSRs están ampliamente distribuidos en arqueas, bacterias termofílicas, cianobacterias y proteobacterias (Mojica et al., 2000).



El término CRISPR fue acuñado en 2002 cuando un grupo de investigadores en Holanda solicitaron a Mojica modificar el término SRSR y es ahí donde se decide tomar el acrónimo CRISPR para hacer referencia a las repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas y agrupadas por Jansen y sus colaboradores (2002), quienes describieron la familia de genes asociada a CRISPR (Cas, CRISPR associated). Para el año 2005, Mojica y sus colaboradores identifican el origen de los espaciadores que hay entre secuencias, los espaciadores provienen de virus que infectan a las bacterias (Mojica et al., 2005). CRISPR Cas es un tipo de sistema inmune que le permite a bacterias infectadas degradar cadenas de ADN exógeno al cortarlo en fragmentos pequeños y después incorporarlo a su propio material genético a manera de memoria para que así, durante la siguiente infección, el ADN foráneo sea reconocido y se genere una respuesta de defensa contra el nuevo ataque (Datsenko et al., 2012).

Se han identificado tres tipos de sistemas según las endonucleasas involucradas y el procesamiento del ARN Crispr (ARNCr). El mecanismo está dividido en tres fases:

- (I) Adquisición del espaciador o adaptación (Figura 2). Esta fase ocurre después de que un bacteriófago infecta por primera vez e inyecta su genoma; un pequeño tramo de este genoma de entre 32-38 pb es insertado entre las secuencias palindrómicas de 28-37 pb del genoma de la bacteria y los fragmentos insertados reciben el nombre de ADN espaciador. Durante esta primera fase actúan las enzimas Cas-1 y Cas-2 formando un dímero conformado por nucleasas e integrasas que hacen la función de cortar e integrar el ADN espaciador en el genoma bacteriano. La enzima Cas-2 contiene endorribonucleasas que actúan en los casos donde el bacteriófago es de ARN (Makarova et al., 2011).
- (II) Expresión o procesamiento del ARNCr (Figura 2). Existen 3 tipos de procesamiento de ARNCr. En el tipo 1 actúan las enzimas Cas-6e y Cas-6f que dividen al transcrito del locus CRISPR en secciones de espaciador + repetición CRISPR en forma de loop. Durante el tipo 2 se crea un ARNtracr (ARN CRISPR trans activado) que se une a la secuencia CRISPR por acción de las enzimas Cas-9 y RNasa III. Mientras que en el tipo 3, el homólogo a Cas-6 corta directamente el ARN mensajero (ARNm) (Makarova et al., 2011).

(III) Interferencia (Figura 2). En esta fase, los ARN<sub>Cr</sub> se integran con la proteína Cas para formar al complejo de interferencia, el sistema vuelve a ser distinto para cada tipo. Para los tipos 1 y 2 es necesario tener unas secuencias pequeñas PAM (Protospacer Adjacent Motif (inglés); Motivo Adyacente al Protoespaciador (español)) cerca de la región del ADN espaciador, esto para aumentar la especificidad del reconocimiento por parte de la enzima Cas, mientras que en el tipo 3 este motivo tiene menor importancia. Una vez que el complejo de interferencia se une, la nueva configuración le permite realizar cortes en las secuencias homólogas que encuentre como parte del ARNm viral. Para el tipo 1, cuando ocurre la unión del ARNm con el ARN<sub>Cr</sub> se activa una cascada de enzimas Cas, la enzima Cas-3 corta en pequeños fragmentos al genoma viral y el bacteriófago es incapaz de volver a infectar. En el tipo 2, la protagonista es la enzima Cas-9 que realiza un corte de doble cadena. En el tipo 3 se reconoce el genoma viral y se corta para hacerle perder su función (Makarova et al., 2011).

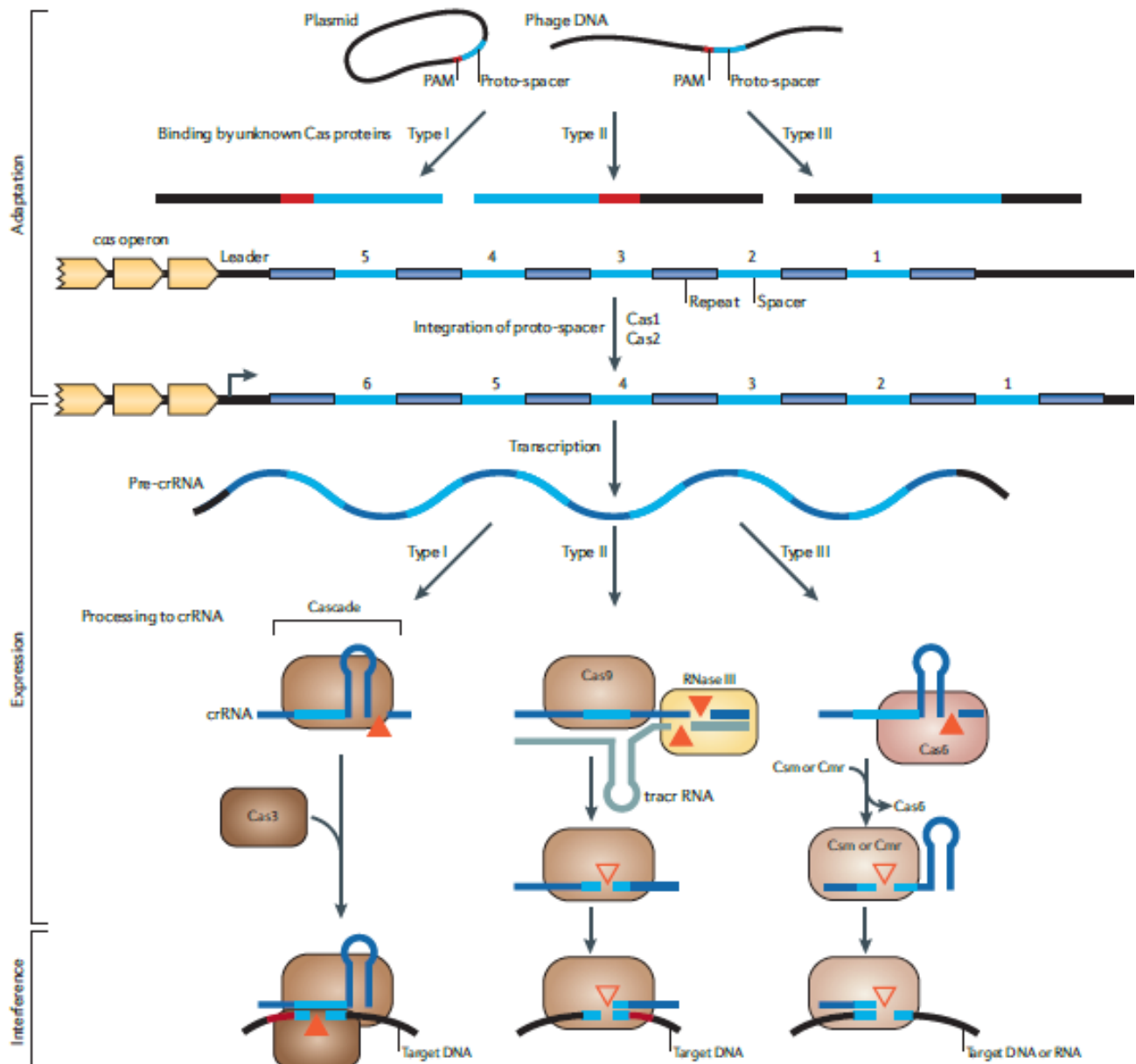


Figura 2 Funcionamiento de CRISPR Cas

Existen 3 tipos de CRISPR descritos, cada uno se diferencia por los elementos que hacen uso y su procesamiento. Como elementos básicos se encuentra el genoma de una célula y el de un fago; compuestos a su vez por una región conocida como protoespaciador y una secuencia PAM cercana.

La primera fase llamada Adaptación es donde la célula toma el protoespaciador del fago y lo añade a su propio genoma dentro de lo que es conocido como locus CRISPR, formado por una serie de secuencias cortas palindrómicas y repetidas.

La segunda fase llamada Expresión es donde la célula expresa esta región del genoma.

La tercera fase llamada Interferencia es donde el ARN que resultó de la expresión anterior se une con una nucleasa (esta puede ser 3, 9 o 6, según el tipo de proceso) para formar el complejo Cas que va a actuar para inactivar el gen homólogo a la sección del protoespaciador del fago.

Obtenida de: Makarova, et al., 2011; p. 2.

### 3.2.2 Sistema de edición de genes CRISPR Cas-9

CRISPR Cas-9 se ha desarrollado como una herramienta que permite editar el genoma de cualquier célula (Mahfouz y Stewart, 2014). Funciona como una tijera molecular, que al entrar al núcleo de la célula localiza una región específica y corta la cadena de ADN. La edición genómica *in vitro* fue posible gracias al trabajo de las científicas Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier (Jinek et al., 2012), quienes en 2012 descubrieron que es posible dirigir la proteína Cas-9 a sitios específicos del genoma. Diseñaron un método en el que la nucleasa Cas-9 se ancla a una región de interés en el genoma para realizar un corte de doble cadena resultando en mutaciones por errores en la reparación o en la incorporación de ADN exógeno. Desde entonces, CRISPR Cas-9 ha sido utilizada para modificar el genoma de diferentes organismos animales (Hwang et al., 2013) y vegetales (Belhaj et al., 2013). El mecanismo CRISPR Cas-9 también ha sido adaptado a un sistema de ingeniería genética que consigue intercambiar un gen por otro (Ran et al., 2013).

Este proceso tiene la ventaja de poder llevarse a cabo en células *in vivo*. Como se mencionó antes, existen tres tipos de CRISPR Cas-9, de ellos únicamente el tipo 2 es utilizado para la edición génica. Para este tipo 2, es sintetizada una molécula conocida como ARN<sub>Cr</sub> conformada por el ARN<sub>tracr</sub> y el ARN<sub>m</sub> del protoespaciador. Cuando el propósito es reemplazar un gen por otro se requiere además de la presencia de una secuencia de ADN de reparación, esto se refiere a la secuencia de ADN que se desea insertar en el sitio donde el gen original será suplantado (Ran et al., 2013).

Una vez que se cuenta con los componentes necesarios: ARN<sub>Cr</sub>, ARN<sub>tracr</sub>, Cas-9 y se conoce la secuencia de ADN a editar, es necesario introducir el sistema a las células. Para ello se ha diseñado un plásmido vector que carga las secuencias que transcriben a cada componente, llevando las copias de ARN<sub>Cr</sub> (Thurtle y Lo, 2018). El plásmido es introducido a las células por electroporación o por medio de vectores virales. El plásmido entra y transcribe a cada uno de sus componentes, se forma el complejo Cas-9 y el ARN<sub>Cr</sub> reconoce la secuencia complementaria del gen de interés gracias a un motivo adyacente al protoespaciador (PAM), el cual suele ser de tres nucleótidos, comúnmente identificado como NGG donde N es cualquier nucleótido (Thurtle y Lo, 2018).

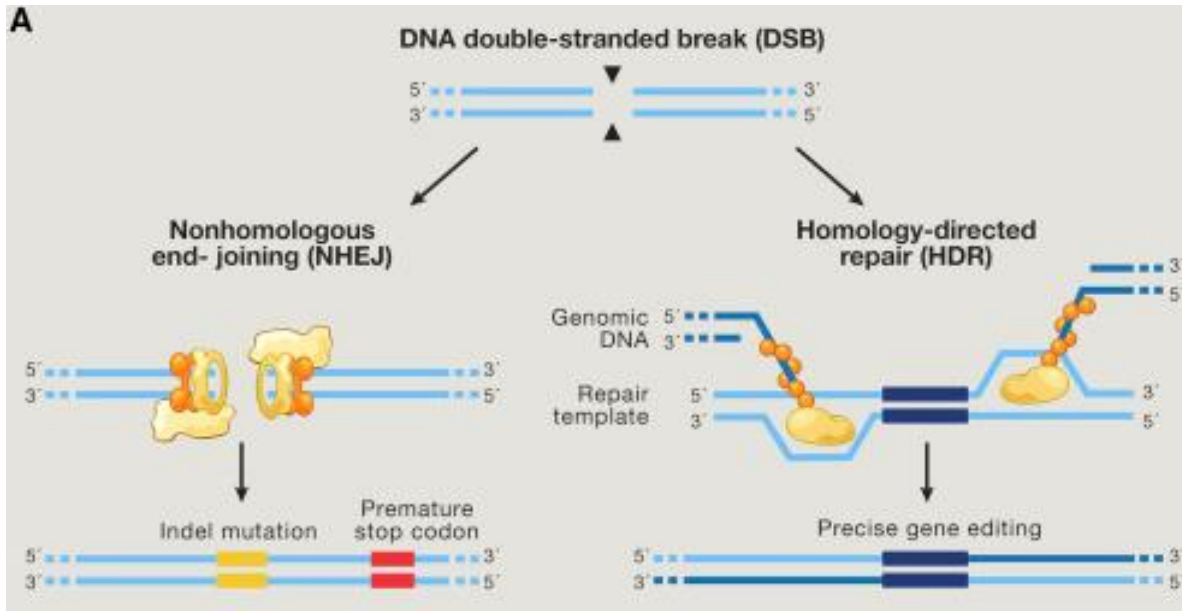


Figura 3 Tipos de reparación para cortes de doble cadena

Los cortes de doble cadena de ADN (DSB) se reparan por uniones no homólogas (NHEJ) o por reparación de homología dirigida (HDR). NHEJ es propensa a errores.

Cuando se desea un indel o sustitución de gen, estos se introducen por hebras complementarias que reparan por homología en sus extremos y se unen al sitio del corte, lo que finalmente conduce a mutaciones de cambio de marco y eliminación de genes.

Recuperada de: Hsu y colaboradores (2014, p.3)

El ARNcr se une a la región reconocida y la nucleasa Cas-9 activa sus dominios para realizar un corte de doble cadena, el cual resulta en un corte tipo liso, en este caso el corte se encuentra en ambas cadenas en el mismo sitio y por consiguiente será una interferencia que la maquinaria de la célula pueda arreglar por medio de una reparación homóloga dirigida, sin embargo ese no es el objetivo. Para evitar que esta corrección ocurra, se induce a que la nucleasa haga un corte de tipo cohesivo a través de cortes de cadena sencilla en sitios distintos de ambas secuencias, lo que induce, en este caso a una reparación no homóloga donde el gen original no se pueda recuperar. En su lugar se une un templado de ADN reparador (Figura 3). El templado puede ser la secuencia de un nuevo gen que se desea sustituya al gen original. La unión la realiza la enzima ligasa y la ADN polimerasa. El templado se inserta en el sitio y forma parte del genoma (Hsu et al., 2014).

### **3.3 DISEÑO DE UN SISTEMA GENÉTICO BACTERIANO PARA INACTIVAR GENES MEDIANTE CRISPR Cas-9**

#### **3.3.1 Elementos que componen al plásmido CRISPR (pBBR1MCS-3-CS02)**

El sistema genético propuesto consiste en un plásmido que contiene los elementos necesarios para recrear el sistema CRISPR Cas-9 dentro de una célula bacteriana. Para lograr conjuntar todos estos elementos en un mismo sitio, se utilizó un plásmido ya existente, el plásmido pBBR1MCS-3 de Kovach (1995) (Figura 4).

##### **3.3.1.1 Plásmido pBBR1MCS-3**

Kovach y colaboradores (1994) construyeron el vector de clonación pBBR1MCS, el cual es útil en un amplio rango de hospederos, tiene un tamaño de ~4.7 kb, confiere resistencia a cloranfenicol y contiene un sitio de clonación múltiple ubicado en el gen *lacZ* $\alpha$  con 16 sitios diferentes. A un año de la publicación de este vector, en 1995, se presentaron cuatro nuevas adaptaciones, incrementando la utilidad del plásmido en bacterias Gram negativas resistentes a cloranfenicol (Kovach et al., 1995). El plásmido pBBR1MCS-3, (Figura 3) es el tercero de estas nuevas adaptaciones y su característica esencial es la resistencia a tetraciclina. Tiene un tamaño aproximado de 5.3 kb, conserva el gen *lacZ* $\alpha$  con una extensión del sitio de clonación múltiple, permite la selección directa de moléculas plasmídicas recombinantes en *Escherichia coli*, entre otras mejoras que trajo consigo la adaptación (Kovach, 1995). Dentro de GenBank puede consultarse la secuencia nucleotídica del plásmido con el número de accesoión U25059.

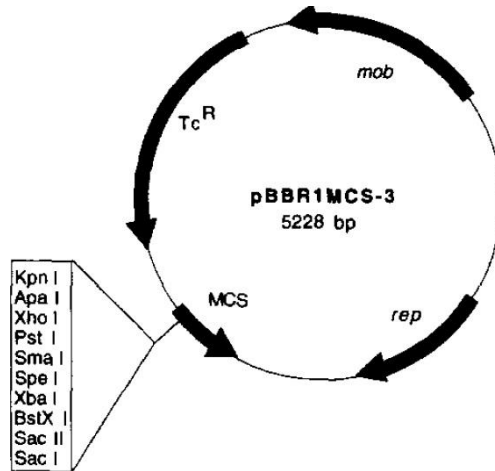


Figura 4 Plásmido pBBR1MCS-3

El plásmido pBBR1MCS-3 tiene un tamaño de 5228 pb, contiene 4 sitios: resistencia a tetraciclina, un sitio múltiple de clonación, un origen de replicación y un sitio mob.

Obtenida de: Kovach y colaboradores (1995, p. 2)

### 3.3.1.2 Promotor P<sub>rhaB</sub>

El promotor P<sub>rhaB</sub> inducible por ramnosa es capaz de inducir la expresión a un alto nivel de proteínas recombinantes cuando se encuentra en presencia de L-ramnosa. Este promotor es aislado de *E. coli* y responde a bajas concentraciones de ramnosa. En Cardona y Valvano (2005) se puede apreciar cómo el sistema responde eficazmente cuando se usó en un rango de concentración de 0.002% a 0.2%, por el contrario, requiere una concentración de 0.2% de glucosa para ser reprimido. Cardona y Valvano (2005) construyeron un vector de expresión que contiene al promotor P<sub>rhaB</sub> de *E. coli* en *B. cenocepacia* para expresar la proteína mejorada verde fluorescente (eGFP) donde se comprobó que el sistema se puede usar en *B. cenocepacia*.

La secuencia del promotor puede consultarse en GenBank con el número de accesoión DM016233.1

### 3.3.1.3 Sp Cas-9

La proteína Cas-9 que se utilizó en este trabajo para la construcción del plásmido CRISPR es obtenida de la bacteria *Streptococcus pyogenes*. La Sp Cas9 es una enzima nucleasa guiada por un

ARN guía sencillo (sgRNA), y reconoce el sitio 5'-NGG-3' (Thurtle y Lo, 2018), sitio mejor conocido como Motivo Adyacente al Protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés). La secuencia del sgRNA y el PAM sirven como señalamiento para distinguir entre el ADN del hospedero y el del agente infeccioso (Mali, et al., 2013).

Hsu y colaboradores (2013) han probado la especificidad de la nucleasa *Sp Cas9* en células humanas, y encontraron que *Sp Cas-9* tolera pequeños sitios sin coincidencia entre el ARN guía y el ADN de interés, dependiendo de la posición y frecuencia de estos. Además la interacción entre el ARN guía y ADN no se ve afectado por metilaciones en el ADN. La proteína está compuesta por aproximadamente 1368 amino ácidos, el equivalente a ~160 kDa o ~4.2 kb (Ferretti, 2001). La secuencia de la proteína puede consultarse en GenBank con el número de accesoión RJG49139.1.

#### 3.3.1.4 *sacB*

El plásmido contiene un marcador de contraselección, el gen *sacB*, que proviene de *Bacillus subtilis*. El gen *sacB* codifica para la exoenzima levansacarosa que cuando está en *B. subtilis* no causa ningún daño, sin embargo, cuando este se transforma en una bacteria Gram negativa, confiere sensibilidad a sacarosa y la lleva a la muerte cuando la transformante se encuentra en un medio de crecimiento suplementado con sacarosa (Gay et al., 1983). La toxicidad de la levansacarosa se debe a que ésta sintetiza polímeros de fructosa de alto peso molecular conocidos como levanes, los cuales se acumulan en el periplasma de las bacterias gram negativas (Steinmetz, 1983). La expresión de *sacB* en *E. coli* cuando se crece en sacarosa desemboca en la lisis de la célula (Briones, 2008).

La secuencia del gen puede consultarse en GenBank con el número de accesoión CCD10844.1

### 3.3.2 Técnicas de ensamble del plásmido CRISPR

#### 3.3.2.1 Gibson Assembly

La proteína *Sp Cas-9*, el sgRNA, el promotor  $P_{rhaB}$  y el gen *SacB* fueron ensamblados en el plásmido base mediante Gibson Assembly (Figura 5) para evitar las cicatrices entre los fragmentos



y tener la certeza de que cada uno está en su sitio. La técnica de Gibson Assembly fue desarrollada en 2009 por el Dr. Daniel Gibson y colaboradores, como un método de ensamble de múltiples fragmentos lineales (Gibson et al., 2009). Los fragmentos de ADN se pueden unir en una sola reacción sin importar su tamaño o la compatibilidad de sus extremos. Es un método efectivo para ensamblar plásmidos ya que el producto final es una molécula de ADN de doble cadena (Moser, 2012).

Felix Moser (2012) plantea las cuatro principales ventajas de usar este método: "(I) No necesita sitios de restricción específicos. Une casi cualesquiera dos fragmentos sin importar la secuencia. (II) No hay cicatriz entre los fragmentos unidos. (III) Pocos pasos. Una sola reacción. (IV) Se pueden combinar varios fragmentos de ADN de una sola vez."

El proceso de ensamble consiste en generar amplificaciones de los fragmentos a ensamblar añadiendo a los extremos oligonucleótidos complementarios entre ellos. Posteriormente, la enzima *T5* exonucleasa *chew back* "muerde" los extremos 5' de los productos de PCR para dejar extremos romos 3' de una sola cadena compatibles con el siguiente fragmento (Figura 6), dentro de la misma reacción se encuentra la Polimerasa Phusion DNA, la cual incorpora los nucleótidos para llenar los huecos entre los fragmentos alineados y por último la Ligasa Taq DNA une los fragmentos complementarios que fueron alineados anteriormente (Gibson et al., 2009).

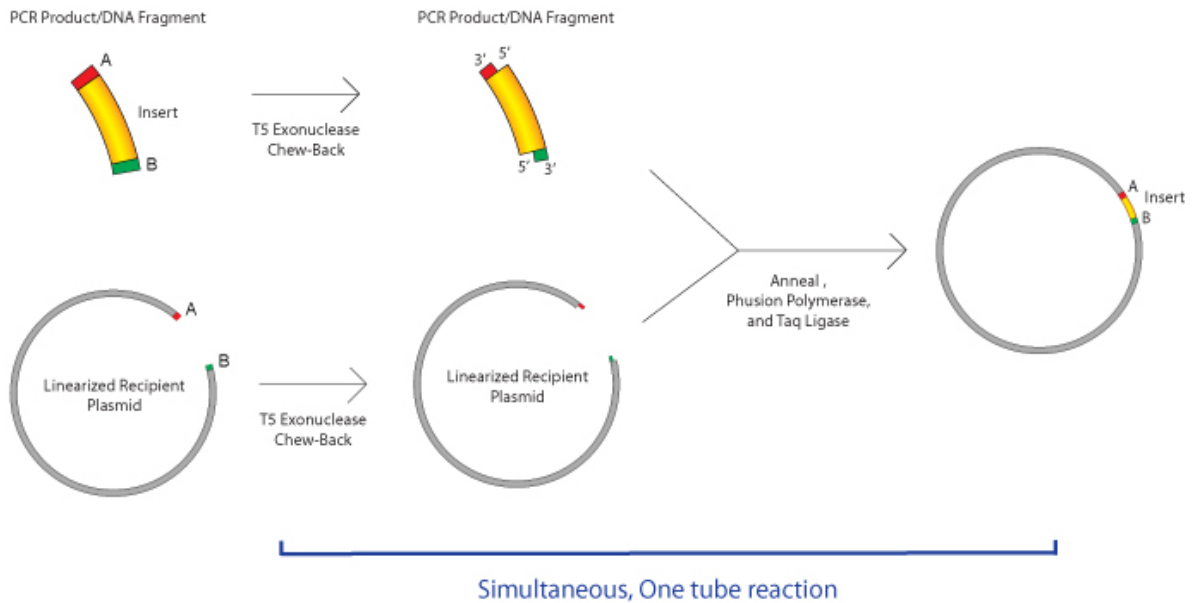


Figura 5 Gibson Assembly

El procedimiento de ensamble ocurre en una sola reacción, actúan 3 enzimas: T5 Exonucleasa Chew-Back, Phusion Polimerasa y Taq Ligasa. A los fragmentos a ensamblar se le añaden oligos en los extremos que son complementarios entre cada uno de ellos y con los extremos del plásmido a donde se van a ensamblar.

Obtenida de: <https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/>

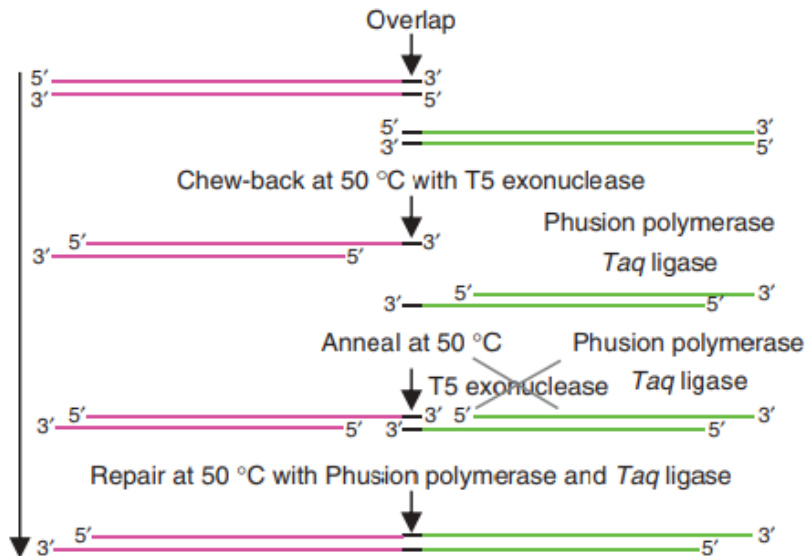


Figura 6 Actividad de las enzimas durante Gibson Assembly

Procedimiento que siguen los fragmentos y las enzimas al momento de ensamblarse en una sola molécula de ADN de doble cadena.

Obtenida de: Gibson et al. (2009, p. 1)

### 3.3.2.2 Golden Gate

Se refiere a un ensamble de fragmentos de ADN que no deja costuras, surgió en 1996 cuando se ensamblaron múltiples insertos en un plásmido usando la actividad de enzimas de restricción IIS y una T4 ADN ligasa (Lee et al., 1996). El sistema saca provecho de la habilidad que tienen las enzimas de tipo IIS de unirse al ADN fuera de la secuencia reconocida. Las enzimas de restricción tipo IIS pueden remover la secuencia de reconocimiento del ensamble debido a que los insertos y vectores tienen sitios de reconocimiento y de corte distintos, estando estos distantes para no coincidir dentro de la secuencia (NEB, s.f.).

El sistema tiene 3 ventajas:

1. La secuencia de reconocimiento no es dictada por la enzima de restricción y, por lo tanto, no se introduce ninguna secuencia cicatriz.
2. La secuencia específica de los fragmentos permite el ensamblaje ordenado de múltiples fragmentos simultáneamente.
3. El sitio de restricción se elimina del producto ligado, por lo que la digestión y la ligadura se pueden llevar a cabo simultáneamente. NEB s.f.

El resultado es un ensamble de fragmentos de ADN sin costuras en una sola reacción (Scior, 2012).

#### 3.3.2.2.1 Protoespaciadores

Se utilizó el ensamble de tipo Golden Gate en este trabajo para unir al plásmido CRISPR con los protoespaciadores específicos para cada gen.

En el sistema de defensa CRISPR Cas-9, un protoespaciador es la secuencia que existe entre cada una de las repeticiones CRISPR de un locus CRISPR. Cada uno de los protoespaciadores hace referencia a ADN viral que se ha insertado en estos locus tras el ataque del virus a la célula (Youle, 2011). El protoespaciador contiene al ADN que es reconocido como externo y es degradado por el

sistema de defensa de la bacteria, la secuencia de este es cercana a la secuencia PAM, sin embargo no coinciden en el mismo sitio (Figura 7).

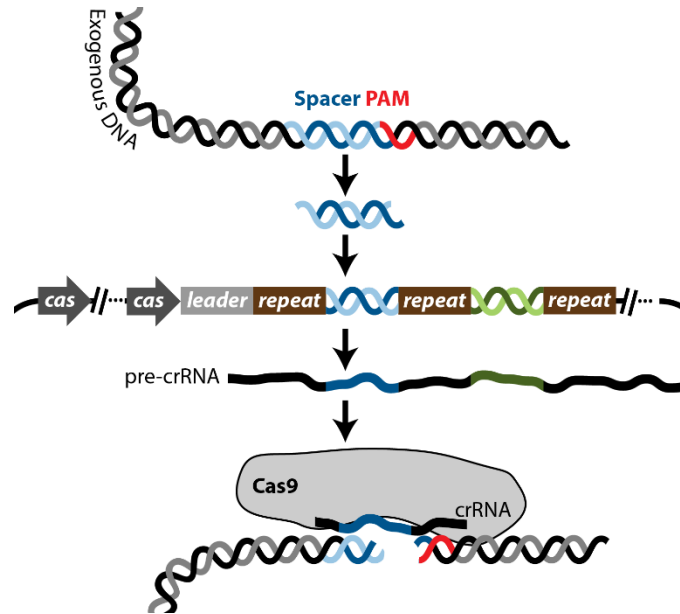


Figura 7 Función del espaciador en CRISPR Cas-9

El espaciador o protoespaciador es en primer lugar parte del genoma del virus o bacteriófago que ataca a una bacteria, posteriormente éste se integra al locus CRISPR de la bacteria entre cada una de las secuencias repetidas. Cuando el virus o bacteriófago infectan nuevamente, el locus se transcribe incluyendo el protoespaciador, y una vez que el complejo Cas-9 llega al ADN viral, el protoespaciador funciona como indicador del sitio donde debe cortar y degradar.

Obtenida de: Registry of Standard Biological Parts –iGEM <http://parts.igem.org/Collections/CRISPR>

El protoespaciador dentro de este proyecto se refiere a la secuencia del genoma que es reconocido por la nucleasa y que una vez identificada en la bacteria, realiza un corte de doble cadena sobre el sitio PAM –NGG-, el cual se encuentra dentro de la misma secuencia (Revisar Anexo 1 para conocer la ubicación específica que debe tener).

### 3.4 ORGANISMO Y GENES DE INTERÉS

Se seleccionaron dos genes blanco *hppD* y *olsB* para mutagenizarlos en la proteobacteria *B. cenocepacia*.

#### 3.4.1 *B. cenocepacia* J2315

Se probó el plásmido CRISPR en la bacteria *B. cenocepacia* J2315, la cual es un patógeno oportunista que ha sido aislada del 83% de los casos de fibrosis quística en Canadá (Hunt et al., 2004). *B. cenocepacia* es un patógeno resistente a una amplia variedad de antibióticos como la amikacina, tobramicina, tetraciclina, azitromicina, entre otros agentes antimicrobianos (Holden et al., 2009). Algunos miembros del complejo de *Burkholderia cepacia* tienen la habilidad de sobrevivir dentro de células eucariotas, como macrófagos, células respiratorias epiteliales y amibas. Cuando crece produce un pigmento de color café conocido como melanina (Zughaier et al., 1999).

Entre los factores de virulencia descritos se encuentran pili, flagelos, el sistema de secreción tipo III, la producción de exopolisacáridos de superficie, la producción de melanina, enzimas catalasas, más de 4 tipos de sideróforos hierro-quelantes, proteasas y otras enzimas secretadas, sistema de quorum sensing y la habilidad de formar biopelículas (Hunt et al., 1999). A pesar de todos estos hallazgos no se ha encontrado que alguno de éstos sea el principal factor para causar la fibrosis quística en humanos (Hunt et al., 2004). Zughaier y colaboradores (1998) encontraron que los lipopolisacáridos (LPS) de *B. cepacia* estimulan la producción de factores  $\alpha$  de necrosis tumoral, incluso en menor concentración que los LPS de otras bacterias gram negativas patógenas de pulmón. Cuando un LPS es identificado se crea un estallido respiratorio (*respiratory burst*) como mecanismo de defensa contra patógenos invasores, los macrófagos y monocitos producen superóxido en respuesta a las bacterias fagocitadas y a sus productos. Los radicales de oxígeno generados son transformados a H<sub>2</sub>O por enzimas desintoxicantes del humano (Zughaier et al., 1998).

*B. cenocepacia* J2315 se encuentra entre las cepas epidémicas que producen un pigmento parecido a melanina (Zughaier et al., 1998). El pigmento purificado se enfrentó a células antígeno CD14 con LPSs de *B. cenocepacia*. Ya que anteriormente se había descrito que al interactuar se

genera el estallido respiratorio. En el enfrentamiento, se observó que la concentración de especies reactivas de oxígeno decayó a niveles muy bajos, casi nulos (Zughaier et al., 1998).

#### 3.4.1.1 *hppD*

Keith y colaboradores (2007) reportaron que el gen *hppD* codifica a la dioxigenasa 4-hidroxifenilpiruvico, un precursor de la melanina. La presencia del pigmento parecido a la melanina es un fenotipo visual, y se sabe que la mutación del gen *hppD* es una alteración que se puede rastrear en la bacteria sin necesidad de pruebas complejas, a través de una asociación de fenotipo (Keith et al., 2007). La melanina es el pigmento más común producido en la naturaleza (Popa y Nealson, 2014). Wang y colaboradores (2015) describen que en la ruta de síntesis de la piomelanina (melanina producida por bacterias Gram negativas) está involucrada la expresión de cuatro genes, *phhA* (codifica la fenilalanina hidroxilasa), *tyrB* y *aspC* (ambos codifican la amino ácido aminotransferasa) y el *hppD* (codifica 4-hidroxifenilpiruvatodioxigenasa). La síntesis de piomelanina comienza con el catabolismo de la fenilalanina (Lehninger, 1975) y la interferencia de alguno de estos genes bloquea la producción del pigmento.

#### 3.4.1.2 *olsB*

Los lípidos de ornitina (OLs) son lípidos de membrana libres de fósforo presentes en muchas bacterias, pero no se ha mostrado su presencia en eucariotas o arqueas (Sohlenkamp y Geiger, 2016). Contienen un grupo 3-hidroxi acil graso unido al grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido ornitina. Un segundo grupo acil está unido al grupo 3-hidroxi del primer ácido graso por un enlace éster. En algunas bacterias, los OLs se forman solo bajo condiciones de limitación de fosfato y en otras son producidos constitutivamente. Existen variantes en su estructura, por ejemplo se han descrito los OLs metilados y los OLs hidroxilados (Sohlenkamp y Geiger, 2016).

La primera ruta de biosíntesis de lípidos de ornitina (OLs) que se describió consiste de dos pasos. En el primer paso, la *N*-aciltransferasa *olsB* cataliza la transferencia de un ácido graso 3-hidroxiado desde una proteína acarreadora al grupo alfa-amino de ornitina, formando el lisolípido de ornitina. *olsB* fue caracterizado por primera vez en *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Gao et al., 2004). Cuando *olsB* no está presente hay ausencia total de OLs en este organismo (Weissenmayer et al, 2002).

Para el cumplimiento del segundo objetivo planteado en el presente trabajo, se adaptó el plásmido CRISPR al gen *olsB* y se utiliza para inactivar el gen en *B. cenocepacia*, lo cual provoca la ausencia de lípidos de ornitina en la cepa.

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Cepas, medios y reactivos

Se usó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para clonar y mantener los plásmidos. La cepa *E. coli* S17-1 se utilizó para movilizar plásmidos de *E. coli* a otras bacterias por conjugación. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio Luria Bertani (LB) (Extracto de levadura 5 000  $\mu$ g/ml, NaCl 10 000  $\mu$ g/ml, Peptona 10 000  $\mu$ g/ml) suplementado con tetraciclina 2  $\mu$ g/ml por 16 horas a 37° C. Para la selección de transformantes se agregó 1  $\mu$ l/ml de X-gal al medio. La cepa de *B. cenocepacia* y las conjugaciones se crecieron en medio LB suplementado con tetraciclina 500  $\mu$ g/ml y ácido nalidíxico 40  $\mu$ g/ml.

#### 4.1.2 Oligonucleótidos para PCR

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la construcción del plásmido CRISPR y para comprobar las cepas mutantes fueron sintetizados por la empresa SIGMA\* y por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México\*\*. La lista completa se encuentra en la Tabla 1. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems con las enzimas Phusion de Fermentas y Pfx de Thermo Fisher. Las enzimas de restricción se obtuvieron de la marca New England Biolabs.



Tabla 1

*Oligonucleótidos utilizados para amplificar los 4 componentes del plásmido y el gen de interés.*

Oligo	Secuencia (5'→3')
Rham F*	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTTTAATCTTTCTGCGAATTGAG
Rham R*	ATTTCTTATCCATAATGTGATCCTGCTGAATTC
Cas-9 F*	GCAGGATCACATTATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGC
Cas-9 R*	AGAACTAAAAAATTCATCCTGCAGCTCCACCGC
SacB F*	AGCTGCAGGATGATTTCCCATCGGCATTTTCTTTTG
SacB R*	AATTTTTTATGATTTCCCATCGGCATTTTCTTTTG
sgRNA F*	AAATGCCGATGGGGAATCGGCATTTTCTTTTG
sgRNA R*	CAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCCCACGGTCCTCTAGAT
hppD F **	ACTGCATATGCAGATCCCCACCTGGGA
hppD R**	ACTGGGATCCTCAGGCCTTGTCTGACGCA

Tabla 2

*Oligonucleótidos para protoespaciadores.*

Oligo	Secuencia (5'→3')
hppD proto F**	ACGCGCACTTCGCGGAAGTTGAAC
hppD proto R**	AAACGTTCAACTTCCGCGAAGTGC
<i>OlsB</i> proto F**	ACGCTTCGCCTTCGGCGTACAGGC
<i>OlsB</i> proto R**	AAACGCCTGTACGCCGAAGGCGAA

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Construcción del plásmido pBBR1MCS-3-CS02 (plásmido CRISPR)

Se partió desde un plásmido base, el plásmido pBBR1MCS-3, el cual fue en primer lugar linearizado con dos cortes por enzimas de restricción, con la enzima *XhoI* (200 U) en la posición 3302, secuencia 5'---C<sup>^</sup>TCGAG---3' y otro con la enzima *SacI* (100 U) en la posición 3219, secuencia 5'---GAGCT<sup>^</sup>C---3'. La reacción se incubó con el buffer 4 de New England Biolabs, por 16 horas a 37°C. Los 4 fragmentos que forman parte del plásmido CRISPR: P<sub>rhaB</sub>, SpCas-9, sgRNA y *SacB* fueron generados por amplificaciones de PCR, el programa que se siguió para amplificar los 4 insertos fue: 30 segundos a 98°C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 40 segundos a 62°C, 60 segundos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. En este paso se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla 1; el proceso de diseño y selección de estos oligonucleótidos se encuentra en el Anexo 2. Siguiendo el protocolo de recombinación por Gibson Assembly (Anexo 2), se realizó la unión de los fragmentos con el plásmido base digerido, incubando la reacción con buffer 5x isothermal NEB por 1 hora a 50°C (NEB, 2017). El nuevo ensamble se transformó en células de *E. coli* DH5α por choque térmico exponiendo células quimiocompetentes en glicerol por 40 minutos en hielo, después se incubaron por 2 minutos a 42°C, se regresaron nuevamente por 5 minutos a hielo, transcurrido este tiempo, se añadió medio LB líquido sin antibiótico y se dejaron incubar por 16 horas a 37°C. Posterior a esto, las transformantes fueron crecidas en medio LB con tetraciclina 2 µg /ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-gal). Las colonias resistentes y azules se aislaron y se analizó la presencia del plásmido. El ADN se corrió en un gel de agarosa 1% por 40 minutos a 120 V.

#### 4.2.2 Diseño de oligonucleótidos para protoespaciador

Para la creación de una mutante se requiere de la selección de un protoespaciador específico para cada uno de los genes a mutagenizar. Para la selección y el diseño de los protoespaciadores se siguió el protocolo descrito por Cobb et al (20014) (Anexo 1). La lista de estos oligonucleótidos se encuentra en la Tabla 2. Fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cada par de oligonucleótidos se utilizó para introducir dentro de cada gen el sitio de corte de la nucleasa Cas 9.

#### 4.2.3 Adaptación del plásmido CRISPR a los genes de interés *hppD* y *olsB*

Se siguió el protocolo de intercambio de genes (Cobb at el, 2014) por Golden Gate (Anexo 1) con los oligonucleótidos del protoespaciador de los genes *hppD* y *olsB* de *B. cenocepacia* (por separado) con la enzima T4 ligasa de New England Biolabs y las reacciones se procesaron en un termociclador Master Cycler Gradient de Eppendorf.

#### 4.2.4 Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ con el plásmido para inactivar *hppD* y el plásmido para inactivar *olsB*

Tanto el plásmido para inactivar *hppD* como el plásmido para inactivar *olsB* se utilizaron para transformar por choque térmico a células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las transformantes se crecieron en medio LB sólido suplementado con tetraciclina (2  $\mu$ g/ml) y X-gal (1  $\mu$ l/ml) por 16 horas a 37° C. Se seleccionaron las colonias blancas resistentes y se extrajo ADN plasmídico por medio del kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep. El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% para identificar el remplazo del gen por el protoespaciador al comparar con el plásmido CRISPR. El procedimiento fue el mismo para ambos plásmidos.

#### 4.2.5 Conjugación *E. coli* S17-1– *B. cenocepacia*

Los plásmidos para inactivar *hppD* y para inactivar *olsB* (por separado) se transformaron en *E. coli* S17-1 por choque térmico según el protocolo descrito por Hanahan (1985). Las células se crecieron en medio LB suplementado con tetraciclina (2 µg/ml).

Se iniciaron precultivos de las células de *B. cenocepacia* J2315 en medio LB líquido y de *E. coli* S-17-1 transformadas por una noche en agitación a 30°C. Después de 16 horas de incubación, se realizó la conjugación de ambas células en una relación 1:2 de *E. coli* S17-1 y *B. cenocepacia* J2315 a 30 °C siguiendo el protocolo de Casali y Preston (2003), la mezcla de ambas células se creció en cajas petri con medio LB selectivo por goteo, cuando se observó crecimiento se rasparon ambos cultivos agregando LB líquido y fueron resembradas 3 veces en medio LB con tetraciclina.

#### 4.2.6 Inducción de la expresión del plásmido con ramnosa

La construcción del plásmido para inactivar *hppD* contiene, entre otros (*SpCas-9*, *SacB*, *sgRNA*), al promotor  $P_{rhaB}$  para que la nucleasa Cas-9 se induzca únicamente al agregar el azúcar ramnosa al medio de cultivo. Se realizaron pruebas de inducción con 3 concentraciones diferentes de ramnosa. Cardona y Valvano (2005) habían observado que el sistema de inducción por ramnosa funcionaba en *B. cenocepacia* al agregar de 0.02-0.2% (p/v) de ramnosa. Se optó por utilizar 0.02%, 0.1% y 0.2%. Las pruebas se realizaron en cajas de medio LB sólido suplementado con tetraciclina (500 µg/ml).

El proceso de inducción se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó pre-cultivo líquido de medio LB suplementado con tetraciclina (250 µg/ml) e inoculando con *B. cenocepacia* J2315 + plásmido para inactivar *hppD* o plásmido para inactivar *olsB*. Se incubó en agitación a 30°C por una noche, 16 horas después se inició un nuevo cultivo en medio LB con antibiótico, inoculando con el pre-cultivo anterior de *B. cenocepacia* a una densidad óptica (D.O.) de 0.2 (medida a 600 nm), se incubaron a 30°C por aproximadamente 4 horas. Cuando se alcanzó una  $DO_{600}$  de 0.4, se añadió la

concentración de ramnosa necesaria para cada prueba (0.02%, 0.1% y 0.2%). Se tomó 1 ml de cada uno de los cultivos y se realizan diluciones 1:100, las diluciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  se crecieron en medio LB sólido suplementado con tetraciclina (500  $\mu\text{g/ml}$ ). Se tomaron muestras al tiempo T0 (0 horas), T1 (1 hora después de la inducción), T2 (3 horas después de la inducción) y T3 (16 horas después de la inducción). Las cajas se dejaron incubar a 30°C por 5 días, monitoreando cada día el crecimiento y el avance en la pigmentación de las células. Cinco días después de la inducción se retiraron las cajas de la incubadora y se observaron las colonias y la coloración resultantes. Se seleccionaron las cajas que presentaron el fenotipo esperado (sin pigmento café), se sembraron en placas nuevas de LB sólido suplementado con tetraciclina (500  $\mu\text{g/ml}$ ). Se realizó una tercera réplica de la cual se evaluarán 4 posibles mutantes que tenían 3 días post tratamiento.

#### 4.2.7 Cuantificación de melanina

Para el desarrollo del presente trabajo, la pérdida de la coloración en el medio de crecimiento se tiene como indicativo del correcto funcionamiento del plásmido. La pigmentación producida sobre medio de cultivo sólido se dispersa, así que se optó por realizar pruebas de eficacia del plásmido al cuantificar absorbancia de luz de la melanina presente en el medio de cultivo. Se ha descrito que la absorbancia de luz por parte de la melanina ocurre a una longitud de onda corta (400 nm) (19) en el espectro visible de la luz (400-700 nm).

Para monitorear la presencia de pigmentos secretados, se inoculó medio LB líquido con *B. cenocepacia* cepa silvestre (WT), dos colonias blancas distintas *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *hppD* con ramnosa (posibles mutantes) y una cepa de *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *hppD* sin ramnosa (SR). En matraces estériles se agregaron 100 ml de medio LB líquido, los cultivos se calibraron a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.1 para iniciar la prueba y durante los siguientes 8 días se tomaron 5 ml de muestra. Las muestras se filtraron para remover las células con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  y se midió la absorbancia de luz a una longitud de onda de 400 nm siguiendo el protocolo anteriormente descrito por Wang (2015) donde se filtro-esterilizan 5 ml de cultivo líquido y se mide absorbancia de luz.

#### 4.2.8 PCR para posibles mutantes *hppD* de *B. cenocepacia*

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *hppD* de *B. cenocepacia* (tabla 1, gen *hppD*) utilizando el software OligoCalc y obteniendo de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) la secuencia del gen a amplificar. Se realizó una reacción de PCR para la cepa control Wild Type (WT) y 6 posibles mutantes (colonias blancas) utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados (Tabla 1, gen *hppD*). Se utilizó la enzima Polimerasa *Pfx* para amplificar la región a 69 °C, se siguió un programa que inicia con la activación de la polimerasa por 2 minutos a 95° C, para después continuar con una repetición de 30 ciclos de desnaturalización de las cadenas de ADN por 30 segundos a 95° C, alineamiento de los oligonucleótidos con la secuencia por 1 minuto con 20 segundos a 73° C, extensión de las cadenas por 1 minuto con 20 segundos a 69° C, terminando con una extensión final de 10 minutos a 69° C y conservación del producto a 4°C. El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, se dejó teñir por 30 minutos en una solución de bromuro de etidio suficiente para cubrir el gel, posteriormente se puso a desteñir en agua con agitación por 10 minutos y se visualizó en un transiluminador de luz UV. El producto de PCR fue purificado del gel con el PCR con un kit de purificación (Thermo Scientific) y posteriormente enviado a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para ser secuenciado.

#### 4.2.9 Extracción de lípidos de ornitina

Para seleccionar las posibles mutantes de *OlsB* se extrajeron lípidos de ornitina de las células de *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *OlsB* siguiendo el protocolo descrito en González-Silva y colaboradores (2011). Las muestras de lípidos se analizaron por cromatografía de capa fina en una dirección usando como solvente cloroformo/metanol/agua (130:50:8, v/v/v). La placa de cromatografía de capa fina fue teñida con ninhidrina para detectar los lípidos con grupos amino primarios.

#### 4.2.10 Extracción de proteínas

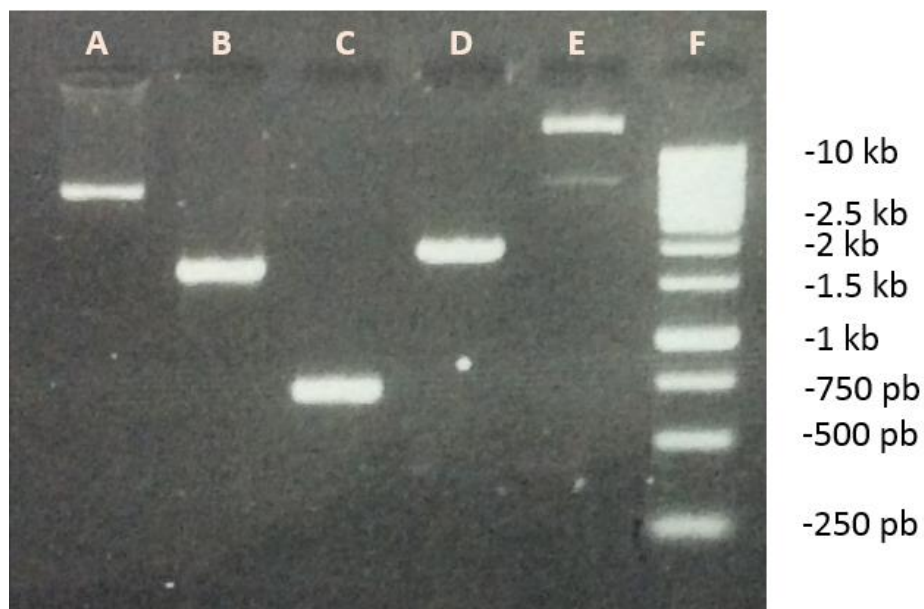
Para confirmar o descartar la expresión de la proteína Sp Cas-9 se analizó el perfil proteico de las posibles mutantes *B. cenosepacia hppD*. Se realizó un cultivo líquido en 50 ml de LB inoculado con las probables mutantes. 16 horas después, se centrifugaron las células a 4000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 40 mM pH 7.0 y se pasaron por la prensa francesa 3 veces. El extracto se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. El pellet se resuspendió en 3 ml de Tris-HCl 40 mM pH 7.0 y se hizo una dilución 1:100. Se mezclaron 10 µl de muestra con 10 µl de buffer de carga, posteriormente se incubaron a 95° por 10 minutos.

Previamente se preparó un gel de acrilamida SDS (anexo 3), una vez que tanto el gel running como el stacking se polimerizaron se cargó 20 µl por muestra en cada uno de los pozos, dejando el carril central para el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards) y se dejó correr en la cámara de electroforesis BioRad por 01:10 horas a 120 V. Al finalizar el gel se tiñó con azul Coomassie R-250 y se eliminó el exceso de colorante durante una noche con una mezcla de ácido acético, metanol y agua (1:4:5) en agitación. El resultado se registró por fotografía digital.

## V. RESULTADOS

### 5.1 PLÁSMIDO CRISPR

Para la implementación del sistema CRISPR Cas-9 dentro de las células de *B. cenocepacia* y como parte del diseño del sistema se optó por introducir 4 fragmentos de ADN al plásmido pBBR1MCS-3. Se hicieron ampliaciones por PCR de los 4 fragmentos a insertar: SpCas-9, sgRNA,  $P_{rhaB}$  y *SacB*, y el producto de las PCRs (Figura 8) se visualizó por medio de un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.



*Figura 8* Visualización de productos de PCR utilizados para construir el plásmido CRISPR, en gel de agarosa

Carril **A**: 2800  $\mu$ g de la ampliación de *Cas-9* con un tamaño de 5 kb. Carril **B**: 3000  $\mu$ g de la ampliación del promotor  $P_{rhaB}$  de 2 kb. Carril **C** 3000  $\mu$ g de la ampliación del sgRNA de 0.5 kb. Carril **D** 3000  $\mu$ g de la ampliación del gen *SacB* de 3.2 kb. Carril **E**: 2600  $\mu$ g del plásmido base antes de digerir con enzimas de restricción. Carril **F**: 2000  $\mu$ g de marcador molecular de 1 kb (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder).



El plásmido base se cortó con dos enzimas de restricción: *SacI* y *XhoI*, obteniendo como resultado un plásmido lineal de ~5 kb (Figura 9).

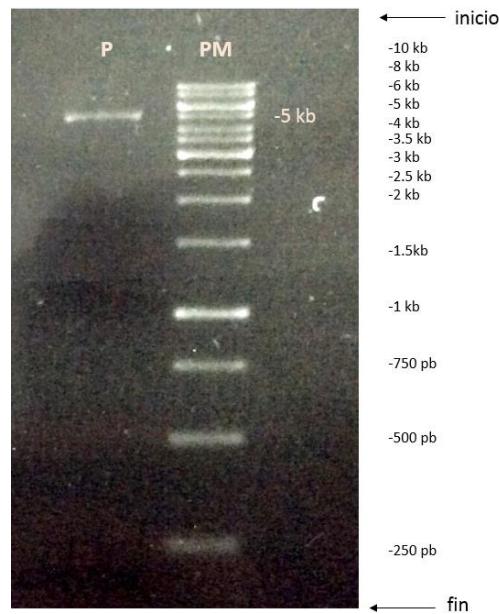


Figura 9 Linearización del plásmido base con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*.

El plásmido base (**P**) se cortó para abrir los sitios de recombinación de los fragmentos a insertar. *XhoI* corresponde al sitio de recombinación de Cas-9 y *SacI* al sitio de recombinación de *SacB* quien es el fragmento que queda en el último sitio del ensamble. **PM** el marcador de peso molecular 1 kb.

Tamaño del plásmido: 5 kb

El plásmido CRISPR se construyó al unir el plásmido base linearizados junto con los fragmentos  $P_{rhamB}$ , SpCas-9, sgRNA y *SacB* por medio de una reacción de Gibson Assembly, la cual permitió tener la certeza de que cada inserto se colocó en orden gracias a la homología que lleva entre cada uno de sus extremos. Se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico, con este ADN y se cultivaron en placas de LB tetraciclina y ácido nalidíxico y suplementadas con X-Gal. Debido a que el sgRNA contiene una región del marcador molecular Lac-Z $\alpha$ , las células exitosamente transformadas con el plásmido CRISPR crecen tomando un color azul. Al crecer las colonias en medio LB suplementado con tetraciclina y X-gal, las colonias transformadas fueron identificadas visualmente por la coloración que tomaron. Además hubo también colonias que no presentaron la coloración, las cuales fueron descartadas por no contener el plásmido CRISPR ensamblado.

Se seleccionaron colonias aisladas de color azul y se les extrajo ADN plasmídico. El producto se visualizó en un gel de agarosa 1% (Figura 10) comparando su capacidad de migrar durante la electroforesis con la del ADN del plásmido base. Al comparar ambos plásmidos se observó que al plásmido CRISPR le toma más tiempo para migrar hacia el cátodo, esto puede ser porque tenga un tamaño mayor que el plásmido base, a partir de esta observación se infiere que ambos plásmidos son distintos.

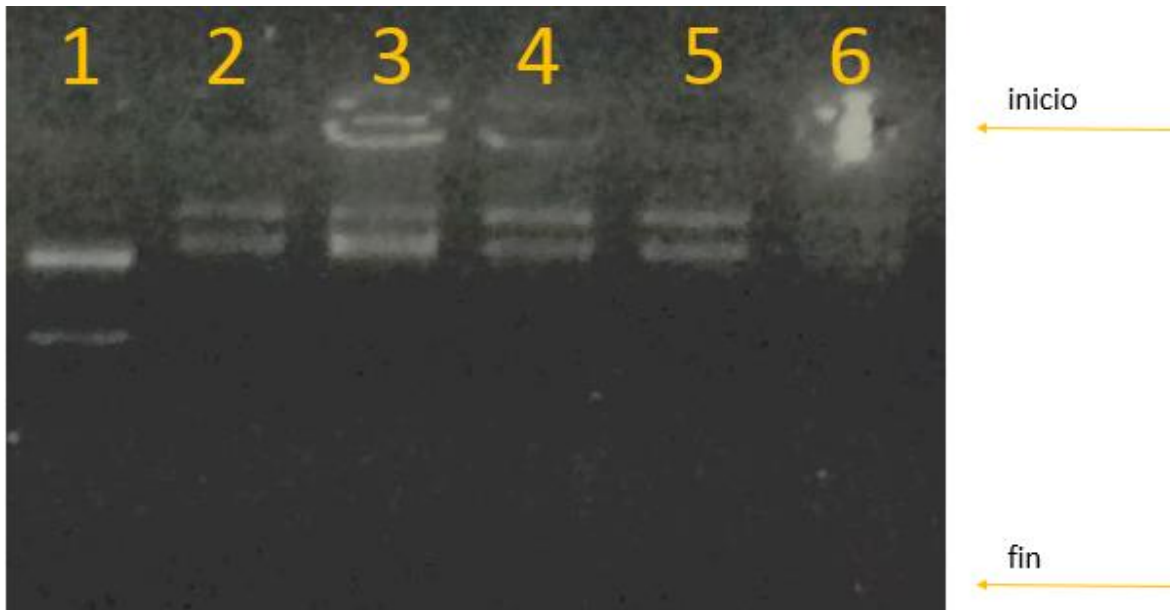


Figura 10 Comparación de los plásmidos base y plásmido CRISPR

Los plásmidos CRISPR y base purificados se corrieron en un gel de agarosa 1%. El ADN del plásmido CRISPR se corrió en un gel de agarosa 1%. Carril **1**: 2800 µg plásmido base no linearizado, carriles **2** (1000 µg), **3** (900 µg), **4** (1000 µg), **5** (1000 µg) al **6** (800 µg) plásmido CRISPR no linearizado.

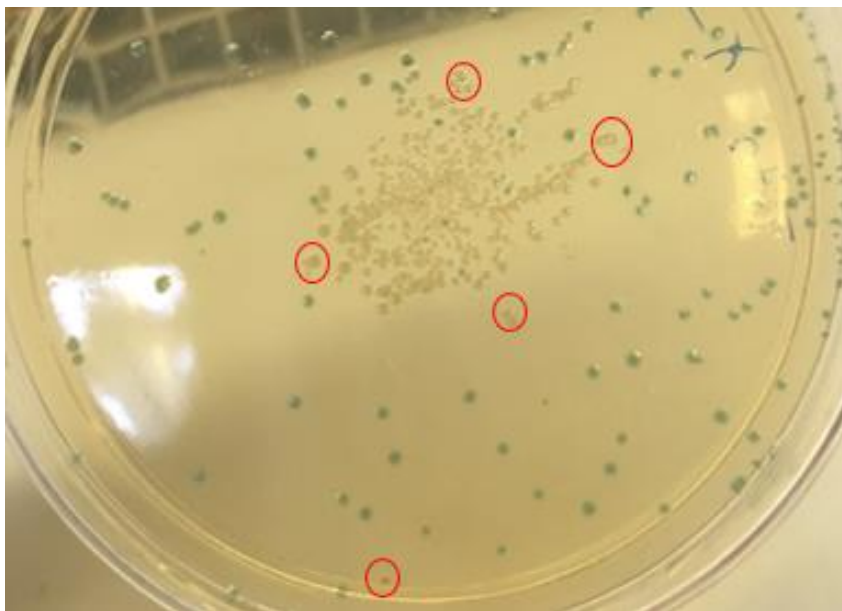


Figura 11 Selección de células transformadas con el plásmido pBBR1MCS-3-CS03 para inactivar *hppD*.

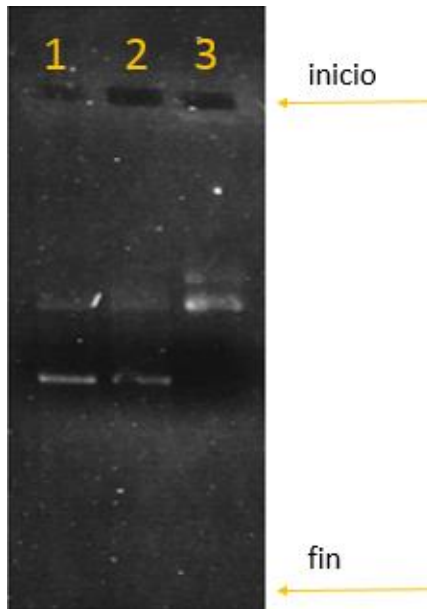
Las células transformadas con el plásmido pBBR1MCS-3-CS03 se identificaron por la ausencia de coloración azul cuando se crecieron en X-gal (círculos rojos).

## 5.2 PLÁSMIDO PARA INACTIVAR EL GEN *hppD* DE *B. CENOCEPACIA*

Una vez que se construyó el plásmido CRISPR, se seleccionó el primer gen para inactivar en *B. cenocepacia*, *hppD*: involucrado en la vía de síntesis de melanina. Se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes al protoespaciador del gen (tabla 2), se sintetizaron y se insertaron en el plásmido CRISPR por medio de una recombinación Golden Gate, dando como resultado el plásmido pBBR1MCS-3-CS03 (plásmido para inactivar *hppD*).

Se visualizaron en un mismo gel el plásmido CRISPR y el plásmido para inactivar *hppD* (Figura 12), el supuesto teórico plantea que el plásmido CRISPR contiene el fragmento del gen *lacZ* y el plásmido para inactivar *hppD*, en su lugar, tiene los 24 nucleótidos del protoespaciador.

Se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido para inactivar *hppD* y se crecieron en medio LB tetraciclina y X-gal. Se seleccionaron las colonias transformadas (Figura 11) que perdieron el fragmento del *lacZ* debido a la recombinación del protoespaciador.



Una vez que se confirmó tener el plásmido para inactivar *hppD*, se transformó en células de *E. coli* S-17-1, las cuales se utilizaron para hacer una conjugación con células de *B. cenocepacia*.

*Figura 12* Comparación de los plásmido CRISPR y plásmido para inactivar *hppD*.

Los carriles 1 y 2 corresponden al plásmido para inactivar *hppD*, el carril 3 contiene al plásmido CRISPR. El patrón de migración de ambos plásmidos fue distinto, indicando que son plásmidos diferentes. El tamaño de los plásmidos no se puede conocer a través de este experimento debido a que ninguno de los dos está linearizado.

### 5.3 INACTIVACIÓN DEL GEN *hppD* DE *B. CENOCEPACIA*

Se hicieron cultivos líquidos con las células transconjugantes de *B. cenocepacia*, se expusieron a tres concentraciones distintas de ramnosa: 0.02%, 0.1% y 0.2%, y se tomaron muestras en cuatro tiempos distintos (Figura 13). Se esperaba que las tres concentraciones provocaran una disminución en la producción de melanina, a distinto nivel, donde la concentración más alta 0.2% fuera la de mayor efecto. La disminución en la producción de melanina se observó debido a la coloración sobre medio de crecimiento. En la concentración más baja (0.02%) no se observó disminución sobre la coloración o esta fue menos notoria que el resto, a pesar de que la literatura sugería que 0.02% es una concentración funcional para el promotor  $P_{rhaB}$  (Figura 13 A). Con 0.1% de ramnosa es visible una disminución en la coloración del medio, sin embargo esta se pierde a las 16 horas después (Figura 13 B). Por último se observó que con 0.2% de ramnosa a las 16 horas visiblemente no hay producción de melanina en las células debido a la ausencia de coloración del medio (Figura 13 C).

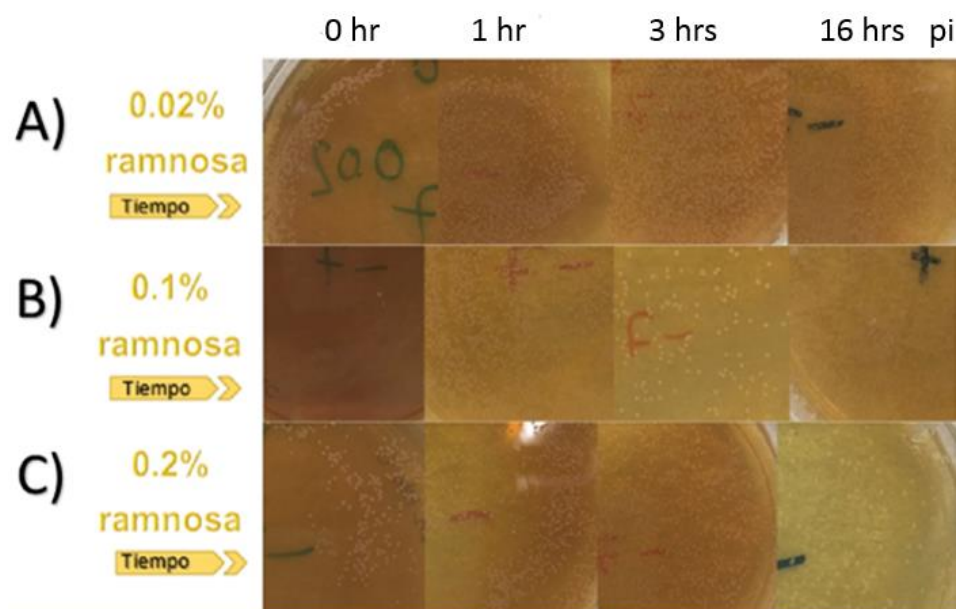


Figura 13 Efecto de la inducción del plásmido para inactivar *hppD* con 3 distintas concentraciones de ramnosa

El ensayo se llevó a cabo a las concentraciones 0.02% (A), 0.1% (B) y 0.2% (C) de ramnosa, cada recuadro horizontal representa un tiempo de muestreo distinto, 0 hr, 1 hr, 3 hr, 16 hrs después. El recuadro de 0.2% a las 16 post inducción muestra una pérdida total de melanina, siendo el fenotipo que se esperaba obtener.

Basado únicamente en el fenotipo, donde las cajas control con 0 horas post inducción tienen la coloración café y la caja de 16 horas post inducción con 0.2% de ramnosa carece de pigmento (Figura 14) se sugiere que el sistema funciona y el gen *hppD* había sido inactivado. Sin embargo, este no es motivo suficiente para asegurar que son mutantes exitosas. Se requiere de más ensayos para comprobar dicho argumento, así como conocer la secuencia del gen mutado para comparar con su versión silvestre.

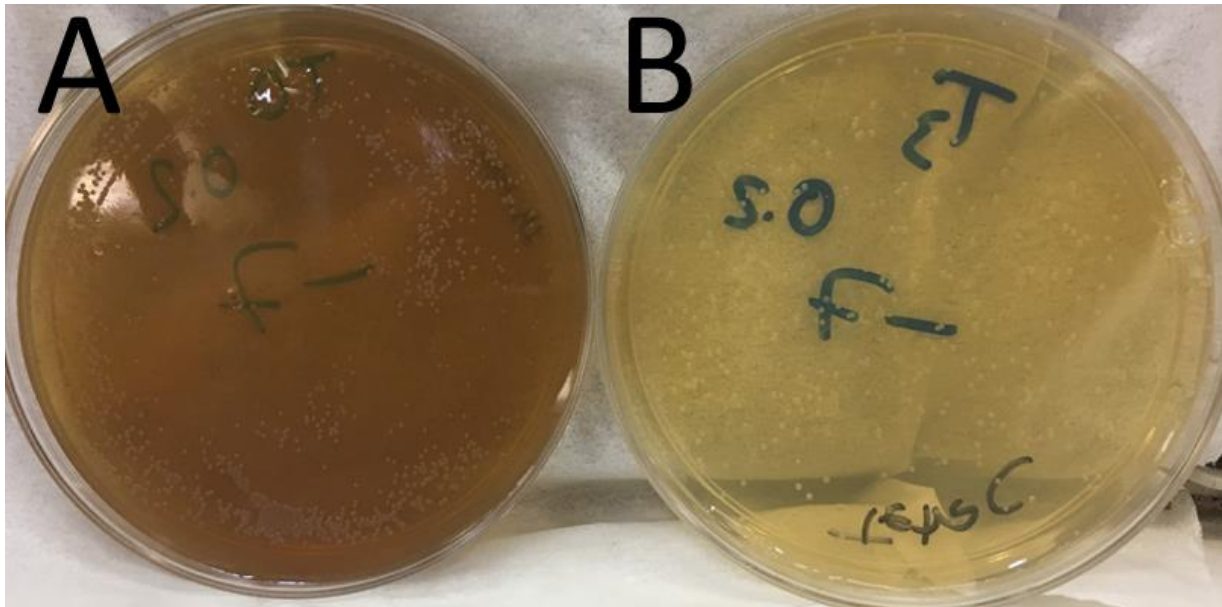


Figura 14 Comparación de la coloración del medio tras la inactivación del gen *hppD* en *B. cenocepacia*

**A:** células de *B. cenocepacia* transformadas con el plásmido para inactivar *hppD* inducida con ramnosa al 0.2% a 0 horas post-inducción. **B:** 16 horas post-inducción. El fenotipo de B parece haber suprimido la síntesis de melanina que causa la coloración café en el medio de cultivo.

#### 5.4 RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO SILVESTRE POR PARTE DE LAS MUTANTES PUTATIVAS

Las posible mutantes se resembraron en medio LB con tetraciclina y se incubaron por 5 días para observar su avance, pasados 3 días (Figura 15 A) las células permanecían sin coloración, sin embargo, las células con 5 días de crecimiento (Figura 15 B) mostraban pigmentación, indicando que el fenotipo silvestre se había reestablecido.

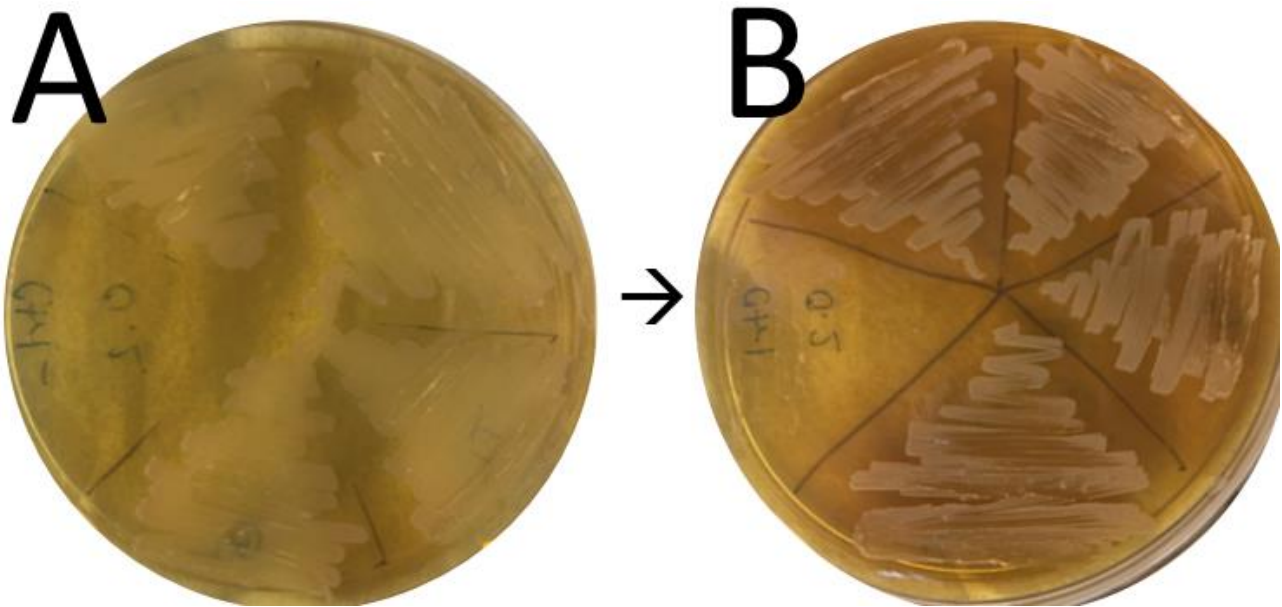


Figura 15 Recuperación de la producción de melanina por las células transformadas con el plásmido para inactivar *hppD*.

Las placas con las mutantes putativas de *hppD* se dejaron a 30° C por 5 días para observar su evolución.

**A:** crecimiento en medio LB a 30° por 3 días. **B:** mutantes putativas de *hppD* con 5 días de crecimiento a 30° C.

Debido a que era difícil cuantificar la producción de melanina en caja, se optó por hacer la cuantificación en medio líquido por espectrofotometría. En la medición por espectrofotometría (Figura 16) se observó que a partir del 3er día la producción de melanina era la misma tanto en la cepa silvestre como en las dos mutantes putativas que se analizaron. Visiblemente, el medio se tornó café para las 3 muestras (Figura 17).



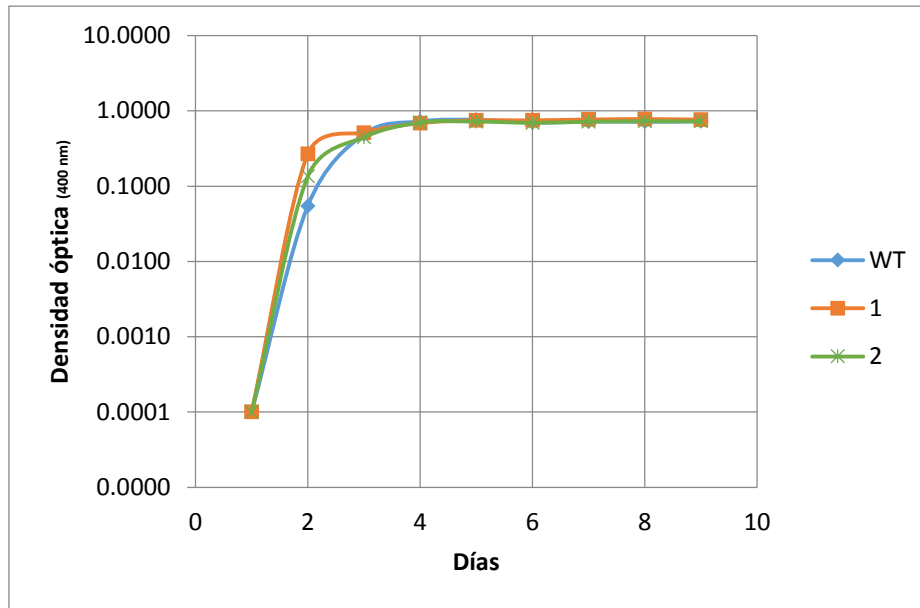


Figura 16 Producción de melanina en *B. cenocepacia*

La síntesis de melanina se restablece en las posibles mutantes del gen *hppD*. **WT**: cepa silvestre de *B. cenocepacia*, **1** y **2**: mutantes putativas (independientes) con 0.2% de ramnosa.

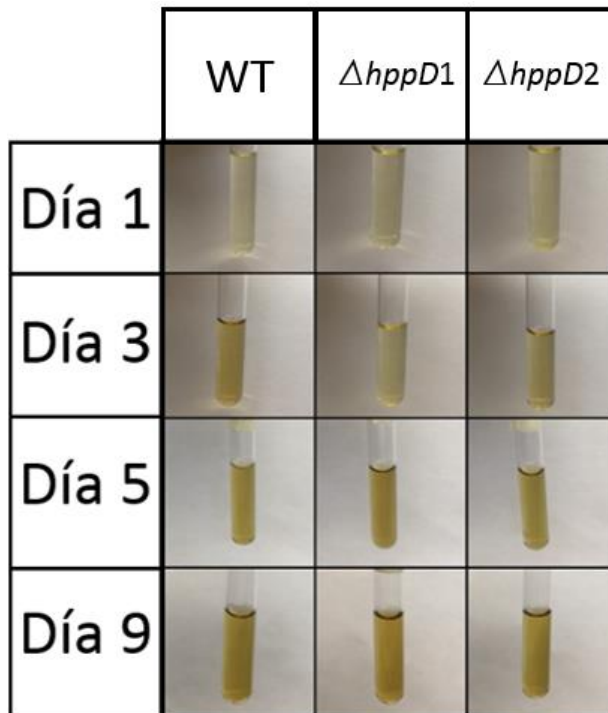


Figura 17 Muestreo de melanina para cuantificación en medio LB líquido

Coloración del medio líquido donde se crecieron las dos mutantes putativas  $\Delta hppD1$  y  $\Delta hppD2$  y la cepa silvestre **WT**. Al final del tratamiento (día 9) los 3 medios son de la misma tonalidad.



## 5.5 SIN DIFERENCIAS ENTRE LA SECUENCIA DE LA CEPA SILVESTRE Y LA MUTANTE PUTATIVA

Para indagar sobre lo que estaba sucediendo con el gen que al principio parecía estar inactivado y después retomaba su actividad. Se buscó identificar algún cambio a nivel de nucleótidos a través de análisis por secuenciación (Figura 16).

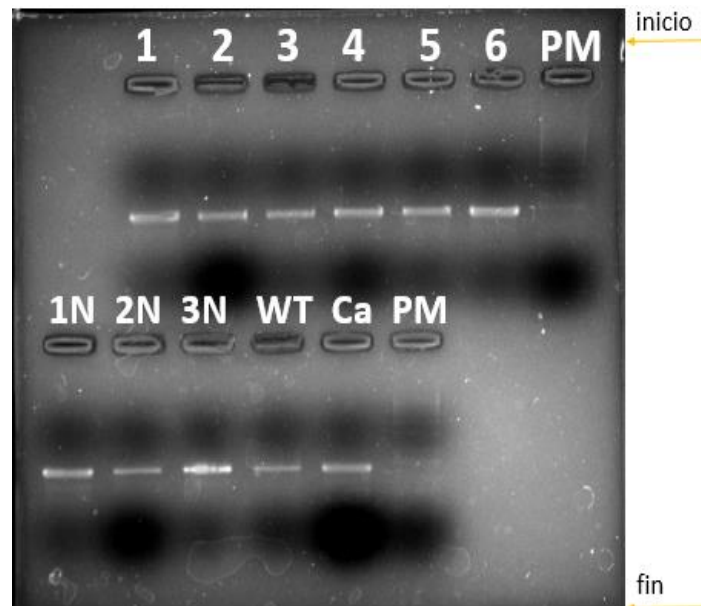


Figura 18 Producto de PCR del gen *hppD* en las cepas mutagenizadas.

Los productos de la PCR se purificaron de banda a partir del gel, los carriles **1-6**: (3000  $\mu$ g) 6 posibles mutantes distintas obtenidas de la primer réplica del experimento. Los carriles **1N**, **2N** y **3N**: candidatas de la segunda réplica (3000  $\mu$ g), Carril **WT**: 3000  $\mu$ g de la cepa silvestre. Carril **Ca**: colonia que al inicio mostraba un fenotipo blanco y después cambio a coloración café. **PM**: marcador de peso molecular de 1 kb.

Dentro de las posibles candidatas a ser mutantes de *hppD* se seleccionaron 9 y fueron secuenciadas junto con la cepa silvestre de *B. cenocepacia* (Figura 19). El resultado de la secuenciación se alineó con el software Clustal W. Se esperaba obtener un cambio de nucleótidos dentro de la región marcada en amarillo de la figura 19, sin embargo no es visible ningún cambio, incluso en la región 5'—AGG—3' correspondiente al PAM. Este resultado lleva a plantear que algún componente del sistema probablemente no está funcionando. Para descartar que el fallo sea del promotor P<sub>rhAB</sub> o de la nucleasa se realizó una extracción de proteínas, las cuales se visualizaron en un gel de acrilamida 12% (Figura 20).

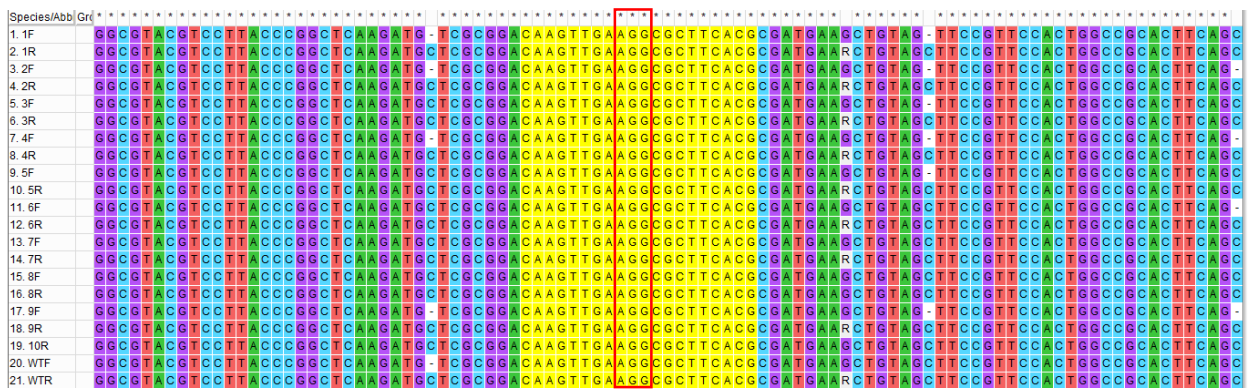
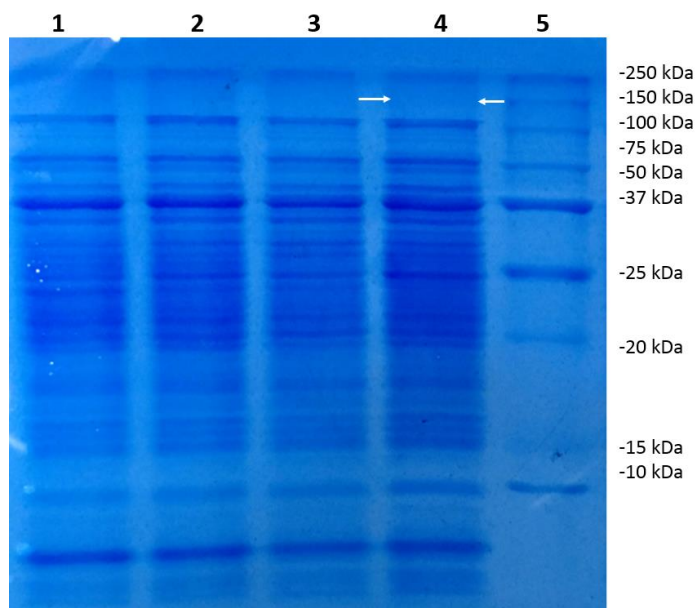


Figura 19 Alineamiento de las secuencias de las posibles mutantes en *hppD* y la cepa silvestre de *B. cenocepacia*

Dentro de la región amarilla se encuentra el protoespaciador, no se presentan cambios en la secuencias dentro de este sitio comparado con la secuencia silvestre. Dentro del marco color rojo se encuentra la secuencia PAM. Las secuencias se encuentran por duplicado debido a la técnica de secuenciación que requiere una muestra con el oligo Forward y otra con el oligo Reverse (es decir, 1F y 1R corresponden a la misma colonia).

La extracción de proteínas se hizo en 4 colonias con 4 condiciones distintas para descartar el ruido de otras fuentes.

1. Se utilizó como primera condición a la cepa silvestre;
2. Una cepa silvestre expuesta a ramnosa 0.2% para descartar que la ramnosa por si sola está causando un cambio sobre la coloración del medio;
3. Una cepa de *B. cenocepacia* transformada con el plásmido para inactivar *hppD* pero que no fue expuesta a ramnosa en ninguna concentración y;
4. finalmente se encuentra la posible mutante (*B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *hppD*) expuesta a 0.2% de ramnosa.



**Figura 20** Visualización por gel de acrilamida de la expresión de proteínas de *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *hppD*

Carril 1: cepa silvestre. Carril 2: cepa silvestre expuesta a ramnosa 0.2%. Carril 3: posible mutante (*B. cenocepacia* + plásmido para *hppD*) la cual no fue expuesta a ramnosa. Carril 4: posible mutante que si fue expuesta a ramnosa 0.2%. Carril número 5: marcador de proteínas Precision Plus Protein™ Standards de BIORAD. Dentro del carril 4 se observa una ligera banda (entre flechas) cerca de la posición de los 150 kDa, la cual corresponde al Cas-9.

El peso molecular de Cas-9 es alrededor de 160 kDa. Las cepas de los carriles 1-3 de la figura 20 no tienen presente una banda de este tamaño, sin embargo en el carril número 4 de la posible

mutante se puede encontrar una banda tenue que puede indicar que la proteína se está expresando a una tasa muy baja.

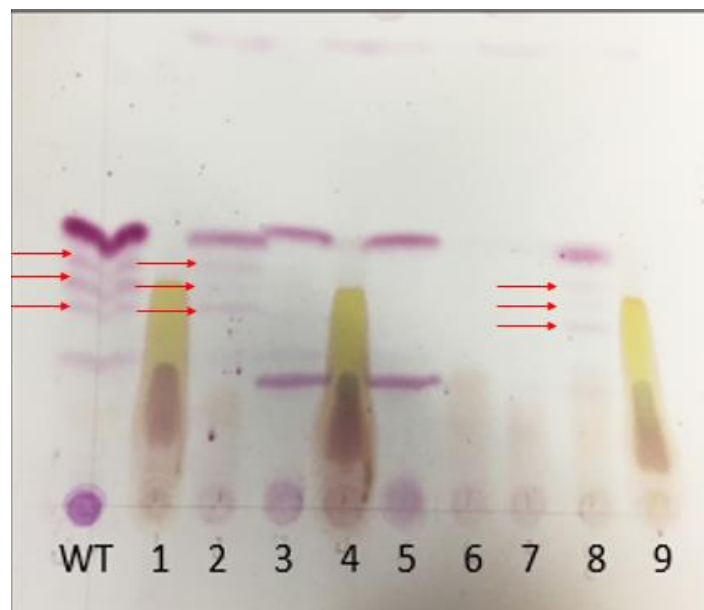
Por cuestiones de tiempo, el experimento con las mutantes de *hppD* en *B. cenocepacia* terminó aquí. Lo siguiente que se propone es la purificación de la proteína Cas-9, así como una PCR en tiempo real en 4 tiempos distintos al igual que las mediciones de melanina para conocer cómo cambia la expresión a través del tiempo y si hay coincidencia entre la expresión de Cas-9 y la producción de pigmento por parte de las mutantes en *hppD* de *B. cenocepacia*.

## **5.6 INACTIVACIÓN DEL GEN *olsB* DE *B. CENOCEPACIA***

Para conocer si el efecto observado con el gen *hppD* es algo general y el plásmido CRISPR es aplicable a cualquier gen, se optó por inactivar uno de los genes de estudio del laboratorio, *olsB* de *B. cenocepacia*. Primera enzima de la ruta de biosíntesis de lípidos de ornitina. Para ello se construyó el plásmido para inactivar *olsB*, de la misma manera que el plásmido para inactivar *hppD* y se siguió el protocolo para la generación de mutantes a través de la exposición a ramnosa de las células transformadas con el plásmido.

Una vez que se generaron las mutantes putativas en *olsB* de *B. cenocepacia*, se realizó una extracción de lípidos de ornitina, la cual se visualizó por cromatografía de capa fina de una dimensión.

La cromatografía de capa fina de una dimensión (Figura 19) arrojó como resultado que se generaron 2 posibles mutantes de *olsB* (carriles 3 y 5), en estos carriles no se visualizan 3 bandas correspondientes a los lípidos de ornitina como en los carriles WT, 2 y 8 (flechas rojas). Sin embargo las mutantes no se pudieron comprobar ni dar seguimiento por cuestiones de tiempo. Se propone para comprobar estos resultados, repetir la extracción de lípidos de ornitina y volver a teñir con ninhidrina para visualizar en una cromatografía de dos dimensiones. Posteriormente, analizar por secuenciación los posibles cambios sobre la secuencia nucleotídica.



*Figura 21* Cromatografía de capa fina en una dimensión de lípidos extraídos e *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *olsB*.

**WT** corresponde a la cepa silvestre la cual tiene el perfil de lípidos de ornitina completos.

**2 y 8** son cepas de *B. cenocepacia* + plásmido para inactivar *olsB* que no son mutantes

**3 y 5** son posibles mutantes de *olsB* al no tener lípidos de ornitina.

Los carriles **1, 4, 6, 7 y 9** tuvieron problemas para migrar y por lo tanto fueron descartados.

## VI. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue el diseño y la construcción de un sistema genético para inactivar genes en bacterias Gram negativas mediante CRISPR Cas-9, el cual se cumplió durante la primera etapa de desarrollo gracias a la metodología utilizada y a la unificación de material teórico en temas de sistemas genéticos, CRISPR Cas-9, promotores inducibles y acerca de *B. cenocepacia*. El trabajo ahora consistía en probar que este sistema funciona en diferentes hospederos y con diferentes genes. Para ello originalmente se optó por trabajar con 4 organismos distintos, todos ellos con respuesta negativa a la tinción Gram: *B. cenocepacia* J2315, *Agrobacterium tumefaciens* A208, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Flavobacterium johnsoniae* con un gen diferente en cada organismo.

Para la prueba del plásmido para inactivar *hppD* de *B. cenocepacia* se observó que el sistema estaba funcionando óptimamente, se obtuvo exactamente el cambio de fenotipo que se estaba buscando, la pérdida de coloración en el medio de cultivo, asociado a la inactivación del gen *hppD*. Esta era una prueba “rápida” donde no era necesario de más pruebas para identificar el fenotipo, la inactivación del gen era visible e indicaba ser positivo. Sin embargo, estas posibles mutantes dieron un resultado que fue de gran sorpresa, al quinto día de crecimiento en medio sólido este se tornaba de color café, igual al fenotipo silvestre. Con cada réplica del experimento el resultado era el mismo, los primeros 3 días se tenían placas carentes de coloración y al quinto día estas ya presentaban coloración café. De momento no se tenía una explicación certera de lo que estaba pasando así que hubo una serie de hipótesis planteadas que se fueron descartando con el tiempo.

H1. La síntesis de melanina no desaparece, sino que únicamente se retrasa. Al observar que la síntesis de melanina se restablecía a partir del día 5 en medio sólido y día 3 en medio líquido, se puede pensar en que la producción del pigmento está aletargada debido a la inserción del plásmido a la célula. Se conoce por Zughai y colaboradores (1998) que la melanina es un metabolito secundario generado como respuesta de defensa antioxidante por lo que no es una sustancia necesaria durante su fase exponencial. Hasta el momento se desconoce con certeza la curva de crecimiento de *B. cenocepacia* J2315 pero sería interesante compararla con la curva de cuantificación de melanina de las mutantes putativas, de esta comparación se espera que coincida

el inicio de la fase estacionaria con el inicio de la síntesis de melanina. Lo cual supondría que el simple hecho de insertar el plásmido para inactivar *hppD* a las células causa disturbio en su desarrollo silvestre, donde el pigmento se produce a partir del tercer día en medio sólido.

H2. Algún componente del sistema no funciona o no se expresa. A pesar de tener la certeza de haber utilizado tecnología que permite ensamblar plásmidos sin costuras y en el orden correcto, se deja abierta la posibilidad a que exista algún error sobre la secuencia del plásmido CRISPR. Más allá de algún posible error durante el ensamble, se plantea que alguno de los componentes pudiera haber tenido errores durante la amplificación por PCR y que estos errores se encuentren sobre un área funcional o un codón esencial para el gen. De esta manera, se habrían integrado piezas no funcionales al plásmido o que su expresión no es precisamente la deseada.

H3. *B. cenocepacia* tiene dentro de su genoma un gen que suple la función de *hppD* cuando este es inactivado. Como consecuencia de la evolución propia de *B. cenocepacia* puede ocurrir que *hppD* tenga un gen homólogo dentro de su genoma y que este no haya sido inactivado por la Cas-9 por no tener la suficiente similitud en cuestión de secuencia. Si existe este supuesto gen homólogo, puede que esté tomando el papel de *hppD* para promover la supervivencia de la célula.

H4. Las colonias que pierden la coloración son contra seleccionadas con el paso de los días. Es decir, se consiguen mutantes exitosas de *B. cenocepacia* en *hppD* y son estas las que se puede observar que tienen un fenotipo sin coloración, sin embargo, con los días mueren a causa de la proliferación de células no mutantes.

H5. La nucleasa Sp Cas-9 no reconoce la sección de *B. cenocepacia* donde se debería de realizar el cambio. El supuesto teórico plantea que una vez que se arma el plásmido para inactivar *gen* este está correctamente ensamblado y con el protoespaciador correspondiente al gen correcto, sin embargo puede ocurrir que la Cas-9 y el protoespaciador no sean funcionalmente compatibles.

H6. Inespecificidad del PAM seleccionado. A pesar de que en Thurtle y Lo (2018) se habla de un PAM único en el genoma y que el protocolo de Golden Gate (anexo 2) indica los pasos y la precisión con que se selecciona este, y que estos se siguieron al pie de la letra, queda abierta la posibilidad de que este no sea único en el genoma y *hppD* no esté siendo detectado para inactivarlo.

H7. *hppD* no fue el gen óptimo para probar el sistema. *hppD* fue seleccionado por el fenotipo al que está asociado que es la coloración café sobre el medio de cultivo y favorecía un ensayo por asociación de fenotipo visible y por lo tanto resulta “fácil” detectar la inactivación. Sería interesante contar con una simulación *in silico* de los sitios activos de la enzima hidroxifenilpiruvato deoxigenasa y simular la unión del complejo Cas-9 con el protoespaciador que se utilizó y conocer la interacción que tienen, y si el corte cae sobre un sitio funcional y las posibles consecuencias que pueda tener.

H8. La síntesis de melanina por parte de *B. cenocepacia* es indispensable para la supervivencia de esta. Como se mencionó anteriormente, la melanina es un producto del metabolismo secundario de *B. cenocepacia* (Zughaier et al., 1998) si bien, no es un compuesto vital para la célula, se propone que tiene una función realmente importante y no puede simplemente suprimirse.

H9. Las condiciones del medio donde se crecía a las posibles mutantes causaban un nivel muy alto de estrés y esto obligaba a las colonias a producir melanina como defensa. Si la síntesis de melanina es un mecanismo de defensa, se puede pensar que la célula está expuesta a condiciones desfavorables y requiere de la protección que ésta le brinda.

H10. La disminución de melanina está causada por la presencia de ramnosa en el medio. Se asociar el hecho de añadir ramnosa a los cultivos con que estos dejen de producir melanina o retrasen su producción por la causa-efecto que se pudo observar, para evaluar este factor se extrajo proteínas de una cepa silvestre expuesta a ramnosa y el resultado fue el mismo que el no tener ramnosa. Un ensayo viable pero que por cuestiones de tiempo no se pudo desarrollar es crecer en medio sólido a las combinaciones de cepa silvestre con y sin ramnosa y de igual manera a las transconjugantes para observar el fenotipo a los tres y cinco días.

Sabemos que el plásmido CRISPR está ensamblado completamente y un error del ensamblaje no es causante del fenotipo sin coloración. Se realizó una extracción de proteínas para conocer si la nucleasa se estaba expresando y el resultado fue favorable, aunque a una baja concentración. Por medio de un alineamiento BLAST supimos que el gen *hppD* no tiene un gen homólogo cercano dentro de *B. cenocepacia* que pueda estar suplantando su función, pero no podemos excluir que



haya una proteína no relacionada, que tenga la misma función enzimática. Las pruebas realizadas no nos ayudan a conocer si hubo alguna contra selección de las colonias sin melanina, la presencia de estrés en el medio o si *hppD* fue la mejor elección. Según la literatura, *hppD* no es un gen esencial cuando las condiciones son estables y no se somete a *B. cenocepacia* a un estrés inducido. Sin embargo, si realizamos pruebas con ramnosa en el medio, cuando se hicieron los cultivos para extraer proteína se jugó con las condiciones y a cada una de las variantes se tuvo una con ramnosa 0.2% y otra sin ramnosa, pero la coloración del medio no respondía a la presencia o ausencia de ramnosa 0.2%.

En criterio propio, basado en las pruebas realizadas y los resultados obtenidos, la síntesis de melanina se inactivó al principio sin embargo el efecto no pudo predominar debido a la poca síntesis de proteína Cas-9 que se pudo observar en el PAGE de *B. cenocepacia*, así que esto únicamente retrasó la producción de melanina.

Por otra parte, se realizó una segunda prueba del plásmido CRISPR, éste se adaptó al gen *olsB* de *B. cenocepacia*. Para este gen los resultados fueron una vez más a favor del plásmido, se obtuvieron 2 posibles mutantes de 9 candidatos probados, sin embargo, las pruebas no se pudieron seguir para comprobar que estas dos realmente sean mutantes, sería de gran interés conocer el desenlace de las 2 candidatas así como mandar a secuenciar para descubrir si aquí existe un cambio generado por la nucleasa.

Ambas mutantes putativas: *hppD* y *olsB* se dejaron como investigación en curso al no poder terminar con las comprobaciones por cuestión de tiempo. Se propone comprobar a estas dos por complementación química añadiendo al medio de cultivo hidroxifenilpiruvato desoxigenasa y la enzima de biosíntesis de lípidos de ornitina, respectivamente, para posteriormente evaluar los fenotipos y comprobar si estos lucen como la cepa silvestre.

Como se desconoce algún cambio sobre la secuencia del posible gen mutante, no se propone comprobar las posibles mutantes por PCR.

El proceso de inactivación de genes se inició para *A. tumefaciens* con el gen *psD* y en *R. tropici* con *exoQ*, se sintetizaron los espaciadores para ambos genes y se construyeron los plásmidos

respectivos, denominados como plásmido pBBR1MCS-3-CS05 o plásmido para inactivar *psD*; y plásmido pBBR1MCS-3-CS06 o plásmido para inactivar *exoQ*; estos con la intención de probar nuevos genes en nuevos organismos a la par mientras la primera prueba en *B. cenocepacia* se analizaba, sin embargo, el sorpresivo retorno de las mutantes putativas al fenotipo silvestre causó retraso en el proceso al tener que montar nuevos ensayos para indagar un poco acerca de lo que sucedía.

El trabajo con *psD* y *exoQ* se realizó en paralelo y tomó alrededor de 4 semanas, lo que habla de tiempos optimizados para generar mutantes por inactivación de genes.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1), 39.
- Briones Martín del Campo, M. C. (2008). *Construcción de un vector para clonar productos de PCR* (Master's thesis).
- Cardona, S. T., & Valvano, M. A. (2005). An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid*, 54(3), 219-228.
- Casali, N., & Preston, A. (Eds.). (2003). *E. coli plasmid vectors: methods and applications* (Vol. 235). Springer Science & Business Media.
- Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2014). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 723-728.
- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., & Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature communications*, 3, 945.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Tsang, S., Cho, G., & Little, E. (1996). Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*, 271(5248), 470-477.
- Ferretti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., ... & Lai, H. S. (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(8), 4658-4663.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., & Hoch, J. A. (1983). Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 153(3), 1424-1431.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343.
- González-Silva, N., López-Lara, I. M., Reyes-Lamothe, R., Taylor, A. M., Sumpton, D., Thomas-Oates, J., & Geiger, O. (2011). The dioxygenase-encoding *olsD* gene from

*Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry*, 50(29), 6396-6408.

- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning: a practical approach*, 1, 109-135.
- Holden, M. T., Seth-Smith, H. M., Crossman, L. C., Sebahia, M., Bentley, S. D., Cerdeño-Tárraga, A. M., ... & Cherevach, I. (2009). The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *Journal of bacteriology*, 191(1), 261-277.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Cradick, T. J. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827.
- Hunt, T. A., Kooi, C., Sokol, P. A., & Valvano, M. A. (2004). Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival in vivo. *Infection and immunity*, 72(7), 4010-4022.
- Hwang, H. H., Wu, E. T., Liu, S. Y., Chang, S. C., Tzeng, K. C., & Kado, C. I. (2013). Characterization and host range of five tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains and possible application in plant transient transformation assays. *Plant Pathology*, 62(6), 1384-1397.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., ... & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), 227.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Kanner, L., & Hanawalt, P. (1970). Repair deficiency in a bacterial mutant defective in DNA polymerase. *Biochemical and biophysical research communications*, 39(1), 149-155.

- Keith, K. E., Killip, L., He, P., Moran, G. R., & Valvano, M. A. (2007). *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9057-9065.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175-176.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, 16(5), 800-802.
- Ledford, H. (2016). CRISPR: gene editing is just the beginning. *Nature News*, 531(7593), 156.
- Lee, J. H., Skowron, P. M., Rutkowska, S. M., Hong, S. S., & Kim, S. C. (1996). Sequential amplification of cloned DNA as tandem multimers using class-IIIS restriction enzymes. *Genetic analysis: biomolecular engineering*, 13(6), 139-145.
- Lehninger A (1975) *Biochemistry* (Worth Publishers, N.Y. NY).
- MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (1991). Use of *Escherichia coli* (E. coli) lacZ ( $\beta$ -Galactosidase) as a Reporter Gene. In *Gene transfer and expression protocols* (pp. 217-235). Humana Press.
- Mahfouz, M. M., Piatek, A., & Stewart Jr, C. N. (2014). Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant biotechnology journal*, 12(8), 1006-1014.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... & Van Der Oost, J. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467.
- Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods*, 10(10), 957.
- Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods*, 10(10), 957.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36(1), 244-246.
- Mojica, F. J., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Moser, F. (s.f.) Gibson Assembly Cloning. *Addgene*.  
<https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/>

- Moser, F., Horwitz, A., Chen, J., Lim, W. A., & Voigt, C. A. (2013). Genetic sensor for strong methylating compounds. *ACS synthetic biology*, 2(10), 614-624.
- New England Biolabs (s.f.), Golden Gate Assembly. *Neb.* <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly>
- New England Biolabs, (2017), Gibson Assembly® Master Mix Instruction Manual. *New England Biolabs*. NEB #E2611S/L 10/50 reactions Version 5.0 8/18
- Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2014). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(3), 389-400.
- Painter, P. R. (1975). Mutator genes and selection for the mutation rate in bacteria. *Genetics*, 79(4), 649-660.
- Popa, R., & Nealson, K. H. (2014). *U.S. Patent No. 8,815,539*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635-700.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281.
- Reichmann, N. T., & Gründling, A. (2011). Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS microbiology letters*, 319(2), 97-105.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud pública de México*, 44, 464-475.
- Sciaky, D., Montoya, A. L., & Chilton, M. D. (1978). Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid*, 1(2), 238-253.
- Scior, A., Preissler, S., Koch, M., & Deuerling, E. (2011). Directed PCR-free engineering of highly repetitive DNA sequences. *BMC Biotechnology*, 11(1), 87.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133-159.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Djemia, H. B., & Gay, P. (1983). Analyse génétique de *sacB*, gène de structure d'une enzyme sécrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. *Molecular and General Genetics MGG*, 191(1), 138-144.
- Strizhkov, B. N., Drobyshev, A. L., Mikhailovich, V. M., & Mirzabekov, A. D. (2000). PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of

- bacterial toxin-and drug-resistant genes and their mutations. *Biotechniques*, 29(4), 844-857.
- Tatum, E. L. (1945). X-ray induced mutant strains of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 31(8), 215.
- Tatum, E. L., & Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 53(6), 673.
- Thurtle-Schmidt, D. M., & Lo, T. W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2), 195-205.
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Bermúdez-Barrientos, J. R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2013). *Agrobacteria* lacking ornithine lipids induce more rapid tumour formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 895-906.
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Escobedo-Hinojosa, W. I., Bermúdez-Barrientos, J. R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environmental Microbiology*, 17(5), 1487-1496. 2 lomo cue felipe
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Ormeño-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I. M., Martínez-Romero, E., & Sohlenkamp, C. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1496-1514.
- VGP. (2014) *Xenbase* <https://www.xenbase.org/other/static/CRISPR.jsp>
- Voelker, D. R. (1997). Phosphatidylserine decarboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1348(1-2), 236-244.
- Wang, H., Qiao, Y., Chai, B., Qiu, C., & Chen, X. (2015). Identification and molecular characterization of the homogentisate pathway responsible for pyomelanin production, the major melanin constituents in *Aeromonas media* WS. *PLoS One*, 10(3), e0120923.
- Wang, Y., & Taylor, D. E. (1990). Natural transformation in *Campylobacter* species. *Journal of bacteriology*, 172(2), 949-955.
- Weissenmayer, B., Gao, J. L., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2002). Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Molecular microbiology*, 45(3), 721-733.
- Witkin, E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews*, 40(4), 869.

- Wright, A. C., Simpson, L. M., Oliver, J. D., & Morris, J. G. (1990). Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*, *58*(6), 1769-1773.
- Yao, S. Y., Luo, L., Har, K. J., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G. Q., ... & Cheng, H. P. (2004). *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *Journal of Bacteriology*, *186*(18), 6042-6049.
- Youle, M. (2011) Six Questions About CRISPRs. *Small things considered*. <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/04/six-questions-about-crisprs.html>
- Zughaier, S. M., Ryley, H. C., & Jackson, S. K. (1999). A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. *Infection and immunity*, *67*(2), 908-913.



## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Golden Gate Assembly

Protocolo detallado para ensamble de plásmidos

1. Seleccionar un protoespaciador de interés de 20 nt. El PAM 3' debe ser NGG, donde N es cualquier nucleótido. Dar preferencia a:
  - a. Secuencias con purinas ocupando los últimos 4 sitios (3') del protoespaciador.
  - b. Secuencias en la cadena no codificante.
  - c. Secuencias en las cuales las últimas 12 nt del protoespaciador + 3 nt PAM (15 nt en total) sean únicos en el genoma (revisar por BLAST con todas las secuencias NGG posibles).
2. Diseñar dos oligonucleótidos de 24 nt (4 nt 5' + 20 nt de la secuencia del espaciador) con los extremos pegajosos ACGC en el oligo forward y AAAC en el oligo reverse.
3. Templar los espaciadores
  - a. Resuspender ambos oligos en 100  $\mu$ M de agua
  - b. Mezclar 5  $\mu$ l oligo forward + 5  $\mu$ l oligo reverse + 90  $\mu$ l 30mM buffer HEPES, pH 7.8
  - c. Calentar a 95°C por 5 min, después bajar a 4°C.
4. Insertar los espaciadores por Golden Gate Assembly

Mezcla para la reacción de Golden Gate

Plásmido	X $\mu$ l	100 ng
Inserto	0.3 $\mu$ l	Del stock de oligos templados de 100 $\mu$ M
Buffer T4 Ligasa (NEB)	2 $\mu$ l	
T4 ligasa (NEB)	1 $\mu$ l	añadir al final
BbsI (NEB)	1 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	Y $\mu$ l	
	<hr/>	
	20 $\mu$ l	

Programa Golden Gate:

37°C 10 min

16°C 10 min

Regresar al paso 1, 9 veces

50°C, 5 min

65°C, 20 min

4°C,  $\infty$

Tomado de: Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2014). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 723-728.

## ANEXO 2

### Diseño de oligonucleótidos para Gibson Assembly

Cuando deseamos insertar una secuencia de ADN dentro de un plásmido sin dejar cicatrices podemos emplear la técnica de Gibson Assembly donde a través de la acción de 3 enzimas podemos crear el ensamble.

Los oligonucleótidos para Gibson Assembly se diseñan de la siguiente manera

- Si ambas partes a ensamblar son productos de PCR se siguen los siguientes pasos:
  - (I) Tomar los últimos 30 nt del fragmento 1 y tomar los primeros 30 nt de la secuencia a insertar.

Ejemplo:

Plásmido pBBR1MCS-03, posición 3302

5'---GTCCT CGCCG AAAAT GACCC AGAGC GCTGC CGGCA ---3'

3'---CAGGA GCGGC TTTTA CTGGG TCTCG CGACG GCCGT—5'

Gen *sacB*

5'---ATGAA CATCA AGAAG TTCGC CAAGC AGGCC---3'

3'---TACTT GTAGT TCTTC AAGCG GTTCG TCCGG---5'

- (II) Seleccionar los últimos 20 nt de la primera secuencia, en este caso, el plásmido pBBR1MCS-3, ajustar si es necesario para dejar en el extremo un enlace G-C

5'---GACCC AGAGC GCTGC CGGCA---3'

- (III) Seleccionar los primeros 20 nt de la segunda secuencia, en este caso, el gen *sacB*, ajustar si es necesario para dejar en el extremo un enlace G-C

5'---ATGAA CATCA AGAAG TTC---3'

(IV) Unir ambas secuencias

5'---GACCC AGAGC GCTGC CGGCA ATGAA CATCA AGAAG TTC---3'

(V) Obtener la cadena complementaria

3'---CTGGG TCTCG CGACG GCCGT TACTT GTAGT TCTTC AAG---5'

De manera que tenemos un 1er par de oligonucleótidos:

5'---GACCC AGAGC GCTGC CGGCA ATGAA CATCA AGAAG TTC---3'

3'---CTGGG TCTCG CGACG GCCGT TACTT GTAGT TCTTC AAG---5'

(VI) El segundo par actúa sobre la cadena 3' → 5' por lo tanto necesitamos obtener la cadena reversa:

5'---GAA CTTCT TGATG TTCAT TGCCG GCAGC GCTCT GGGTC---3'

El 2º par de oligonucleótidos queda como:

5'---GAA CTTCT TGATG TTCAT TGCCG GCAGC GCTCT GGGTC---3'

3'---CTT GAAGA ACTAC AAGTA ACGGC CGTCG CGAGA CCCAG---5'

(VII) Repetir el proceso con el otro extremo del gen *sacB* con el extremo que está libre del plásmido pBBR1MCS-03

- Si los fragmentos a ensamblar tienen entre ellos un sitio de restricción el proceso es el siguiente:

(I) Hay que cuidar que el sitio de la enzima esté presente una sola ocasión en el vector y el inserto. Tomar los últimos 30 nt del fragmento a ensamblar:

5'---GACGC CAACG ACAGC ATCCT GAAGG ACCAG---3'

3'---CTGCG GTTGC TGTCG TAGGA CTTCC TGGTC---5'

- (II) Tomar la secuencia del sitio de restricción

*XhoI*:

C<sup>^</sup>TCGAG

G<sup>^</sup>AGCTC

- (III) Tomar los primeros 30 nt del fragmento posterior a ensamblar:

5'---ACGAG TTGCA TGATA AAGAA GACAG TCATA---3'

3'---TGCTC AACGT ACTAT TTCTT CTGTC AGTAT---5'

- (IV) Seleccionar los últimos 20 nt de la primera secuencia, ajustar si es necesario para dejar en el extremo un enlace G-C y los primeros 20 nt de la otra secuencia. Colocar entre ellas el sitio de restricción.

De modo que se tiene un 3er par de oligonucleótidos:

5'---CAGC ATCCT GAAGG ACCAG C<sup>^</sup>TCGAG ACGAG TTGCA TGATA AAG---3'

3'--- GTCG TAGGA CTTCC TGGTC G<sup>^</sup>AGCTC TGCTC AACGT ACTAT TTC---5'

- (V) Generar el par sobre la cadena 3' → 5' a través de su reversa

4º par de oligonucleótidos:

5'---CTT TATCA TGCAA CTCGT C<sup>^</sup>TCGAG CTGGT CCTTC AGGAT GCTG---3'

3'---GAA ATAGT ACGTT GAGCA G<sup>^</sup>AGCTC GACCA GGAAG TCCTA CGAC---5'

Nota\* Se repiten los pasos para cada uno de los fragmentos a ensamblar en cada uno de los extremos, ya sea que se tengan productos de PCR o sitios de restricción.

## ANEXO 3

### Preparación gel de acrilamida 12%

#### Reactivos

##### Running gel

Acrilamida-bis 30%	2.88 ml
4X Buffer Running	1.8 ml
SDS 10%	72 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MQ	2.44 ml
Persulfato de amonio 10%	36 $\mu$ l
TEMED	4.8 $\mu$ l

##### Stacking gel

Acrilamida-bis 30%	480 $\mu$ l
4X Buffer Running	900 $\mu$ l
SDS 10%	3.6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MQ	2.16 ml
Persulfato de amonio 10%	21 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l

##### 1X tank Buffer

Tris 1.5 M	3 g
Glicerol 100% (p/V)	14.4 g
SDS 10%	1 g
H <sub>2</sub> O MQ	1 L

## Procedimiento

1. Mezclar los reactivos del stacking gel, dejando por último al persulfato de amonio y TEMED.
2. Preparar el molde para el gel. Hacer una marca a ~1-1.5 cm debajo del nivel del "peine" de muestras. Retirar el peine.
3. Verter la solución en los vidrios (molde), hasta la marca hecha en el paso #2, sin atrapar burbujas. Eliminar la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada o de isobutanol, depositada muy suavemente sobre la mezcla. Dejar que polimerice el gel (óptimamente en 15-20 min).
4. Una vez que la interfase entre el polímero y el agua se torna visible, esperar 10-15 min adicionales para que se complete la reacción. Luego, decantar el exceso de líquido de la superficie, y colocar el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas).
5. Mezclar los componentes del gel superior (stacking).
6. Una vez agregados los catalizadores, mezclar y verter de inmediato en el molde, nivelando ahora el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Dejar polimerizar.
7. Quitar el peine deslizándolo suavemente, y lavar los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa. Esto elimina residuos de componentes no polimerizados.
8. Preparar las muestras con el respectivo buffer de carga.
9. Cargar las muestras en los pozos (es fundamental realizar este paso sin que haya contaminaciones cruzadas entre los distintos hoyos. Incluir marcadores de PM en uno de los carriles, como referencia).
10. Llenar la cámara con el buffer tank.

Tomado de: Lomonte, B. (2001). Electroforesis en gel de poliacrilamida. *Inmunología General. Manual de Laboratorio. Universidad Politécnica de Cataluña, España*, 92-96.