



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPLEMENTACIÓN DEL
SISTEMA CRISPR-Cas9
EN LA EDICIÓN GENÉTICA
DE LA LEVADURA
Debaryomyces hansenii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ALBERTO ZAMORA BELLO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Zamora

Bello

Alberto

56 13 14 01

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312028578

2. Datos del tutor

Dr

James Enrique

González

Flores

3. Datos del sinodal 1

Dra

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

M en Bioética

José Antonio

Alonso

Pavón

5. Datos del sinodal 3

Dra

Norma Silvia

Sánchez

Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dr

Alejandro

Flores

Alanis

7. Datos del trabajo escrito

Implementación del sistema CRISPR-Cas9 en la edición genética de la levadura *Debar-*
yomyces hansenii

77 páginas

2019

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la tutoría del Dr. James Enrique González Flores.

Agradezco a la Dra. Claudia Segal Kischinevzky por la retroalimentación recibida durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a la Química Viviana Escobar Sánchez, a la Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno y a la Dra. Edén Marcela Rodríguez Flores por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco en especial a la M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez y al Dr. Antonio Peña, del Instituto de Fisiología Celular, por su generosidad y valioso apoyo para desarrollar varios experimentos fundamentales.

Agradezco a los ingenieros Aurey Galván y Manuel Ortíz del taller del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo técnico brindado.

Agradezco a la Dra. Lucero Romero Aguilar de la Facultad de Medicina por el entrenamiento necesario para la preparación de muestras en microscopía confocal y al Dr. Miguel Tapia Rodríguez del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su gran apoyo técnico en la unidad de de microscopía confocal.

Agradezco a la Dra. Almudena Fernández López del laboratorio del Dr. Lluís Montoliu del Centro Nacional de Biotecnología, España, por haber proporcionado el protocolo de actividad de Cas9.

Agradezco al Dr. Nicolas Papon, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Université Bretagne-Loire, Francia, por proporcionarnos el plásmido pAYCU244.

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo PAPIIT con número IA208820.

Agradecimientos

A mi madre. Más que nada, gracias a ella soy todo lo que soy y todo lo que seré.

A toda mi familia. Su cariño y apoyo que se que nunca me hará falta. A mi tía Caro y mi tío Mario, en especial. No hay palabras capaces de describir mi agradecimiento.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica que me abrió sus puertas.

A James, que se encargó de esta etapa de mi formación, brindándome su experiencia y todo el apoyo, a veces más allá de las limitaciones. A Fernanda, sin ella este trabajo habría sido muy lento, aburrido y más difícil. Verdaderos “magnates de la ciencia.”

A Viviana y a Claudia, los catalizadores de la reacción que fue esta tesis, sin ustedes no habría sido posible en principio. A todos en el laboratorio, de todos ustedes he aprendido algo que atesoro. Espero que en este tiempo hayan podido rescatar de mi algo útil o al menos curioso.

A Pepe, Adhemar y Mario. De ustedes aprendí más de lo que pueden imaginar y me brindaron un apoyo que considero invaluable. Adhemar estará por siempre en mi pensamiento sin importar el tiempo.

A mis sinodales que revisaron y corrigieron esta tesis. El proceso de formación nunca termina, y su labor fue una parte esencial en la mía. En especial a Norma, que a través del desarrollo de este trabajo nos apoyó no solamente como colega sino también como amiga.

A los profesores y profesoras cuyas clases tuve el privilegio de presenciar. A quienes nos han apoyado a mi madre y a mí a través de los años.

A todas las personas maravillosas que han formado parte mi vida. A Daniel, maldito suertudo. A los amigos que están, estuvieron, y estarán conmigo. Si alguna vez reí o lloré frente a ustedes tienen un lugar aquí. Continuen ante la adversidad, regocíjense en la prosperidad. El infierno son ustedes.

A quien lea esta humilde contribución al conocimiento humano. Adentrarse en la profundidad de lo desconocido es la única manera de traer luz a nuestra confusa existencia. En esta búsqueda por el conocimiento nadie está solo.

A las personas alrededor del mundo que luchan por la libertad del pensamiento y la ciencia. Hombres y mujeres que defienden el futuro. A Sci-Hub y a Genesis Library, proyectos sin los cuales no habría sido capaz de realizar este trabajo. Al software libre y open source. A la piratería informática. Al electroporador que murió durante estos experimentos.

A la música. A las futuras generaciones y el porvenir de la humanidad. A la esperanza de un futuro mejor que el que nos fue prometido.

“La ciencia es una actividad esencialmente anarquista.”

Paul Feyerabend

Tabla de Contenidos

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. <i>Debaryomyces hansenii</i> : una levadura no convencional	2
1.2. Manipulación genética en levaduras	5
1.2.1. Modificación genética mediante la reparación del DNA	5
1.2.2. De la PCR a las meganucleasas	9
1.3. El sistema CRISPR-Cas: edición genética de precisión	9
1.3.1. CRISPR-Cas9 en levaduras convencionales y no convencionales	14
2. Justificación	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	18
5. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Cepas usadas	20
6.2. Medios de cultivo	20
6.3. Plásmidos utilizados en este estudio	21
6.4. Diseño de oligonucleótidos	23
6.5. Diseño del RNA guía para implementar CRISPR-Cas9	23
6.6. Análisis de hibridación de los oligonucleótidos mediante MUSCLE	24
6.7. Ensamblaje de los complejos riboprotéicos Cas9:gRNA	26
6.8. Prueba de actividad <i>in vitro</i> de gRNA y Cas9	27
6.9. Protocolos de transformación	28

6.9.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
6.9.2. Transformación de <i>Debaryomyces hansenii</i>	29
6.10. Observación de colonias transformantes mediante microscopía confocal . . .	33
6.11. Construcción y purificación del <i>cassette</i> de reparación	33
7. Resultados	34
7.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con el plásmido pYES2 mediante electroporación (control experimental)	34
7.2. Transformación de <i>Debaryomyces hansenii</i> con el plásmido pAYCU244 mediante electroporación	35
7.3. Prueba de actividad <i>in vitro</i> de gRNA y Cas9	39
7.4. Implementación del sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en <i>Debaryomyces hansenii</i>	41
7.4.1. Transformación de <i>Debaryomyces hansenii</i> mediante RNP para generar colonias auxótrofas de uracilo	41
7.5. Predicción <i>in silico</i> de las posibles mutaciones generadas en el gen <i>DhURA3</i> mediante inDelphi	44
7.6. Construcción del <i>cassette</i> para reemplazar el gen <i>DhURA3</i> mediante el sistema de reparación homóloga	45
7.6.1. Primera estrategia de construcción del <i>cassette</i> de reparación	46
7.6.2. Segunda estrategia de construcción del <i>cassette</i> de reparación	48
8. Discusiones	53
8.1. Permeabilización de la pared celular de <i>D. hansenii</i>	54
8.2. <i>D. hansenii</i> fue transformada con el plásmido optimizado pAYCU244	55
8.3. <i>D. hansenii</i> fue electroporada con el complejo Cas9:gRNA y se lograron obtener colonias mutantes	55
8.4. Construcción del <i>cassette</i> de recombinación para reemplazar el gen <i>DhURA3</i>	56

9. Conclusiones	57
10.Perspectivas	59
11.Referencias	60

Resumen

Debaryomyces hansenii es una levadura no convencional con alto potencial biotecnológico. Sin embargo, el aprovechamiento de su potencial genético ha sido prácticamente nulo debido a las limitaciones que presentan la manipulación genética y el uso de diferencial del codón CTG. CRISPR-Cas9 es un sistema enzimático capaz de realizar cortes en el DNA de manera precisa y dirigida que está revolucionando la edición genética en levaduras no convencionales. El objetivo de este trabajo fue generar una mutante auxótrofa de uracilo mediante el sistema CRISPR-Cas9 vía complejos riboprotéicos en la levadura *D. hansenii*. Los resultados de esta investigación muestran los parámetros y la estandarización de un protocolo de permeabilización y transformación para *D. hansenii* con el plásmido pAYCU244 que confiere resistencia a nourseotricina y contiene la secuencia del gen YFP que codifica para la proteína amarilla fluorescente. El protocolo estandarizado fue utilizado para electroporar a *D. hansenii* con el complejo Cas9-*DhURA3*gRNA y generar mutaciones en el locus *DhURA3*, que codifica para la enzima descarboxilasa de orotidina 5'-fosfato, involucrada en la síntesis de uracilo. Este método permitió seleccionar colonias auxótrofas de uracilo en medio mínimo con 5-FOA. En conclusión, se estandarizó un protocolo para transformar y generar mutaciones mediante el sistema CRISPR-CAS9 en *D. hansenii*.

1. Introducción

1.1. *Debaryomyces hansenii*: una levadura no convencional

Una levadura se considera no convencional cuando no es *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. La denominación de “no convencional” engloba a la mayor cantidad de levaduras existentes y por lo tanto es un grupo sumamente heterogéneo. *S. cerevisiae* es el principal modelo de estudio en levaduras debido a su facilidad de manipulación en comparación a levaduras no convencionales que igualmente poseen un gran potencial biotecnológico, tales como *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* o *Debaryomyces hansenii* (Prista, Michán, Miranda, & Ramos, 2016; Wagner & Alper, 2015).

Debaryomyces hansenii es una levadura que habita usualmente en alimentos salados y en ambientes salinos como el agua marina, de donde fue aislada por primera vez (Norkrans, 1966). Se ha encontrado en suelos y en alimentos como carne, quesos, vino, cerveza y fruta, así como productos con altas cantidades de azúcar (Breuer & Harms, 2006; Prista, Loureiro-Dias, Montiel, García, & Ramos, 2005). Esto hace de *D. hansenii* un organismo de gran interés biotecnológico, ya que es una especie altamente heterogénea con variaciones fenotípicas entre cepas y diferencias en cuanto a su capacidad para asimilar y fermentar distintas fuentes de carbono, actividades diversas de lipasas y proteasas, así como un crecimiento óptimo bajo distintas condiciones nutrimentales (Petersen & Jespersen, 2004). El rasgo fisiológico de *D. hansenii* más caracterizado es su halotolerancia, el cual le permite sobrevivir en condiciones de hasta 4 M de NaCl (en comparación con *S. cerevisiae* que soporta condiciones de hasta 1.7 M) (Onishi, 1963); sin embargo, este rasgo no se ha caracterizado genéticamente. Esta levadura es también osmo- y xerotolerante, además de tolerar un alto quimioestrés, por lo que en cultivo se pueden usar altas concentraciones de varios sustratos. Crece de manera óptima entre 20 y 25 °C; sin embargo, también se ha reportado su crecimiento a temperaturas de entre 5 y 10 °C o incluso bajo 0 °C (Breuer & Harms, 2006). Así como otras levaduras, puede contaminar alimentos con baja concentración de agua. Se le encuentra comúnmente en aguas

hipersalinas, y puede estar en cultivo de hasta 25 % de NaCl o 18 % de glicerol (Breuer & Harms, 2006). Es altamente resistente a compuestos con actividad antibiótica como penco-nazol, y medianamente resistente a benomil y cicloheximida o compuestos biocidas como el ClO₂ (Ramírez-Orozco, Hernández-Saavedra, & Ochoa, 2001). La concentración inhibitoria mínima de antibióticos como fluconazol y anfotericina B es mayor para *D. hansenii* en comparación a *Candida albicans* (Prista et al., 2016). No hay reportes confirmados de infección a humanos por *D. hansenii*, ya que los casos reportados muy probablemente se deben a su identificación errónea cuando en realidad se trataba de especies de *Pichia* o *Candida*, esto debido a la identificación por parámetros fenotípicos y no por secuenciación de las muestras aisladas (Desnos-Ollivier et al., 2008). *D. hansenii* es capaz de generar toxinas antifúngicas, las cuales son estables a temperatura corporal humana, por lo que es de potencial interés en la medicina o en la agricultura como agente de biocontrol contra patógenos como *Penicillium digitatum* entre otros (Breuer & Harms, 2006; Buzzini & Martini, 2001; Droby, Chalutz, Wilson, & Wisniewski, 2009). En la industria alimentaria y biotecnológica, hay un particular interés por *D. hansenii* para la maduración de alimentos o la producción de biocombustibles, pues sintetiza una gran cantidad de lípidos, entre ellos ácidos grasos libres, característica que la define como una levadura oleaginoso junto a especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, entre otras (Breuer & Harms, 2006; Lamers, et al., 2016). *D. hansenii* es capaz de producir diversas enzimas como β -glucosidasas, esterasas e inulinasas, además de producir alcoholes a partir de pentosas como la arabinosa (Johnson & Echavarrri-Erasun, 2011). No obstante, debido a la falta de herramientas moleculares para la manipulación de este organismo y la alta heterogeneidad genética entre cepas, la investigación y aplicación ha sido limitada.

Debaryomyces hansenii pertenece al clado CTG dentro de los ascomicetos, el cual es un grupo de distintas especies como *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia stipitis* y una gran cantidad de especies de *Candida*, incluyendo a *C. albicans*, que traducen de manera diferencial el codón CUG como serina en lugar de leucina debido a un tRNA_{CAG} único (Prista et al., 2016).

Algunas especies de este grupo son patógenas (e.g. algunos miembros del género *Candida*), mientras que otras como *D. hansenii* tienen potencial biotecnológico. La traducción diferencial del codón CUG es uno de los obstáculos en el desarrollo de herramientas moleculares eficientes en *D. hansenii*, dado que otorga a las levaduras del clado CTG la posibilidad de expresar una gran cantidad de proteínas distintas codificadas en un mismo gen (Prista et al., 2016). En levaduras patógenas como *C. albicans*, la traducción diferencial del codón CUG se asocia a inicio de eventos de virulencia, cambios fenotípicos, morfogénesis, resistencia a drogas y producción extracelular de hidrolasas (Turner & Butler, 2014), por lo que en *D. hansenii* podría estar asociada a la adaptación a su medio ambiente. En especial su osmo- y halotolerancia características, así como su capacidad de crecer a bajas temperaturas, comentadas previamente (Prista et al., 2016). Para superar la limitación a la manipulación genética que presenta el uso diferencial del codón CTG en *D. hansenii* y otras levaduras, es necesario utilizar secuencias optimizadas para la especie en cuestión cuando el gen de interés es un transgen. Esto se ha llevado a cabo en distintas levaduras del clado CTG, desde *C. albicans* hasta *C. lusitaniae* y *C. auris* (Grahl, Demers, Crocker, & Hogan, 2017), así como en el desarrollo de un grupo de plásmidos con el gen de resistencia a estreptomycin y nourseotricina (*SAT1*) junto a distintos marcadores fluorescentes optimizados para varias especies del clado CTG, entre ellas *D. hansenii* (Defosse et al., 2018). Sin embargo, la heterogeneidad de cepas de *D. hansenii* hace que incluso estas herramientas se limiten al fondo genético de cada cepa, por lo que los métodos de manipulación genética de precisión como CRISPR-Cas9 son prometedores en la generación de una herramienta molecular independientemente de la cepa con la que se trabaje (Raschmanová, Weninger, Glieder, Kovar, & Vogl, 2018).

1.2. Manipulación genética en levaduras

1.2.1. Modificación genética mediante la reparación del DNA

El daño al DNA en forma de rupturas de doble cadena (DSB, **D**ouble **S**trand **B**reaks), puede tener fuentes tanto metabólicas como ambientales, especies reactivas del oxígeno, radiación ionizante, agentes químicos o estrés mecánico en los cromosomas (Khanna & Jackson, 2001). La célula en general, posee mecanismos para contender con este tipo de daño, de los cuales los principales son la reparación por unión de extremos no idénticos (NHEJ, **N**on **H**omologous **E**nd **J**oining) y la reparación dirigida por identidad (HDR, **H**omology **D**irected **R**epair) (**Figura 1**).

La reparación por NHEJ es la manera más común dentro de la célula para reparar el daño al DNA ya que no requiere de un molde de reparación. La reparación por NHEJ depende de las proteínas inicialmente de las proteínas Ku. Tanto en procariontes como eucariontes, estas proteínas se encuentran conservadas y siempre forman un heterodímero. En mamíferos la vía clásica involucra la unión del heterodímero Ku70/80 al DNA y la formación de un complejo con la subunidad DNA-Pkcs el cual regula distintos eventos de fosforilación, entre ellos la fosforilación de la nucleasa ARTEMIS.

Ya que distintas fuentes de daño al DNA pueden provocar DSB con estructuras no compatibles para su ligación directa, en este punto puede ocurrir un procesamiento nucleolítico de ambos extremos por ARTEMIS o el llenado de huecos en la secuencia de DNA por la DNA polimerasa μ o λ (Dudášová, Dudáš & Chovanec, 2004; Davis & Chen, 2013). La ligación directa de los extremos de DNA por la DNA ligasa IV en complejo con XRCC4 es el proceso básico de reparación por NHEJ, donde el complejo de reparación cierra la ruptura de la cadena de DNA ligando los extremos compatibles (Dudášová, Dudáš & Chovanec, 2004). Si hubo un procesado de los extremos, la reparación puede provocar mutaciones por inserciones o deleciones, así como la incorporación no específica de DNA exógeno (Daley, Palmbo, Wu, & Wilson, 2005). En *S. cerevisiae* la vía canónica de reparación por NHEJ involucra a las

proteínas Ku correspondientes de levadura, denominadas Yku70/80. El heterodímero Yku interactúa con el complejo Mre11/Rad50/Xrs2, formando un puente entre ambos extremos del DNA dañado y promoviendo su estabilidad, de la misma manera que el complejo Ku70/80 DNA-Pkcs (Arras & Fraser, 2016). El procesado de los extremos ocurre gracias a la acción nucleolítica de Rad27 y el rellenado de huecos en la secuencia por la DNA polimerasa 4, similar a la acción de ARTEMIS y la DNA polimerasa λ (Daley, Palmbo, Wu, & Wilson, 2005). Finalmente, el paso de ligación de los extremos de DNA ocurre por la acción del DNA ligasa 4, similar a la NHEJ en mamíferos, en complejo con Lif1 y Nej1, las cuales llevan a cabo una función similar a XRCC4 (Daley, Palmbo, Wu, & Wilson, 2005; Dudášová, Dudáš & Chovanec, 2004; Emerson & Bertuch, 2016).

La reparación por HDR requiere la presencia de un molde de recombinación que usualmente es idéntica a la secuencia dañada. Cuando se da un DSB inicia el proceso de resección, el cual es la degradación nucleolítica de los extremos de la cadena de DNA en sentido 5' a 3', lo que da como resultado una cadena sencilla 3', libre para el reclutamiento de la maquinaria de reparación (Liu & Huang, 2016). En mamíferos, el complejo MRE11/RAD50/NSB1 es homólogo al complejo Mre11/Rad50/Xrs en levaduras, sin embargo su función solo encuentra en el inicio de la resección de la cadena durante el HDR y no se ha demostrado que tenga papel alguno en la NHEJ (Dudášová, Dudáš & Chovanec, 2004). En levaduras, este complejo no solamente permite la estabilidad de los extremos rotos de la cadena de DNA durante la NHEJ, sino que también tiene un papel crucial en la resección de la cadena junto con EXO1 y Sae2, además de la helicasa Sgs1 (Verma & Greenberg, 2016). La cadena 3' libre recluta a Rad51, gracias a la unión de RPA al DNA, formando un filamento nucleoproteico. RPA elimina estructuras secundarias del DNA, sin embargo también inhibe la nucleación de Rad51, por lo que para la unión de Rad51 al DNA es necesaria la participación de cofactores como Rad57 y Rad52. El filamento de Rad51 invade al DNA molde, formando un heteroduplex intermediario denominado "bucle D". A su vez, el otro extremo de la cadena rota invade o se alinea con el DNA molde gracias a Rad52 (Guirouilh-Barbat, Lambert, Bertrand &

Lopez, 2014; Jasin & Rothstein, 2018). Esto activa la síntesis de la cadena invasora a partir del molde de reparación, formando uniones de Holliday. El producto sintetizado se puede disolver formando secuencias sin *crossover* por la acción de BLM-TOPOIII α o una nucleasa sitio específica, o en secuencias con *crossover* por la Resolvasa A (Li & Heyer, 2008).

Estos mecanismos son aprovechados para la manipulación genética de distintos organismos, ya que permiten introducir mutaciones o realizar el reemplazo de genes de manera específica. En *S. cerevisiae*, en especial, hay altas tasas de HDR por lo que la integración de secuencias idénticas a su genoma se lleva a cabo de manera eficiente (David & Siewers, 2015).

Ambos mecanismos compiten entre sí. La liberación o resección de la cadena 3' terminal se requiere como primer paso de la HDR y permite la invasión de una secuencia homóloga para su reparación, mientras que la NHEJ requiere la generación de extremos romos en la doble hebra del DNA. De esta manera, la NHEJ y la HDR compiten directamente en la reparación del daño al DNA y por tanto en el proceso de incorporar material genético exógeno (Arras & Fraser, 2016; Daley, Palmbo, Wu, & Wilson, 2005; Davis & Chen, 2013; Liu & Huang, 2016).

La competencia entre ambos mecanismos de reparación representa un problema al incorporar secuencias exógenas al organismo en cuestión, ya que el dominio de la NHEJ provoca la inserción inespecífica de las secuencias en el genoma y por lo tanto puede tener efectos deletéreos o la imposibilidad de expresar la secuencia integrada debido a la topología del DNA. Para superar esta limitante, una de las principales estrategias es promover la HDR al generar mutantes deficientes de la NHEJ, por ejemplo, al eliminar genes importantes para la NHEJ como las proteínas Ku70/Ku80, o su inhibición transitoria mediante agentes químicos. Esto se ha realizado tanto en células de mamíferos como en levaduras convencionales y no convencionales como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Y. lipolytica* o *Cryptococcus neoformans* (Arras & Fraser, 2016; Prista et al., 2016). Una de las dificultades al manipular el genoma de *D. hansenii* e integrar secuencias a su genoma es la baja tasa de HDR presente en esta levadura.

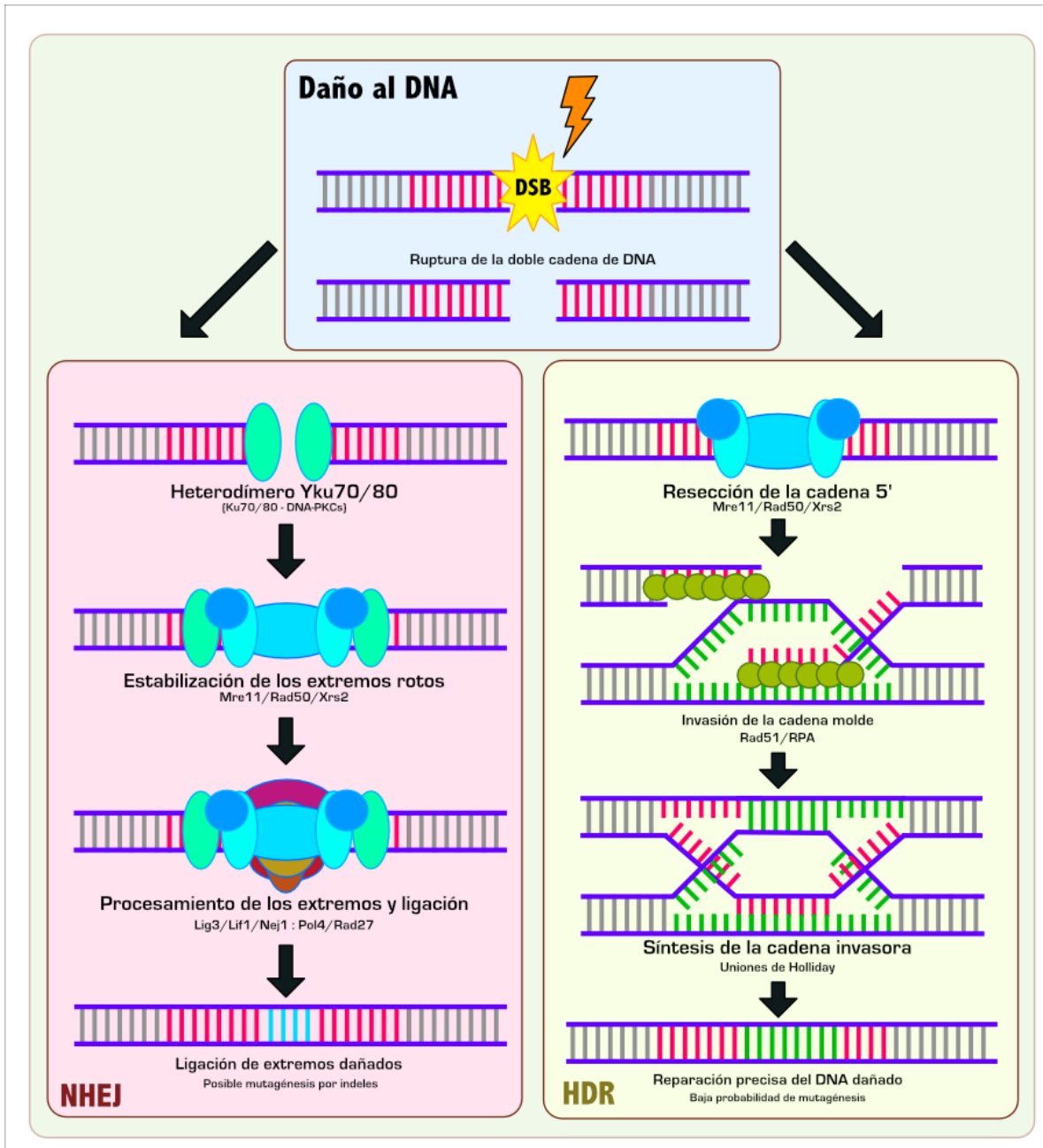


Figura 1: **Mecanismos principales de reparación del daño al DNA.** La reparación por NHEJ es directa y eficiente, sin embargo puede generar mutaciones. La reparación por HDR requiere de un molde de reparación, el cual contiene regiones idénticas al DNA dañado, por lo que disminuye la probabilidad de generar mutaciones.

Sin embargo, *D. hansenii* también posee los genes necesarios tanto de la NHEJ como de la HDR (Richard, Kerrest, Lafontaine, & Dujon, 2005).

1.2.2. De la PCR a las meganucleasas

Los primeros trabajos de recombinación genética en *Saccharomyces cerevisiae* fueron publicados a principios de la década de 1980, y en 1996 su genoma fue secuenciado (Fraczek, Naseeb, & Delneri, 2018). *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son los organismos modelo en la investigación con levaduras. La mayor parte de las herramientas moleculares y de edición genética se han desarrollado en *S. cerevisiae* debido a su facilidad de manipulación, su trazabilidad genética y el hecho de que su genoma se encuentra ampliamente anotado (Wagner & Alper, 2015).

Históricamente, la manipulación genética de *S. cerevisiae* ha sido a través de la selección de genes basada en PCR, integrando construcciones generadas por PCR al genoma de la levadura por diferentes métodos de transformación, esto gracias principalmente a sus altas tasas de HDR (Wach, Brachat, Pohlmann, & Philippsen, 1994). Otros métodos de manipulación genética en levaduras que se basan igualmente en la recombinación homóloga son el sistema de recombinación Cre-Lox, el cual hace uso de la recombinasa sitio-específica Cre y el reconocimiento de secuencias Lox que flanquean el gen de interés y el sistema *Delitto perfetto*, que hace uso de múltiples oligonucleótidos para el gen de interés, o el uso de meganucleasas, que son enzimas de restricción con alta especificidad al sitio que reconocen. Sin embargo, estos sistemas tienen desventajas como que la mutagénesis está restringida a la región del cassette integrado (Fraczek et al., 2018). Nuevas tecnologías de manipulación genética como CRISPR-Cas tienen la capacidad de superar estos obstáculos y generar nuevas herramientas moleculares eficientes.

1.3. El sistema CRISPR-Cas: edición genética de precisión

Uno de los descubrimientos más importantes de la microbiología en las últimas décadas es la existencia de inmunidad adaptativa y hereditaria en procariontes. Uno de los mecanismos por los cuales estos organismos adquieren inmunidad son los sistemas CRISPR-Cas (por sus

siglas en inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Sequences y CRISPR Associated Sequences, respectivamente) que les confieren protección ante infecciones virales (Hille et al., 2018). Los sistemas CRISPR-Cas fueron descritos por primera vez en 1987 y están presentes en aproximadamente el ~50 % de los genomas bacterianos y en alrededor de un ~90 % en los genomas de arqueas. Los sistemas CRISPR-Cas se encuentran formados por uno o varios cassettes génicos de secuencias repetidas y espaciadoras alternadas: el arreglo CRISPR y un cassette de genes cas (Javed et al., 2018) (**Figura 2**).

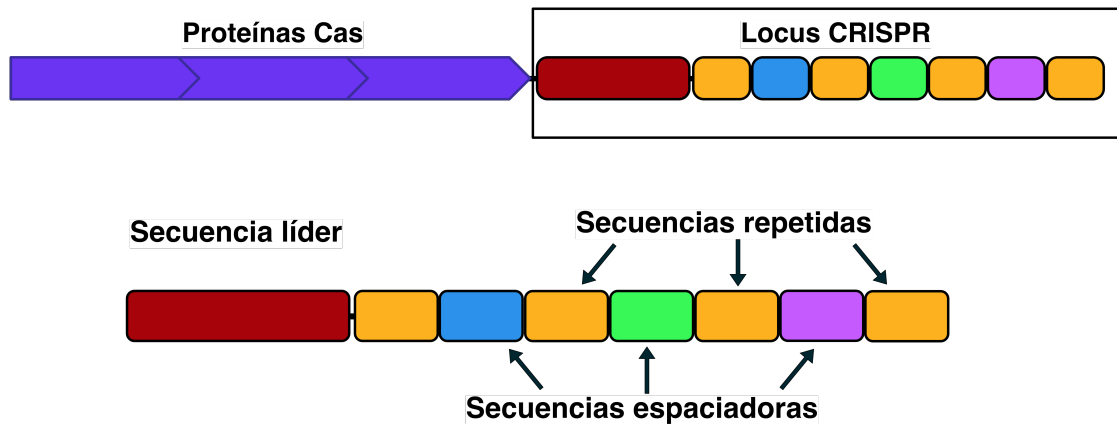


Figura 2: **Estructura general de los sistemas CRISPR-Cas.** El *locus* CRISPR se compone de dos partes principales: el *cassette* de genes *cas* y el arreglo CRISPR. El *cassette* de genes *cas* codifica la maquinaria de interferencia y de adquisición. EL arreglo CRISPR contiene secuencias no codificantes, las cuales se dividen en tres: una secuencia líder, múltiples secuencias palindrónicas repetidas y múltiples secuencias variables o espaciadoras.

Los sistemas CRISPR se clasifican en dos grupos por su relación filogenética: la clase I y la clase II. Cada clase agrupa a tres subsistemas distintos. La clase I comprende los subsistemas I, III y IV. Mientras que la clase II agrupa a los subsistemas tipos II, V y VI. Los subsistemas de la clase I se caracterizan porque su maquinaria de interferencia se compone de un complejo multiprotéico. Esta maquinaria es denominada CASCADE (**CRISPR AS**ociated **C**omplex for **Antiviral DE**fense). A diferencia de la clase I, los subsistemas de la clase II utilizan una sola proteína multidominio como maquinaria de interferencia (Hille et al., 2018).

El arreglo CRISPR se transcribe en RNA pequeños denominados crRNA (CRISPR RNA),

que permiten la detección e interferencia específica de elementos genéticos móviles (EGM) invasores para los cuales son complementarios (Jinek et al., 2012). Las secuencias que conforman el arreglo CRISPR provienen de DNA viral o plasmídico en donde son denominadas protoespaciadores, estas secuencias son integradas al locus CRISPR por la acción de las proteínas Cas1 y Cas2 (Hille et al., 2018; Javed et al., 2018). El éxito del sistema CRISPR depende de la actividad de las proteínas Cas, que se encargan tanto de la detección del DNA invasor como de su interferencia. Estas proteínas se encuentran en el mismo locus que el arreglo CRISPR, codificadas por los genes *cas*. Las proteínas Cas se encuentran involucradas en la adquisición de nuevas secuencias espaciadoras, la maduración de los crRNA de los transcritos del locus CRISPR y la detección e interferencia de los ácidos nucleicos invasores al formar complejos proteína-crRNA que tienen complementariedad con los protoespaciadores (Mojica & Garrett, 2013).

La actividad de los sistemas CRISPR-Cas ocurre en tres etapas: adaptación, donde se adquieren nuevas secuencias virales y por lo tanto se genera una memoria de infecciones previas; biogénesis del crRNA; donde el transcrito de crRNA es madurado para su utilización por las proteínas Cas; y expresión o interferencia; donde las proteínas Cas se dirigen a su blanco en el ácido nucleico invasor y lo silencian al producir una ruptura de doble cadena (DSB, **D**ouble-**S**trand **B**reaks) por su actividad de nucleasa (Hille et al., 2018). Los genes *CAS* son traducidos en las proteínas Cas específicas del subsistema, sin embargo, el arreglo CRISPR es transcrito de manera constitutiva y tiene que pasar por un proceso de maduración para poder generar los crRNA. En el evento de una infección viral, todo el arreglo CRISPR es expresado. (Marraffini & Sontheimer, 2010). El transcrito inicial es denominado crRNA precursor o pre-crRNA. Una vez generado el crRNA maduro, la secuencia repetida puede ser reconocida por las proteínas Cas de un modo dependiente de la secuencia para formar un complejo proteína-crRNA (RNP, Complejo **R**ibonucleoprotéico), mientras que la secuencia espaciadora permite que el complejo reconozca a su blanco y se una. Los crRNA maduros son piezas clave en la defensa antiviral y la especificidad de los sistemas CRISPR-Cas, ya

que guían a la maquinaria de interferencia a su blanco a partir de la complementariedad de las secuencias espaciadoras del crRNA y el DNA invasor (Hille et al., 2018).

Los sistemas CRISPR-Cas son sistemas modulares, conformados en general por dos módulos: el módulo efector y el módulo de adaptación, los cuales se encuentra altamente conservados a través de las dos clases de sistemas CRISPR (Nuñez et al., 2014). El módulo efector del sistema tipo II de la clase II es denominado Cas9. Fue identificado y caracterizado por primera vez en *Streptococcus pyogenes* y codifica para una proteína multidominio con actividad de endonucleasa capaz de generar DSB de manera específica guiada por el crRNA, atributo que facilita su uso en biotecnología (Shmakov et al., 2017). El crRNA guía (gRNA) madura al formar un duplex con una secuencia denominada tracrRNA o RNA transactivador, codificada río arriba del locus CRISPR-Cas. El duplex crRNA:tracrRNA puede ser una sola molécula quimérica de RNA denominada sgRNA (single guide RNA), que también dirige de manera específica a Cas9 de *S. pyogenes* ya que contiene tanto los 20 nt de crRNA complementarios a la secuencia blanco en el extremo 5' como la estructura de doble cadena que se forma en el duplex crRNA:tracrRNA en el extremo 3' y que se une a Cas9 (**Figura 3**). Una vez maduro, el duplex crRNA:tracrRNA es requerido para que Cas9 se dirija hasta el sitio complementario en el EGM invasor, llevando a cabo la fase de interferencia. La falta del tracrRNA provoca la pérdida de actividad de Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek et al., 2012).

El sistema CRISPR-Cas9, así como otros sistemas CRISPR, requieren el reconocimiento de una secuencia PAM (**P**rospacer **A**djacent **M**otif, o *motif* adyacente a protoespaciador, por sus siglas en inglés), tanto para el reconocimiento de protoespaciadores en la fase de adquisición como para dirigir a la maquinaria de interferencia. La secuencia específica del *motif* varía de acuerdo a la especie del hospedero del sistema CRISPR-Cas. La secuencia PAM que reconoce a Cas9 de *S. pyogenes* es NGG así que para poder llevar a cabo cortes de doble cadena específicos de manera dirigida solo es necesario cambiar la secuencia de 20 nt del espaciador en el crRNA a una adyacente a un sitio PAM. Los dominios tipo

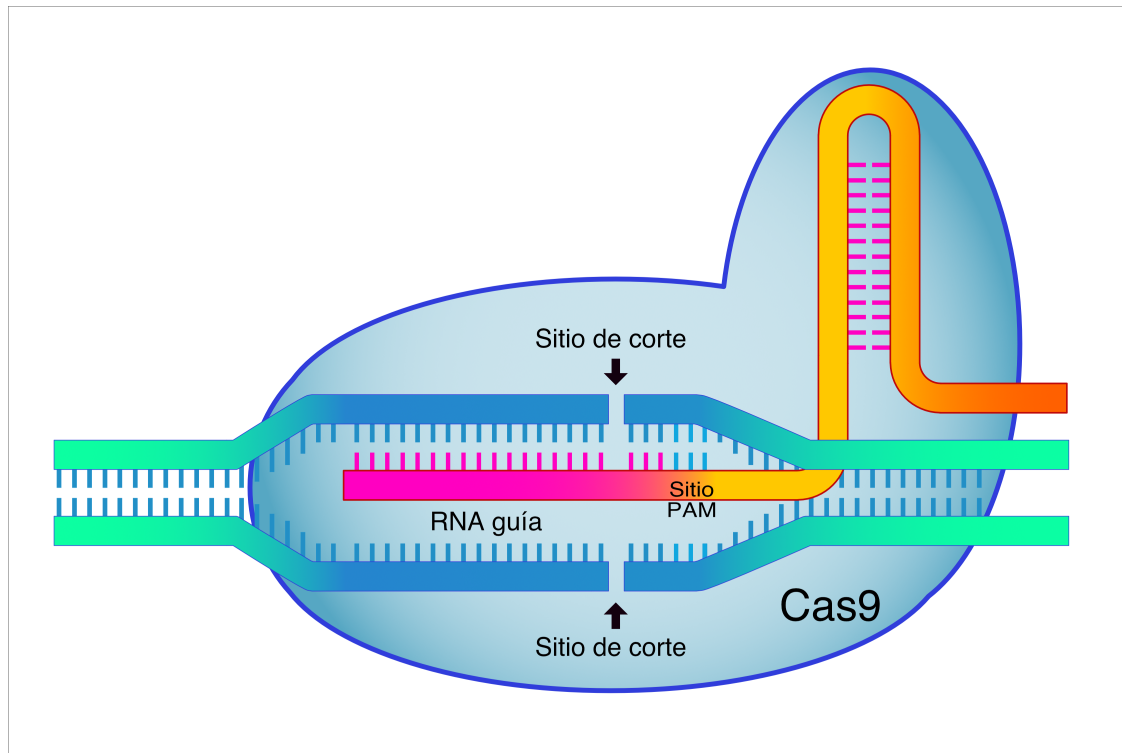


Figura 3: **Complejo riboproteico de Cas9 con el RNA guía unido al DNA blanco.** La secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' del RNA guía es complementaria al DNA blanco y marca el sitio de corte de Cas9. El extremo 3' del RNA guía es usualmente palindrómico, por lo que forma una estructura tallo-asa que al unirse a Cas9 produce un cambio conformacional que activa su función de nucleasa.

HNH y tipo RuvC de Cas9 llevan a cabo el corte en cada una de las cadenas del DNA. Mutaciones en alguno de los dos dominios provocan que realice cortes de una sola cadena (nickasa), mientras que mutaciones en ambos dominios provocan la pérdida de actividad de nucleasa de Cas9 pero no de su capacidad de unirse de manera específica al DNA (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek et al., 2012). En su ambiente nativo, Cas9 lleva a cabo la fase de interferencia en la respuesta inmune de *S. pyogenes*. En el evento de una invasión por un EGM, se expresa todo el cassette CRISPR, produciendo múltiples crRNAs que pueden guiar a Cas9. Esta programabilidad y facilidad de personalización de Cas9 permite su uso para introducir alteraciones genéticas dirigidas en una célula aprovechando los mecanismos de reparación del DNA nativos como la NHEJ, o el reemplazo de genes mediante la HDR,

así como el uso de múltiples secuencias de RNAs guía de manera simultánea (multiplexeo) (Cong et al., 2013).

1.3.1. CRISPR-Cas9 en levaduras convencionales y no convencionales

La manipulación genética mediante CRISPR-Cas9 se ha hecho de manera exitosa tanto en levaduras convencionales como en no convencionales, tales como varias especies de *Candida* (incluyendo a *C. albicans*), en *Cryptococcus neoformans*, *C. deneoformans*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, entre otras. Esto ha sido llevado a cabo principalmente de tres maneras: 1) inserción de uno o más vectores de expresión con el cassette de Cas9 y una o más secuencias de gRNA, integrando el cassette de Cas9 al genoma de la levadura, 2) expresión el gRNA desde un plásmido (Fraczek et al., 2018), y 3) inserción de la proteína Cas9 en complejo directo con las moléculas de gRNA de manera transitoria sin requerir de la expresión del sistema (Arras & Fraser, 2016; Grahl et al., 2017). Las primeras dos estrategias utilizan una expresión constitutiva de Cas9 usualmente gracias al promotor *TEF1*. Sin embargo, existen reportes de que la sobreexpresión de Cas9 con los promotores fuertes de los genes *HXT7* o *TDH3* resulta en efectos negativos en el crecimiento del cultivo y/o en la eficiencia de transformación. Para poder tener una expresión constitutiva sin las desventajas de la sobreexpresión de Cas9, es necesario elegir promotores específicos, ya que los promotores débiles pueden no dar como resultado eficiencias de edición lo suficientemente altas, y/o los promotores fuertes podrían tener efectos deletéreos en la célula (Raschmanová, 2018).

La implementación del sistema CRISPR-Cas9 ha sido principalmente mediante transformación con un vector que contiene tanto la secuencia que codifica para Cas9 como la secuencia del gRNA; por otro lado, se tiene la secuencia del molde de reparación que puede estar codificada dentro del mismo vector o en un vector individual o se puede generar de manera independiente mediante PCR.

Para editar el genoma de levaduras del clado CTG, se han utilizado moldes de reparación que contienen la secuencia del gen *NAT1* o *SAT1*, los cuales dan resistencia al antibiótico

nourseotricina o estreptomycinina respectivamente, secuencia que está optimizada para evitar el uso del codón CTG. En la levadura *Candida*, el blanco de esta estrategia fue el gen *ADE2*, que está involucrado en la síntesis de adenina, se ha observado que la delección de este gen genera colonias color rojo (Min, Ichikawa, Woolford, & Mitchell, 2015; Norton, Sherwood, & Bennett, 2017; Vyas, Barrasa, & Fink, 2015).

Para evitar los problemas que conlleva el uso de un sistema de expresión constitutiva de Cas9 en la célula, el equipo de Grahl y colaboradores desarrolló un sistema de edición genética con CRISPR-Cas9 libre de expresión para *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. auris*, el cual previamente se ha observado funcionar en otros organismos como hongos filamentosos, plantas y algas, así como células de mamíferos como ratones y líneas celulares humanas. Este sistema inserta a la proteína Cas9 en complejo con el gRNA en la célula mediante electroporación para realizar los DSB, paralelo a esto es insertado el cassette de recombinación con el marcador NAT1 (Grahl, et al., 2017). Basado en este sistema, Wang, P, ha usado la proteína Cas9 en complejo con los gRNA para realizar un knockout del gen *GIB2* en *Cryptococcus neoformans* (Wang, 2018).

2. Justificación

A pesar de los avances recientes en la manipulación genética de levaduras convencionales y no convencionales, a la fecha no hay reportes de edición genética en *Debaryomyces hansenii* mediante complejos riboproteicos Cas9:gRNA. Por esta razón, el objetivo de este trabajo de tesis es implementar el sistema CRISPR-Cas9 en *D. hansenii* a partir de la estrategia usada por Grahl, et al., 2017 con modificaciones específicas que permitan estandarizar un protocolo general de permeabilización y transformación independientemente de la cepa o fondo genético. Esto daría lugar a la manipulación y edición genética de *D. hansenii*, permitiendo tanto un avance en la investigación básica de levaduras no convencionales, como su posible aplicación en términos biotecnológicos.

3. Hipótesis

Es posible implementar el sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante la adaptación de la estrategia de Grahl, et al. (2017) para generar una cepa auxótrofa de uracilo.

4. Objetivo general

Adaptar la estrategia de Grahl, et al. (2017) para generar una mutante auxótrofa de uracilo en *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR-Cas9 via complejos riboproteicos.

5. Objetivos particulares

1. Estandarizar un protocolo de permeabilización para *D. hansenii* con distintas concentraciones de ditioneitol (DTT) y diferentes intervalos de tiempo de tratamiento.
2. Transformar a *D. hansenii* por electroporación con el plásmido pAYCU244.
3. Seleccionar las colonias transformadas con el plásmido pAYCU244 en medio sólido con nourseotricina y verificar la expresión de la proteína amarilla fluorescente yeYFP mediante microscopía confocal.
4. Diseñar un gRNA idéntico a una región del gen *DhURA3* usando CRISPRdirect.
5. Electroporar a *D. hansenii* con el complejo Cas9-*DhURA3*gRNA y seleccionar las colonias mutantes en medio selectivo con 5-FOA.
6. Construir un *cassette* de recombinación homóloga que contenga la secuencia del gen *SAT1* y las regiones intergénicas del gen *DhURA3*.

6. Materiales y métodos

6.1. Cepas usadas

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Debaryomyces hansenii* (Y7426 y C11), las cuales fueron transformadas por electroporación con el plásmido pAYCU244. Como control positivo de electroporación se usó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743), la cual es una cruce de las cepas BY4741 y BY4742. *S. cerevisiae* BY4743 es auxótrofa de uracilo (*ura3Δ*) y fue transformada con el plásmido pYES2, el cual complementa la auxotrofia con el gen *URA3*. La levadura *Lachancea kluyveri* (*ura3Δ* 156-1) fue utilizada como control. El plásmido pAYCU244 fue clonado en la cepa de *Escherichia coli* XL1Blue (**Tabla 1**).

Tabla 1: Cepas de levaduras y bacterias utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
<i>D. hansenii</i> Y7426	Tipo silvestre (WT)
<i>D. hansenii</i> C11	Tipo silvestre (WT)
<i>S. cerevisiae</i> BY4743	MATa MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>L. kluyveri</i> 156-1	<i>Ura3Δ</i>
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>

6.2. Medios de cultivo

Las cepas fueron cultivadas inicialmente en medio rico (YPD) con extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2%), glucosa (2%) y agar (2%). Fueron re-estriadas en el medio selectivo correspondiente de acuerdo al experimento realizado. Para la selección de mutantes *ura3Δ* de la cepa *D. hansenii* C11 se utilizó medio mínimo (MM), el cual es YNB (Yeast Nitrogen Base, 0.17%), sin aminoácidos ni sulfato de amonio, sulfato de amonio (0.5%) y glucosa (2%). Para la selección de la cepa *D. hansenii* Y7426 se utilizó MM adicionado con sales adicionales (K_2HPO_4 (160 mg/L), KH_2PO_4 (350 mg/L), Na_2SO_4 (280 mg/L), K_2SO_4 (340 mg/L) y asparagina (1.12 g/L) como fuente de nitrógeno (**Tabla 2**). Los medios de MM fueron preparados con o sin uracilo y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). Para seleccionar las células transformadas con el plásmido pAYCU244 se utilizó YPD con concentraciones de 150

$\mu\text{g}/\text{mL}$ o $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ de clonNat (nourseotricina) dependiendo de la cepa, $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ para Y7426 y $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ para C11. La selección de *S. cerevisiae* como control de electroporación se hizo con MM con o sin uracilo (Tabla 2). Para el mantenimiento y selección de *E. coli* XL1Blue con el plásmido pAYCU244 se usó medio LB con ampicilina.

Tabla 2: Composición de ingredientes de cada medio por litro.

Ingrediente	YPD	YPD+ clonNAT (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	MM	MM (<i>D.</i> <i>hansenii</i> Y7426)	MM 5-FOA	MM 5-FOA (<i>D. hansenii</i> Y7426)	LB
Extracto de levadura (g)	10	10	-	-	-	-	-
Glucosa (g)	20	20	20	20	20	20	-
Peptona de caseína (g)	20	20	-	-	-	-	-
Sales adicionales 100x (mL)	-	-	-	10	-	10	-
Uracilo (mL)	-	-	-	-	10	10	-
Sulfato de amonio (g)	-	-	5	-	5	-	-
LB (g)	-	-	-	-	-	-	25
Ampicilina (g)	-	-	-	-	-	-	0.05
clonNAT (g)	-	0.15	-	-	-	-	-
5-FOA (mg/mL)	-	-	-	-	-	2	-
Agar (g)	20	20	20	20	20	20	15

6.3. Plásmidos utilizados en este estudio

Los plásmidos pYES2 y pAYCU244 fueron clonados en *E. coli* XL1 Blue, y mantenidas en medio selectivo LB con ampicilina a 4°C . El plásmido pYES2 contiene al gen *URA3* y un marcador de resistencia a ampicilina, así como al promotor *GAL1* junto al sitio de clonación múltiple (**Figura 4**).

El plásmido pAYCU244 fue donado por la M. en C. Norma Silvia Sánchez del Instituto de Fisiología Celular y diseñado por Defosse et al. (2018). Este plásmido contiene al gen *SAT1* de resistencia a la nourseotricina y yeYFP como gen reportero. El gen *SAT1* es regulado a partir del promotor *Dh_{TEF1}* y contiene al terminador *Mg_{PGK1}*. El gen reportero yeYFP es regulado por el promotor *'Mg_{ACT1}* y el terminador *Mg_{TRP1}*. El plásmido fue linearizado usando la enzima de digestión *ApaI*, en una digestión sencilla que da como resultado una banda de aproximadamente 5900 pb (**Figura 5**).

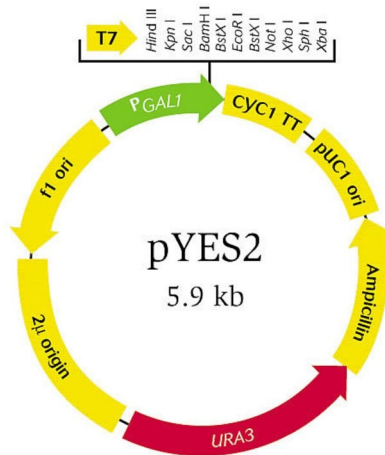


Figura 4: Mapa del plásmido pYES2. El plásmido pYES2 contiene el gen *URA3* por lo que las colonias transformadas son verificadas en medio selectivo con y sin uracilo.

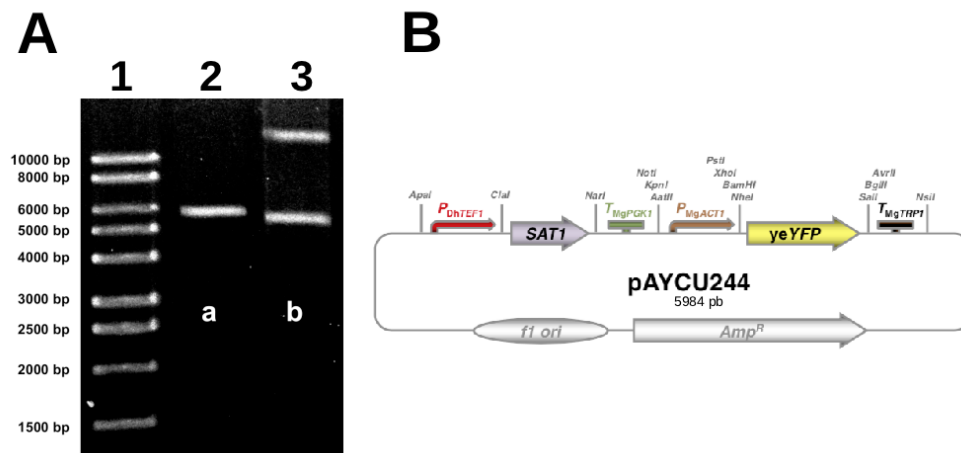


Figura 5: Plásmido pAYCU244 linearizado. **A)** Linearización del plásmido con la enzima de restricción *ApaI*. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular. a) En el carril 2 se observa una banda única de un tamaño cercano a las 6000 pb, correspondiente al plásmido linearizado. b) En el carril 3 se observan dos bandas. Ambas corresponden al plásmido, sin embargo esta muestra no fue linearizada, por lo que existen dos poblaciones, una que logra migrar a la distancia correspondiente a su tamaño y otra que puede estar superenrollada y por lo tanto no es capaz de migrar durante la electroforesis. **B)** Mapa del plásmido pAYCU244, tomado de Defosse et al. (2018).

6.4. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron siete oligonucleótidos distintos para la construcción del *cassette* de reparación con *SAT1*. Un par de oligonucleótidos por cada fragmento (**Tabla 3**). Un séptimo oligonucleótido fue diseñado para reemplazar el oligonucleótido número 1, ya que éste hibridaba de manera inespecífica con *SAT1*. La temperatura de alineamiento (T_m) de cada uno fue obtenida usando la calculadora de ThermoFisher Scientific *Tm Calculator*. Estos oligonucleótidos corresponden a las secuencias de las regiones 5' y 3' del gen *DhURA3* y las secuencias del fragmento *SAT1*. Para los oligonucleótidos 4 y 5 se calcularon dos T_m individuales debido a que cada mitad (colores distintos) corresponde a la secuencia de hibridación al DNA genómico de *D. hansenii* y a la secuencia de hibridación a *SAT1*.

Tabla 3: **Diseño de oligonucleótidos y parámetros.**

No.	Nombre	Amplicón	Dirección	Secuencia (5' - 3')	T_m (°C)
1	1 <i>SAT1</i> Fw	Fragmento <i>SAT1</i>	Delantero	CCAGTCTTATATATATCCGA ACT TGGTAC	60
2	1 <i>SAT1</i> Rv	Fragmento <i>SAT1</i>	Reverso	TCACATAACCACAAGGTGCC	58.5
3	2up <i>URA3</i> Fw	UTR 5' <i>DhURA3</i>	Delantero	TTAACGGCCGAATTGAACTCAA GTACCAAGTTCGGATATATATAA	57.8
4	2up <i>URA3</i> Rv	UTR 5' <i>DhURA3</i>	Reverso	GACTGGCCATCGCTAATATGGGA TTTGT	60 y 61.5
5	3dw <i>URA3</i> Fw	UTR 3' <i>DhURA3</i>	Delantero	GGCACCTTGTTGGTTATGTGATC AAGGATCAAGTGCACCTG	59.8 y 61.6
6	3dw <i>URA3</i> Rv	UTR 3' <i>DhURA3</i>	Reverso	CTGACCAGGTGTTGCCA	59.8
7	up <i>URA3</i> Neo	UTR 5' <i>DhURA3</i>	Delantero	ACCCAGACAGAAGCGTTATCT	60.5

Cada oligonucleótido es identificado por el par al que corresponde en el número inicial. Seguido por la zona en la que hibrida, ya sea el gen *SAT1*, la región río arriba de *URA3* (up*URA3*) o la región río abajo de *URA3* (dw*URA3*) y la dirección del oligonucleótido: delantero (Fw) o reverso (Rv). El oligonucleótido 7 no tiene número de par ya que fue un rediseño del oligonucleótido 1, por lo tanto la identificación *Neo*.

6.5. Diseño del RNA guía para implementar CRISPR-Cas9

La secuencia de RNA guía para dirigir a Cas9 hasta el locus de *DhURA3* fue diseñada usando la herramienta de diseño RNA guía de Naito, Hino, Bono, & Ui-Tei (2015):

CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>).

La secuencia del gen *DhURA3* obtenida de GeneBank (número de acceso AY033329.1), que tiene un 88.4% de identidad a la secuencia de referencia NC_006043.2. Ambas secuencias fueron ingresadas en CRISPRdirect con la opción de revisar la especificidad para *D. hansenii*. El resultado fueron 60 y 61 posibles diseños distintos de RNA guía, para la secuencia AY033329.1 y NC_006043.2 respectivamente, de los cuales se eligieron las secuencias mostradas en la **Tabla 4**.

Tabla 4: **Diseño del RNA guía para Cas9. Los últimos 3 nucleótidos de la secuencia resaltados en negritas corresponden al sitio PAM.**

No.	Posición dentro de <i>DhURA3</i>	Secuencia	Sitios de restricción	20mer+ PAM	10mer+ PAM	8mer+ PAM
1	301-323	ACAGTCAAATCACAATACTCT TGG	-	0	0	8
2	301-323	ACGGTCAAATCACAATATTCT TGG	<i>SspI</i>	1	1	30

Ambas secuencias son de alta especificidad y tienen la misma región blanco dentro de *DhURA3*. Estas secuencias se encuentran en una posición media del gen así como adyacente a un sitio PAM adicional (**Figura 6**), lo cual fue considerado en el diseño pues se ha reportado que esto incrementa la especificidad de Cas9 (Farboud & Meyer, 2015). Adicional a esto, se hizo un análisis en BLAST para determinar la correspondencia de la secuencia elegida al gen blanco y descartar posibles cortes inespecíficos de Cas9.

6.6. Análisis de hibridación de los oligonucleótidos mediante MUSCLE

Se alinearon las secuencias de los oligonucleótidos 1 y 4 (ver **6.4 Diseño de oligonucleótidos**) con la secuencia de *SAT1* ante la posibilidad de una hibridación inespecífica. Se diseñó un oligonucleótido adicional (nucleótido 7, ver **6.4 Diseño de oligonucleótidos**), el cual hibrida de manera específica con el fragmento UTR 5' *DhURA3*. Estas secuencias

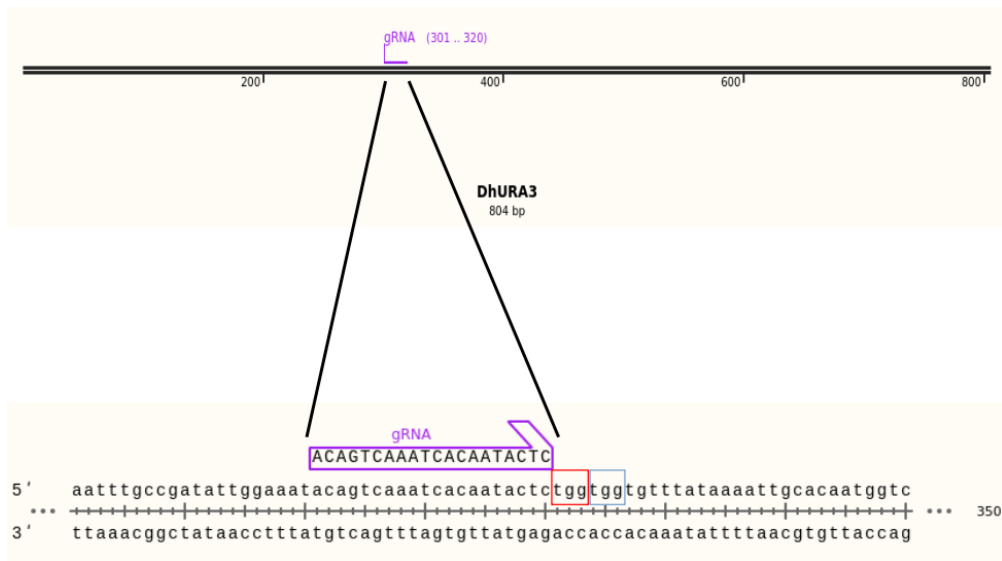


Figura 6: **Marco de lectura del gen *DhURA3***. Se alineó la secuencia del gRNA seleccionado con el marco de lectura del gen *DhURA3*. El gRNA es complementario a una secuencia de 20 pb del nucleótido 301 al 320 de *DhURA3*. El sitio PAM (cuadro rojo) se encuentra junto a un sitio PAM adicional (cuadro azul).

fueron alineadas utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004). MUSCLE alinea múltiples secuencias que son introducidas mediante un archivo de texto en formato FASTA, el cual contiene la secuencia de los oligonucleótidos a analizar y la secuencia de *SAT1*. El resultado del alineamiento fue almacenado en un archivo de texto con formato FASTA para su visualización con el programa SnapGene Viewer (GSL Biotech; disponible en snapgene.com) para la identificación de la hibridación del oligonucleótido inespecífico (**Figura 7**).

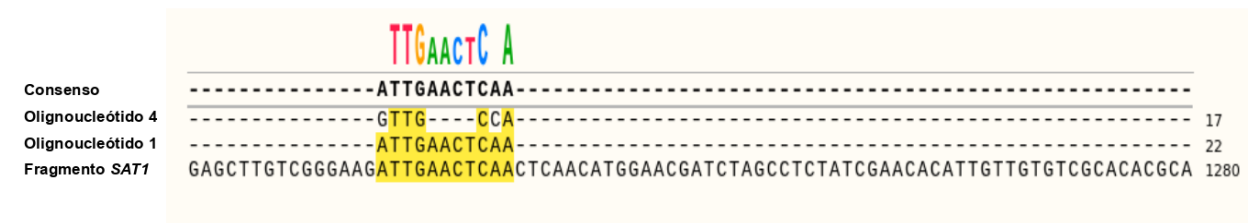


Figura 7: **Alineamiento de las secuencias de los oligonucleótidos 1, 4 y 7 con la secuencia del fragmento *SAT1***. Los últimos once nucleótidos de la secuencia del oligonucleótido 1 son idénticos a los nucleótidos 1216 a 1226 de *SAT1* (resaltado en amarillo)

6.7. Ensamblaje de los complejos riboprotéicos Cas9:gRNA

Los RNP utilizados fueron preparados con el kit Alt-R CRISPR-Cas9 de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.), el cual incluye la proteína Cas9 purificada, el crRNA y el tracrRNA liofilizados y amortiguador de duplex. El crRNA fue resuspendido en 100 μL de amortiguador de duplex, mientras que el tracrRNA fue resuspendido en 200 μL del mismo amortiguador. La proteína Cas9 tiene una concentración de fábrica de 60 μM . Los tres reactivos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La formación de los RNP se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Grahl y colaboradores. La proteína Cas9 fue diluida en agua estéril libre de nucleasas a una concentración final de 4 μM . El crRNA y el tracrRNA fueron diluidos en amortiguador de duplex para llevarlos a una concentración final de 4 μM . Para la formación del RNA guía se mezclaron cantidades equimolares de crRNA y tracrRNA, se incubó a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para promover la formación del gRNA y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para la formación de los RNP se mezcló la proteína Cas9 y el gRNA en una proporción 1:1.2 (3 μL de Cas9 y 3.6 μL de gRNA de manera que se usaron 6.6 μL por transformación).

6.8. Prueba de actividad *in vitro* de gRNA y Cas9

Para probar la actividad de Cas9:gRNA en la secuencia del gen *DhURA3 in vitro* se realizó un ensayo de actividad usando el protocolo proporcionado por el laboratorio del Dr. Lluís Montoliu del Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España.

Ensayo de actividad *in vitro* de Cas9

1. Purificar el producto de PCR que será usado para la digestión.

2. Digestión *in vitro*

a) Reacción

1) 200 - 300 ng del producto de PCR purificado.

2) 100 ng de proteína Cas9.

3) 50 ng de gRNA.

4) 2 μ L de amortiguador de Cas9 5x.

5) Agua libre de nucleasas a un volumen final de 10 μ L.

3. Incubar durante 3 horas a 37 °C.

4. Incubar 10 min a 65 °C.

Amortiguador de Cas9.

El amortiguador de Cas9 fue preparado con 0.1 M HEPES, 0.75 M KCl, 2.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.05 M MgCl₂

6.9. Protocolos de transformación

La transformación de *E. coli* fue llevada a cabo por choque térmico, mientras que las transformaciones de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* fueron por electroporación en el electroporador Multiporator Eppendorf con celdas de electroporación de 2 mm. El plásmido pAYCU244 fue preservado en *E. coli*. Para la transformación de *D. hansenii* el plásmido pAYCU244 fue linearizado previamente con la enzima *ApaI* (Ver sección **6.3**).

6.9.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

El protocolo para la electroporación de *Saccharomyces cerevisiae* fue el recomendado por Eppendorf, el cual se describe a continuación:

1. Inocular 500 mL de medio YPD con una alícuota de un cultivo crecido toda la noche o una colonia de un cultivo en caja e incubar hasta que alcance una OD₆₀₀ de 1.3-1.5.
2. Recuperar por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
3. Lavar con 500 mL de agua estéril fría, centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Repetir el lavado con 250 mL de agua estéril fría.
4. Resuspender en 20 mL de sorbitol 1M frío y centrifugar.
5. Resuspender en 0.5 mL de sorbitol 1M frío a un volumen final de 1 – 1.5 mL y mantener en hielo.
6. Agregar 0.1 µg de DNA (en un volumen no mayor a 5 µL), a 65 µL de células electrocompetentes.
7. Homogeneizar suavemente con la punta de la micropipeta e incubar 5 minutos en hielo.
8. Transferir a una celda de electroporación previamente enfriada en hielo.
9. Electroporar con un pulso de 1.5 kV durante 5 ms.
10. Agregar inmediatamente 1 mL de sorbitol 1M frío y sembrar en medio selectivo.

6.9.2. Transformación de *Debaryomyces hansenii*

Protocolo de Defosse et al., 2017

1. Inocular 10 mL de medio YPD en un tubo cónico de 50 mL con una colonia de *D. hansenii* e incubar a 28 °C con agitación de 180 rpm por ~24 hrs.
2. Al siguiente día inocular 50 mL de medio YPD en un matraz de 250 mL con 1 mL del cultivo e incubar a 28 °C con agitación de 180 rpm por ~24 hrs.
3. Al siguiente día recuperar por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y resuspender en 6 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.5 con 25 mM de DTT preparado en el momento e incubar durante 15 minutos a 28 °C.
4. Recuperar por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante debe de observarse turbio.
5. Lavar dos veces con 20 mL de agua estéril fría, y una vez con 20 mL de sorbitol 1M frío. Recuperar por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
6. Resuspender la pastilla de células en 3 mL de sorbitol 1M frío.
7. Agregar el DNA linearizado (~1 µg resuspendido en 10 µL de agua estéril libre de nucleasas) a 200 µL de células electrocompetentes y transferir a la celda de electroporación.
8. Electroporar con un pulso de 2.3 kV durante 5 ms.
9. Inmediatamente después de la electroporación recuperar las células de la celda con 1 mL de YPD.
10. Inocular estas células en un matraz con 10 mL de YPD e incubar durante ~24 hrs a 28 °C con agitación de 180 rpm.
11. Al siguiente día sembrar 100 µL en medio selectivo.

Modificaciones

Modificación 1: 2 pulsos de electroporación consecutivos de 2.3 kV y 5 ms cada uno.

Modificación 2: Los mismos parámetros del pulso eléctrico que en la modificación 1 más 30 minutos de incubación de las células en amortiguador de fosfatos y DTT.

El amortiguador de fosfatos de potasio fue preparado con KH_2PO_4 0.1 M, K_2HPO_4 0.1 M, con un pH de 7.5

Protocolo de Grahl et al., 2018

1. Inocular 10 mL de medio YPD en un tubo cónico con una colonia de *Debaryomyces hansenii* e incubar a 28°C con agitación de 180 rpm durante toda la noche hasta una OD₆₀₀ de 1.6 a 2.2.
2. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm.
3. Resuspender las células en amortiguador de electroporación e incubar.
4. Agregar 100 mM de DTT e incubar durante 30 minutos.
5. Centrifugar y lavar dos veces con agua estéril fría.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y lavar con sorbitol 1 M frío.
7. Centrifugar y resuspender en 200 μ L de sorbitol frío 1 M.
8. Colocar 40 μ L de células en una celda de electroporación.
9. Agregar el DNA linearizado ($\sim 1 \mu$ g resuspendido en 10 μ L de agua estéril libre de nucleasas) o 6.6 μ L de RNP (Cas9 + gRNA) a la celda de electroporación.
10. Electroporar con un pulso de 2.3 kV durante 5 ms.
11. Inmediatamente después de la electroporación recuperar las células de la celda con 1 mL de sorbitol 1 M frío.
12. Inocular estas células en un matraz con 10 mL de YPD e incubar durante ~ 24 hrs a 28 °C y 180 rpm.
13. Al siguiente día plaquear 100 μ L de células en medio selectivo.

Modificaciones

Modificación 3. Incremento del tratamiento de DTT 100 mM, de 30 a 80 minutos. Uso de 65 μ L de células electrocompetentes para la transformación.

Modificación 4. Se agregaron 5 μ L de DNA de esperma de salmón con una concentración de 10 μ g/ μ L previamente hervido a 95 °C durante 5 minutos e incubados en hielo por 5 minutos a la celda de electroporación junto al DNA o RNP y las células a transformar.

El amortiguador de electroporación fue preparado con LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM.

6.10. Observación de colonias transformantes mediante microscopía confocal

Las colonias transformantes de *D. hansenii* con el plásmido pAYCU244 se observaron mediante microscopía confocal en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con el apoyo técnico del Dr. Miguel Tapia Rodríguez. Una colonia transformante de cada cepa de *D. hansenii* se seleccionó al azar de medio selectivo y se inoculó en medio YPD líquido. Se incubó durante 24 h a 28 °C. Este cultivo fue centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió la pastilla de células en 1 mL de formaldehído 4%. Estas células se lavaron dos veces con agua estéril y se resuspendieron finalmente en 500 μ L de agua estéril. Las células fueron observadas con Calcofluor en el microscopio confocal a una longitud de onda de excitación de 500 nm y una longitud de onda de emisión de 540 nm como es reportado por Courdavault et al. (2011).

6.11. Construcción y purificación del *cassette* de reparación

El *cassette* de reparación por HDR fue construido a partir de los fragmentos A, B y *SAT1*. Los fragmentos A y B corresponden a las regiones 5' UTR y 3' UTR de *D. hansenii*, respectivamente. El fragmento *SAT1* corresponde al marcador de resistencia *SAT1* encontrado en el plásmido pAYCU244. Los tres fragmentos fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección 6.4.

Todas las reacciones de PCR para amplificar estos fragmentos fueron llevadas a cabo utilizando la polimerasa Phusion Flash de ThermoFisher Scientific. Los productos de cada PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Estos amplicones fueron cortados del gel y purificados utilizando el kit de purificación de PCR “QIAquick PCR Purification Kit” de Qiagen.

7. Resultados

Uno de los principales obstáculos para transformar levaduras es su pared celular. Los protocolos de transformación usualmente involucran la eliminación de esta pared mediante un tratamiento previo con acetato de litio (LiAc) y/o polietilenglicol o utilizando enzimas como zimoliasa o liticasa (Manivasakam, P. & Schiestl, R. H., 1993). La transformación mediante electroporación en *Saccharomyces cerevisiae* no requiere tratamientos previos para eliminar su pared celular. Sin embargo, se ha demostrado que es posible incrementar la eficiencia de transformación mediante un tratamiento previo que elimine la pared celular (formación de esferoplastos), lo cual promueve la electropermeabilización, dando como resultado el paso de moléculas de gran tamaño, tales como plásmidos o proteínas (Tripp, J. D., Lilley, J., Wood, W. N. & Lewis, L. K., 2013). Dado que los protocolos convencionales de transformación no han podido ser replicados en *D. hansenii*, decidimos probar distintos protocolos de electroporación diseñados para levaduras no convencionales, los cuales involucran un tratamiento previo a la electroporación.

7.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con el plásmido pYES2 mediante electroporación (control experimental)

Antes de iniciar cualquier experimento se decidió transformar a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el plásmido pYES2, lo cual nos permitió verificar nuestros medios de selección, reactivos y probar el funcionamiento del electroporador Eppendorf Multiporator 4308 805.005. La transformación se llevó a cabo en la cepa de *S. cerevisiae* BY4743 auxótrofa de uracilo (*ura3Δ*) con el plásmido pYES2, el cual contiene el gen *URA3* (**Figura 4, Materiales y Métodos**). Se usaron dos condiciones de transformación por electroporación: a) con el plásmido pYES2, y b) sin el plásmido (control negativo). Las células transformadas en ambas condiciones fueron plaqueadas en medio mínimo sólido (MM) con uracilo (ura+) y MM sin uracilo (ura-). Las células transformadas fueron incubadas a 28 °C durante 48 hrs.

Se observaron colonias en MM ura-, lo cual indica que la cepa BY4743 fue complementada con el plásmido pYES2.

7.2. Transformación de *Debaryomyces hansenii* con el plásmido pAYCU244 mediante electroporación

Se ha reportado que *D. hansenii* es una levadura con gran heterogeneidad genética (Prishta, et al., 2016). Por otra parte, no existen protocolos de transformación eficientes para la modificación genética de esta levadura. Por lo tanto, en este estudio primero decidimos estandarizar un protocolo de transformación en dos cepas de *D. hansenii*, una proveniente del laboratorio del Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Y7426), y otra que fue aislada del Mar de Cortés de México (C11) (US Department of Agriculture, Peoria, IL; Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, respectivamente). Dado que las cepas Y7426 y C11 podrían presentar diferentes respuestas en el ensayo de inhibición de crecimiento en presencia de nourseotricina, se decidió probar distintas concentraciones de nourseotricina en medio rico sólido YPD con cada cepa (**Figura 8**). La concentración inhibitoria de crecimiento establecida para la cepa C11 fue de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para la cepa Y7426 fue a partir de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la M. en C. Norma Sánchez recomienda usar 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para evitar falsos positivos. Por lo tanto, para los experimentos de transformación se usaron medios sólidos de YPD + clonNAT con concentraciones de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la cepa Y7426 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la cepa C11.

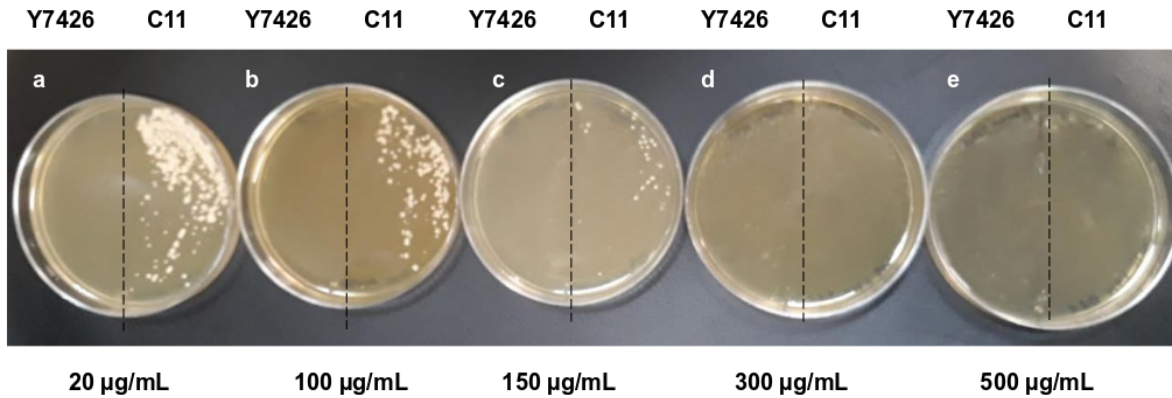


Figura 8: **Ensayo de inhibición de crecimiento de las cepas Y7426 y C11 de *D. hansenii* en medio rico sólido con nourseotricina YPD + clonNAT.** Se utilizaron distintas concentraciones de clonNAT: a) 20, b) 100, c) 150, d) 300, e) 500 $\mu\text{g/mL}$ en cada caja. Las cajas fueron divididas por la mitad y se sembró la cepa C11. Las cajas fueron incubadas a 28 °C por 120 hrs. Los resultados muestran que las concentraciones de nourseotricina inhibitorias de crecimiento para la cepa Y7426 y C11 fueron 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Una vez que fue establecida la concentración de nourseotricina que inhibe el crecimiento de cada cepa, se decidió estandarizar el protocolo de transformación mediante electroporación con el plásmido pAYCU244, que contiene el gen de resistencia a nourseotricina y estreptomicina *SAT1* (ver **Figura 5** en **Materiales y Métodos**) (Defosse et al., 2018). La estandarización del protocolo de transformación fue basada en lo descrito por Defosse et al. (2018), el cual hace uso de un amortiguador de fosfatos y un tratamiento previo de 25 mM de DTT a 28 °C durante 15 minutos (**Tabla 5**, ver **protocolo de Defosse** en **Materiales y Métodos**). Este protocolo no generó ninguna colonia transformante, por lo que decidimos aumentar la cantidad de pulsos de electroporación, de 1 a 2 pulsos consecutivos y el tiempo con tratamiento de DTT, de 15 a 30 min; sin embargo, no se obtuvieron colonias transformantes (**Tabla 5**, ver modificación 1 y 2), por lo que se optó por usar el protocolo reportado por Grahl et al. (2017). Este protocolo utiliza un amortiguador de electroporación con acetato de litio, Tris-HCl, EDTA y una concentración mayor de DTT (100 mM) en el tratamiento previo (ver **protocolo de Grahl** en **Materiales y Métodos**).

Con este protocolo tampoco obtuvieron transformantes positivos (**Tabla 5**, ver **protocolo de Grahl en Materiales y Métodos**), por lo que decidimos seguir las recomendaciones de Tripp y colaboradores (2013), que aumentan el tiempo con el tratamiento de DTT, de 30 a 80 minutos. Este último protocolo permitió obtener colonias transformantes en ambas cepas (**Tabla 5**, modificación 4), las cuales fueron re-sembradas en medio selectivo YPD + cloNAT.

Tabla 5: **Protocolos y parámetros usados en la transformación de las dos cepas de *D. hansenii*.**

Protocolo	Defosse et al. (2018)	Modificación 1	Modificación 2	Grahl et al. (2017)	Modificación 3	Modificación 4	Modificación 4 + Cas9
Amortiguador	PBS	PBS	PBS	LiAc-Tris-HCl-EDTA	LiAc-Tris-HCl-EDTA	LiAc-Tris-HCl-EDTA	LiAc-Tris-HCl-EDTA
DTT (min)	15	15	30	30	80	80	80
DTT (mM)	25	25	25	100	100	100	100
Pulsos	1	2	2	1	1	2	2
#Y7426	-	-	-	-	-	2	41
#C11	-	-	-	-	-	679	42

PBS = Amortiguador de fosfatos. **DTT** = Ditiotreitól. **LiAc** = Acetato de litio. **EDTA** = Ácido etilendiaminotetraacético. **#** = Número de colonias por cepa.

De la transformación de la cepa *D. hansenii* C11 se aislaron 50 colonias que fueron re-sembradas en medio rico sólido YPD + clonNAT con concentraciones de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para eliminar cualquier posible falso positivo (**Figura 9A**). Posteriormente, se eligió una colonia al azar (colonia 27) para extraer DNA y mediante PCR se amplificó el gen SAT1 con los oligonucleótidos 5 y 6 que se describen en **Materiales y Métodos**. Esta última parte se realizó para verificar la presencia del plásmido pAYCU244 posterior a la transformación con el protocolo de Grahl et al. (2017), y la modificación 4 (**Tabla 5** y **Figura 9B**). En la figura 9B se observa una banda de ~ 1700 pb que corresponde al tamaño de SAT1 (**Figura 9B**, carriles 2 y 3). A partir de la transformación de la cepa Y7426 con el plásmido pAYCU244 se obtuvieron únicamente dos colonias, las cuales fueron re-sembradas en medio sólido selectivo de YPD + clonNAT (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron incubadas a 28 °C durante 120 hrs. Las colonias crecidas fueron aisladas y sembradas nuevamente en medio sólido selectivo para eliminar cualquier falso positivo (pases de purificación de colonias) (**Figura 9C**).

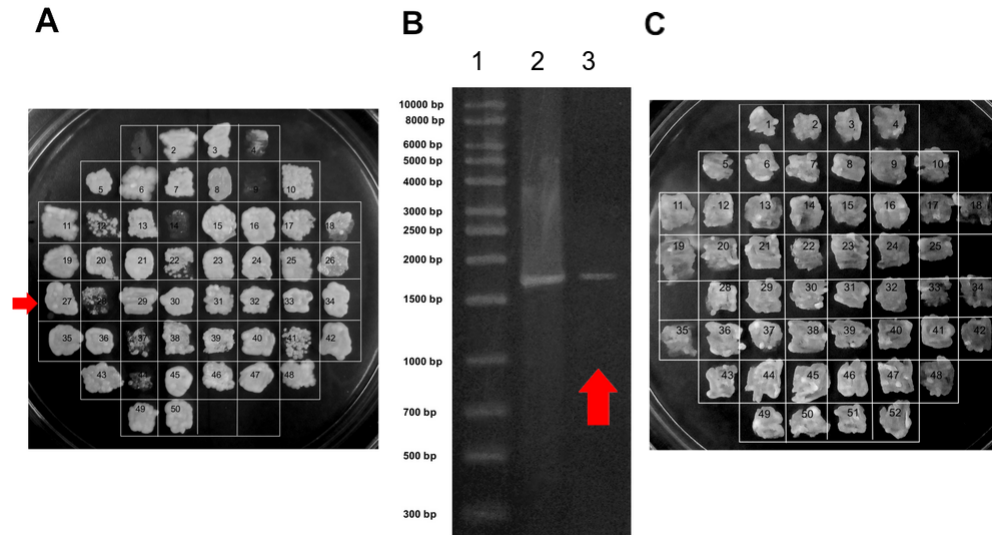


Figura 9: *D. hansenii* C11 y Y7426 transformadas con el plásmido pAYCU244. **A)** Se aislaron 50 colonias de la cepa C11 que fueron transformadas con el plásmido pACYU244. Estas colonias fueron re-sembradas en medio rico sólido YPD + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clonNAT. Se observó que aunque todas las colonias provienen de la misma transformación, no todas crecieron en el medio selectivo (eg. colonias 1, 9 y 14 son falsos positivos). Se eligió la colonia 27 (flecha roja) al azar para extraer el DNA y confirmar la presencia de plásmido pAYCU244 mediante PCR. **B)** Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amplicón de PCR de *SAT1* a partir del plásmido pAYCU244. Carril 3: Amplicón de PCR a partir del DNA obtenido de la colonia 27. La banda que se observa en el segundo y tercer carril corresponde con el tamaño del fragmento *SAT1* (1700 pb). **C)** Se aislaron las únicas 2 colonias de la cepa Y7426 que fueron transformadas con el plásmido pAYCU244, ambas colonias fueron re-sembradas en medio selectivo y a partir de esta caja se aislaron 50 colonias en medio rico sólido con YPD + 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clonNAT.

Posteriormente, la expresión la proteína amarilla fluorescente yeYFP en las cepas transformadas fue confirmada en cultivos de YPD líquido incubados a 28 °C durante 20 hrs. Al día siguiente, las células fueron fijadas con formaldehído al 4%, se colocaron en un portaobjetos y se les agregó el colorante fluorescente Calcofluor que tiñe la pared celular. Las células preparadas fueron observadas en un microscopio confocal a 200X como se describe en **Materiales y Métodos (Figura 10)**.

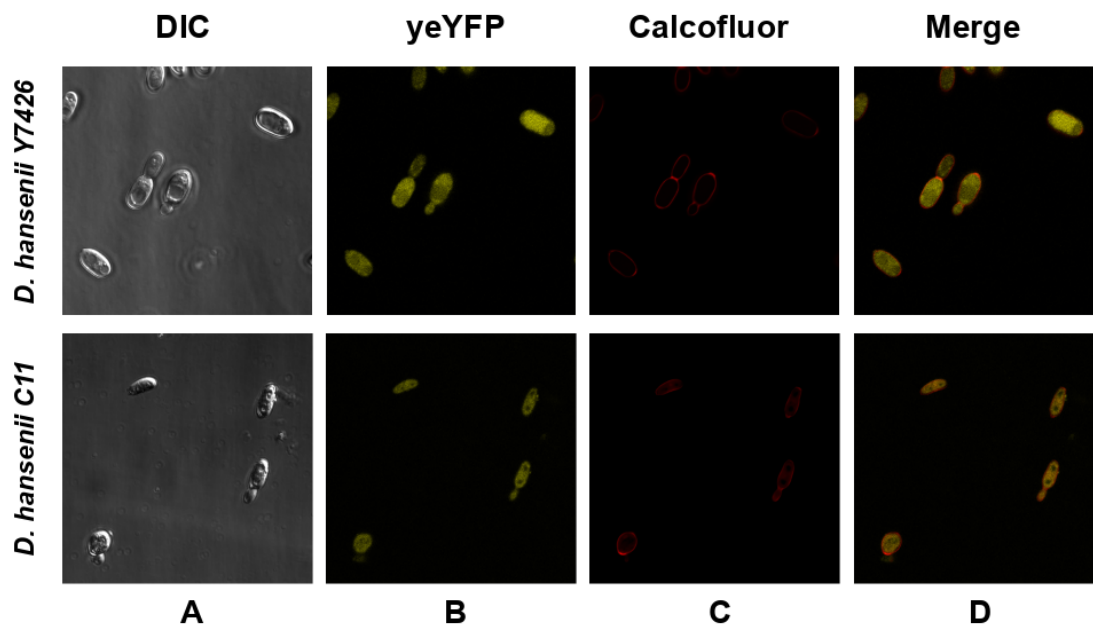


Figura 10: Expresión de la proteína amarilla fluorescente en las cepas *D. hansenii* Y7426 y C11 transformadas con el plásmido pAYCU244. **Columna A:** Células en luz transmitida. **Columna B:** Celulas expresando la proteína amarilla fluorescente (yeYFP). **Columna C:** Tinción de la pared celular con calcofluor (en rojo). **Columna D:** Sobreposición de las columnas B y C (merge). Ambas cepas expresan la yeYFP en el citoplasma.

En conjunto, estos datos demuestran que el método de Grahl et al. (2017), en combinación con el tratamiento previo de 80 minutos con DTT 100 mM, dos pulsos consecutivos y la adición de DNA de esperma de salmón, permite permeabilizar la pared celular y transformar a *D. hansenii* (Tabla 5, Figuras 9 y 10). Por otro lado, la localización de la proteína yeYFP en el citoplasma de ambas cepas demuestra la expresión heteróloga del reportero fluorescente en *D. hansenii*.

7.3. Prueba de actividad *in vitro* de gRNA y Cas9

Antes de la transformación de *D. hansenii* con los RNP, se llevó a cabo un ensayo para corroborar la actividad *in vitro* de Cas9, como se describe en **Materiales y Métodos**.

Se digirieron dos productos de PCR distintos de *DhURA3*, uno purificado del gel de

agarosa y otro directamente sin purificar. Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 2% (**Figura 11**). Como control se agregaron muestras de cada producto de PCR sin digerir por Cas9. Este resultado demuestra que la nucleasa Cas9 tuvo actividad gracias al gRNA diseñado para *DhURA3*, ya que la secuencia blanco fue escindida en el sitio de corte como se muestra en la **figura 6**.

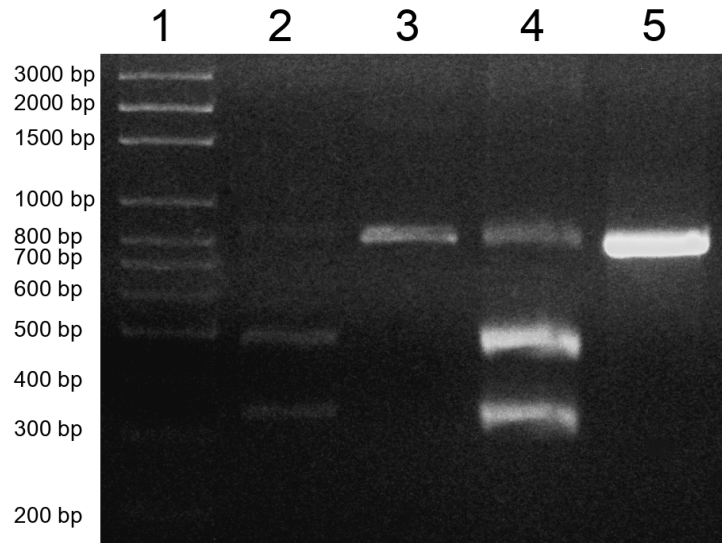


Figura 11: **Ensayo de actividad *in vitro* de Cas9.** **Carril 1:** marcador de peso molecular. **Carril 2:** Muestra de PCR purificada y digerida por Cas9. Se observan dos bandas de un tamaño aproximado a 500 y 300 pb cada una, fragmentos generados por el corte de Cas9 en el sitio aledaño al PAM dentro de la secuencia amplificada. **Carril 3:** Muestra de PCR purificada sin digerir por Cas9. Solo se observa una banda de 800 pb, correspondiente al tamaño de la secuencia del marco de lectura de *DhURA3*. **Carril 4:** Muestra de PCR no purificada y digerida con Cas9. Al igual que en el carril 2, se observan dos bandas que corresponden a un tamaño de 500 y 300 pb, correspondientes a los fragmentos resultantes de la digestión con Cas9. Se observa una banda adicional de un tamaño de 800 pb correspondiente a una población no digerida. **Carril 5:** Muestra de PCR no purificada sin digerir con Cas9. Así como en el carril 3, solo se observa una banda de 800 pb correspondiente al tamaño de la secuencia del marco de lectura de *DhURA3*.

7.4. Implementación del sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en *Debaryomyces hansenii*

La edición genética mediante el sistema CRISPR-Cas9 se ha llevado a cabo de manera exitosa en levaduras tanto convencionales como no convencionales. Recientemente, este protocolo se ha implementado en levaduras del clado CTG, específicamente varias especies de *Candida*, y se demostró que el sistema CRISPR-Cas9 es una tecnología que permite generar cepas mutantes de estos organismos de manera eficiente. A pesar de esto, no hay reportes de edición genética en *Debaryomyces hansenii* con este método, por lo que esta tesis constituye el primer estudio que aborda la edición genética en *D. hansenii* mediante CRISPR-Cas9.

7.4.1. Transformación de *Debaryomyces hansenii* mediante RNP para generar colonias auxótrofas de uracilo

El objetivo principal de este trabajo fue generar una mutante auxótrofa de uracilo en la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR-Cas9 vía RNPs por reparación no de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Para lograrlo, se decidió mutar al gen *URA3* que codifica para la enzima orotidina 5-fosfato descarboxilasa (Ura3), la cual participa en la biosíntesis de uracilo. Para aislar una mutante auxótrofa de uracilo (*ura3* Δ) se usó el método de selección con ácido 5-fluororótico (5-FOA); en presencia de 5-FOA, la enzima Ura3 cataliza la descarboxilación del 5-FOA, produciendo el compuesto tóxico 5-fluorouracilo, que inhibe diversos procesos metabólicos fundamentales de la célula (Atomi, Imanaka, & Fukui, 2012; Boeke, Trueheart, Natsoulis, & Fink, 1987). Por lo tanto, las únicas colonias que pueden crecer en presencia de 5-FOA, son aquellas que no expresen la proteína Ura3.

Para llevar a cabo la selección de colonias auxótrofas de uracilo, se utilizó medio mínimo con uracilo adicionado con 1 o 2 mg/mL de 5-FOA, como fue descrito por Boeke, et al. (1987). Para transformar a *D. hansenii* con los RNP mediante electroporación, se usó el protocolo modificado de Grahl, et al. (2018) como se describió anteriormente (**Figuras 9**

y 10). El RNA guía (gRNA) fue diseñado a partir de la secuencia del gen *DhURA3* como se describió en **Materiales y Métodos**. Previamente a la electroporación, los RNP fueron ensamblados como se describió en **Materiales y Métodos**. Las células transformadas fueron sembradas en medio mínimo sólido con 5-FOA e incubadas a 28 °C hasta observar colonias (aproximadamente entre 4 a 5 días). A partir de la transformación se obtuvieron 41 y 42 colonias de las cepas Y7426 y C11 respectivamente (**Tabla 5**). Todas las colonias fueron aisladas y re-sembradas en medio selectivo con 5-FOA, aquellas colonias que crecieron en medio selectivo fueron re-sembradas en medio mínimo sin uracilo para confirmar que fueran auxótrofas de uracilo (control negativo). De la transformación de la cepa Y7426 sólo se obtuvieron 4 colonias que no lograron crecer en medio mínimo sin uracilo (colonias 18, 20, 23 y 27), estas colonias fueron re-sembradas en medio selectivo con 5-FOA para verificar su resistencia. De estas últimas, sólo crecieron 2 colonias (**Figura 12A y 12C**, colonias Y7426-20 y Y7426-27). De la transformación de la cepa C11, sólo 3 colonias (24, 26 y 27) no lograron crecer en medio mínimo sin uracilo, de las cuales la C11-26 y C11-27 siguieron creciendo en 5-FOA (**Figura 12B y 12C**). Por lo tanto, las colonias seleccionadas (Y7426-20, Y7426-27, C11-26 y C11-27) logran crecer en presencia de 5-FOA y no crecen sin uracilo. Esto indica que se obtuvieron colonias auxótrofas de uracilo mediante el sistema de edición genética CRISPR-Cas9.

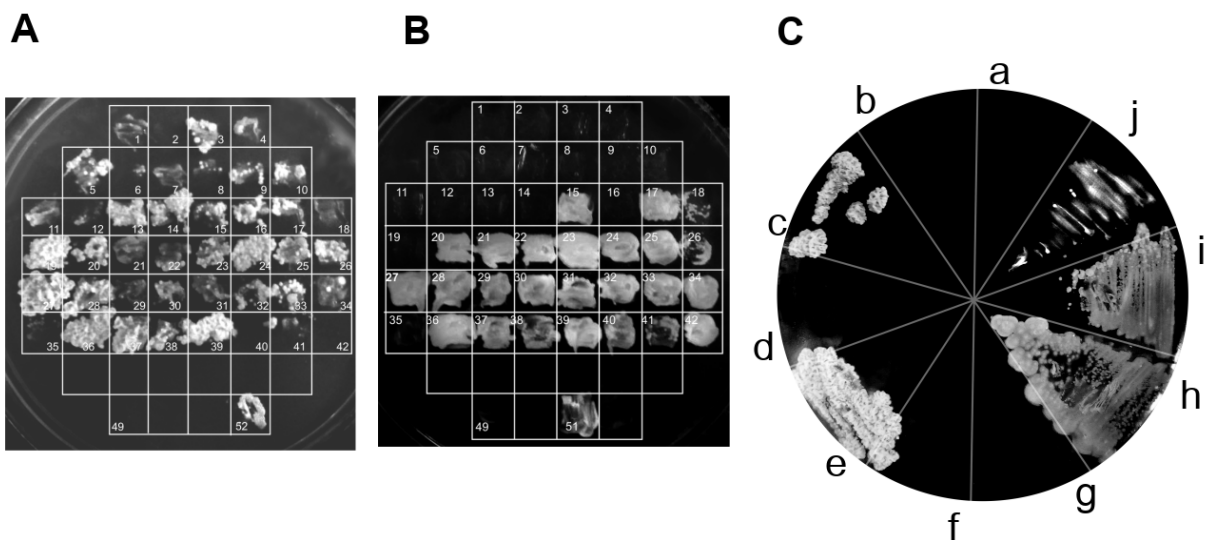


Figura 12: **Selección de colonias aisladas en medio con 5-FOA y medio mínimo sin uracilo.** **A)** Se aislaron 41 colonias de *D. hansenii* Y7426 transformadas mediante electroporación con RNP de Cas9 en medio sólido con 2 mg/mL de 5-FOA. No todas las colonias pueden crecer en medio selectivo (eg. colonias 2, 35 t 40). **B)** De la transformación de la cepa *D. hansenii* C11 se aislaron 42 colonias mediante electroporación con los RNP de Cas9. Solamente 23 fueron capaces de crecer en medio selectivo con 5-FOA. **C)** Purificación de colonias en medio mínimo con 5-FOA. De la cepa *D. hansenii* Y7426 fueron seleccionadas y purificadas las colonias 18, 20, 23 y 27, que no fueron capaces de crecer en ausencia de uracilo. De la cepa *D. hansenii* C11 fueron purificadas las colonias 24, 26 y 27, que no fueron capaces de crecer en ausencia de uracilo. **a)** Cepa silvestre de *D. hansenii* Y7426, no se observa crecimiento. **b)** Colonia 18 de la cepa Y7426, no se observó crecimiento. **c)** Colonia 20 de la cepa Y7426, se observó el crecimiento de colonias. **d)** Colonia 23 de la cepa Y7426, no se observó crecimiento. **e)** Colonia 27 de la cepa Y7426, se observó el crecimiento de colonias. **f)** Cepa silvestre de *D. hansenii* C11, no se observó ningún crecimiento debido al 5-FOA. **g)** Colonia 24 de la cepa C11, no se observó crecimiento. **h)** Colonia 26 de la cepa C11, se observó el crecimiento de colonias. **i)** Colonia 27 de la cepa C11, se observó el crecimiento de colonias. **j)** Cepa 156-1 de *Lachancea kluyveri*, se observó el crecimiento de colonias (cepa auxótrofa de uracilo, control positivo).

7.5. Predicción *in silico* de las posibles mutaciones generadas en el gen *DhURA3* mediante inDelphi

Se realizó un análisis *in silico* mediante la aplicación *online* **inDelphi** (Shen et al., 2018) paralelo a la transformación de *D. hansenii* con RNP, con la finalidad de predecir las posibles mutantes ocasionadas por la acción de Cas9 y el sistema de reparación NHEJ. Lo anterior se hizo con la finalidad de verificar qué tan predecible es el sistema de edición de CRISPR-CAS9 en un gen.

La aplicación web inDelphi funciona mediante el uso de machine learning, una inteligencia artificial (IA) entrenada con los resultados de las mutaciones generadas por la reparación vía NHEJ después de la acción de Cas9. Esta IA fue alimentada con una base de datos de 2000 secuencias de RNA guía y su blanco en el DNA, a partir de las cuales hace la inferencia de las posibles mutaciones y sus probabilidades, dada la secuencia a analizar, con una precisión del 87%. Al introducir una secuencia de 60 pb río arriba y río abajo del sitio de corte de Cas9 en el gen *DhURA3* (**Tabla 6**), los resultados arrojados por inDelphi muestran la predicción de inserciones y deleciones cortas, siendo la principal una deleción de 2 nucleótidos con una probabilidad de 8.3% (**Figura 13**).

Tabla 6: **Secuencia de gRNA introducida e inDelphi.** La secuencia está dividida en dos regiones en referencia al sitio de corte (4 nucleótidos río arriba del sitio PAM): la región 5' y la región 3', ambas de 60 nucleótidos.

Región	Secuencia
5'	ATTTGATGATTTTCGAAGACCGTAAATTTGCTGATATTGGAAACACGGTCAAATCACAAT
3'	ATTCTGGTGGTGTGTTATAAGATTGCTCAATGGTCCGATATTACAAATGCGCATGGTATAA

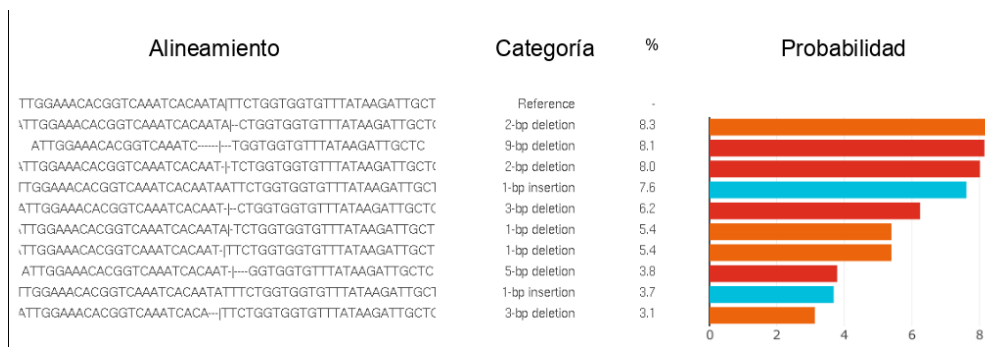


Figura 13: **Predicción de las mutaciones en *DhURA3* por inDelphi.** La aplicación web utiliza *machine learning* para predecir mutaciones a partir de la secuencia del gRNA analizada. El resultado es la predicción de probabilidad de indeles, siendo la más probable una deleción de 2 nucleótidos con un porcentaje de 8.3%.

7.6. Construcción del *cassette* para reemplazar el gen *DhURA3* mediante el sistema de reparación homóloga

La generación de mutantes y deleción de genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo de manera convencional mediante la reparación dirigida por homología (HDR), usando un *cassette* que contiene un gen de resistencia a kanamicina (*KANMX1*) o nourseotricina (*NAT1* o *SAT1*) flanqueado por secuencias homólogas del locus que será eliminado. Sin embargo, la baja tasa de HDR reportada en *D. hansenii* (Prista, et al., 2016), ha impedido la implementación de estas técnicas de manipulación genética, por lo que el uso del sistema CRISPR-Cas9 promovería la inserción de genes mediante HDR.

Como primer paso para eliminar el gen *DhURA3* vía HDR, se generó un módulo a partir de la amplificación del gen *SAT1* contenido en el plásmido pAYCU244 mediante PCR usando los oligonucleótidos descritos en la sección 6.4. El tamaño de este fragmento fue de 1727 pb, e incluye al promotor *DhTEF1* y el terminador *MgPGK1* (Figura 5). Posteriormente, fueron amplificadas las regiones 5' y 3' UTR del gen *DhURA3* (fragmentos A y B, respectivamente) con un tamaño aproximado de 1 kb usando los oligonucleótidos 3, 4, 5 y 6 (Tabla 3). El tamaño de los tres fragmentos fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa

(Figura 14)

La construcción del *cassette* se hizo mediante dos estrategias distintas buscando las condiciones en las que la amplificación por PCR produjera la cantidad necesaria del *cassette* para ser usada en la transformación.

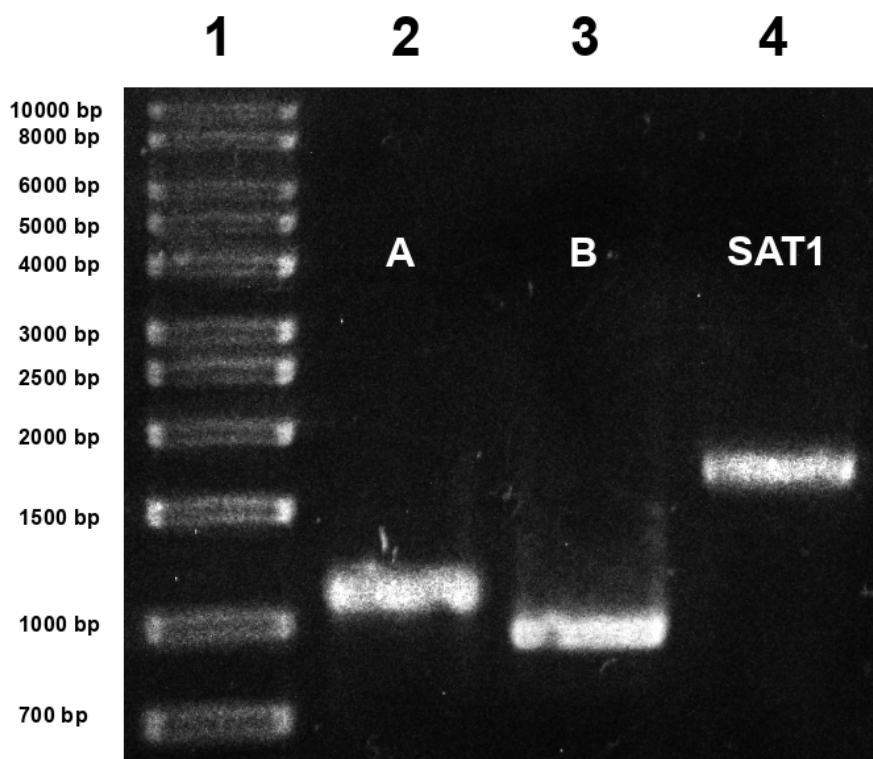


Figura 14: Fragmentos amplificados por PCR para construir el *cassette* de reemplazo del gen *DhURA3*. Los fragmentos A y B (carriles 2 y 3) tienen un tamaño cercano a 1000 pb, estos corresponden a las regiones 5' y 3' UTR del gen *DhURA3*. El gen *SAT1* (carril 4) junto con el promotor *DhTEF1* y el terminador *MgPGK1* tiene un tamaño cercano a 1700 pb.

7.6.1. Primera estrategia de construcción del *cassette* de reparación

Los fragmentos A, B y *SAT1* fueron fusionados de manera secuencial mediante PCR de fusión en dos pasos como se muestra en la figura 15.

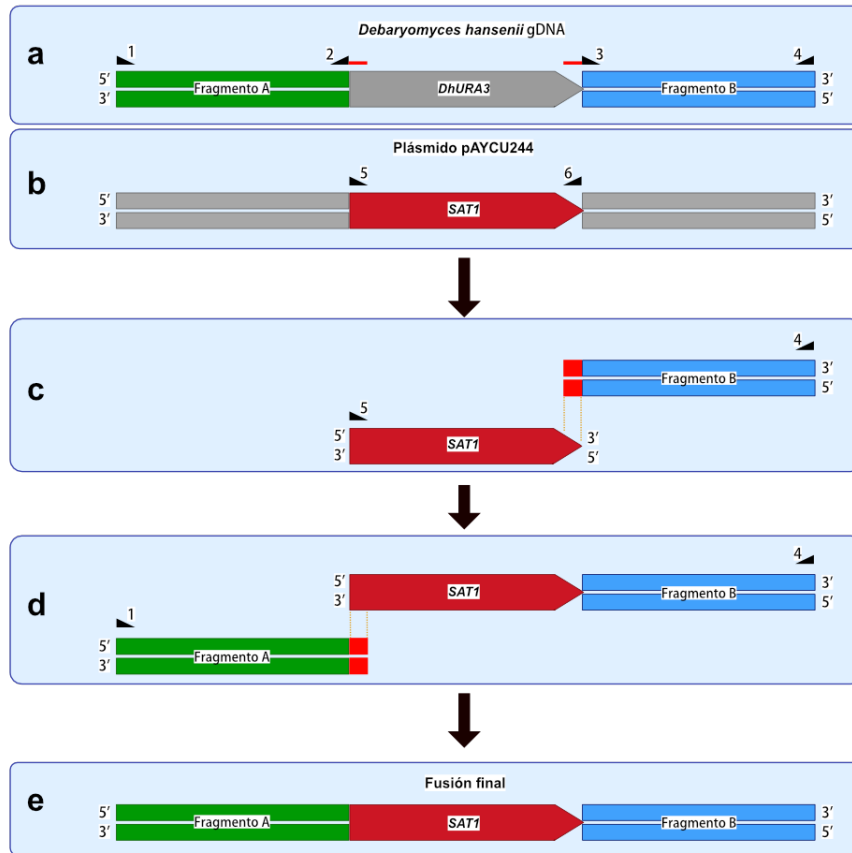


Figura 15: **Primera estrategia utilizada para construir el *cassete* de reparación mediante HDR.** a) Los fragmentos A y B fueron amplificados a partir del DNA genómico de *D. hansenii* estos fragmentos corresponden a las regiones 5' UTR y 3' UTR del gen *DhURA3*. b) El fragmento *SAT1* fue amplificado del plásmido pAYCU244 e incluye tanto al promotor como al terminador. c y d) La fusión mediante PCR fue realizada de manera secuencial: la primera fusión parcial incluye al fragmento *SAT1* y al fragmento B. e) La fusión final incluye la primera fusión parcial y al fragmento A.

Se inició con la fusión del fragmento *SAT1* al fragmento B: el primer paso de la PCR utiliza los mismos fragmentos como oligonucleótidos, que hibridan en la región complementaria de 20 bases que queda después de la amplificación del fragmento B. En el segundo paso de la PCR fueron agregados los oligonucleótidos 5 y 4. El producto de este PCR fue separado en un gel de agarosa 1% y purificado. Esta fusión parcial (*SAT1* + B), fue fusionada con el fragmento A de la misma manera, mediante una PCR en dos pasos, agregando los oligonucleótidos 1 y 4 en el segundo paso (**Figura 15**).

El producto purificado fue utilizado en una nueva PCR para aumentar la cantidad disponible de DNA. El resultado fue separado en un gel de agarosa 1 % (**Figura 16A**). Con un tamaño aproximado de 3800 pb se observa la banda correspondiente a la construcción final, sin embargo, se aprecia una segunda banda a una altura de ~ 1500 pb. Esta banda aparece tanto en la construcción inicial del *cassette* como en amplificaciones posteriores del *cassette* purificado, viéndose favorecida en comparación con la construcción final (**Figura 16A y 16B**).

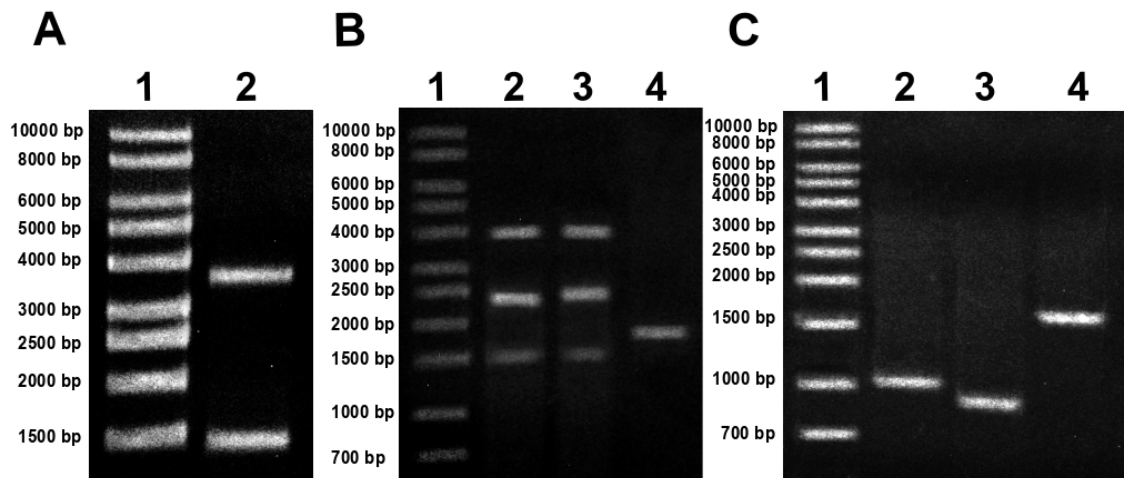


Figura 16: Verificación del *cassette* de reemplazo construido mediante PCR de fusión en dos pasos. **A)** Construcción inicial. La banda en el carril 2 que se encuentra a un tamaño aproximado de 4 kb, corresponde al *cassette* de 3.7 kb. A la altura de 1.5 kb se amplificó una banda inespecífica. **B)** Construcción del *cassette* utilizando dos temperaturas de alineación distintas para la PCR. El carril 2 muestra la PCR con una temperatura de alineamiento de 55 °C, en el carril 3 se encuentra la PCR con una temperatura de 50 °C. Ambas construcciones presentan la banda correspondiente a la construcción final de un tamaño cercano a 4000 pb, así como dos bandas inespecíficas. El carril 4 muestra la amplificación del fragmento *SAT1*. **C)** Amplificación de cada fragmento individual a partir de la construcción final. Carril 2: fragmento A, carril 3: fragmento B, carril 4: fragmento *SAT1*.

7.6.2. Segunda estrategia de construcción del *cassette* de reparación

La segunda estrategia de construcción del *cassette* genera dos fusiones parciales de *SAT1* + A y *SAT1* + B. Estas fusiones parciales fueron realizadas de la misma manera que en la

primera estrategia (Figura 17).

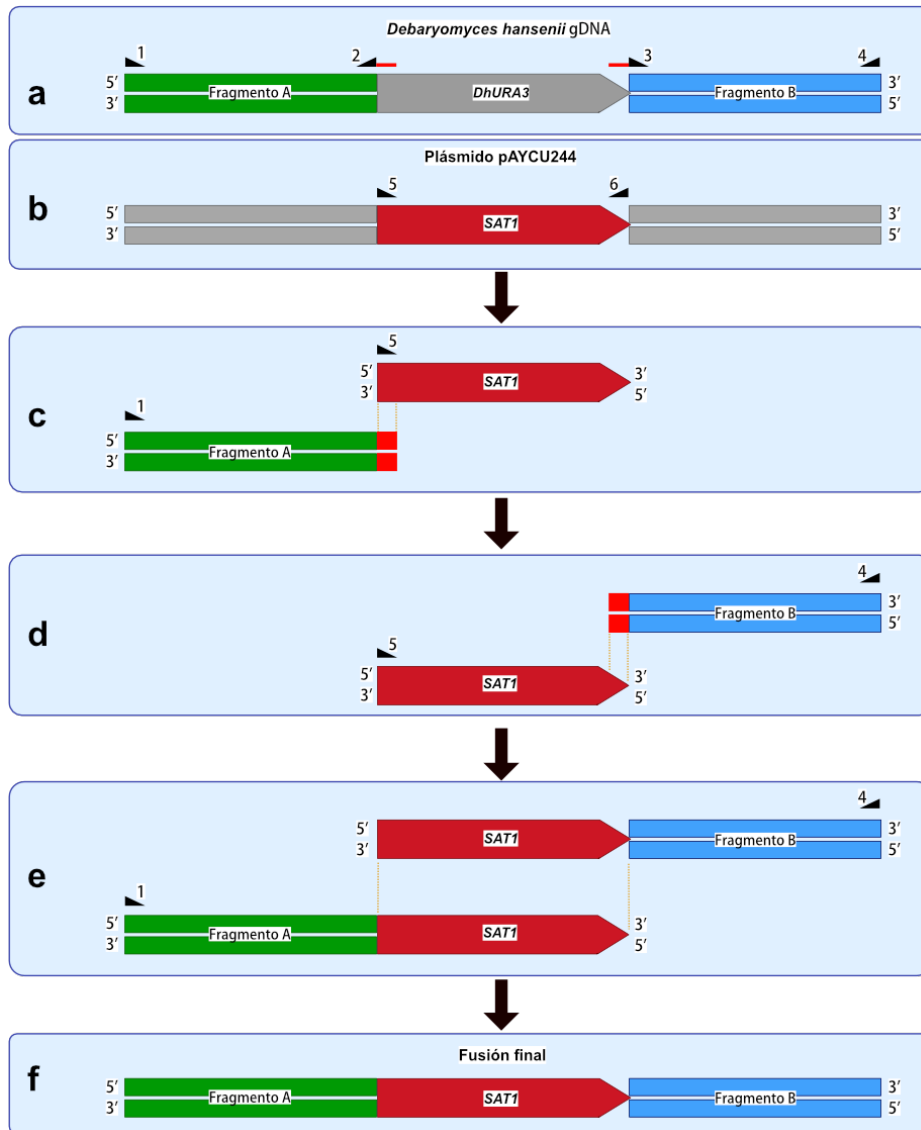


Figura 17: **Segunda estrategia de construcción del *cassette* de *DhURA3*.** a) Los fragmentos A y B fueron amplificados a partir del DNA genómico de *D. hansenii*, estos fragmentos corresponden a las regiones 5' UTR y 3' UTR de *DhURA3*. b) El fragmento *SAT1* fue amplificado del plásmido pAYCU244 e incluye tanto al promotor como al terminador. c y d) Las fusiones parciales mediante PCR fueron realizadas de manera secuencial: la primera fusión parcial incluye al fragmento *SAT1* y al fragmento B, la segunda fusión parcial incluye al fragmento *SAT1* y al fragmento A. e y f) La fusión final fue hecha a partir de las dos fusiones parciales, usando a *SAT1* para la hibridación de ambas fusiones en el primer paso de PCR y su amplificación con los oligonucleótidos 1 y 4.

La fusión final utilizó ambas fusiones en un PCR de dos pasos. El primer paso de PCR hibrida las fusiones parciales que el segundo paso amplifica con los oligonucleótidos 1 y 4 (Figura 18).

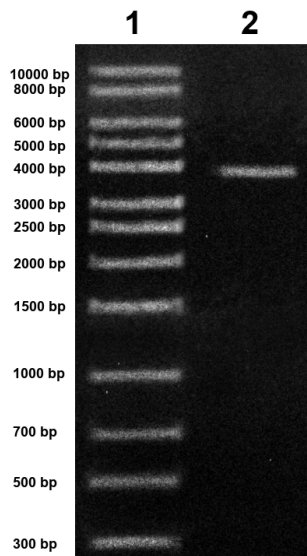


Figura 18: **Purificación del *cassette* construido mediante la segunda estrategia.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: La banda de un tamaño cercano a 4000 pb corresponde al *cassette* completo (~ 3700 pb) después de ser purificado.

Al realizar la PCR de fusión para construir el *cassette*, el amplicón inespecífico seguía presente independientemente de la estrategia usada, por lo que se consideró el diseño de los oligonucleótidos como la posible causa de la aparición de una banda inespecífica que afecta la amplificación del *cassette*. Para verificar que efectivamente el *cassette* estaba conformado por los tres fragmentos señalados anteriormente se decidió amplificar y recuperar de manera individual cada uno de ellos mediante PCR (Figura 16C).

Ya que fue posible recuperar los tres fragmentos de la construcción, se decidió verificar si los oligonucleótidos hibridaron de manera inespecífica. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron alineadas entre sí, así como con el fragmento *SAT1* usando el programa MUSCLE. El resultado del alineamiento fue la hibridación del oligonucleótido 1 y el fragmento *SAT1*, donde las últimas 11 bases de este oligonucleótido son complementarias al fragmento *SAT1*.

Esta hibridación amplifica una fusión incompleta que contiene tanto al fragmento B, como a ~500 pb del fragmento *SAT1*, dando como resultado un fragmento de 1500 pb, consistente con los resultados observados en la construcción del *cassette* (**Figura 19B**).

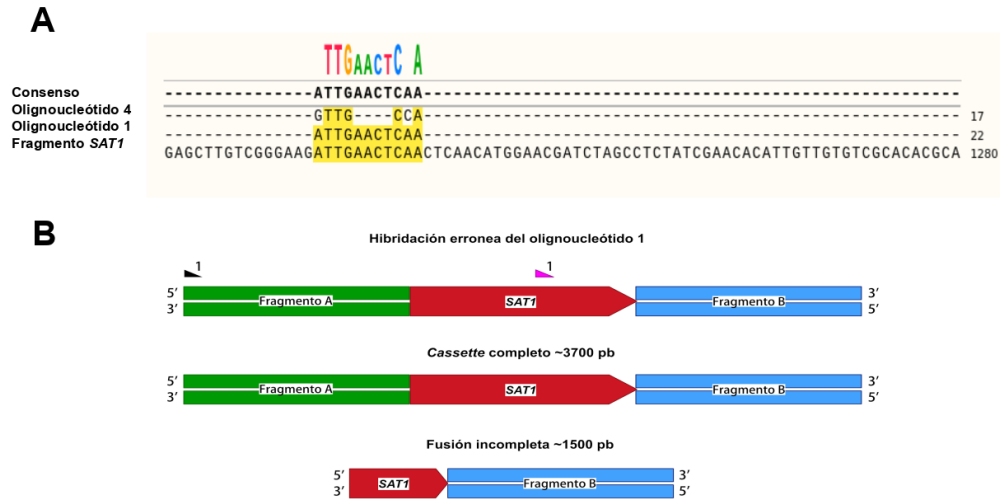


Figura 19: **Hibridación inespecífica del oligonucleótido 1.** **A)** Alineamiento de los oligonucleótidos 1 y 4 con el fragmento *SAT1*. Las últimas 11 bases del oligonucleótido 1 son complementarias a 11 bases del fragmento *SAT1* ubicadas a una altura de 1216 pb, dejando un fragmento de 510 pb fusionado al fragmento B. **B)** Mapas de fusiones del *cassette* de reemplazo de *DhURA3*. La hibridación del oligonucleótido 1 produce tanto el *cassette* completo de cerca de 3700 pb, como una fusión incompleta de 1500 pb que se ve favorecida en la PCR y por tanto impide la amplificación del *cassette* completo.

Debido a esto, se diseñó el oligonucleótido 7, el cual resulta en un amplicón de 731 pb, en lugar de las 1004 pb, evitando así la hibridación inespecífica. Para verificar la especificidad del oligonucleótido 7, se llevó a cabo un PCR con los oligonucleótidos reversos y fueron amplificados los fragmentos A y B (Figura 20).

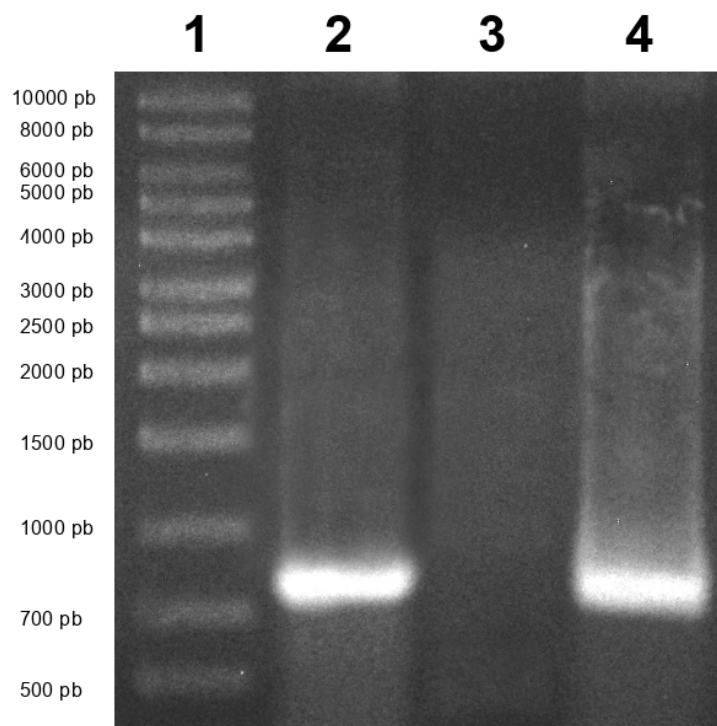


Figura 20: **Prueba de especificidad del oligonucleótido 7.** **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** Amplificación del fragmento A a partir del *cassette* con los oligonucleótidos 7 y 1. Se observa una banda de ~ 700 pb correspondiente a las 731 pb del fragmento A. **Carril 3:** PCR del fragmento *SAT1* usando los oligonucleótidos 7 y 6. No se observa ninguna banda. **Carril 4:** PCR con los oligonucleótidos 7 y 1 a partir del DNA genómico de *D. hansenii*. Se observa una banda de ~ 700 pb, confirmando la especificidad del oligonucleótido 7.

8. Discusiones

Se estableció un protocolo de electroporación estándar para *Debaryomyces hansenii* independientemente del fondo genético. Este protocolo fue puesto a prueba en dos cepas utilizando el plásmido pAYCU244, el cual fue optimizado y diseñado para *D. hansenii*. El resultado fue la obtención de colonias resistentes a nourseotricina, las cuales fueron verificadas como transformantes positivas por la expresión de la proteína yeYFP detectada mediante microscopía confocal. Un protocolo de permeabilización y electroporación estandarizado permite la transformación y por tanto la manipulación genética eficiente de *D. hansenii*. Se diseñó un gRNA específico para el gen *DhURA3* de *D. hansenii*. Esta levadura fue transformada utilizando los complejos de Cas9:gRNA lo que dio como resultado colonias que crecen en medio mínimo adicionado con 5-FOA, fenotipo que corresponde con mutaciones en el gen de *DhURA3*. Aunque este no es el primer estudio que reporta la obtención de mutantes auxótrofos de Uracilo en *D. hansenii*, es el primero que lo hace mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9 en complejos riboproteicos. La construcción del *cassette* de delección de *DhURA3* se logró a partir de dos estrategias. La primera consiste en un PCR de dos pasos que fusiona los fragmentos *SAT1* y B en una fusión parcial. Esta fusión parcial es unida con el fragmento A para formar el *cassette*. La segunda estrategia fusiona los fragmentos A y B de manera independiente con el gen de *SAT1*. Sin embargo, el rendimiento de la producción del *cassette* de delección en ambas estrategias es baja. El enriquecimiento por PCR no es suficiente, por lo que la alternativa más factible es clonar las regiones UTR 5' y 3' del gen *DhURA3* flanqueando el gen *SAT1* directamente dentro del plásmido pAYCU244 aprovechando los sitios de restricción del plásmido, lo que permitirá su propagación masiva en bacterias y por tanto su obtención en las cantidades necesarias para la transformación de *D. hansenii*.

8.1. Permeabilización de la pared celular de *D. hansenii*

El ditiotreitól (DTT) es un agente reductor usado comúnmente en la transformación de levaduras. Este es capaz de reducir los puentes disulfuro encontrados las proteínas de la pared celular (Meilhoc, Masson & Teissié, 1990), lo que provoca su desestabilización y la formación de esferoplastos (Sommer & Lewis, 1971). A pesar de que ha sido reportada como un método más eficiente que de la transformación con acetato de litio (LiAc) (Delorme, 1989; Becker & Guarente, 1991; Thompson, Register, Curotto & Kelly, 1998; Backer et al., 1999), la transformación de levaduras mediante un tratamiento con DTT depende de varios factores, como la fase de crecimiento o el medio en el que las células crecieron. La fase de crecimiento influye en la eficiencia de transformación, siendo la fase de crecimiento exponencial temprana asociada a una mayor eficiencia de transformación por electroporación (Meilhoc, et al., 1990). Tripp, et al. (2013) reportan una relación proporcional entre la eficiencia de transformación por LiAc y el tiempo de tratamiento así como la concentración de DTT. En contraste, Meilhoc et al. (1990) reportaron que en fase de crecimiento exponencial no incrementa la eficiencia de la transformación con una mayor concentración o un mayor tiempo de tratamiento. Ambos resultados no son contradictorios entre sí, puesto que en cada caso las células se encuentran en momentos metabólicos distintos.

La cantidad de colonias obtenidas a través del protocolo de electroporación modificado de Grahl et al. (2017) hizo patente el hecho de que la transformación de ambas cepas de *D. hansenii* en fase de crecimiento exponencial requiere un tratamiento con mayor concentración de DTT y tiempo de incubación en comparación con otros protocolos reportados (Defosse, et al., 2018; Grahl, et al. 2017). El punto ideal donde es posible maximizar la eficiencia de electroporación tras un tratamiento de DTT quizás se encuentre en un punto medio en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, tal como es planteado por Tripp et al. (2013), esta eficiencia puede tener variaciones de acuerdo al fondo genético de la cepa. Debido a que *D. hansenii* es una especie con alta heterogeneidad genética entre cepas (Prista et al.,

2016), es de esperar que el protocolo planteado en este trabajo no tenga la misma eficiencia de transformación para otras cepas de *D. hansenii*.

8.2. *D. hansenii* fue transformada con el plásmido optimizado pAYCU244

Una de las problemáticas que existen para transformar a *D. hansenii* es la falta de plásmidos optimizados que faciliten este proceso, ya que esta levadura tiene un uso preferencial de codones para la síntesis de proteínas, lo que impide el uso de plásmidos comerciales (Prista et al., 2016). El plásmido pAYCU244 resuelve esta problemática al evitar el uso del codón CTG, además de utilizar un promotor fuerte específico de *D. hansenii*.

La estandarización del protocolo de permeabilización mediante DTT permitió transformar a *D. hansenii* con el plásmido pAYCU244. La selección de colonias resistententes en medios sólidos con 150 o 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clonNAT después de cada electroporación nos permitió discernir aquellas cepas que fueron transformadas con el plásmido pAYCU244. La detección de la señal de la proteína amarilla fluorescente (yeYFP) en ambas cepas mediante microscopía confocal nos permitió confirmar que el plásmido pAYCU244 se expresa y se mantiene en *D. hansenii*. Se observó que incluso después de crecer a las células transformadas durante 24 horas en medio rico no selectivo (YPD), la expresión de SAT1 se mantiene ya que son capaces de crecer en medio selectivo a comparación a la forma silvestre (WT) de cada cepa, lo cual demuestra que el plásmido pAYCU244 es un vector estable y eficiente en para *D. hansenii*, como ha sido reportado por Defosse, et al. (2018).

8.3. *D. hansenii* fue electroporada con el complejo Cas9:gRNA y se lograron obtener colonias mutantes

El uso de CRISPR-Cas9 mediante RNP resultó una herramienta efectiva para la modificación genética de *D. hansenii*, evitando la necesidad de expresar la proteína Cas9 desde

un vector como se ha hecho en otros estudios de modificación genética con CRISPR-Cas9 en levaduras del clado CTG (Min et al., 2015; Norton et al., 2017; Vyas et al., 2015), y por lo tanto el uso de promotores y terminadores específicos de la levadura para dirigir la expresión de Cas9 (Grahl et al., 2017).

Haciendo uso del protocolo de transformación estandarizado fueron electroporadas ambas cepas de *D. hansenii* con los RNPs de Cas9:gRNA con el objetivo de obtener colonias auxótrofas de uracilo al mutar el gen de *DhURA3* a través de la reparación por NHEJ.

8.4. Construcción del *cassette* de recombinación para reemplazar el gen *DhURA3*

Se logró construir el *cassette* de recombinación para el reemplazo del gen *DhURA3* mediante reparación dirigida por homología, sin embargo, la producción del *cassette* fue de muy bajo rendimiento. Ya que la cantidad de DNA donante necesaria para la transformación de *D. hansenii* es de 0.5 μ g, la alternativa para superar este obstáculo fue amplificar las regiones 5' y 3' UTRs del gen *DhURA3* mediante PCR y posteriormente clonar estas regiones flanqueando el gen de *SAT1* directamente dentro del plásmido pAYCU244. Esta estrategia utiliza la maquinaria de recombinación de la célula para la formación del *cassette* (Collpy et al., 2010). De esta manera, es posible propagar el plásmido en *E. coli* y posteriormente recuperar el *cassette* de recombinación mediante digestión con enzimas de restricción, permitiendo el enriquecimiento del *cassette* de recombinación para la delección del gen *DhURA3* mediante recombinación homóloga.

9. Conclusiones

La transformación de *Debaryomyces hansenii* usando el protocolo modificado de Grahl y colaboradores (2018) muestra que posiblemente las cepas Y7426 y C11 tienen mayor resistencia a la exposición de DTT en comparación con otras levaduras como *Saccharomyces* o *Candida*, ya que se requiere una concentración y tiempo de exposición mayor de DTT que lo reportado en otros estudios. La transformación y expresión del plásmido pAYCU244 en *D. hansenii*, es un paso importante para el desarrollo de herramientas moleculares eficientes en esta levadura. La detección de la señal fluorescente que fue emitida por la proteína yeYFP después de ~ 24 h en medio YPD no selectivo muestra que este plásmido es estable, ya que no se pierde después de este tiempo. Por lo tanto, una herramienta como ésta es un importante avance en la manipulación genética de *D. hansenii* en futuros estudios. Actualmente, una modificación de esta misma serie de plásmidos pAYCU fue utilizada como vector inicial en la construcción de un sistema CRISPR-Cas9 para la edición de especies de *Candida* (Lombardi, Oliveira-Pacheco, & Butler, 2019), lo cual podría tener un gran impacto en aquellas levaduras con potencial biotecnológico como *D. hansenii*. Sin embargo, el plásmido se pierde después de 48 h de crecer en medio sólido no selectivo. No está claro aún cuánto tiempo puede mantener *D. hansenii* el plásmido. Existen reportes de que el uso de RNPs en lugar de un vector de expresión con Cas9 es una estrategia exitosa en otros sistemas eucariotas tales como líneas celulares humanas (Ramakrishna et al., 2014). Sin embargo, el uso de RNPs en la transformación de levaduras del clado CTG hasta ahora solo ha sido implementado por Grahl et al. (2017). Al no requerir del diseño de un sistema de expresión regulada y precisa de Cas9, este sistema de modificación por CRISPR-Cas9 libre de expresión evita los obstáculos que la traducción diferencial de codones presenta en estas levaduras (Defosee et al., 2018; Grahl et al., 2017). La edición genética de levaduras no convencionales mediante este método puede ser llevada a cabo en conjunto con otras técnicas de manipulación genética y biología molecular (Frazcek et al., 2017), ya que a pesar de que existe un interés en la

industria (Norton et al., 2017; Prista et al., 2016), la dificultad de su manipulación genética ha impedido hasta ahora su estudio y manejo eficiente (Prista et al., 2016). Esta tesis constituye el primer estudio que usa complejos riboproteicos Cas9:gRNA en la modificación genética de la levadura *D. hansenii*.

10. Perspectivas

La pared celular de *D. hansenii* debe estar constituida por una estructura robusta y por eso se requerirá incrementar el tratamiento con DTT. Proponemos aumentar la concentración de DTT a 150 y 200 mM con intervalos de tiempo de 100, 120 y 150 min.

El plásmido pAYCU244 contiene sitios de corte para diversas enzimas de restricción, proponemos utilizar este plásmido para clonar y sobre-expresar diversos genes de interés biotecnológico y/o para estudiar la función de genes en *D. hansenii*.

La modificación de *D. hansenii* mediante RNPs dio como resultado colonias auxótrofas de uracilo, sin embargo el próximo paso es identificar el tipo de mutaciones que ocasionó la pérdida de la función del gen *DhURA3*, por lo tanto, se amplificará el locus de *DhURA3* de las colonias auxótrofas de uracilo mediante PCR y se identificará el tipo de mutaciones que fueron generadas por el sistema de reparación no homóloga mediante secuenciación de Sanger.

11. Referencias

1. Arras, S. D. M., & Fraser, J. A. (2016). Chemical inhibitors of non-homologous end joining increase targeted construct integration in *Cryptococcus neoformans*. PLoS ONE, 11(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163049>
2. Atomi, H., Imanaka, T., & Fukui, T. (2013). Overview of the genetic tools in the Archaea. *Frontiers in Microbiology*, 3(10), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00337>
3. Grahl, N., Demers, E. G., Crocker, A. W., & Hogan, D. A. (2017). Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-albicans *Candida Species*. *MSphere*, 2(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
4. De Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., & Luyten, W. H. M. L. (1999). Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast*, 15(15), 1609–1618.
5. Becker, D. M., & Guarente, L. (1991). High-Efficiency Transformation of Yeast by Electroporation. *Methods in Enzymology*, 194, 182–187. <https://doi.org/10.1128/9781555815462.ch5>
6. Boeke, J., Trueheart, J., Natsoulis, G., & Fink, G. (1987). 5-Fluoroorotic Acid as a Selective Agent in Yeast Molecular Genetic. *Methods in Enzymology*, 154(1984), 164–175.
7. Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
8. Buzzini, P., & Martini, A. (2001). Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathoge-

- nic yeasts . *Medical Mycology*, 39(6), 479–482. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.6.479.482>
9. Collopy, P. D., Colot, H. V., Park, G., Ringelberg, C., Crew, C. M., Borkovich, K. A., & Dunlap, J. C. (2010). High-Throughput Construction of Gene Deletion Cassettes for Generation of *Neurospora crassa* Knockout Strains. *Methods in Molecular Biology*, 33–40. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_3
 10. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems, (February), 819–824.
 11. Courdavault, V., Millerioux, Y., Clastre, M., Simkin, A. J., Marais, E., Crèche, J., ... Papon, N. (2011). Fluorescent protein fusions in *Candida guilliermondii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(11), 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.004>
 12. Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D., & Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous End Joining in Yeast. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 431–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113340>
 13. David, F., & Siewers, V. (2015). Advances in yeast genome engineering, (June 2014), 1–14. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12200>
 14. Davis, A. J., & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), 130–143. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02>
 15. De Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., & Luyten, W. H. M. L. (1999). Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast*, 15(15), 1609–1618.

16. Defosse, T. A., Courdavault, V., Coste, A. T., Clastre, M., de Bernonville, T. D., Godon, C., ... Papon, N. (2018). A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 144(October 2017), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.015>
17. Delorme, E. (1989). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Electroporation, 55(9), 2242–2246.
18. Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J. C., & Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3237–3242. <https://doi.org/10.1128/JCM.01451-08>
19. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
20. Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (2009). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit . *Canadian Journal of Microbiology*, 35(8), 794–800. <https://doi.org/10.1139/m89-132>
21. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
22. Farboud, B., & Meyer, B. J. (2015). Dramatic Enhancement of Genome Editing by CRISPR / Cas9 Through Improved Guide RNA Design, 199(April), 959–971. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.175166>
23. Fraczek, M. G., Naseeb, S., & Delneri, D. (2018). History of genome editing in yeast. *Yeast*, 35(5), 361–368. <https://doi.org/10.1002/yea.3308>

24. Grahl, N., Demers, E. G., Crocker, A. W., & Hogan, D. A. (2017). Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-albicans *Candida* Species. *MSphere*, 2(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
25. Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239–1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
26. Javed, M. R., Sadaf, M., Ahmed, T., Jamil, A., Nawaz, M., Abbas, H., & Ijaz, A. (2018). CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms. *Current Microbiology*, 0(0), 0. <http://doi.org/10.1007/s00284-018-1547-4>
27. 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(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
28. Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. *The Yeasts*, 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
29. Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, 27(march), 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
30. Lamers, D., van Biezen, N., Martens, D., Peters, L., van de Zilver, E., Jacobs-van Dreumel, N., ... Lokman, C. (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0276-7>
31. Liu, T., & Huang, J. (2016). DNA End Resection: Facts and Mechanisms. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(3), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.002>

32. Lombardi, L., Oliveira-Pacheco, J., & Butler, G. (2019). Plasmid-Based CRISPR-Cas9 Gene Editing in Multiple *Candida* Species, 4(2), 1–12.
33. Manivasakam, P., & Schiestl, R. H. (1993). High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation, 21(18), 4414–4415.
34. Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>
35. Meilhoc, E., Masson, J. M., & Teissié, J. (1990). High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Bio/Technology*, 8(3), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nbt0390-223>
36. Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A., & Mitchell, A. P. (2015). *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System, 1(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00130-16>. Editor
37. Mojica, F. J. M., & Garrett, R. A. (2013). Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. In R. Barrangou & J. van der Oost (Eds.), *CRISPR-Cas Systems: RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea* (pp. 1–31). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34657-6_1
38. Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7), 1120–1123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>
39. Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv Für Mikrobiologie*, 54(4), 374–392. <https://doi.org/10.1007/BF00406719>

40. Norton, E. L., Sherwood, R. K., & Bennett, R. J. (2017). Development of a CRISPR-Cas9 System for Efficient Genome Editing of *Candida lusitaniae*. *Molecular Biology and Physiology* 2(3), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00217-17>.
41. Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
42. Onishi, H. (1963). Osmophilic Yeasts. *Advances in Food Research*, 12, 53–94. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60006-3)
43. Petersen, K. M., & Jespersen, L. (2004). Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses, 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02293.x>
44. Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Montiel, V., García, R., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 5(8), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
45. Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
46. Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A. B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., & Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*, 24(6), 1020–1027. <https://doi.org/10.1101/gr.171264.113>
47. Ramírez-Orozco, M., Hernández-Saavedra, N. Y., & Ochoa, J.-L. (2001). *Debaryomyces*

- hansenii* growth in nonsterile seawater ClO₂ - Peptone-containing medium. Canadian Journal of Microbiology, 47(7), 676–679. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-7-676>
48. Raschmanová, H., Weninger, A., Glieder, A., Kovar, K., & Vogl, T. (2018). Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. Biotechnology Advances, 36(3), 641–665. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>
49. Richard, G., Kerrest, A., Lafontaine, I., & Dujon, B. (2005). Comparative Genomics of Hemiascomycete Yeasts: Genes Involved in DNA Replication , Repair , and Recombination, 22(4). <https://doi.org/10.1093/molbev/msi083>
50. Shen, M. W., Arbab, M., Hsu, J. Y., Worstell, D., Culbertson, S. J., Krabbe, O., ... Sherwood, R. I. (2018). Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. Nature, 563(7733), 646–651. <http://doi.org/10.1038/s41586-018-0686-x>
51. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 15(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
52. Sommer, A., & Lewis, M. J. (1971). Effect of Dithiothreitol on Yeast: Sphaeroplast Formation and Invertase Release. Journal of General Microbiology, 68(3), 327–335. <https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-327>
53. Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., & Kelly, R. (1998). An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast, 14(6), 565–571. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980430\)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980430)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B)
54. Tripp, J. D., Lilley, J. L., Wood, W. N., & Lewis, L. K. (2013). Enhancement of plasmid DNA transformation efficiencies in early stationary-phase yeast cell cultures.

- Yeast, (April), 191–200. <https://doi.org/10.1002/yea.2951>
55. Turner, S. A., & Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4(9), 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a019778
 56. Vyas, V. K., Barrasa, M. I., & Fink, G. R. (2015). A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. Science Advances, 1(3), e1500248–e1500248. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500248>
 57. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., & Philippsen, P. (1994). New Heterologous Modules for Classical or PCR-based Gene Disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, 10, 1793–1808.
 58. Wagner, J. M., & Alper, H. S. (2015). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. Fungal Genetics and biology, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>
 59. Wang, P. (2018). Two Distinct Approaches for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in *Cryptococcus neoformans* and Related Species, 3(3), 1–9.