



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto de la ϵ -poli-l-lisina en la viabilidad celular y la transformación de la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR/Cas9

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Maria Fernanda Schwartz Hobbs



DIRECTOR DE TESIS

Dr. James Enrique González Flores

Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado:

1. Datos del alumno

Maria Fernanda

Schwartz

Hobbs

56 13 14 01

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias Biología

31100074-8

2. Datos del tutor

Dr

James Enrique

González

Flores

3. Datos del sinodal 1

M. en C

Norma Silvia

Sánchez

Sánchez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María Soledad

Funes

Argüello

5. Datos del sinodal 3

Dr.

José Eduardo

Rodríguez

Bustamante

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Alejandro

Flores

Alanis

7. Datos del trabajo escrito Evaluación del efecto de la ϵ -Poli-L-Lisina en la viabilidad celular y la transformación de la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

68 páginas

2021

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 todas sus enseñanzas en los seminarios.

Agradezco a la Q. 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 Dra. Norma Silvia Sánchez Sánchez, al QFB. Francisco Javier Padilla Garfias y al Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su generosidad y todo el apoyo brindado para desarrollar varios experimentos fundamentales.

Agradezco a la Dra. Lucero Romero Aguilar de la Facultad de Medicina y al Dr. Miguel Tapia Rodríguez del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su gran apoyo técnico en la unidad de microscopía confocal y por el entrenamiento necesario para la preparación de muestras de microscopía de fluorescencia y todo el apoyo que me brindaron en cuanto a conocimientos generales para el desarrollo de mi tesis.

Agradezco al Dr. Nicolas Papon y a la Dra. Tatiana Defosse del *Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Université d'Angers*, Francia, por donar el plásmido pAYCU244.

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativos PAPIIT con número IA208820 y IN225320.

Agradecimientos

Principalmente a mi mamá, a mi hermana y a mi papá por creer en mí en todo momento y siempre estar en los momentos más difíciles de toda mi carrera y de mi vida. Lo que soy ahora y seré en un futuro siempre será gracias a ustedes.

A toda mi familia que siempre me apoyó en todo.

A todos mis amigos que estuvieron siempre conmigo escuchando todas mis ideas que parecían irreales, pero en especial a Rebeca por siempre creer en mí y ser mi compañera en todas las locuras posibles de la vida, a Melissa por siempre dejar una sonrisa en mi aun en mis peores días, a Isabel por enseñarme mucho dentro de la carrera y ayudarme en todo, a Pau por todas las veces que salvo mis prácticas de campo y de laboratorio y a Lucia por siempre estar a mi lado en cada aventura de laboratorio, gracias por siempre estar niñas, esto también se los debo a ustedes.

Al Dr. James González que me dio la mejor formación que puede tener para enfrentar la vida científica, gracias por todo Magnate.

A todas las personas que se han cruzado en mi camino y me han hecho recobrar mi amor por la ciencia y regresarme la esperanza de que la vida puede cambiar, al Dr. Eduardo Rodríguez Bustamante, al Biol. Rubén Morelos y a la Dra. Miñana.

A Albert que fue el mejor compañero de tesis que la vida me pudo dar, sin ti este camino hubiera sido difícil, aburrido y muy largo, gracias por todo el conocimiento que me diste y sobre todo por ser un verdadero “Magnate de la ciencia”.

A ti Rogelio Hobbs que fuiste mi fortaleza por muchos años y siempre fuiste pieza clave en toda mi formación, por ser la mejor persona que me pudo dar la vida, esta tesis te la debo a ti por siempre estar y por siempre creer en mí aun en los días que pensé que ya no podía más, siempre una parte de ti irá conmigo, aunque la vida ya no nos deje estar juntos.

A todas esas personas que aún creen que la ciencia puede cambiar al mundo y no les importa que tan difícil sean las circunstancias, que la vida de más seres como ustedes porque los necesitamos y necesitaremos siempre.

El camino que no escogí

(Robert Frost, 1916)

*Dos caminos se bifurcaban en un bosque amarillo
y lamentablemente no pude recorrer los dos.*

Y siendo yo un viajero solitario, largo tiempo me detuve.

*Y miré por uno de ellos, tan lejos como pude
hasta donde se perdía en la maleza.*

*Entonces consideré el otro, tan recto como el anterior
y poseedor quizá de mejor derecho,
porque el pasto era más alto y deseaba ser recorrido
aunque quienes habían pasado por allí
los habían desgastado casi por igual.*

*Y esa mañana ambos se tendían
en hojas que ninguna pisada había ennegrecido
¡Ah, dejé el primero para otro día!*

*Y sin embargo, sabedor de que un camino lleva al otro,
dudé si alguna vez regresaría.*

*Debería decir esto con un suspiro
en algún momento, dentro de muchas eras;
dos caminos se bifurcaban en el bosque, y yo,
tomé el camino menos transitado.*

Y esa ha sido la diferencia.

Evaluación del efecto de la ϵ -Poli-L-Lisina en la viabilidad celular y la transformación de la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR/Cas9

Tabla de contenido

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. La levadura <i>D. hansenii</i> y su importancia biotecnológica	2
1.2. Transformación de células mediante electroporación	4
1.3. Usos y aplicaciones de la ϵ -poli-l-lisina en la microbiología	5
1.4. Generalidades del sistema de edición genética CRISPR/Cas9	9
2. Justificación.	16
3. Hipótesis.	17
4. Objetivo General	18
5. Objetivos Particulares	19
6. Material y métodos	20
6.1. Cepas	20
6.2. Viabilidad celular.	20
6.2.1. Preparación de inóculos	20
6.2.2. Medios de cultivo selectivos	20
6.2.3. Preparación de solución con ϵ -Poli-L-Lisina	21
6.2.4. Determinación de la dosis letal en <i>D. hansenii</i>	22
6.2.5. Prueba de viabilidad celular por goteo	22
6.2.5. Detección de especies reactivas de oxígeno utilizando DCFH-DA	22
6.3. Plásmidos	23
6.4. Diseño de RNA guía	24
6.5. Ensamblaje del complejo riboproteico RNAg/Cas9	26
6.6. Protocolos de transformación	26
6.6.1. Transformación con el plásmido pYES2 (<i>S. cerevisiae</i>)	27
6.6.2. Tratamiento con ϵ -PL y transformación con el plásmido pAYCU244 (<i>D. hansenii</i>)	27
6.6.3. Transformación con el sistema CRISPR/Cas9	28
6.7. Curva de crecimiento en el lector de placas	30
6.8. Microscopía de fluorescencia	30
6.9. Microscopía confocal	31
7. Resultado y discusión	32
7.1. <i>D. hansenii</i> Y7426 y C11 tienen distinta tolerancia al tratamiento con ϵ -PL	33
7.2. <i>D. hansenii</i> genera especies reactivas de oxígeno durante el tratamiento con ϵ -PL.	36
7.3. <i>D. hansenii</i> C11 es transformada con el plásmido pAYCU244 utilizando ϵ -PL	38
7.4. <i>D. hansenii</i> C11 es transformada utilizando ϵ -PL y el sistema CRISPR/Cas9	40
7.5. Efecto de ϵ -PL en el crecimiento de <i>D. hansenii</i> Y7426	42
7.6. Degradación de la pared celular de <i>D. hansenii</i> Y7426 con el tratamiento de ϵ -PL	43
8. Conclusiones	46
9. Perspectivas	47
10. Referencias	48

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
5-FOA	<i>5-fluorouracil-6-carboxylic acid monohydrate</i> o ácido 5 - fluororótico
clonNat	Nourseotricina
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> o Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas
crRNA	CRISPR RNA
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DTT	Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	<i>Double-strand breaks</i> o roturas de doble hebra
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas de oxígeno
HDR	<i>Homology directed repair</i> o reparación dirigida por homología
LiAc	Acetato de litio
LPS	Lipopolisacáridos
MM	Medio mínimo
NAT1	Gen que confiere resistencia a nourseotricina
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> o unión de extremos no homólogos
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
OMP	Monofosfato de orotidina
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i> o motivo adyacente de protoespaciador

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
RFP	Proteína roja fluorescente
RNA	Ácido ribonucleico
RNAg	RNA guía
SAT1	Gen que confiere resistencia a nourseotricina
TALEN's	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i> o nucleasa de actividad similar a activador de transcripción
tracrRNA	CRISPR RNA trans-activador
Tris-HCl	<i>Tris-Hydrochloride</i> o Tris-Clorhidrato
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UMP	Monofosfato de uridina
yeYFP	<i>Codon optimized Yellow Fluorescent Protein</i> o proteína amarilla fluorescente con uso de codones optimizado para levaduras del clado CTG
ZFN	<i>Zinc-finger nucleases</i> o nucleasas con dedos de zinc
ϵ -PL	<i>Epsilon-poly-l-lysine</i> o Epsilon-poli-l-lisina

Lista de figuras

- Figura 1. Esquema representativo del sistema CRISPR/Cas9.
- Figura 2. Fases del sistema inmune adaptativo bacteriano CRISPR/Cas.
- Figura 3. Esquema representativo de la nucleasa Cas9 dirigida por el RNA guía.
- Figura 4. Esquema representativo del mecanismo de edición genética mediante el sistema CRISPR/Cas9.
- Figura 5. Estructura química de L-lisina y ϵ -PL.
- Figura 6. Esquematación del posible modo de acción de la ϵ -PL en la levadura *S. cerevisiae*.
- Figura 7. Esquema representativo de mapa del plásmido pYES2.
- Figura 8. Esquema representativo de mapa del plásmido pAYCU244.
- Figura 9. Alineamiento de la secuencia del marco de lectura del gen *DhURA3* y RNAg.
- Figura 10. Porcentaje de unidades formadoras de colonias de *D. hansenii* bajo diferentes concentraciones de ϵ -PL.
- Figura 11. Evaluación de la supervivencia de *D. hansenii* tras la exposición a ϵ -PL en diferentes intervalos de tiempo.
- Figura 12. Acumulación intracelular de EROs en *D. hansenii* tras la exposición a ϵ -PL.
- Figura 13. Expresión de la proteína amarilla fluorescente en *D. hansenii* C11 con el plásmido pAYCU244.
- Figura 14. Curva de crecimiento de *D. hansenii* Y7426 en presencia de ϵ -PL.
- Figura 15. Efecto de ϵ -PL en *D. hansenii* Y7426 durante distintos intervalos de tiempo.

Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros utilizados para transformar a *D. hansenii* con el plásmido pAYCU244.

Tabla 2. Número de colonias de *D. hansenii* resistentes a 5-FOA después de ser tratadas con ϵ -PL y transformadas con el sistema CRISPR/Cas9.

RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante de gran importancia para la investigación básica y aplicada. Sin embargo, esta levadura presenta varias complicaciones para manipular su genoma, lo cual impide aprovechar su potencial biotecnológico. Actualmente, son escasos los reportes que han logrado transformar a *D. hansenii* con la ayuda de plásmidos o módulos de recombinación homóloga. Los protocolos de transformación para *D. hansenii* son ineficientes debido a que la pared celular de esta levadura es resistente a los tratamientos convencionales o a que la recombinación homóloga es muy baja. Para incrementar la eficiencia de transformación en *D. hansenii*, este estudio propone implementar un protocolo de transformación utilizando: (i) ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PL) y (ii) el sistema de edición genética CRISPR/Cas9. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la ϵ -PL en la viabilidad celular y la transformación de *D. hansenii* con el sistema CRISPR/Cas9. Para determinar la dosis no letal de ϵ -PL se realizaron pruebas de viabilidad celular, curvas de crecimiento y valoraciones de la integridad celular mediante microscopía de fluorescencia durante diferentes intervalos de tiempo. Estos resultados permitieron evaluar la dosis-respuesta de ϵ -PL en el crecimiento de *D. hansenii* con el fin de permeabilizar la pared celular e implementar un protocolo de transformación con el complejo riboproteico RNAg*DhURA3*/Cas9, el cual tiene como blanco escindir el gen *DhURA3* que participa en la biosíntesis de uracilo. Se observó que las células pretratadas con ϵ -PL incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno, sugiriendo que este agente debe utilizarse a concentraciones menores de 100 o 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dependiendo de la cepa transformada. Con los experimentos preliminares de transformación se obtuvieron colonias auxótrofas de uracilo, indicando que ϵ -PL podría ser útil en los protocolos de transformación de *D. hansenii* C11. Se requerirán experimentos adicionales que confirmen las posibles mutantes generadas mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 y validar el protocolo de transformación con ϵ -PL.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La levadura *Debaryomyces hansenii* y su importancia biotecnológica

Debaryomyces hansenii es una levadura no convencional de gran importancia en la investigación de ciencia básica y aplicada. Es una levadura oleaginosa, halotolerante, xerotolerante y osmotolerante que puede sobrevivir a diferentes pH que oscilan entre 3 y 10. *D. hansenii* es cosmopolita, abunda en ambientes marinos y pertenece al clado de las levaduras CTG (su codón CUG se traduce ambiguamente para el aminoácido serina o leucina; Prista *et al.*, 2016; Minhas *et al.*, 2009; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Breuer y Harms 2006; Al-Qaysi *et al.*, 2017). *D. hansenii* tiene un gran potencial biotecnológico porque produce: (i) exopeptidasas, enzimas de suma importancia para la maduración de salchichas, quesos y algunas carnes frías, (ii) β -glucosidasas termófilas, enzimas esenciales para la síntesis de alcohol combustible, (iii) toxinas *killer*, sirven como agentes antagónicos contra algunas levaduras que pertenecen al género *Candida* o especies del género *Penicillium* como *P. digitatum* y *P. liticum* (afectan cultivos de cítricos) y algunos hongos fitopatógenos (*Mucor circinelloides*, *Fusarium proliferatum* y *F. subglutinans*) que infectan los granos de maíz (Breuer y Harms, 2006; Banjara *et al.*, 2016; Al-Qaysi *et al.*, 2017; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Prista *et al.*, 2016). *D. hansenii* también se utiliza como agente bioprotector contra algunos mohos lácteos como *Aspergillus sp.*, *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Cladosporium sp.*, *Eurotium chevalieri*, *P. candidum* y *P. roqueforti*. Otra peculiaridad de esta levadura es que resiste las toxinas *killer* producidas por *Trichosporon cutaneum* y *C. zeylanoides* (Al-Qaysi *et al.*, 2017), lo cual podría ser de importancia médica para el tratamiento de algunas infecciones en un futuro. Otra característica interesante de *D. hansenii* es su resistencia frente a diferentes agentes microbianos (dióxido de cloro, penconazol, benomilo, cicloheximida, fluconazol y anfotericina; Breuer y Harms 2006). Por lo tanto, *D. hansenii* es un organismo con

un alto potencial biotecnológico. Sin embargo, su genoma presenta varias complicaciones para la manipulación genética, como la traducción diferencial del codón CUG, siendo uno de los principales obstáculos en el desarrollo de herramientas moleculares eficientes en este organismo 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).

Hasta ahora se han reportado pocas investigaciones enfocadas en modificar genéticamente a *D. hansenii* mediante la inserción de plásmidos por electroporación. Los estudios de Ricaurte y Govind (1999) fueron los primeros en tratar de transformar a *D. hansenii* por medio de dos plásmidos (pMR95 y pMR96), estos plásmidos confieren resistencia a la higromicina. El plásmido pMR96, además contiene el gen de *URA3* que codifica para la enzima Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está involucrada en la biosíntesis de pirimidina; cataliza la descarboxilación del monofosfato de orotidina (OMP) para formar monofosfato de uridina (UMP). Los estudios de Ricaurte y Govind (1999) demostraron que ambos plásmidos pueden utilizarse para transformar tanto a *S. cerevisiae* como a *D. hansenii*, pero con una baja frecuencia de transformación en medio con higromicina, y una alta frecuencia de transformación cuando se seleccionan colonias protótrofas de uracilo. Posteriormente, Minhas y colaboradores (2009) utilizaron los plásmidos pDH4 y pDH11, este último contiene el gen que codifica para la proteína roja fluorescente (RFP) como gen reportero. En dicho estudio nuevamente se demostró que la transformación con plásmidos en *D. hansenii* tiene baja eficiencia.

1.2. Transformación de células mediante electroporación

La electroporación es una de las técnicas físicas más comunes que se usan para la transformación de hongos microscópicos. Esta técnica se basa en la aplicación de campos eléctricos a células o tejidos, lo cual resulta rápido, simple y eficiente; sin embargo, se requieren desarrollar protocolos específicos para cada organismo modelo. La transformación mediante electroporación mejora la formación de poros transitorios en la membrana celular a través de la alteración de su polaridad, causado por un campo eléctrico alterno o pulsado. Los voltajes que se utilizan van de 0.5 a 2.5 V, permitiendo de esta manera que moléculas, enzimas, DNA, metabolitos, lípidos y compuestos farmacéuticos ingresen a la célula quedando atrapados dentro de ésta (Grosser *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2014).

Se han reportado tres factores importantes que influyen en la introducción exitosa de moléculas exógenas en la célula por electroporación: (i) factores celulares, (ii) fisicoquímicos y (iii) eléctricos. Los factores celulares engloban la etapa de crecimiento de la célula, la composición de la pared celular, la densidad del cultivo celular, diámetro celular y la susceptibilidad de las células para transferir cargas. Los factores fisicoquímicos son temperatura, cantidad de DNA exógeno, pH y iones añadidos, y por último los factores eléctricos que están dados por la intensidad de campo eléctrico (kV/cm), la longitud del pulso, el tiempo del pulso y la cantidad de pulsos (Prasanna y Panda 1997; Rivera *et al.*, 2014).

Se han reportado transformaciones exitosas mediante electroporación en hongos filamentosos utilizando tratamientos enzimáticos que degradan la pared celular como el polietilenglicol, zimoliasa o liticasa, que se usa para la preparación de protoplastos y esferoplastos. Algunos grupos han adoptado el uso de una alta concentración de iones de litio como medio para hacer que las

paredes celulares sean permeables al DNA sin formar protoplastos, este método se ha ideado principalmente para *S. cerevisiae* (Ruiz-Diez 2002; Manivasakam y Schiestl 1993).

Otros tratamientos que se han probado son el uso de ditioneitol (DTT) o de acetato de litio (LiAc) para permeabilizar la pared celular en levaduras; estos tratamientos son eficaces para la transformación de algunas levaduras como *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, entre otras (Grahl *et al.*, 2017; De Backer *et al.*, 1999; Beggs 1978; Gietz, 1995; Thompson *et al.*, 1998; Wu y Letchworth 2004). Sin embargo, no hay reportes hasta el momento que mencionen que estos tratamientos mejoran la eficiencia en la transformación de *D. hansenii*.

1.3. Usos y aplicaciones de la ϵ -poli-L-lisina en la microbiología

La ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PL) se produce típicamente como un homopolipéptido catiónico de aproximadamente 25-30 residuos de L-lisina (**Figura 1**). Se ha observado que la actividad antimicrobiana de este compuesto está relacionada con el número de residuos repetidos de L-lisina y se ha demostrado que se requieren más de 10 residuos para que esta ejerza su actividad antimicrobiana de una manera adecuada (Shima *et al.*, 1984; Takehara *et al.*, 2010). El péptido está unido por un enlace amino entre el grupo α -carboxilo y el grupo ϵ -amino de L-lisina (Chheda y Vernekar 2015; Hylgaard *et al.*, 2014, Tan *et al.*, 2018).

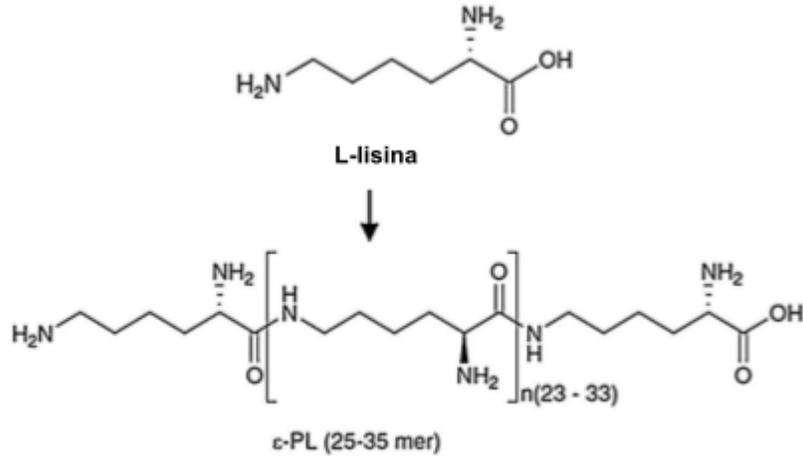


Figura 1. Estructura química de L-lisina y ϵ -PL. La ϵ -PL es un pequeño homo-biopolímero natural del aminoácido esencial L-lisina (25–35 residuos) que biosintetiza la bacteria *Streptomyces albulus* durante el proceso de fermentación. Imagen modificada de Pandey y Kumar (2014).

La ϵ -PL tiene actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos tales como levaduras, hongos y bacterias. Esta se adsorbe electrostáticamente a la superficie celular de la bacteria, seguida de un desprendimiento de la membrana externa. Esto eventualmente conduce a una distribución anormal del citoplasma que causa daño a la célula bacteriana (Shima y Sakai 1984; Hylgaard *et al.*, 2014). Además de que la ϵ -PL es biodegradable, soluble en agua, comestible, no es tóxica para los humanos y lo produce de manera natural la bacteria *Streptomyces albulus* (Shima y Sakai 1984; Hylgaard *et al.*, 2014). En Japón, la ϵ -PL se ha utilizado como conservador de alimentos para refrescos, quesos, arroz, ensaladas, pescado, salsas, y alimentos a base de papa (Tan *et al.*, 2018; Hylgaard *et al.*, 2014). La ϵ -PL también se utiliza como agente emulsionante, dietético, fibras biodegradables, hidrogeles, recubrimiento de biochips, entre otras aplicaciones. (Chheda y Vernekar 2015).

La actividad antimicrobiana de la ϵ -PL es bien conocida, pero el mecanismo de acción no ha sido descrito a detalle hasta que Hylgaard y colaboradores (2014) observaron que este agente tiene un

efecto inhibitor sobre el crecimiento y la viabilidad celular de bacterias (*Escherichia coli* y *Listeria innocua*). Estos estudios demostraron que a mayor concentración de ϵ -PL, hay una mayor muerte celular. Sin embargo, se observó que a las 15 hrs. de la actividad antimicrobiana con ϵ -PL, los cultivos bacterianos comienzan a recuperarse, infiriendo que el compuesto fue degradado o desactivado, lo cual permite crecer a las células sobrevivientes (Hylgaard *et al.*, 2014). La exposición de ϵ -PL en células de *E. coli* resulta en la eliminación parcial de la membrana externa, hendiduras en la pared celular y cambios irregulares en la rigidez celular. Se observó que la exposición a altas concentraciones de ϵ -PL (mayores de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) condujo a la desintegración completa de las células, mientras que a concentraciones menores se elimina la capa de lipopolisacáridos (LPS; Ye *et al.*, 2013; Hylgaard *et al.*, 2014).

La actividad antimicrobiana de la ϵ -PL se basa en las interacciones electrostáticas, esto quiere decir que la interacción de la ϵ -PL con la superficie celular es por medio de fuerzas electrostáticas y se ve afectada por la presencia de otras moléculas cargadas positivamente que compiten por sitios cargados negativamente en la superficie celular. Debido a que los LPS en la membrana externa son polianiónicos, necesitan cationes para mantener la interacción lateral de los lípidos, y la fluidez y la fusión de la membrana se ven afectadas cuando se altera la homeostasis catiónica. La interacción de ϵ -PL por fuerzas electrostáticas implica que las interacciones con grupos cargados negativamente en la pared celular, membrana o LPS son críticas para su acción (Ye *et al.*, 2013; Hylgaard *et al.*, 2014).

Posteriormente, Tan y colaboradores (2018) estudiaron el efecto de la ϵ -PL que tiene afinidad por los enlaces β -1,3 glucano y β -1,6 glucano, de la pared celular de la levadura convencional *S. cerevisiae*. En este estudio se evaluó el crecimiento celular en presencia de la ϵ -PL a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se midió la cantidad de residuos de quitina

liberada en el medio después de cada tratamiento. Se concluyó que la ϵ -PL es un compuesto biocida que a bajas concentraciones ($<200 \mu\text{g/mL}$) puede funcionar como un agente que permeabiliza la pared y membrana celular, mientras que a altas concentraciones ($>200 \mu\text{g/mL}$) degrada la pared celular cambiando la morfología o matando las células. En algunos casos se ha observado que la ϵ -PL puede aumentar la concentración de especies reactivas del oxígeno (EROs) provocando estrés oxidante y daños en el DNA (**Figura 2**; Ye *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2018).

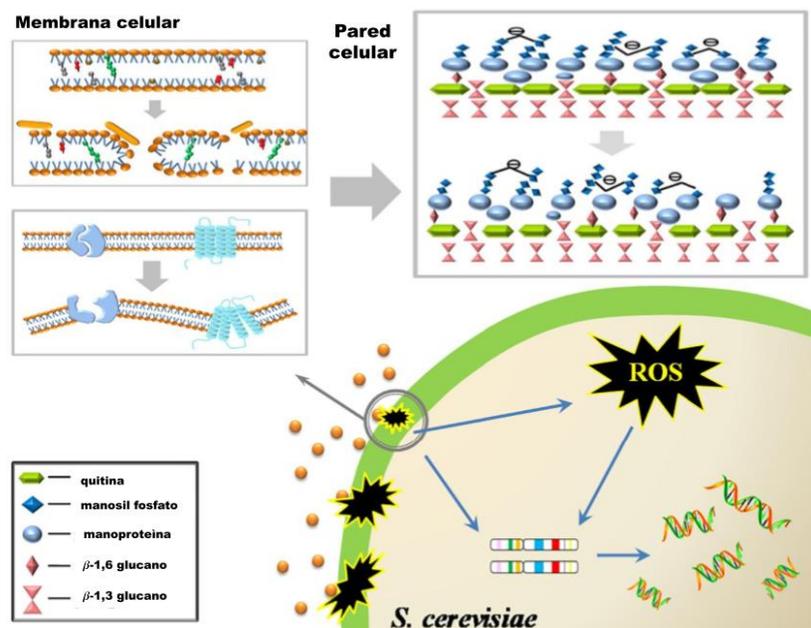


Figura 2. Esquematización del posible modo de acción de la ϵ -PL en la levadura *S. cerevisiae*. La ϵ -PL tiene afinidad por los enlaces β -1,3 glucano y β -1,6 glucano, lo cual desestabiliza la pared y la membrana celular. Después de exponer a *S. cerevisiae* al agente ϵ -PL ($> 200 \mu\text{g/mL}$) se acumulan especies reactivas de oxígeno (EROs, o ROS por sus siglas en inglés) y se fragmenta el material genético. Imagen modificada de Tan *et al.*, (2018).

Se ha descrito que la composición general de la pared celular de *D. hansenii* es similar a la de *S. cerevisiae*, la cual consiste en manoproteína, β -glucanos y pequeñas cantidades de quitina (Nguye *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2002), por lo que se espera que el mecanismo de acción de la ϵ -PL sea similar en *D. hansenii*.

1.4 Generalidades del sistema de edición genética CRISPR/Cas9

Durante las últimas siete décadas, la biología ha cambiado de una manera radical gracias al descubrimiento del DNA, este cambio revolucionario comenzó con el desarrollo continuo de métodos y enzimas para la síntesis y restricción del DNA como la reacción en cadena de polimerasas (PCR) y el descubrimiento de las enzimas de restricción, proporcionando mecanismos para aislar genes y fragmentos de DNA, así como para introducir mutaciones *in vitro* en genes de células y organismos modelo (Hille *et al.*, 2018). Sin embargo, introducir mutaciones en sitio específicos del genoma de células y organismos ha sido una tarea sumamente complicada. Las estrategias más exitosas se basan en el empleo de las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN's) que utilizan los principios de reconocimiento del DNA-proteína para introducir cortes específicos en la molécula de DNA. No obstante, dificultades con el diseño y síntesis de las proteínas específicas necesarias para que ambos sistemas puedan funcionar han supuesto barreras infranqueables en la adopción generalizada de estos dos métodos de edición genética (Cao *et al.*, 2018; Hille *et al.*, 2018). Actualmente, el sistema CRISPR/Cas ha sido empleado para generar diversas mutaciones tanto en células de mamíferos y de plantas, así como de microorganismos, con la finalidad de realizar estudios genéticos (Doudna y Charpentier, 2014; Javed *et al.*, 2018), demostrando ser una herramienta de edición genética más eficiente que sus predecesores (los sistemas ZFN y TALEN's).

La secuencia CRISPR por sus siglas en inglés (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas), es un sistema inmunitario procariótico que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos, que genera una forma de inmunidad adquirida (Hille *et al.*, 2018). La secuencia CRISPR se encuentra en aproximadamente el 40% de los genomas de bacterias y en el 90% de los genomas

de las arqueas (Javed *et al.*, 2018). Se ha descrito que CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas análogo al silenciamiento con RNA interferente en eucariontes, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos. CRISPR se compone de una secuencia líder o promotora y distintas secuencias espaciadoras (entre 25 y 50 nucleótidos) flanqueadas por elementos repetidos, usualmente palindrómicas (aproximadamente de 32 nucleótidos). El primer paso en la respuesta inmunológica es la adquisición de secuencias espaciadoras tras la exposición con el patógeno, ya sea material genético de un virus o plásmido (**Figura 3a**). Una vez que estas secuencias están en el citoplasma, la célula reconoce una secuencia conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *Protospacer Adjacent Motif*) e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como elemento espaciador junto al promotor en CRISPR. Durante este proceso, se genera una copia de la secuencia repetida para que ambas queden flanqueando el nuevo fragmento (**Figura 3b**).

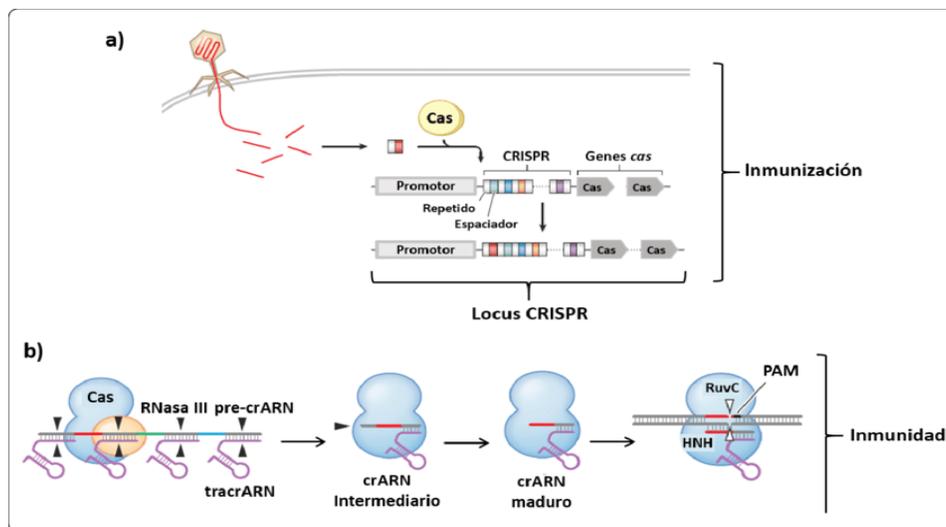


Figura 3. Fases del sistema inmune adaptativo bacteriano CRISPR/Cas. a) Fase de inmunización. Adquisición de fragmentos de material genético exógeno de bacteriófagos o plásmidos, estos fragmentos son incorporados en el locus CRISPR, el cual será utilizado posteriormente para proteger a la bacteria de una reinfección. b) Fase de inmunidad. La secuencia espaciadora es transcrita desde la región promotora, el transcrito resultante crRNA intermedio se procesa en un crRNA maduro. El crRNA se utiliza para guiar a la nucleasa específica Cas hasta su sitio blanco. Las puntas de flechas negras y blancas indican los sitios de unión del RNA y DNA respectivamente. Se muestra el sitio PAM, el cual se requiere para el reconocimiento del sitio blanco. Imagen modificada de Chávez-Jacobo (2018).

Se han identificado tres tipos de sistemas según las endonucleasas involucradas y el procesamiento del crRNA. En el sistema CRISPR I, se utiliza una cascada de caspasas para activar a Cas3; en CRISPR II, se activa Cas9 y en CRISPR III, se activa Cas6. En el presente trabajo nos enfocaremos en el segundo sistema (Cas9), por ser el más empleado en ingeniería genética debido a la alta tasa de eficiencia de Cas9. En el sistema CRISPR II se requiere adicionalmente un segundo RNA no codificante, llamado tracrRNA, el cual es complementario a la secuencia palindrómica repetida. Una vez que se finaliza la transcripción de CRISPR, el tracrRNA forma un dímero con las secuencias repetidas. A su vez, una RNasa III reconoce este híbrido crRNA/tracrRNA y lo procesa para generar un transcrito maduro de aproximadamente 40 nucleótidos y un asa de doble cadena en 3' de 20 nucleótidos. En el tercer y último paso, Cas se asocia con el crRNA maduro y forma el complejo riboproteico CRISPR/Cas. El crRNA es quien guía al complejo hacia su blanco por medio del reconocimiento de la secuencia complementaria. En caso de una segunda infección, la porción de la secuencia espaciadora del crRNA maduro reconoce y forma un complejo DNA-RNA con el material exógeno. Este complejo es reconocido por los dos dominios de la enzima Cas, RuvC y HNH. Cada uno de los dominios corta una hebra distinta, por lo cual el proceso se conoce como *double strand break* (DSB; **Figura 4**).

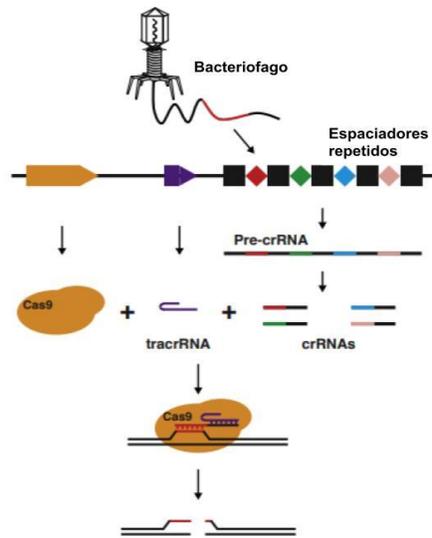


Figura 4. Esquema representativo del sistema CRISPR/Cas9. El DNA exógeno se captura e inserta entre las repeticiones del locus CRISPR del genoma bacteriano. Pre-crRNA se transcribe y procesa en múltiples crRNA con una secuencia espaciadora única y una secuencia repetida. El crRNA forma un complejo con Cas9 y tracrRNA, el cual reconoce al DNA exógeno que contiene la misma secuencia de algún espaciador, permitiendo que Cas9 lo reconozca y genere una ruptura de doble hebra en el DNA exógeno. Imagen modificada de Cao *et al.*, (2018).

Existen dos vías para reparar estos cortes en ambas hebras: vía no homóloga, conocida como *Non homologous end Joining* (NHEJ), y la vía homóloga, conocida como *homology directed repair* (HDR). No obstante, la NHEJ muchas veces resulta en inserciones o deleciones no deseadas dentro del genoma (codones de paro o cambios en el marco de lectura), mientras que para inducir la HDR, se requiere la introducción de una secuencia que tenga un alto porcentaje de homología en sus extremos 5' y 3' (Marraffini y Sontheimer, 2010; Horvath, P. y Barrangou, R. 2010; Doudna y Charpentier, 2014; Hille *et al.*, 2018; **Figura 5**).

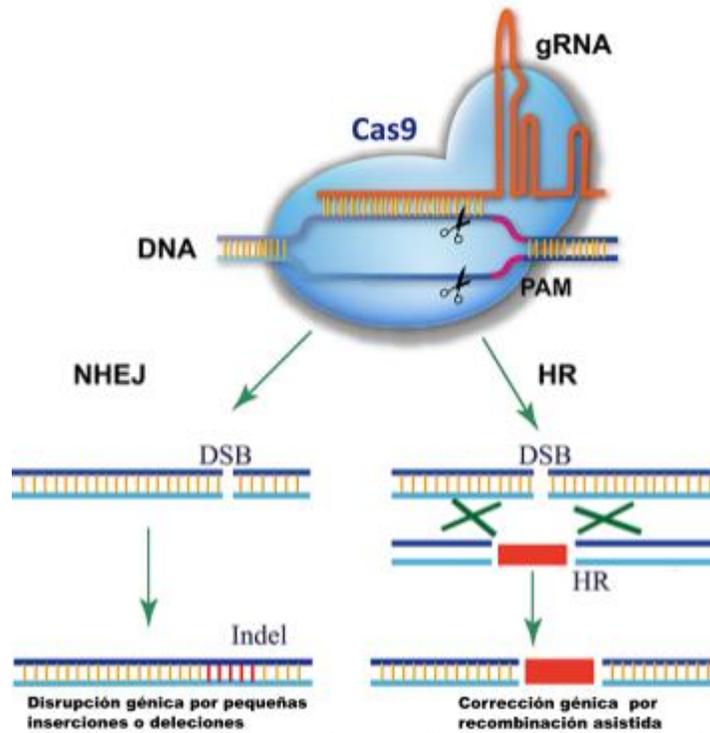


Figura 5. Esquema representativo del mecanismo de edición genética mediante el sistema CRISPR/Cas9. La edición de una secuencia de DNA por CRISPR/Cas9 requiere un RNA guía único, que dirige la endonucleasa Cas9 a una región específica del DNA genómico, resultando en una ruptura de doble cadena. Al proporcionar un DNA donante o módulo de recombinación, se puede crear un DNA transgénico, mientras que, en ausencia de un DNA donante, la célula huésped reparará la ruptura de la doble cadena, lo cual resulta en inserciones o deleciones. Imagen modificada de Ding *et al.*, (2016).

Actualmente, el interés en el sistema CRISPR/Cas9 reside principalmente en la sencillez de su diseño, ya que se requiere solamente sintetizar la secuencia de RNA guía (RNAg) complementaria de la región de interés que será digerida por la nucleasa Cas9 (**Figura 6**).

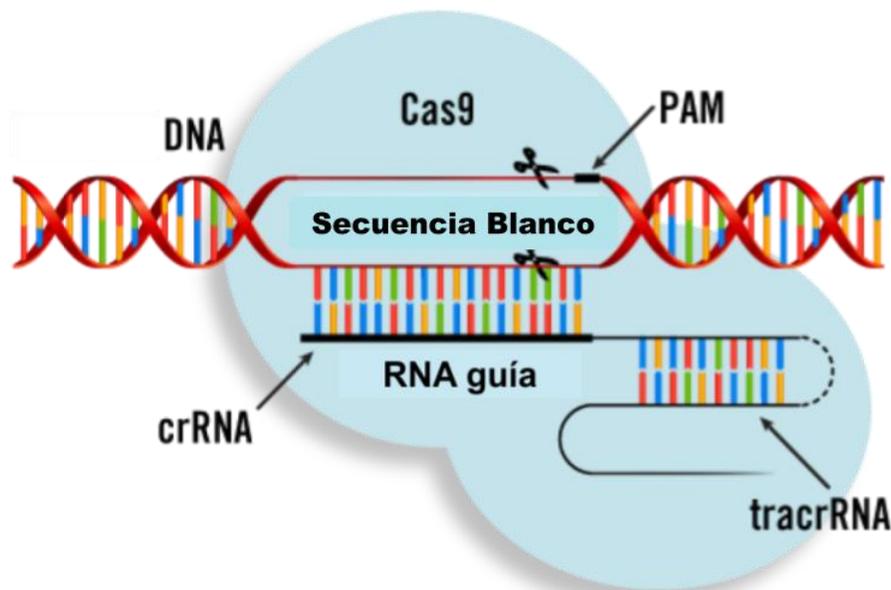


Figura 6. Esquema representativo de la nucleasa Cas9 dirigida por el RNA guía. Cas9 puede digerir un DNA exógeno a través de la secuencia guía de 20 nucleótidos denominada sgRNA (compuesto por porciones de crRNA y tracrRNA). La secuencia guía se aparea con el DNA blanco, esto ocurre en la secuencia río arriba del motivo adyacente 5'-NGG PAM. Cas9 escinde la doble cadena alrededor de 3 pares de bases río arriba del PAM. Imagen modificada de Ding *et al.*, (2016).

Recientemente, el equipo de Grahl y colaboradores (2017) desarrolló un sistema de edición genética con el sistema CRISPR/Cas9 en las levaduras no convencionales: *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. auris*, el cual funciona en otros organismos como hongos filamentosos, plantas y algas, así como células de mamíferos de ratones o líneas celulares humanas (Grahl *et al.*, 2017). Este protocolo consiste en ensamblar un complejo que consta de la proteína Cas9 y el RNAg (RNAg/Cas9), el cual se introduce en la célula mediante electroporación con el fin de provocar una ruptura de doble cadena en una región particular del genoma, en paralelo a lo anterior se inserta un casete, que contiene el marcador del gen NAT1 que confiere resistencia a nourseotricina. En este estudio, se demostró que con la inclusión de la Cas9 y el RNAg aumentó el porcentaje de transformantes con el reemplazo correcto del gen, reduciendo así el número de transformantes que

requieren ser seleccionadas para obtener una mutante (Grahl et al., 2017). Por tal motivo se espera que al implementar el sistema CRISPR/Cas9 mediante electroporación con el complejo riboproteico RNAsg/Cas9, se logre obtener un protocolo más eficiente con el fin de modificar a *D. hansenii* como en los casos de otras levaduras no convencionales (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *C. deneoformans*, *Y. lipolytica* y *P. pastoris*, entre otras; Fraczek et al., 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

Debaryomyces hansenii es una levadura osmotolerante, que ha sido de gran interés para los estudios fisiológicos, metabólicos, genéticos y moleculares, debido a su versatilidad en sobrevivir y proliferar en condiciones que pueden ser agrestes para otras levaduras no convencionales. *D. hansenii* ha sido aislada de diversos hábitats que presentan baja actividad de agua, alto contenido de azúcar, fuentes limitadas de carbono y altas concentraciones de sal. *D. hansenii* es una levadura modelo con características atractivas para estudiar diferentes tipos de estrés, ya que sus capacidades metabólicas son de gran interés para la industria y tienen implicaciones ecológicas. Por lo tanto, *D. hansenii* es una levadura de gran interés para la biotecnología. A pesar de los avances biotecnológicos en la modificación genética de levaduras no convencionales, son escasos los reportes que han logrado transformar a *D. hansenii* con la ayuda de plásmidos o módulos de recombinación homóloga; esta levadura presenta varias complicaciones para manipular su genoma, lo cual impide aprovechar su potencial biotecnológico. Los protocolos de transformación para *D. hansenii* son ineficientes y la frecuencia de la recombinación homóloga en el genoma de *D. hansenii* aparentemente es baja. Para incrementar la eficiencia de transformación en *D. hansenii*, en este estudio se propuso implementar un protocolo de transformación utilizando: (i) la ϵ -poli-L-lisina, un agente antimicrobiano permeabilizante con afinidad por los polisacáridos (1,3- β y 1,6- β glucanos) de la pared celular, y (ii) el sistema de edición genética CRISPR/Cas9.

3. HIPÓTESIS

La composición de la pared celular de *Debaryomyces hansenii* hace que la viabilidad de este organismo esté comprometida en presencia de ϵ -Poli-L-Lisina. Sin embargo, utilizar una concentración adecuada permitirá permeabilizar la pared y así estandarizar un protocolo de transformación por electroporación para construir mutantes mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ϵ -Poli-L-Lisina en la viabilidad celular y la transformación de la levadura *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la relación dosis-respuesta de ϵ -PL en el crecimiento de *D. hansenii*.
- Cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) de *D. hansenii* después de un tratamiento con ϵ -PL mediante fluorometría.
- Transformar células de *D. hansenii* previamente tratadas con ϵ -PL con el plásmido pAYCU244 (condición control).
- Estandarizar un protocolo de transformación con células de *D. hansenii* pretratadas con ϵ -PL utilizando el complejo riboproteico RNAg*DhURA3*/Cas9 y generar colonias auxótrofas de uracilo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas

En este trabajo se utilizó la levadura *Debaryomyces hansenii* cepas C11 y Y7426. La cepa C11 fue aislada del mar de Cortés (Golfo de California, México) y pertenece a la colección de levaduras marinas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR, S. C.; Hernández-Saavedra 1990). La cepa Y7426 fue aislada de un estuario sueco (Norkrans 1966), la cual fue donada por el laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BY4741, auxótrofa de uracilo) se utilizó como control positivo en cada transformación con el plásmido pYES2 como se describió previamente (González *et al.*, 2020).

6.2. Viabilidad celular

6.2.1. Preparación de inóculos

Los inóculos de la cepa C11 o Y7426 se prepararon a partir de colonias frescas que fueron sembradas en medio rico YPD sólido (extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2%, dextrosa al 2% y agar al 2%) durante 48 o 72 hrs. a 28°C. Del medio sólido se tomó una colonia y se inoculó un tubo cónico para centrifuga con 10 mL de YPD líquido (extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y dextrosa al 2%) y se incubó durante 18 hrs. a 28°C a 180 rpm. Los preinóculos fueron lavados con 10 mL de agua estéril y fueron resuspendieron en 5 mL de agua estéril. A partir de estas células se inocularon matraces de 30 mL con 10 mL de YPD líquido a una densidad óptica (OD_{600nm}) de 1 con la ayuda de un espectrofotómetro Beckman DU 650.

2. Medios de cultivo selectivos

Para seleccionar colonias auxótrofas de uracilo (mutantes *ura3Δ* en la cepa C11) se preparó medio mínimo sólido (MM) con YNB al 0.17% (*Yeast Nitrogen Base*), sulfato de amonio al 0.5%, agar 2% y dextrosa al 2%. Para seleccionar colonias auxótrofas de uracilo (mutantes *ura3Δ* en la Y7426) se preparó MM sólido con sales (K_2HPO_4 160 mg/L; KH_2PO_4 350 mg/L; Na_2SO_4 280 mg/L; K_2SO_4 340 mg/L), agar 2% , dextrosa al 2%, asparagina (1.12 g/L) como fuente de nitrógeno (este medio ha sido utilizado en el laboratorio previamente y ha resultado eficiente para el crecimiento de la cepa Y7426). Los medios MM fueron preparados con o sin uracilo y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (1 o 2 mg/mL). Para detectar la expresión del gen *URA3*, que codifica la orotina-5'-monofosfato (OMP) dicarboxilasa. Las levaduras con un gen *URA3* activo (Ura+) convierten 5-FOA en fluorodesoxiuridina, lo cual es tóxico para las células e inhibe su crecimiento. Las mutantes *ura3Δ* crecen en presencia de 5-FOA cuando se les adiciona uracilo.

Para seleccionar las células transformadas con el plásmido pAYCU244 se preparó YPD con agar (2%) con concentraciones de 150 μ g/mL o 300 μ g/mL de clonNAT (nourseotricina) dependiendo de la cepa; Y7426 (150 μ g/mL) y C11 (300 μ g/mL; Zamora-Bello, 2020). Las células *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pYES2 (Thermo Fisher Scientific) fueron seleccionadas en MM con y sin uracilo. El plásmido pAYCU244 se propagó en la cepa *E. coli XL1Blue* en medio LB (cloruro sódico 10%, triptona 10%, extracto de levadura 5%, agar 1.5%) con ampicilina (50 μ L).

6.2.3. Preparación de solución con ϵ -Poli-L-Lisina

Se preparó una solución concentrada al 1% de clorhidrato de ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PL) $[(C_6H_{12}N_2O)_x \cdot HCl]$, con un peso molecular entre 2.5 y 3.8 kDa, la cual es distribuida por la empresa Wilshie Technologies Inc., (Princeton, NJ, EUA). Se pesó 1 g de ϵ -PL en una balanza

analítica, y se disolvió por agitación en 100 mL de agua destilada (1%). La solución de ϵ -PL al 1% se esterilizó por filtración. A partir de la solución stock de ϵ -PL al 1% se obtuvieron las concentraciones necesarias para evaluar el efecto de la ϵ -PL en la viabilidad celular de *D. hansenii*.

6.2.4. Determinación de la dosis letal en *D. hansenii*

Para determinar la dosis letal de ϵ -PL en *D. hansenii* se prepararon cajas de medio rico YPD sólido con diferentes concentraciones de ϵ -PL estéril (100, 250, 500 y 750 μ g/mL). Se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo de *D. hansenii* ($OD_{600} = 1$) y se realizaron diluciones seriadas con agua estéril hasta llegar a la dilución 1/10000. A partir de la dilución 1/10000 se toman 50 μ L de muestra y se vertieron en cajas petri que contenían el medio rico YPD sólido con ϵ -PL. Las células se dejaron incubar de 3 a 5 días a 28°C. Se contaron las colonias que crecieron en cada caja para ambas cepas.

6.2.5. Prueba de viabilidad celular por goteo

Para realizar la prueba de viabilidad celular por el método de goteo en placa, se inocularon células en matraces de 25 mL con 10 mL de YPD líquido y ϵ -PL estéril (0, 100, 250, 500 μ g/mL) a una $OD_{600nm} = 1$. Los cultivos se incubaron a 28°C a 180 rpm durante 60 min. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60 min) y se realizaron diluciones seriales de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} con agua estéril. De cada dilución se tomaron 10 μ L y se sembraron en YPD sólido durante 72 hrs. a 28°C.

6.2.6. Detección de especies reactivas de oxígeno utilizando DCFH-DA

Se cultivaron células de *D. hansenii* (cepa C11 y Y7426) en 50 mL de medio YPD líquido a 28 °C durante 24 hrs. a 180 rpm, a este cultivo se le midió la OD_{600} en un espectrofotómetro Beckman DU 650, con el fin de obtener una $OD_{600nm} = 1$. Se agregaron al medio de cultivo concentraciones

El plásmido pAYCU244 fue diseñado, construido y donado por Defosse *et al.*, (2018). El plásmido pAYCU244 contiene el gen *SAT1* de resistencia a la nourseotricina y el gen reportero que codifica para la proteína amarilla fluorescente (yeYFP) (**Figura 8**). El gen *SAT1* es regulado a partir del promotor P_{DhTEF1} y contiene el terminador T_{MgPGK1} . El gen reportero yeYFP es regulado por el promotor P_{MgACT1} y el terminador T_{MgTRP1} . El plásmido fue linearizado usando la enzima de restricción *ApaI*, en una digestión sencilla que da como resultado una banda de aproximadamente 5987 pb .

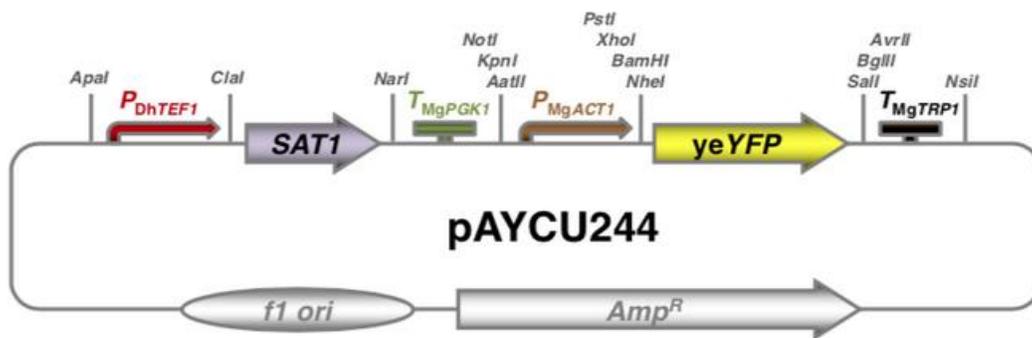


Figura 8. Esquema representativo de mapa del plásmido pAYCU244. El plásmido contiene el gen *SAT1* que confiere resistencia a nourseotricina, regulado a partir del promotor P_{DhTEF1} y el terminador T_{MgPGK1} y el gen reportero yeYFP que expresa la proteína amarilla fluorescente regulada por el promotor P_{MgACT1} y el terminador T_{MgTRP1} . Tomado de Defosse *et al.*, (2018).

6.4. Diseño de RNA guía

El diseño del RNA guía (RNAg) fue realizado previamente a este trabajo por el alumno Alberto Zamora Bello como a continuación se describe: la secuencia de RNAg para dirigir a Cas9 hasta el locus de *DhURA3* fue diseñada usando la herramienta de RNAg propuesta por Naito *et al.*, (2015) CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>). La secuencia del gen *DhURA3* fue obtenida del GeneBank (número de acceso AY033329.1), la cual tiene un 88.4 % de identidad con la secuencia de referencia NC006043.2. Ambas secuencias fueron ingresadas en CRISPRdirect

(<http://crispr.dbcls.jp/>) con la opción de revisar la especificidad para *D. hansenii*. El resultado fueron 61 posibles diseños de RNAg, para la secuencia AY033329.1 y NC 006043.2, de los cuales se eligieron las secuencias: 5'-ACAGTCAAATCACAATACTCTGG-3' y 5'-ACGGTCAAATCACAATATTCTGG-3', 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, lo cual fue considerado en el diseño para elegir el RNAg, ya que se ha reportado que esto incrementa la especificidad de Cas9 (**Figura 9**; Farboud y Meyer, 2015). Adicional a esto, se hizo un análisis en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la correspondencia de la secuencia elegida al gen blanco y descartar posibles cortes inespecíficos de Cas9. Los detalles de esta parte metodológica se realizaron en colaboración con el alumno Alberto Zamora Bello, consultar liga: <http://132.248.9.195/ptd2020/enero/0799452/Index.html> (Zamora-Bello 2020).

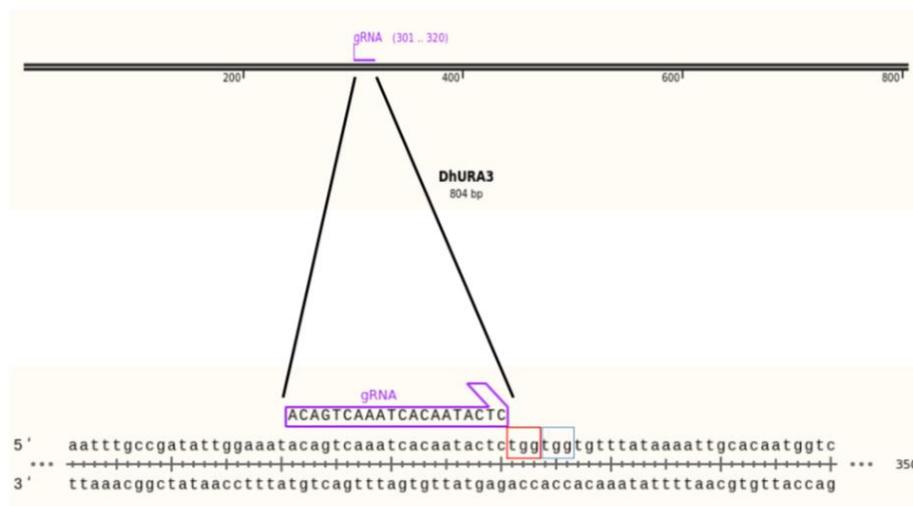


Figura 9. Alineamiento de la secuencia del marco de lectura del gen *DhURA3* y RNAg. Se alineó la secuencia del RNAg seleccionado (morado) con la región de la secuencia del marco de lectura del gen *DhURA3*. El RNAg es complementario a una secuencia de 20 pb del gen *DhURA3* (del nucleótido 301 al 320, considerando el ATG como el inicio de la numeración). El sitio PAM (cuadro rojo) se encuentra adyacente a otro sitio PAM adicional (cuadro azul).

6.5. Ensamblaje del complejo riboproteico RNAg/Cas9

El complejo riboproteico (RNP) fue preparado con el kit Alt-R CRISPR-Cas9 de IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc.*) siguiendo las indicaciones del fabricante. El kit contiene el amortiguador dúplex, la proteína Cas9 purificada, el crRNA y el tracrRNA liofilizados. El crRNA fue resuspendido en 100 μL de amortiguador dúplex, mientras que el tracrRNA fue resuspendido en 200 μL del mismo amortiguador. La proteína Cas9 tiene una concentración de fábrica de 60 μM . Los reactivos resuspendidos en el amortiguador dúplex fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La formación del RNP se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Grahl *et al.*, (2017). 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 dúplex a una concentración final de 4 μM . Para la formación del RNAg se mezclaron cantidades equimolares de crRNA y tracrRNA, se incubó a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min para promover la formación del RNAg y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para la formación del RNP se mezcló la proteína Cas9 y el RNAg en una proporción de volúmenes 1:1.2 (3 μL de proteína Cas9 y 3.6 μL de RNAg, volumen final 6.6 μL por transformación).

6.6. Protocolos de transformación

La transformación en *S. cerevisiae* y *D. hansenii* se realizó mediante electroporación con el electroporador Multiporator Eppendorf con celdas de 2 mm. El plásmido pAYCU244 fue purificado a partir de cultivos de *E. coli XL1Blue* previamente transformadas. El plásmido pAYCU244 fue linearizado con la enzima de restricción ApaI y se utilizó directamente la reacción de digestión en la transformación. Para la transformación de *S. cerevisiae*, se utilizó el protocolo que recomienda Eppendorf (Sclafani 2001).

Para transformar a *D. hansenii* (C11 y Y7426) con el plásmido pAYCU244 y el sistema CRISPR/Cas9, se utilizó el protocolo de Grahl *et al.*, (2017), dicho protocolo de transformación fue adaptado para utilizar ϵ -PL en lugar de Ditioneitol (DTT) y amortiguador de electroporación (LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM) como se describe en el apartado 6.6.2.

6.6.1. Transformación con el plásmido pYES2 (*S. cerevisiae*)

Protocolo de transformación de S. cerevisiae (Sclafani 2001):

1. Inocular 500 mL de medio YPD con una alícuota de un cultivo crecido toda la noche (16 - 24 h) o una colonia de un cultivo de caja e incubar hasta que alcance una $OD_{600} = 1$.
2. Recuperar las células por centrifugación a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) durante 5 min a 4 °C.
3. Lavar con 50 mL de agua estéril fría, centrifugar a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) durante 5 min a 4 °C. Repetir el lavado con 25 mL de agua estéril fría.
4. Resuspender en 2 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 μ g de DNA (en un volumen no mayor a 5 μ L), a 65 μ L de células electrocompetentes.
7. Homogeneizar suavemente con la punta de la micropipeta e incubar 5 min 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 a la celda, mezclar con pipeta, recuperar y sembrar en medio selectivo (en este caso se utilizó medio mínimo sin uracilo) durante 3 días.

6.6.2. Tratamiento con ϵ -PL y transformación con el plásmido pAYCU244 (*D. hansenii*)

Protocolo de transformación de *D. hansenii* reportado por Grahl *et al.*, (2017) con algunas modificaciones

1. Inocular 10 mL de medio YPD en un tubo cónicos para centrifuga de 50 mL con una colonia de *D. hansenii* e incubar a 28 °C con agitación de 180 rpm por 24 h.

2. Al siguiente día inocular 50 mL de medio YPD en un matraz de 250 mL a una $OD_{600nm} = 1$. A estos cultivos se les dio el tratamiento de ϵ -PL (se requiere encontrar la concentración para cada cepa o especie de levadura)
3. Después del tratamiento con ϵ -PL, centrifugar las células a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) por 10 min y lavar dos veces con 20 mL de agua estéril fría, y una vez con 2 mL de sorbitol 1M frío. Recuperar por centrifugación a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) durante 10 min a 4 °C.
4. Resuspender en 200 μ L de sorbitol 1 M frío.
5. Se agregaron 5 μ L de DNA de espermatozoos de salmón con una concentración de 10 μ g/ μ L que fue previamente hervido a 95 °C durante 5 min e incubado en hielo por 5 min.
6. Colocar 40 μ L de células en una celda de electroporación.
7. Agregar el plásmido linealizado (1 μ g resuspendido en 10 μ L de agua estéril libre de nucleasas) a 200 μ L de células y transferir a la celda de electroporación.
8. Electroporar con 2 pulsos de 2.5 kV durante 5 ms.
9. Inmediatamente después de la electroporación recuperar las células de la celda con 1 mL de YPD líquido.
10. Inocular las células tratadas en un matraz con 10 mL de YPD líquido e incubar durante 24 hrs. a 28 °C con agitación de 180 rpm.
11. Al siguiente día lavar las células recuperadas y sembrar 50 o 100 μ L de células (previamente lavadas) en medio selectivo YPD sólido con nourseotricina (clonNAT) a 150 μ g/mL para la cepa Y7426 y 300 μ g/mL para la cepa C11. El aumento en la concentración de clonNAT en C11 fue a consecuencia de que esta cepa es más resistente como lo reportó Zamora-Bello *et al.*, (2020).
12. Se aislaron colonias y se les dieron dos pases de purificación (se picaron colonias individuales, se resembraron en cajas con YPD sólido con nourseotricina (clonNAT) como se describió anteriormente, por 72 hrs. a 28 °C para eliminar cualquier posible falso positivo.

6.6.3. Transformación con el sistema CRISPR/Cas9

Protocolo de transformación de *D. hansenii* reportado por Grahl *et al.*, (2017) con algunas modificaciones:

1. Inocular 10 mL de medio YPD líquido en un tubo cónicos para centrifuga de 50 mL con una colonia de *D. hansenii* e incubar a 28 °C con agitación constante a 180 rpm por 24 hrs.
2. Al siguiente día inocular 50 mL de medio YPD líquido en un matraz de 250 mL a una $OD_{600nm} = 1$, dar el tratamiento de ϵ -PL (se requiere encontrar la concentración para cada cepa o especie de levadura).

3. Después del tratamiento con ϵ -PL, centrifugar las células a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) por 10 min y lavar dos veces con 20 mL de agua estéril fría, y una vez con 2 mL de sorbitol 1M frío. Recuperar por centrifugación a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) durante 10 min a 4 °C.
4. Resuspender en 200 μ L de sorbitol frío 1 M.
5. Se agregaron 5 μ L de DNA de esperma de salmón con una concentración de 10 μ g/ μ L que fue previamente hervido a 95 °C durante 5 min e incubado en hielo por 5 min.
6. Colocar 40 μ L de células en una celda de electroporación de 2 mm.
7. Agregar 6.6 μ L de RNP (Cas9 + RNAg) a la celda de electroporación.
8. Colocar la celda en el electroporador, dar de 1 a 2 pulsos a 2.5 kV durante 5 ms.
9. Inmediatamente después de la electroporación agregar 1 mL de YPD líquido a la celda y tomar las células electroporadas con la misma pipeta.
10. Inocular las células en un matraz con 10 o 25 mL de YPD líquido e incubar durante 24 h a 28 °C con agitación de 180 rpm.
11. Sembrar 50 o 100 μ L en medio mínimo con o sin uracilo y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA; 2 mg/mL).
12. Se aislaron colonias y se les dio dos pases de purificación (se picaron colonias individuales, se resembraron en cajas medio mínimo con o sin uracilo y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA; 2 mg/mL), como se describió anteriormente, por 72 hrs. a 28 °C para eliminar cualquier posible falso positivo.

6.7. Curva de crecimiento en el lector de placas

Se cultivaron células de *D. hansenii* (cepa Y7426) en 50 mL de YPD líquido hasta obtener una $OD_{600nm} = 1$. Se agregó ϵ -PL estéril (100 μ g/mL) al medio de cultivo. El cambio en la absorbancia del cultivo se determinó con un lector de placas automatizado BioScreen C, durante 72 hrs. con agitación constante a 28 °C. Se registró la absorbancia cada 20 min a una OD_{600nm} .

6.8. Microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células de *D. hansenii* (Y7426) en 50 mL de medio YPD líquido a 28 °C durante 24 hrs. a 180 rpm, a este cultivo se le determinó la OD_{600nm} en un espectrofotómetro Beckman DU 650, y se ajustó el volumen para obtener un cultivo de una OD_{600nm}= 1. Se agregó al medio de cultivo una concentración de 100 µg/mL ε-PL estéril. Las células se lavaron 2 veces con agua fría estéril y se recuperaron a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) por 10 min después de ser tratadas con ε-PL en los diferentes intervalos de tiempo (0, 15 y 30 min). Luego las células se resuspendieron en 2 mL de agua estéril. Se tomaron 5 µL de células y se colocaron en un portaobjetos de silano con 2 µL de blanco de calcoflúor M2R a 100 ng/mL (Sigma Aldrich). Se mezcló suavemente la preparación de colorante con células y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes en un microscopio Olympus IX81 Fase De Fluorescencia Invertida con un objetivo de inmersión en aceite de 100X y una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm. Las imágenes capturadas se analizaron utilizando el software ImageJ, como se reportó por Romero-Aguilar y colaboradores (2020) y Zavala-Moreno y colaboradores (2014).

6.9. Microscopía confocal

Las colonias transformantes de *D. hansenii* C11 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. Se seleccionó al azar una colonia transformada del medio selectivo YPD con nourseotricina (clonNAT) a 300 µg/mL, y se inoculó en YPD, las células se incubaron durante 24 h a 28 °C con agitación constante a 180 rpm. Este cultivo fue centrifugado a 3000 rpm (Beckman JS-4.5) durante 5 min. Se eliminó

el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 1 mL de formaldehído al 4 % por 5 min. Estas células se lavaron dos veces con agua estéril y se resuspendieron finalmente en 500 μ L de agua estéril. Se incubaron 2 μ L de células con calcoflúor, durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron, se montaron en portaobjetos SilanePrep (Sigma Co.) y se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal (Zeiss LSM5 Pascal, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Alemania) con inmersión en aceite con el objetivo 100X con una apertura numérica de 1.3 (Romero-Aguilar *et al.*, 2020). Las células se observaron 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 se reportó por Courdavault y colaboradores (2011). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debaryomyces hansenii es una levadura de importancia biotecnológica en la industria alimentaria, agrícola, médica y bioenergética (Prista *et al.*, 2016; Minhas *et al.*, 2009; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Breuer y Harms, 2006; Al-Qaysi *et al.*, 2017). Sin embargo, el potencial de *D. hansenii* no ha sido explotado, debido a la falta de herramientas moleculares para su modificación genética. En algunos estudios se ha logrado modificar su genoma con una tasa de mutación baja y poco eficiente (Ricaurte y Govind 1999; Minhas *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2020). En este trabajo se implementó un protocolo de transformación en *D. hansenii* utilizando el agente ϵ -PL con el fin de permeabilizar la pared o membrana celular y generar mutantes auxótrofos de uracilo mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 vía complejos riboproteicos.

Actualmente, existen pocos estudios sobre el uso y efecto de ϵ -PL en levaduras (Hylgaard *et al.*, 2014), uno de los estudios más recientes se realizó en la levadura modelo *S. cerevisiae* (Tan *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios se centran en evaluar el efecto biocida de ϵ -PL en bacterias Gram negativas y positivas (Hylgaard *et al.*, 2014). Se sabe que ϵ -PL es capaz de generar poros en la pared y la membrana celular de bacterias y hongos; sin embargo, no se ha evaluado si este agente electrostático puede funcionar como un tratamiento permeabilizante en los protocolos de transformación que requieren introducir endonucleasas como Cas9 para editar un genoma. Por lo tanto, esta tesis representa una primera aproximación para estudiar y evaluar el efecto de la ϵ -PL en la viabilidad celular de la levadura *D. hansenii*, lo cual podría permitir implementar un protocolo de transformación eficiente utilizando el sistema CRISPR/Cas9.

Los protocolos de transformación en levaduras generalmente involucran la eliminación de la pared celular y la formación de poros transitorios en la membrana celular, utilizando un tratamiento

previo con acetato de litio (LiAc) o enzimas que digieren la pared celular (zimoliasa o liticasa). Dado que los protocolos convencionales de transformación son poco reproducibles e ineficientes en *D. hansenii*, se decidió probar un protocolo de electroporación con el sistema CRISPR/Cas9 que fue utilizado exitosamente en la levadura no convencional *C. lusitaniae* (Grahl *et al.*, 2017). Adicionalmente, el protocolo de electroporación de Grahl y colaboradores (2017) fue modificado, se utilizó el agente ϵ -PL en lugar del tratamiento convencional para permeabilizar la pared celular.

7.1. D. hansenii Y7426 y C11 tienen distinta tolerancia al tratamiento con ϵ -PL

En primera instancia se determinó la dosis letal de ϵ -PL en dos cepas de *D. hansenii* (Y7426 y C11). Ambas cepas se sembraron en medio rico YPD sólido con diferentes concentraciones de ϵ -PL y se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) como se describe en materiales y métodos. Se contabilizó un 40% de UFC de la cepa Y7426 con respecto al control durante los ensayos de viabilidad en medio rico YPD sólido con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ϵ -PL (**Figura 10A**), mientras que con 250 o 500 $\mu\text{g/mL}$, se observó entre 13 y 7% de UFC con respecto al control, y no se observó crecimiento con 750 $\mu\text{g/mL}$ de ϵ -PL (**Figura 10A**). Por otra parte, se contabilizó un 85% de UFC de la cepa C11 con respecto al control en medio rico YPD sólido con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ϵ -PL (**Figura 10B**), mientras que con 250 $\mu\text{g/mL}$ se observó un 60% de UFC. El porcentaje de UFC fue de 30% cuando la concentración de ϵ -PL se incrementó a 500 $\mu\text{g/mL}$, y no se observó crecimiento con 750 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 10B**). Por lo tanto, a mayor concentración de EPL, se observa una disminución en la viabilidad celular de ambas cepas. Sin embargo, la cepa Y7426 es más sensible que la cepa C11. Se podría considerar que la dosis letal de ϵ -PL para ambas cepas es a partir de 750 $\mu\text{g/mL}$ de ϵ -PL.

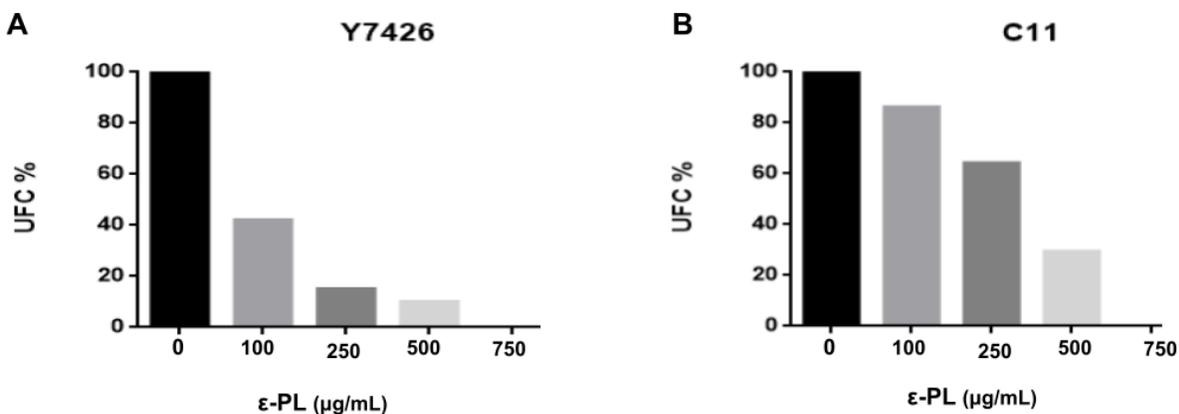


Figura 10. Porcentaje de unidades formadoras de colonias de *D. hansenii* bajo diferentes concentraciones de ϵ -PL. Se utilizaron las cepas Y7426 (A) y C11 (B) para el ensayo de viabilidad celular mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Ambas cepas fueron crecidas en YPD hasta un valor de 1 de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ antes de diluir las células (1/10000) y sembrarlas en medio rico YPD con distintas concentraciones de ϵ -PL (0, 100, 250, 500 y 750 $\mu\text{g/mL}$). Las células se incubaron de 3 a 5 días a 28 °C. Los datos de las gráficas representan el promedio de dos réplicas biológicas.

Para afinar el uso de ϵ -PL en un protocolo de transformación por electroporación para *D. hansenii*, se decidió establecer el intervalo de tiempo para tratar las células con ϵ -PL. Por lo tanto, se realizaron pruebas de viabilidad celular en *D. hansenii* (Y7426 y C11) utilizando la concentración mínima de ϵ -PL que afecta el porcentaje de UFC en cada cepa (Y7426, 100 $\mu\text{g/mL}$ y C11, 250 $\mu\text{g/mL}$), variando el intervalo de tiempo con el fin de reducir la pared celular sin llegar al efecto biocida en *D. hansenii*. A partir de cultivos celulares tratados con ϵ -PL (100 o 250 $\mu\text{g/mL}$) se tomó una alícuota a diferentes intervalos de tiempo (0, 15 y 30 min) como se describe en materiales y métodos. Se encontró que la cepa Y7426 es sensible al tratamiento de ϵ -PL (100 $\mu\text{g/mL}$) a partir de 15 min (**Figura 11A**). Cuando la cepa C11 es tratada con 250 $\mu\text{g/mL}$ de ϵ -PL se observa que a partir de 15 min comienza a disminuir la viabilidad celular (**Figura 11B**). Los datos obtenidos permitieron concluir que C11 es menos sensible a ϵ -PL que Y7426 (**Figuras 10 y 11**).

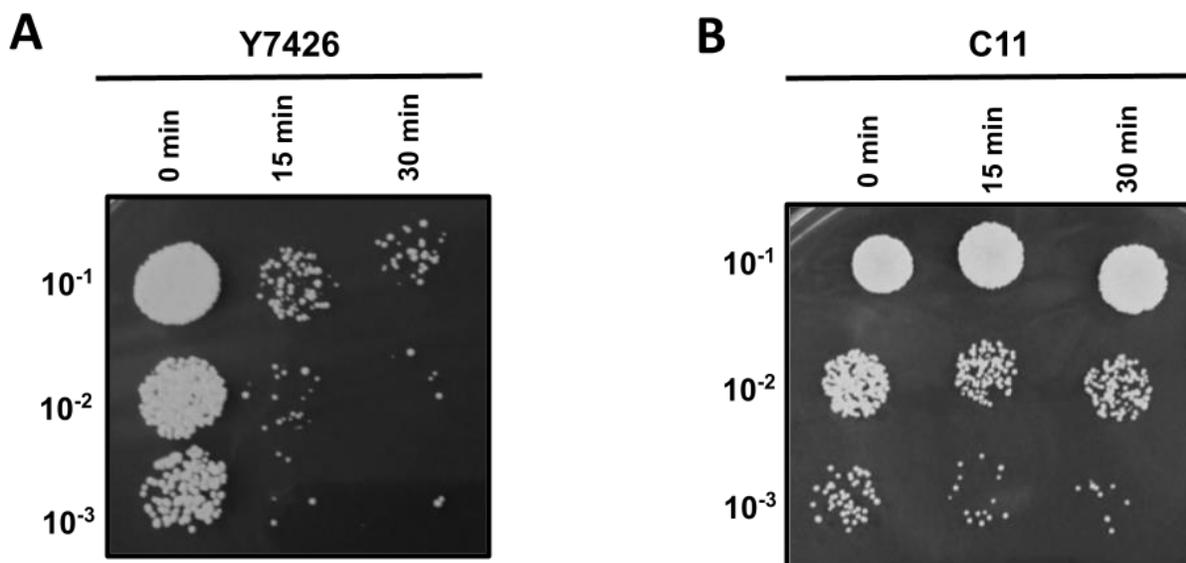


Figura 11. Evaluación de la supervivencia de *D. hansenii* tras la exposición a ϵ -PL en diferentes intervalos de tiempo. Las cepas de *D. hansenii* Y7426 (A) y C11 (B) se incubaron con ϵ -PL (100 o 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) durante 0, 15 y 30 min en medio YPD líquido. Las células tratadas fueron diluidas de manera serial (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) a partir de cultivos de 1 de $\text{OD}_{600\text{nm}}$. Se colocó una alícuota de células de 10 μL de cada dilución y tratamiento en medio YPD. Las células se incubaron a 28 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 días. Las imágenes son representativas de tres réplicas biológicas.

Por lo tanto, se utilizó un tratamiento de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL durante 15 min para permeabilizar a Y7426, y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL durante 30 min para C11. La diferencia en la concentración de ϵ -PL, puede deberse a la heterogeneidad de la composición de la pared celular de cada cepa. Cabe mencionar que *D. hansenii* Y7426 fue aislada de un estuario sueco, mientras que *D. hansenii* C11 fue aislada del Mar de Cortes (Norkrans 1966; CIBNOR, S. C.; Hernández-Saavedra, 1990). Se ha reportado que la heterogeneidad de la pared celular depende de los genes que se expresen bajo distintas condiciones ambientales o la composición del medio, el método de inoculación, la edad de las levaduras y la presencia de antifúngicos (Aguilar Uscanga *et al.*, 2005; Bleichrodt *et al.*, 2020; Pribylová *et al.*, 2007; Serrat-Díaz *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Aguilar Uscanga y colaboradores (2005), se analizó la composición de los polisacáridos (β 1,3 y 1,6,) contenidos en la pared celular de *S. cerevisiae* y se realizaron

pruebas de resistencia a la digestión por zimoliasa. Al Comparar sus resultados en cuanto al contenido de polisacáridos en la pared celular, concluyeron que la resistencia de la célula a la resistencia a la digestión por la zimoliasa podría estar ligada a la cantidad de β -glucanos, así como el número de enlaces de tipo $\beta(1,3)$ y $\beta(1,6)$ - glucanos contenidos en la pared celular. Tomando en cuenta lo anterior, tanto la zimoliasa como la ϵ -PL tienen como blanco los enlaces $\beta(1,3)$. Por lo tanto, aquella cepa de *D. hansenii* que contenga una mayor cantidad de β -glucanos, será más susceptible a un tratamiento con ϵ -PL. Es probable que la pared celular de la cepa Y7426 contiene un mayor número de β -glucanos que la cepa C11, lo cual la hace menos resistente al tratamiento con ϵ -PL. Esto podría ser corroborado mediante un análisis de la composición de los polisacáridos y proteínas contenidos en la pared celular de dichas cepas.

7.2. *D. hansenii* genera especies reactivas de oxígeno durante el tratamiento con ϵ -PL

D. hansenii puede resistir diferentes tipos de estrés entre los que se encuentra el oxidante; su tolerancia a este tipo de estrés es una característica que destaca en comparación con la levadura *S. cerevisiae* (Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011; González *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2020). Algunos estudios han reportado que ϵ -PL es un agente antimicrobiano capaz de generar especies reactivas de oxígeno (EROs; Ye *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2018). En 2018, Tan y colaboradores reportaron que la utilización de ϵ -PL genera EROs en *S. cerevisiae*, este estudio confirmó que después de tratar a la levadura con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL, la concentración de EROs intracelulares incrementa con respecto a células sin tratamiento, lo cual genera daño en el DNA. Considerando las características antioxidantes de *D. hansenii* y el reporte de Tan y colaboradores (2018), se analizó el efecto de la ϵ -PL en la acumulación de EROs en *D. hansenii*. Para evaluar la producción de EROs se trataron las cepas Y7426 y C11 con diferentes concentraciones de ϵ -PL (100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posteriormente se mezclaron con diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). La

detección de EROs con este monitor fluorescente se basa en la acción de una esterasa celular inespecífica sobre la DCFH-DA, que escinde los grupos acetato liberando a la DCFH, la cual reacciona con EROs para formar el producto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF; James *et al.*, 2015) como se describe en materiales y métodos. Se observó que ambas cepas incrementan la producción de EROs después de agregar ϵ -PL (**Figura 12**), la producción de EROs se vuelve más evidente conforme pasa el tiempo. En la figura 12A, se observa que las EROs aumentan significativamente con respecto al control (250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL) en la cepa Y7426. En la figura 12B, la mayor diferencia de EROs se observa con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL en la cepa C11. Asimismo, se observó que a estas concentración, ambas cepas de *D. hansenii* mostraron una alta mortalidad. En un estudio similar en *S. cerevisiae* realizado por Tan y colaboradores (2018), encontraron que las EROs aumentan significativamente respecto al control cuando las células son tratadas con ϵ -PL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y a concentraciones mayores de ϵ -PL (200 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causa una alta mortalidad al fragmentar el DNA. Por lo tanto, *S. cerevisiae* es más sensible al tratamiento con ϵ -PL que *D. hansenii*.

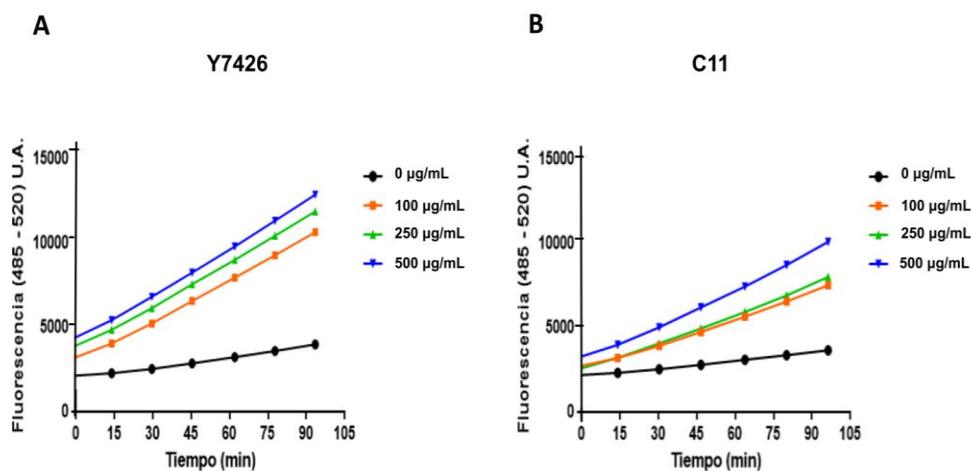


Figura 12. Acumulación intracelular de EROs en *D. hansenii* tras la exposición a ϵ -PL. Las cepas de *D. hansenii* Y7426 (A) y C11 (B) se trataron con 0, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL en medio rico YPD líquido. Las células tratadas se incubaron con la molécula DCFH-DA, la cual se convierte en DCF dependiendo de los niveles de EROs intracelulares. La intensidad de fluorescencia de DCF (Ex.485 nm, Em.520 nm) se midió a distintos intervalos de tiempo (0 - 100 min).

7.3. *D. hansenii* C11 es transformada con el plásmido pAYCU244 utilizando ϵ -PL

Se han realizado múltiples intentos para transformar a *D. hansenii*; sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con un protocolo de transformación eficiente. Los protocolos convencionales de transformación funcionan en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, primero se decidió transformar a *S. cerevisiae* (BY4741) la cual es auxótrofa de uracilo, con el plásmido pYES2 como control experimental, lo cual fue útil para verificar: (i) el funcionamiento de nuestro equipo de electroporación, (ii) los reactivos de transformación, y (iii) los medios selectivos. Las células se transformaron mediante electroporación en presencia y ausencia del plásmido pYES2 como se describe en materiales y métodos. Las células transformadas fueron sembradas en medio mínimo sólido (MM) sin uracilo (-ura). Se observaron colonias después de 3 días, indicando que *S. cerevisiae* fue transformada con el plásmido pYES2. Una vez verificado el control experimental se transformaron las cepas *D. hansenii* Y7426 y C11 con el plásmido pAYCU244 (este vector contiene el gen *SAT1* de resistencia al antibiótico nourseotricina, clonNAT) con el protocolo descrito por Grahl y colaboradores (2017), el cual se modificó para implementar el uso de ϵ -PL como se describe en materiales y métodos. Dado que *D. hansenii* es una levadura genéticamente heterogénea (Petersen y Jespersen 2004; Padilla *et al.*, 2014), se averiguó si las cepas Y7426 y C11 presentan diferencias en la resistencia a clonNAT previamente a la transformación. Se realizaron ensayos de viabilidad con distintas concentraciones de clonNAT (20, 100, 150, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio rico YPD sólido con cada cepa. Se encontró que la concentración inhibitoria de crecimiento para la cepa C11 fue de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clonNAT, mientras que para Y7426 fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta diferencia de resistencia a la nourseotricina, puede ser debido a la presencia de bombas de eflujo, las cuales son transportadores de membrana, involucrados generalmente en la extrusión de sustancias específicas o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicos,

incluyendo antimicrobianos hacia el medio externo, en este último caso las bombas pueden estar asociadas a múltiples tipos de resistencia a antibióticos (Holmes *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018; Marchetti *et al.*, 2011; Prudêncio *et al.*, 2000). La concentración mínima inhibitoria para un fármaco se relaciona con la presencia de al menos una bomba de eflujo activa (Holmes *et al.*, 2016; Prudêncio *et al.*, 2000). En *D. hansenii* han encontrado bombas de eflujo de la familia de casete de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*) la cual puede contribuir a la resistencia de antibióticos (Prudêncio *et al.*, 2000). Por lo tanto, la expresión diferencial de los genes que codifican para las bombas de eflujo puede ser distinta entre la cepa C11 y Y7426, lo cual resultaría en una concentración mínima inhibitoria distinta entre cepas.

Para los experimentos de transformación se decidió utilizar 150 µg/mL de clonNAT para la cepa Y7426 para evitar falsos positivos (Zamora-Bello 2020). Posteriormente se puso a prueba el protocolo de transformación mediante electroporación utilizando una solución de ε-PL con 100 µg/mL durante 15 min para la cepa Y7426, y 250 µg/mL durante 30 min para la cepa C11 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros utilizados para transformar a *D. hansenii* con el plásmido pAYCU244.

Cepa	ε-PL (µg/mL)	Tiempo (minutos)	Pulsos (2500 V)	clonNAT (µg/mL)	Colonias (número)
Y7426	100	15	2	150	-
C11	250	30	2	300	≈ 18

Se realizaron varias rondas de transformación con la cepa Y7426, sin embargo, no se obtuvieron colonias, mientras que con la cepa C11 se aisló un promedio de 18 colonias, que fueron sembradas en medio YPD sólido con clonNAT (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para eliminar cualquier falso positivo (se realizaron 2 pases de purificación). Las colonias transformadas con el plásmido pAYCU244 fueron confirmadas mediante microscopía. Se prepararon células con calcoflúor en un portaobjetos y se observaron mediante microscopía confocal (**Figura 13**). Se detectó la presencia de la proteína amarilla fluorescente yeYFP en el citoplasma de las células C11 transformadas (**Figura 13**).

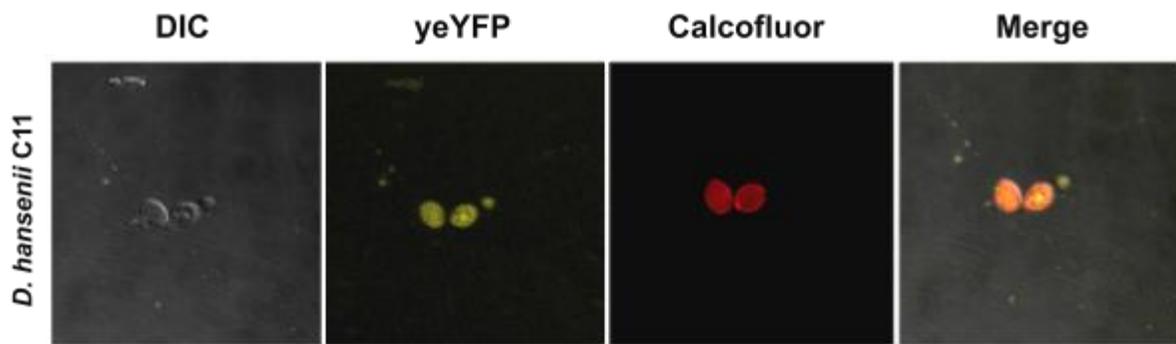


Figura 13. Expresión de la proteína amarilla fluorescente en *D. hansenii* C11 con el plásmido pAYCU244. La cepa C11 se transformó con el plásmido pAYCU244 después del tratamiento con ϵ -PL. Se observaron las células con la luz transmitida (DIC), expresando la proteína amarilla fluorescente (yeYFP), con calcoflúor para definir la pared celular (calcoflúor) o sobreponiendo los paneles DIC, yeYFP y calcoflúor (traslape o merge). La proteína yeYFP se localiza en el citoplasma de la célula. Las células se observaron en un microscopio confocal a 200X (Ex 500 nm, Em 540 nm).

7.4. *D. hansenii* C11 es transformada utilizando ϵ -PL y el sistema CRISPR/Cas9

El objetivo principal de este trabajo fue implementar un protocolo de transformación utilizando ϵ -PL para permeabilizar la pared celular de *D. hansenii* y generar una mutante auxótrofa de uracilo mediante el sistema CRISPR-Cas9 vía complejos ribonucleoproteicos (RNP). Para lograrlo, se optó por mutar el 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 (*ura3Δ*) se usó el método de selección con ácido 5-fluororótico (5-FOA); la enzima Ura3 cataliza la descarboxilación del 5-FOA, produciendo el compuesto tóxico 5-fluorouracilo, el cual inhibe distintos procesos metabólicos esenciales en la célula (Atomi *et al.*, 2012; Boeke *et al.*, 1987). Por lo tanto, las colonias que pueden crecer en presencia de 5-FOA son células que no expresan la proteína Ura3. Para llevar a cabo la selección de células auxótrofas de uracilo, se utilizó medio mínimo con uracilo que contenía 1 o 2 mg/mL de 5-FOA como fue descrito por Boeke y colaboradores (1987).

Para transformar a *D. hansenii* con los RNP mediante electroporación, se usó el protocolo modificado de Grahl y colaboradores (2017) utilizando ϵ -PL como se describe en la **Tabla 1**. El RNAg fue diseñado a partir de la secuencia del gen *URA3* de *D. hansenii* (*DhURA3*) como se describe en materiales y métodos. Previamente a la electroporación, los RNP fueron ensamblados como se describió también en materiales y métodos. Las células transformadas ($OD_{600} = 1$) fueron sembradas en medio mínimo sólido con 5-FOA e incubadas a 28 °C hasta observar colonias (aproximadamente entre 4 a 5 días). De la ronda de transformaciones con la cepa Y7426, no se obtuvieron colonias con los parámetros establecidos (**Tabla 2**), mientras que con C11 se logró obtener un promedio de 40 colonias transformadas, de las cuales sólo 33 lograron crecer en presencia de 5-FOA y no crecer sin uracilo (**Tabla 2**). Estos resultados sugieren que el protocolo de transformación estandarizado con ϵ -PL y el sistema de edición genética CRISPR-Cas9 generan colonias auxótrofas de uracilo sólo en la cepa C11. Sin embargo, habrá que corroborar el tipo de mutación que pudo haber generado CRISPR-Cas9 como inserciones o deleciones de bases que comúnmente se ha reportado genera dicho sistema.

Tabla 2. Número de colonias de *D. hansenii* resistentes a 5-FOA después de ser tratadas con ϵ -PL y transformadas con el sistema CRISPR/Cas9.

Cepa	ϵ -PL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Tiempo (min)	Colonias (número)
Y7426	100	15	-
C11	250	30	≈ 33

7.5. Efecto de ϵ -PL en el crecimiento de *D. hansenii* Y7426

Dado que la cepa Y7426 es sensible al tratamiento con ϵ -PL y el protocolo de transformación implementado no funcionó con el plásmido pAYCU244, ni con el sistema CRISPR/Cas9, se decidió evaluar el efecto de ϵ -PL en la viabilidad celular de Y7426 mediante curvas de crecimiento. Se midió el cambio de la absorbancia en el cultivo celular durante 72 hrs. en medio rico YPD en presencia de ϵ -PL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como se describe en materiales y métodos. Se observó que el cultivo tratado con ϵ -PL tiene una fase de adaptación (lag) más larga que las células sin tratamiento (**Figura 14**). Estos resultados preliminares sugieren que 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL inhibe la viabilidad celular durante al menos 22 hrs., indicando que el tratamiento de ϵ -PL puede resultar tóxico para *D. hansenii* Y7426. Sin embargo, la viabilidad celular comienza a recuperarse después de 24 hrs. de cultivo, incluso se define la fase exponencial de crecimiento, sugiriendo que el efecto de la ϵ -PL fue neutralizado o titulado por las interacciones electrostáticas que se generan con las paredes o membranas celulares promoviendo la proliferación celular hasta la fase estacionaria de crecimiento.

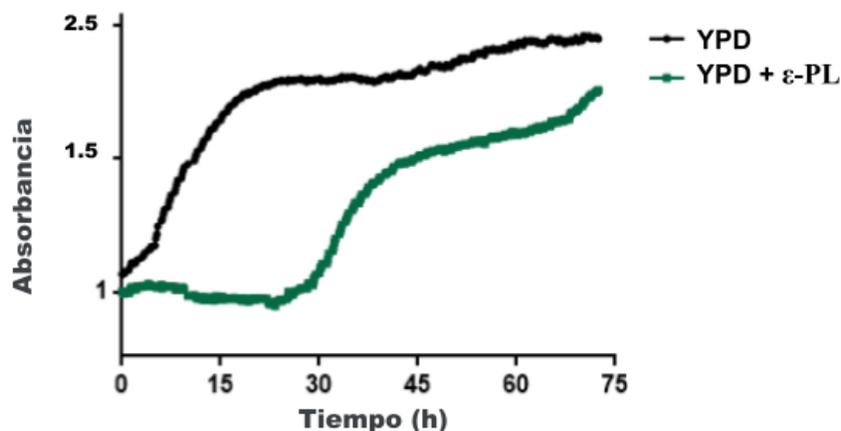


Figura 14. Curva de crecimiento de *D. hansenii* Y7426 en presencia de ϵ -PL. Las células se incubaron con ϵ -PL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio rico YPD. Se inocularon cultivos a una $\text{OD}_{600} = 1.0$. El cambio en la absorbancia del cultivo se determinó con un lector de placas automatizado BioScreen C durante 72 h con agitación constante a 28 °C. Se registró la absorbancia del cultivo cada 20 min a una longitud de onda de 600 nm. Los datos de la gráfica son el promedio de tres réplicas técnicas.

Por lo tanto, el tratamiento con ϵ -PL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en *D. hansenii* Y7426 inhibe el crecimiento o incluso puede resultar letal en los primeros intervalos de tiempo; sin embargo, después de 22 hrs., se observa que ya no hay un efecto biocida y las células logran recuperarse. Estas observaciones son similares a lo reportado por Tan y colaboradores (2018) en *S. cerevisiae*, y los hallazgos de Hylgaard y colaboradores (2014) en *E.coli* y *L. innocua*, indicando que el efecto de ϵ -PL está directamente relacionado con el número de células en el medio.

7.6. Degradación de la pared celular de *D. hansenii* Y7426 con el tratamiento de ϵ -PL

Cuando *E. coli* o *S. cerevisiae* se exponen a concentraciones mayores de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -PL se genera: (i) cambios morfológicos graves, (ii) eliminación parcial de la membrana externa, (iii) hendiduras en la pared celular, (iv) cambios irregulares en la rigidez celular, (v) desintegración completa de las células, (vi) eliminación de los polisacáridos de la pared celular, (vii) aumento de la concentración intracelular de EROs provocando estrés oxidante y daños en el DNA (Ye *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2018; Hylgaard *et al.*, 2014).

En esta tesis, *D. hansenii* Y7426 se trató con 100 µg/mL de ε-PL durante 15 min con el fin de permeabilizar la pared celular como parte de un protocolo de transformación. Sin embargo, no se lograron obtener colonias transformadas sugiriendo que las células tratadas con ε-PL no resultaron viables para la transformación. Por lo tanto, se observó la morfología de la cepa Y7426 mediante microscopía de fluorescencia con el fin de averiguar si la exposición a ε-PL provoca algún tipo de daño celular. La cepa Y7426 se trató ε-PL (100 µg/mL) durante distintos intervalos de tiempo (0, 15 y 30 min) como se describió previamente en materiales y métodos. Se observaron agregados celulares en el cultivo tratado con ε-PL a partir de 15 min de exposición (**Figura 15 A-F**), indicando que el tratamiento utilizado en la cepa Y7426 puede ocasionar la pérdida de quitina y la desestabilización de la membrana celular. En *S. cerevisiae*, se ha observado que a altas concentraciones de ε-PL (> 200 µg/mL) y una exposición prolongada (>50 min) aumenta la concentración intracelular de EROs, conduciendo a la fragmentación de cromosomas (Tan *et al.*, 2018). Tomando en cuenta lo anterior, se puede especular que el tratamiento con ε-PL (100 µg/mL) provocó la muerte celular de un número significativo de células (*D. hansenii* Y7427) por la producción de EROs y probablemente por la desestabilización de la pared y membrana celular, evitando obtener células viables para los protocolos de transformación utilizados. Sin embargo, para confirmar y concluir lo anterior, se debe observar que al tratar las células de la cepa C11 con de ε-PL no se observan agregados celulares.

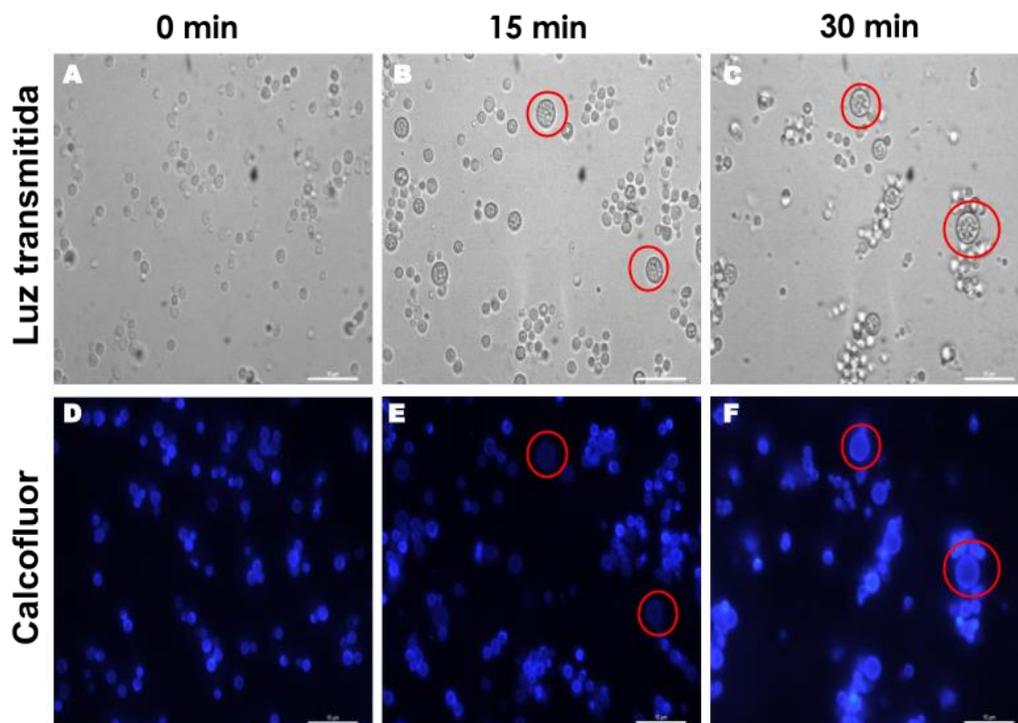


Figura 15. Efecto de ϵ -PL en *D. hansenii* Y7426 durante distintos intervalos de tiempo. Las células tratadas con ϵ -PL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 0, 15 y 30 min se prepararon con el colorante blanco de calcoflúor, el cual se detectó mediante microscopía de fluorescencia. Las células se observaron con la luz transmitida (paneles A, B y C) y la fluorescencia del calcoflúor que interacciona con la pared celular se logró detectar (paneles D, E y F). En la condición control se observan células íntegras y definidas (panel A y D), mientras que los cultivos tratados (paneles B y E o C y F) muestran agregados celulares, los cuales se señalan con círculos rojos.

8. CONCLUSIONES

- En esta tesis se evaluó el efecto de ϵ -PL en la viabilidad celular y la transformación de la levadura *D. hansenii* mediante el sistema CRISPR/Cas9. La utilización de ϵ -PL podría ser un posible agente reductor en el protocolo de transformación de Grahl y colaboradores (2017) en *D. hansenii* C11, lo cual permitió generar colonias que expresan el plásmido pAYCU244 o colonias auxótrofas de uracilo mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9. Por lo tanto, el agente ϵ -PL podría ser un compuesto útil en los protocolos de transformación para levaduras no convencionales. Sin embargo, se requiere identificar una dosis adecuada para cada cepa de *D. hansenii* con el fin evitar la toxicidad o daño celular.
- *D. hansenii* Y7426 es más sensible al tratamiento de ϵ -PL que la cepa C11, lo cual fue corroborado por ensayos de viabilidad celular y producción de EROs.
- Se logró transformar a *D. hansenii* C11 tanto con el plásmido pAYCU244 como con el sistema CRISPR/Cas9 mediante el protocolo implementado con ϵ -PL.
- No se logró transformar a *D. hansenii* Y7426, debido a que la dosis de ϵ -PL que se usó en este estudio no generó células viables para la transformación.

9. PERSPECTIVAS

- Para estandarizar un protocolo de transformación con el agente ϵ -PL y la cepa Y7426, se realizarán ensayos de viabilidad celular a menores concentraciones de ϵ -PL (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$). Esto podría también considerarse para la cepa C11 y evaluar si a menor concentración de ϵ -PL se logra aumentar el número de colonias transformadas.
- Una vez identificada la concentración de ϵ -PL que degrada la pared celular sin afectar la viabilidad celular de la cepa Y7426, se transformarán células (pre-tratadas con la concentración adecuada de ϵ -PL) con el plásmido pAYCU244 o el sistema CRISPR/Cas9 mediante electroporación.
- Será importante observar ambas cepas pre-tratadas con la concentración adecuada de ϵ -PL mediante microscopía confocal. Se sugiere teñir las células con calcoflúor y DAPI con el fin de identificar daños en la pared celular y el material genético.
- Este trabajo constituye un primer ensayo en la transformación de *D. hansenii* usando ϵ -PL como un agente permeabilizante de la pared y membrana celulares y el sistema de edición genética CRISPR/Cas9. A pesar de que algunos resultados son preliminares se logró obtener colonias auxótrofas de uracilo (C11) lo que podría indicar que efectivamente se logró eliminar el gen *URA3*, es aún necesario secuenciar el gen *DhURA3* de las colonias C11 transformadas, lo cual confirmará la(s) mutación(es) que posiblemente generó el sistema CRISPR/Cas9.
- En esta tesis se utilizó un solo RNAg para hacer un corte en el gen *DhURA3*. Sin embargo, se sugiere utilizar en los próximos ensayos de transformación dos RNAg con regiones homologas al 5' y 3' del gen de *DhURA3*. Se ha reportado que esto permite a Cas9 escindir dos regiones distales y generar una deleción de un tamaño considerable, lo cual permite identificar las mutantes de forma rápida mediante PCR.

10. REFERENCIAS

1. Aguilar Uscanga, B., & Solis Pacheco, J., & François, J. (2005). Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. *e-Gnosis*, (3),0.[fecha de Consulta 14 de Julio de 2021]. ISSN: . Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000312>
2. Al-Qaysi, S., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W., & Ibrahim, J. (2017). Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2605382. <https://doi.org/10.1155/2017/2605382>
3. Atomi, H., Imanaka, T., & Fukui, T. (2012). Overview of the genetic tools in the Archaea. *Frontiers in Microbiology*, 3, 337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00337>
4. Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>
5. Beggs, J. D. (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275(5676), 104–109. <https://doi.org/10.1038/275104a0>
6. Bleichrodt, R. J., Foster, P., Howell, G., Latgé, J. P., & Read, N. D. (2020). Cell Wall Composition Heterogeneity between Single Cells in *Aspergillus fumigatus* Leads to Heterogeneous Behavior during Antifungal Treatment and Phagocytosis. *mBio*, 11(3), e03015-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03015-19>
7. Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., & Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology*, 154, 164–175. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54076-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54076-9)
8. Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast (Chichester, England)*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
9. Cao, J., Xiao, Q., & Yan, Q. (2018). The multiplexed CRISPR targeting platforms. *Drug discovery today. Technologies*, 28, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.01.001>

10. 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>
11. Chávez-Jacobo, Víctor M. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21(2), e201825. Epub 03 de septiembre de 2020. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5>
12. Chheda, A. H., & Vernekar, M. R. (2015). Enhancement of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) production by a novel producer *Bacillus cereus* using metabolic precursors and glucose feeding. *3 Biotech*, 5(5), 839–846. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0291-8>
13. De Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., & Luyten, W. H. (1999). Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast (Chichester, England)*, 15(15), 1609–1618. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199911\)15:15<1609::aid-yea485>3.3.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199911)15:15<1609::aid-yea485>3.3.co;2-p)
14. Defosse, T. A., Courdavault, V., Coste, A. T., Clastre, M., de Bernonville, T. D., Godon, C., Vandeputte, P., Lanoue, A., Touzé, A., Linder, T., Droby, S., Rosa, C. A., Sanglard, D., d'Enfert, C., Bouchara, J. P., Giglioli-Guivarc'h, N., & Papon, N. (2018). A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 144, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.015>
15. Ding, Y., Li, H., Chen, L.-L., & Xie, K. (2016). Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 7, 703. doi:10.3389/fpls.2016.00703
16. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
17. Farboud, B., & Meyer, B. J. (2015). Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*, 199(4), 959–971. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.175166>
18. Fraczek, M. G., Naseeb, S., & Delneri, D. (2018). History of genome editing in yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 35(5), 361–368. <https://doi.org/10.1002/yea.3308>
19. García, C., Beltran, P., Guzman, M., León, A., Arredondo, T., & Fonseca, X. (2001). Diagnóstico rápido de dos casos de mucormicosis con tinción de blanco de calcoflúor. *Revista Chilena de Infectología*, 18(4), 285-290. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182001000400007>

20. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast (Chichester, England)*, *11*(4), 355–360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
21. González, J., Castillo, R., García-Campos, M. A., Noriega-Samaniego, D., Escobar-Sánchez, V., Romero-Aguilar, L., Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevzky, C. (2020). Tolerance to Oxidative Stress in Budding Yeast by Heterologous Expression of Catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, *77*(12), 4000–4015. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02237-3>
22. 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), e00218-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
23. Grosser, M. R., & Richardson, A. R. (2016). Method for Preparation and Electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), *1373*, 51–57. https://doi.org/10.1007/7651_2014_183
24. Hernández-Montiel, L., Larralde-Corona, C., Vero, S., López-Aburto, M., Ochoa, L. & Ascencio, F. (2010). Characterization of yeast *Debaryomyces hansenii* for the biological control of blue mold decay of Mexican lemon. *CyTA – Journal of Food*, *8*, 49-56. [10.1080/19476330903080592](https://doi.org/10.1080/19476330903080592).
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. Holmes, A. R., Cardno, T. S., Strouse, J. J., Ivnitski-Steele, I., Keniya, M. V., Lackovic, K., Monk, B. C., Sklar, L. A., & Cannon, R. D. (2016). Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. *Future medicinal chemistry*, *8*(12), 1485–1501. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0050>
27. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
28. Hyldgaard, M., Mygind, T., Vad, B. S., Stenvang, M., Otzen, D. E., & Meyer, R. L. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-l-lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(24), 7758–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>

29. James, J., Fiji, N., Roy, D., Andrew MG, D., Shihabudeen, M. S., Chattopadhyay, D., & Thirumurugan, K. (2015). A rapid method to assess reactive oxygen species in yeast using H₂DCF-DA. *Analytical Methods*, 7(20), 8572–8575. <https://doi.org/10.1039/c5ay02278a>
30. 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*, 75(12), 1675–1683. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1547-4>
31. Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., & Gagnon, M. G. (2018). Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annual review of biochemistry*, 87, 451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>
32. Manivasakam, P., & Schiestl, R. H. (1993). High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Research*, 21(18), 4414–4415. <https://doi.org/10.1093/nar/21.18.4414>
33. Marchetti, M. L., Errecalde, J. O., & Mestorino, O. N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. *Analecta Veterinaria*, 31
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. Minhas, A., Biswas, D., & Mondal, A. K. (2009). Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(1), 95–102. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00457.x>
36. Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(7), 1120–1123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bt743>
37. Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 206–212. <https://doi.org/10.1007/s002530051278>
38. Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv Für Mikrobiologie*, 54(4), 374–392. [doi:10.1007/bf00406719](https://doi.org/10.1007/bf00406719)

39. 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 & Molecular Biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
40. Padilla, B., Manzanares, P., & Belloch, C. (2014). Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology*, 38, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.002>
41. Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, 49(3), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.009>
42. 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. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02293.x>
43. Prasanna, G., & Panda, T. (1997). Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioprocess Engineering* 16, 261–264. <https://doi.org/10.1007/s004490050319>
44. 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>
45. Pribylová, L., Farkas, V., Slaninová, I., de Montigny, J., & Sychrová, H. (2007). Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains. *Folia microbiologica*, 52(3), 241–245. <https://doi.org/10.1007/BF02931305>
46. Prudêncio, C., Sansonetty, F., Sousa, M.J., Côrte-Real, M. and Leão, C. (2000), Rapid detection of efflux pumps and their relation with drug resistance in yeast cells. *Cytometry*, 39: 26–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(20000101\)39:1<26::AID-CYTO5>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(20000101)39:1<26::AID-CYTO5>3.0.CO;2-C)
47. 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>

48. Ricaurte, M. L., & Govind, N. S. (1999). Construction of Plasmid Vectors and Transformation of the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 1(1), 15–19. <https://doi.org/10.1007/pl00011745>
49. Rivera, A. L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2014). Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of life reviews*, 11(2), 184–203. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2014.01.007>
50. Romero-Aguilar, L., Guerra-Sánchez, G., Tenorio, E. P., Tapia-Rodríguez, M., Matus-Ortega, G., Flores-Herrera, O., González, J., & Pardo, J. P. (2020). Rapamycin induces morphological and physiological changes without increase in lipid content in *Ustilago Maydis*. *Archives of Microbiology*, 202(5), 1211–1221. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01833-y>
51. Ruiz-Díez B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of applied microbiology*, 92(2), 189–195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01516.x>
52. Sánchez, N. S., Calahorra, M., González, J., Defosse, T., Papon, N., Peña, A., & Coria, R. (2020). Contribution of the mitogen-activated protein kinase Hog1 to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*, 66(6), 1135–1153. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01099-3>
53. Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., & Peinado, J. M. (2002). (1->6)-Beta-D-glucan as the cell wall binding site for Debaryomyces hansenii killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), 95–99. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01053.x>
54. Sclafani, R. (2001). Transformation protocol *Saccharomyces cerevisiae*. 2021, marzo 15, de Eppendorf Recuperado de https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/045222_Protocol/Eppendorf_Cell-Technology_Protocol_Saccharomyces-cerevisiae_Protocol-No-4308-915531-Saccharomyces-cerevisiae.pdf
55. Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Current Microbiology*, 62(3), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
56. Serrat-Díaz, M., Vallejo-Vidal, A., Ageitos-Martínez, M., Llauradó-Mauri, G., Urdaneta-Laffita, I., & Villa, T. (2017). Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus*. *Revista Cubana de Química*, 29(1), 89-102. Recuperado en 14 de julio de 2021, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000100007&lng=es&tlng=es.

57. Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T., & Sakai, H. (1984). Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*, 37(11), 1449–1455. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1449>
58. Takehara, M., Hibino, A., Saimura, M., & Hirohara, H. (2010). High-yield production of short chain length poly(epsilon-L-lysine) consisting of 5-20 residues by *Streptomyces aureofaciens*, and its antimicrobial activity. *Biotechnology Letters*, 32(9), 1299–1303. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0294-9>
59. Tan, Z., Bo, T., Guo, F., Cui, J., & Jia, S. (2018). Effects of ϵ -Poly-l-lysine on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its involved antimicrobial mechanism. *International journal of biological macromolecules*, 118 (Pt B), 2230–2236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.094>
60. 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 (Chichester, England)*, 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)
61. Wirajana, I., Nengah Puspaningsih, N., Nyoman Puspaningsih, T., Wasito, E., Kusuma, S., Kimura, T., Sakka, K., Kampus, B., Jimbaran. (2010). Construction of pY-Af Vector for Expression of Thermostable α -L-Arabinofuranosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annales Bogoriense*. 14. 15-20.
62. Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36(1), 152–154. <https://doi.org/10.2144/04361DD02>
63. Ye, R., Xu, H., Wan, C., Peng, S., Wang, L., Xu, H., Aguilar, Z. P., Xiong, Y., Zeng, Z., & Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>
64. Zamora-Bello. A. (2020). Implementación del sistema CRISPR-Cas9 en la edición genética de la levadura *Debaryomyces hansenii* (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

65. Zavala-Moreno, A., Arreguin, R., Pardo, J., Aguilar, L., & Guerra-Sanchez, G. (2014). Nitrogen Source Affects Glycolipid Production and Lipid Accumulation in the Phytopathogen Fungus *Ustilago Maydis*. *Advances in Microbiology*. 4. 934-944. <https://10.4236/aim.2014.413104>.