



**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

**Construcción de un plásmido para la modificación genética de *Clavispora  
lusitaniae* para la fermentación de xilosa a etanol**

TESIS

Que presenta:

**Alejandro Lara Meléndez**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**BIOTECNOLOGÍA**

Directora de Tesis:

**Dra. Maria Teresa Ponce Noyola**

Ciudad de México

Noviembre 2020

**Directora de Tesis:**

Dra. María Teresa Ponce Noyola. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
CINVESTAV

**Asesores:**

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
CINVESTAV

Dra. María de Lourdes Villa Tanaca. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-  
IPN

## **CRÉDITOS**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Microbiana y Fermentaciones del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

El desarrollo de esta tesis de Maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca con CVU 933778.

## AGRADECIMIENTOS

A mi guía en este nivel académico:

A la Doctora María Teresa Ponce Noyola, por aceptarme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, sin su apoyo, consejos y guía nada de esto sería posible en mi formación científica.

A mis asesoras:

La Doctora Ana C. Ramos Valdivia y la Doctora Ma. de Lourdes Villa Tanaca, por compartir su experiencia y conocimiento a lo largo del proyecto, sin sus consejos este no hubiera sido lo que es.

Al personal del laboratorio de Genética microbiana:

La M en C Odilia Pérez Avalos, su guía y apoyo fue indispensable en el desarrollo de este proyecto.

A Verónica Soto Bellosa, por su apoyo en el día a día, su trabajo brinda una inmensa facilidad para realizar el trabajo científico del laboratorio.

A la Unidad de genómica, proteómica y metabolómica del CINVESTAV, a la Dra. Dulce Ma del Carmen Delgadillo Álvarez por su apoyo en la estandarización de la técnica de PCR y cuantificación de DNA.

A mis colegas y amigos del Laboratorio:

A Erika Alfayuset, por su introducción, enseñanzas y consejos en las técnicas de biología molecular, antes de ella no sabía nada, así mismo por su amistad.

A Yeily Rangel, por su apoyo y consejos a la hora de enfrentar los inconvenientes experimentales, siempre tendrás un amigo en mí.

A Ricardo Castillo, por su amistad y consejos prácticos en las técnicas de biología molecular, más que un amigo un hermano de investigación y buenos momentos.

A Rodrigo, por su amistad y compañerismo, las tardes-noches eran más amenas con tu compañía.

A Diego por sus consejos metodológicos, fueron de mucha ayuda.

A mi compañero de generación Oscar Ulises, amigo y mentor en técnicas de biología molecular que me daban una perspectiva diferente para abordar los problemas del proyecto.

A Vianey por su apoyo a lo largo de este proyecto, por escucharme y seguir tolerándome.

A Angie por su gran cariño y apoyo que me das, siempre crees en mí.

A mis amigos Erick, Fernando, Berny, Zaira, Nelly, Alex, Carlos, Kevin, Denisse, Samara, Maggie, Alexis, Rodolfo, por estar de una u otra forma siempre ahí.

A la Coordinación Académica y Jefatura del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, al personal de apoyo del Departamento y al personal de la planta piloto, y a todos los que de una u otra forma hicieron posible la realización de este proyecto.

¡MUCHAS GRACIAS!

## DEDICATORIAS

A mi Padre y Madre

Roberto Alejandro Lara Mendoza

Margarita Meléndez Ibarra

A mi familia

Sin su apoyo incondicional no hubiera podido crecer un poco más.

A cualquiera que desee entrar en el mundo del descubrimiento científica.

Nunca pierdan su curiosidad.

## FRASES

Al pesimismo de nuestra inteligencia oponer el optimismo de nuestra voluntad.

-Antonio Gramsci

Aprender el principio, respetar el principio y disolver el principio. En resumen, entra en el molde sin quedar enjaulado en él, obedece el principio sin estar sujeto a él.

-Bruce Lee

Ver la historia, no como un pretexto para vivir en el pasado, si no, como un punto de partida para lanzarse al futuro.

-Pablo Rudomín

No temas fallar, no es fallar, es apuntar muy bajo el error. Con grandes aspiraciones, es glorioso incluso fallar.

-Bruce Lee

Si quieres llegar rapido ve solo, si quieres llegar lejos ve acompañado

-Proverbio africano

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	XI
INDICE DE FIGURAS .....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
<b>1.INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Demanda energética.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Alternativas energéticas: Biocombustibles .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Pasos en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. ....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Importancia del bioetanol como biocombustible.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Microorganismo fermentativo: <i>Clavispora lusitaniae</i> y fermentación de pentosas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Modificación genética: una alternativa al desbalance de cofactores.....</b>	<b>9</b>
<b>1.7 CRISPR/Cas9: Una nueva herramienta de modificación genética .....</b>	<b>11</b>
<b>1.8 Avances en la modificación genética de levaduras para la producción de bioetanol mediante CRISPR/Cas9.....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 General .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Secuencias <i>in silico</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Softwares y páginas bioinformáticas.....</b>	<b>20</b>
<b>5.3 Microorganismos empleados y condiciones de cultivo.....</b>	<b>20</b>
<b>5.4 Medios de Cultivo .....</b>	<b>20</b>
5.4.1 Medio YPD.....	20
5.4.2 Medio LB.....	20

5.4.3 Medio MacConkey.....	21
<b>5.5 Extracción de DNA genómico de <i>C. lusitaniae</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>5.6 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>21</b>
5.6.1 Soluciones .....	21
5.6.2 Metodología.....	22
<b>5.7 Protocolos de PCR.....</b>	<b>23</b>
<b>5.8 Geles y desarrollo de electroforesis .....</b>	<b>23</b>
5.8.1 Gel de TAE .....	23
5.8.2 Gel de LAB .....	23
<b>5.9 Digestión de DNA .....</b>	<b>24</b>
<b>5.10 Ligación de DNA.....</b>	<b>24</b>
<b>5.11 Preparación de <i>E. coli</i> calcio-competentes.....</b>	<b>24</b>
<b>5.12 Transformación de <i>E. coli</i> calcio-competente (Choque térmico).....</b>	<b>24</b>
<b>5.13 Selección de las transformantes positivas de <i>E. coli</i> por <math>\alpha</math> complementación con agar MacConkey.....</b>	<b>25</b>
<b>5.14 Plásmidos e iniciadores requeridos en el proceso.....</b>	<b>25</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
6.1 Búsqueda de información bioinformática.....	26
6.2 Diseño <i>in silico</i> del plásmido con el sistema CRISPR.....	30
6.3 Diseño de iniciadores y estandarización de las PCR's .....	34
6.4 Unión del promotor SNR52 con el gRNA mediante PCR “overlapping” .....	37
6.5 Unión del gRNA con el AmpR mediante enzimas de restricción.....	42
6.6 Unión del gRNA-AmpR con el SNR52 mediante PCR overlapping .....	47
6.7 Unión del gRNA, AmpR y SNR52 por sitios de restricción .....	48
6.8 Unión del gRNA, AmpR, SNR52, promotor de Actina y Cas9 por sitios de restricción en un solo paso.....	50
6.9 Re obtención de fragmentos para el plásmido pCluCas9 de un vector de clonación .....	57

<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
<b>ANEXO 1</b> .....	71
<b>ANEXO 2</b> .....	73

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Levaduras productoras de etanol. ....	7
<b>Tabla 2.</b> Nombre y secuencia de los iniciadores M13 utilizados en el presente trabajo...	25
<b>Tabla 3.</b> Fuentes de xilosas reductasas usadas para el alineamiento.....	27
<b>Tabla 4.</b> Productividad de etanol y xilitol de algunas cepas de levaduras.....	30
<b>Tabla 5.</b> Secuencias de los iniciadores para construir el sistema CRISPR.....	34
<b>Tabla 6.</b> Temperatura de alineamiento óptima basada en la $T_m$ para la amplificación de 8 fragmentos de DNA con Taq amplificasa (BioTecnol).....	36
<b>Tabla 7.</b> Pruebas de PCR overlapping.....	39
<b>Tabla 8.</b> Relación de ng de cada fragmento de DNA.....	51

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Flujo del carbono lineal producido por la quema de combustibles fósiles; B: Flujo de carbono de cíclico producido por la utilización de biocombustibles. ....	1
<b>Figura 2</b> Producción de biocombustibles en tera-watts por hora por región a nivel mundial, de 1990 a 2018 (Ritchie, 2017).....	2
<b>Figura 3</b> Producción de biocombustibles en tera-Watts por hora en México de 2000 a 2018 (Ritchie , 2017).....	3
<b>Figura 4</b> Mapa mundi de la producción de biocombustibles en tera-watts por hora en 2018 (Ritchie , 2017).....	3
<b>Figura 5</b> Arquitectura estructural de la hemicelulosa y celulosa (Tomada y traducida de Walker, 2010) .....	5
<b>Figura 6</b> Metabolismo de la xilosa a D-xilulosa, se resalta la incapacidad del xilitol deshidrogenasa de utilizar el cofactor producido por la xilosa reductasa. ....	9
<b>Figura 7</b> A: Arreglo del crRNA y el tracrRNA en el sistema nativo; B: Arreglo del gRNA (quimera crRNA-tracrRNA) (Imagen tomada y traducida de Jinek et al., 2012).....	11
<b>Figura 8</b> Mecanismo de edición genética con el sistema CRIPR/Cas9, se observa como el DNA es cortado una vez reconocido, para posteriormente ser reparado por el sistema no Homólogo (NHEJ) o bien por el sistema de recombinación homóloga (HDR).....	12
<b>Figura 9</b> Mapa general del gen <i>XR</i> de <i>S. stipitis</i> donde se observan los 3 motifs de interacción al NADP+ (óvalos rojos).....	27
<b>Figura 10</b> Motif 1 de unión al NAD(P)+.....	27
<b>Figura 11</b> Motif 2 de unión al NAD(P)+.....	28
<b>Figura 12</b> Motif 3 de unión al NAD(P)+.....	28
<b>Figura 13</b> Imagen cristalográfica que muestra la interacción del motif 3 de <i>XR</i> de <i>S. stipitis</i> (en blanco) con el NADP+ (negro y naranja), resalta la interacción con el grupo fosfato, donde se observan dos variantes de interacción (a y b) entre cada monómero del dímero del modelo 3D.....	29
<b>Figura 14</b> Esquema de la interacción entre los aminoácidos codificados por el motif 3 de <i>XR</i> en <i>Candida tenuis</i> con el grupo fosfato de NADP+ (izquierda) o con el grupo OH de NAD+ (derecha) (Petschacher et al, 2004). ....	30
<b>Figura 15</b> Plásmido del sistema CRISPR/Cas9 optimizado para <i>C. lusitaniae</i> (pCluCas9). ....	31

<b>Figura 16</b> a: Esquema del motif 3 de <i>C. lusitaniae</i> y la localización de las secuencias PAM encontradas junto con las secuencias de 20 bases tentativas a usar como crRNA; b: Secuencia de 20 bases seleccionada como crRNA y su correspondiente PAM (Café), cabe resalta que la PAM no se debe agregar a la secuencia de crRNA.....	32
<b>Figura 17</b> Secuencia del recombinante homólogo, en amarillo se resalta la secuencia a cambiar de <i>S. stipitis</i> .....	33
<b>Figura 18</b> Geles de la estandarización de la temperatura de alineamiento, resalta en verde la temperatura de alineamiento óptima para cada PCR. ....	35
<b>Figura 19</b> Esquema de la PCR overlapping, específicamente de la PCR de solape de secuencias (1) primero se tienen los fragmentos de DNA con extremos solapados/complementarios (verde) posteriormente (2) se procede a realizar un PCR donde dichos fragmentos se desnaturalizan y se alinean entre sí (3) finalmente cada fragmento funge como iniciador del otro y la DNA polimerasa termina el trabajo sintetizando las cadenas complementarias.....	38
<b>Figura 20</b> Amplificación por PCR overlapping, desarrollados en el gel según el gradiente de temperatura utilizado en la PCR de extensión. La flecha azul señala la banda del tamaño esperado al unir los fragmentos del gRNA con el SNR52. ....	39
<b>Figura 21</b> Amplificación de fragmentos por overlapping. Del carril 2 al 7 corresponde con el orden de la Tabla 5, el carril ocho muestra el SNR52. ....	40
<b>Figura 22</b> Mapa in silico del plásmido pBSII-gA. ....	42
<b>Figura 23</b> Extracción del plásmido pBSII-gA. ....	43
<b>Figura 24</b> Análisis de restricción de pBSII-gA, Las flechas amarillas señalan la banda..	43
<b>Figura 25</b> Gel de electroforesis de la PCR con diferentes condiciones y oligos M13. En amarillo se señala la banda esperada en el carril 2 (Enzima Phusion, TA=50°C), donde   observa mejor definida esta banda. ....	44
<b>Figura 26</b> PCR anidada con los iniciadores específicos partiendo del producto de la PCR con iniciadores M13 y escalamiento de la misma. ....	44
<b>Figura 27</b> PCRs con oligos M13 del plásmido pBSII-gA2.....	45
<b>Figura 28</b> Geles de diversos intentos de obtener el fragmento gRNA-AmpR con oligos M13 sin éxito (Flechas rojas). ....	46
<b>Figura 29</b> Amplificación del fragmento gRNA-AmpR con oligos M13. ....	46
<b>Figura 30</b> Gel de electroforesis de la PCR overlapping para el fragmento SNR52-gRNA-AmpR (SgA). ....	47
<b>Figura 31</b> Geles de las extracciones de 26 plásmidos pBSII-SgA. ....	48
<b>Figura 32</b> Diagrama de la metodología de mezclado de 5 extracciones diferentes. ....	49

<b>Figura 33</b> Diagrama del plásmido a armar, resaltan las enzimas a utilizadas para digerir y unir los fragmentos .....	51
<b>Figura 34</b> Geles de la extracción de diferentes colonias con el plásmido putativo pCluCas9 (SgAAC por las siglas de sus fragmentos: SNR52,gRNA,ActinP,AmpR y Cas9) cada carril de cada gel desarrollo una de las 40 extracciones. ....	52
<b>Figura 35</b> Gel de electroforesis de las mezclas digeridas con SpeI y XhoI.....	52
<b>Figura 36</b> A. Patrón de bandeos de la extracción 38; B: Gel de agarosa de las PCRs de AmpR y de gRNA, marcado en rojo se observan las bandas de los fragmentos esperados. ....	53
<b>Figura 37</b> Gel de agarosa de las PCR's de Cas9, ActinP y SNR52, utilizando como templado la extracción 38. ....	53
<b>Figura 38</b> Digestión de la extracción 38, en rojo se resalta la aparición de una banda de ~2000 pb. ....	54
<b>Figura 39</b> Diagrama del proceso de PCR asimétrica para determinar la longitud de un plásmido. En la izquierda se observa un estado inicial de la enlongación (en verde), y a la derecha se observa una enlongación completa. ....	55
<b>Figura 40</b> Resultado de la PCR asimétrica, plásmido 38, en los últimos dos carriles se muestra la banda de 3000 pbs.....	56
<b>Figura 41</b> Bandas de 3 digestiones del plásmido pBSII-ActinP y dos del mismo plásmido sin cortar.....	57
<b>Figura 42</b> Banda de digestión del plásmido pDrive-ActinP y del mismo plásmido sin cortar. ....	58
<b>Figura 43</b> PCR's con iniciadores M13 de los plásmidos pDrive-ActinP y pDrive.....	58
<b>Figura 44</b> Promotor de actina desarrollado den gel de agarosa posterior a su lavado en columnas de sílica. ....	59
<b>Figura 45</b> Geles donde se muestra el resultado de los diversos intentos de anidación de la PCR M13 del fragmento gRNA-AmpR. ....	71
<b>Figura 46</b> Geles de dos intentos de digerir con SacI y XhoI las extracciones de pBSII-SgA.....	71
<b>Figura 47</b> Gel de las PCRs colonia, el ultimo carril corresponde a una PCR del plásmido pBSII-gA como control positivo. ....	71
<b>Figura 48</b> Prueba de la PCR asimetrica, pUC57-XilA.....	72
<b>Figura 49</b> Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de xilitol por <i>C. lusitaniae</i> . ....	73

## RESUMEN

La producción de los biocombustibles de segunda generación, particularmente el bioetanol, tiene varios cuellos de botella para su escalamiento. Uno de ellos es la capacidad reducida de la mayoría de los microorganismos etanologénicos para utilizar la xilosa, el segundo azúcar más abundante en los residuos lignocelulósicos. *Clavispora lusitaniae* es una levadura prometedora para este proceso a nivel industrial ya que es capaz de asimilar hexosas y pentosas; tolerar altas concentraciones de etanol; altas concentraciones de azúcares y temperaturas de hasta 47°C. Sin embargo, en condiciones fermentativas (microaerofílicas), esta levadura no utiliza la xilosa como sustrato. La xilosa reductasa (XR) , se ha identificado como la enzima principal que limita que la levadura no utilice la xilosa como sustrato fermentativo por su preferencia al NAD<sup>+</sup> con respecto al NADPH<sup>+</sup>. Por lo anterior en el presente trabajo se planteó modificar la capacidad de *C. lusitaniae* de utilizar dicha pentosa mediante mutagénesis dirigida de la XR con la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9. Para la construcción del vector de expresión del sistema CRISPR, primero se realizó una búsqueda y análisis bioinformático del gen *Xyl1* así como de su transcrito para diseñar el mecanismo de mutación de la enzima. Así mismo mediante el uso de las herramientas moleculares se diseñó la síntesis y ensamblaje del plásmido que contuviera la proteína Cas9 y el gRNA para realizar dicha modificación.

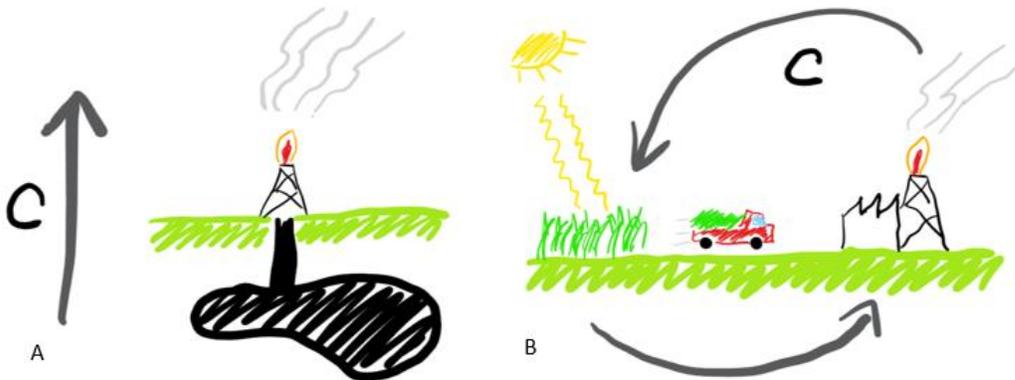
## ABSTRACT

The production of second-generation biofuels, particularly bioethanol, has several bottlenecks to scale-up. One of them is the reduced capacity of most ethanologenic microorganisms to use xylose, the second most abundant sugar in lignocellulosic residues. *Clavispora lusitaniae* is a promising yeast for this process at an industrial level since is capable of assimilating hexoses and pentoses; tolerate high concentrations of ethanol; high concentrations of sugars and temperatures up to 47 ° C. However, under fermentative (microaerophilic) conditions, this yeast does not use xylose as a substrate. Xylose reductase (XR) has been identified as the main enzyme that limits that yeast does not use xylose as a fermentative substrate due to its preference for NAD + over NADPH +. Therefore, in the present work, it was proposed to modify the capacity of *C. lusitaniae* to use such pentose by means of directed mutagenesis of the XR with the CRISPR / Cas9 gene editing tool. For the construction of the expression vector of the CRISPR system, a search and bioinformatic analysis of the *Xyl1* gene as well as its transcript was performed to design the mutation mechanism of the enzyme. Likewise, through the use of molecular tools, the synthesis and assembly of the plasmid that contained the Cas9 protein and the gRNA was designed to carry out said modification.

# 1.INTRODUCCION

## 1.1 Demanda energética

Hoy en día existe una disminución de la disponibilidad de energía la cual se atribuye principalmente al aumento de la demanda por el desarrollo que tenemos como civilización. También existe una disminución de las fuentes de combustibles fósiles que representan más del 80% de las fuentes de energía utilizadas por el hombre, ya que estas fuentes de combustible no son renovables. Con este contexto se plantean una serie de alternativas: la reducción de la demanda energética mejorando la eficiencia del uso de la energía; buscar, investigar y desarrollar nuevas fuentes de energía para la demanda energética a futuro; y que los países desarrollados tomen cartas en el asunto porque pueden ser los principales impulsores de la solución de este problema (Browne, 2013; Manieniyana *et al*, 2009). Además de la disminución de fuentes de energía también está el aumento de gases de efecto invernadero debido de manera importante a la quema de combustibles fósiles que liberan carbono en forma de CO<sub>2</sub> (Fig. 1A) lo que propicia el cambio climático (Salaet y Roca, 2010; FAO *et al*, 2013).



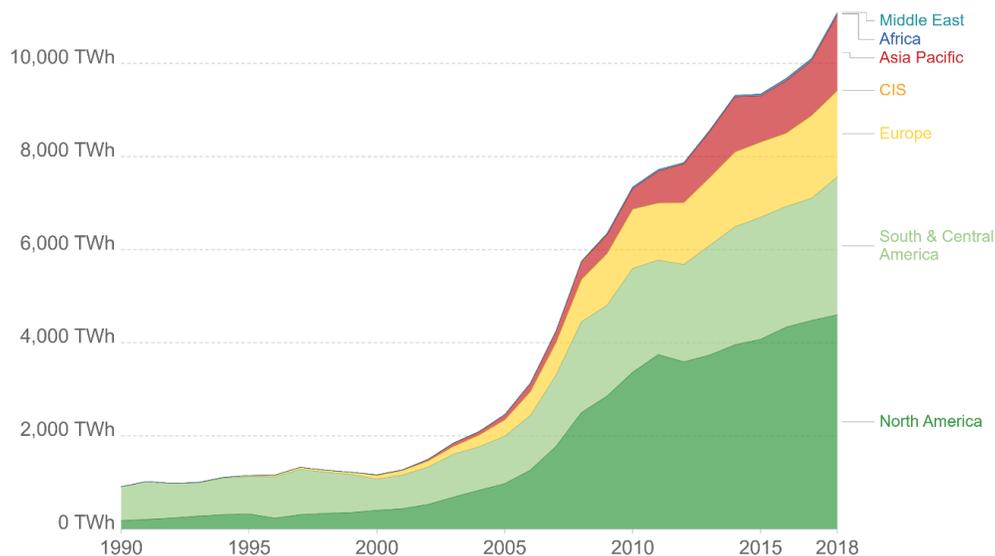
**Figura 1** Flujo del carbono lineal producido por la quema de combustibles fósiles; B: Flujo de carbono de cíclico producido por la utilización de biocombustibles.

Una alternativa a esto es la producción de combustibles renovables a partir de biomasa vegetal (biocombustibles) particularmente el bioetanol, los cuales

producen un ciclo en el flujo de carbono, moviéndose de la biomasa a la atmosfera y viceversa, que es muy distinto del flujo de carbono de la litosfera a la atmosfera, acumulando así CO<sub>2</sub> en esta última (Fig. 1B).

## 1.2 Alternativas energéticas: Biocombustibles

El desarrollo e investigación de nuevas tecnologías para generar energías limpias y renovables es clave para el futuro energético de la civilización y en la historia reciente se ha observado que a nivel mundial desde 2004 (Fig. 2) ha habido un incremento en la producción de biocombustibles (Ritchie, 2017).

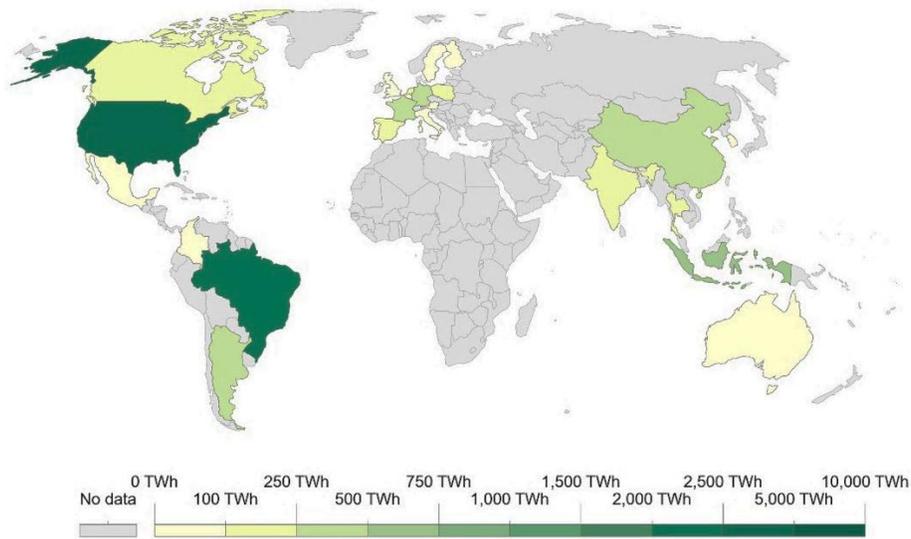


**Figura 2** Producción de biocombustibles en tera-watts por hora por región a nivel mundial, de 1990 a 2018 (Ritchie, 2017).

Particularmente en México se comenzó su producción hasta 5 años después de la señalada mundialmente (Fig. 3) habiendo un incremento desde entonces, más sin embargo la producción de biocombustibles en la mayoría de los países (incluido México) aun es limitada, siendo Estados Unidos y Brasil los principales productores en 2018 (Fig. 4) (Ritchie, 2017).



**Figura 3** Producción de biocombustibles en tera-Watts por hora en México de 2000 a 2018 (Ritchie , 2017).



**Figura 4** Mapa mundi de la producción de biocombustibles en tera-watts por hora en 2018 (Ritchie , 2017).

Inicialmente se destinaban cultivos como soya sorgo, maíz, caña, entre otros, enteramente a la producción de biocombustibles. Sin embargo, este manejo de los recursos agrícolas es bastante controversial por varias razones. Algunas de ellas

son la eficiencia energética de la obtención de la materia prima, la tierra de cultivo disponible para la producción necesaria (tomando en cuenta la necesidad de cultivos con fin alimentario), el impacto ambiental en la atmosfera por la liberación de oxido nitroso, el desgaste excesivo del suelo para suplir la demanda de cultivo, o el impacto en la biodiversidad de ecosistemas como bosques húmedos (Kullander, 2010).

Con base en esta problemática surgen los combustibles de segunda generación, los cuales utilizan como materia prima residuos del sector agrícola o forestal. Esta biomasa vegetal (no comestible), principalmente material lignocelulósico, es la forma más abundante de carbono en la tierra. De esta forma se aprovechan de mejor manera los recursos disponibles propiciando un manejo más sustentable de los recursos naturales (Walker, 2010; González *et al*, 2008).

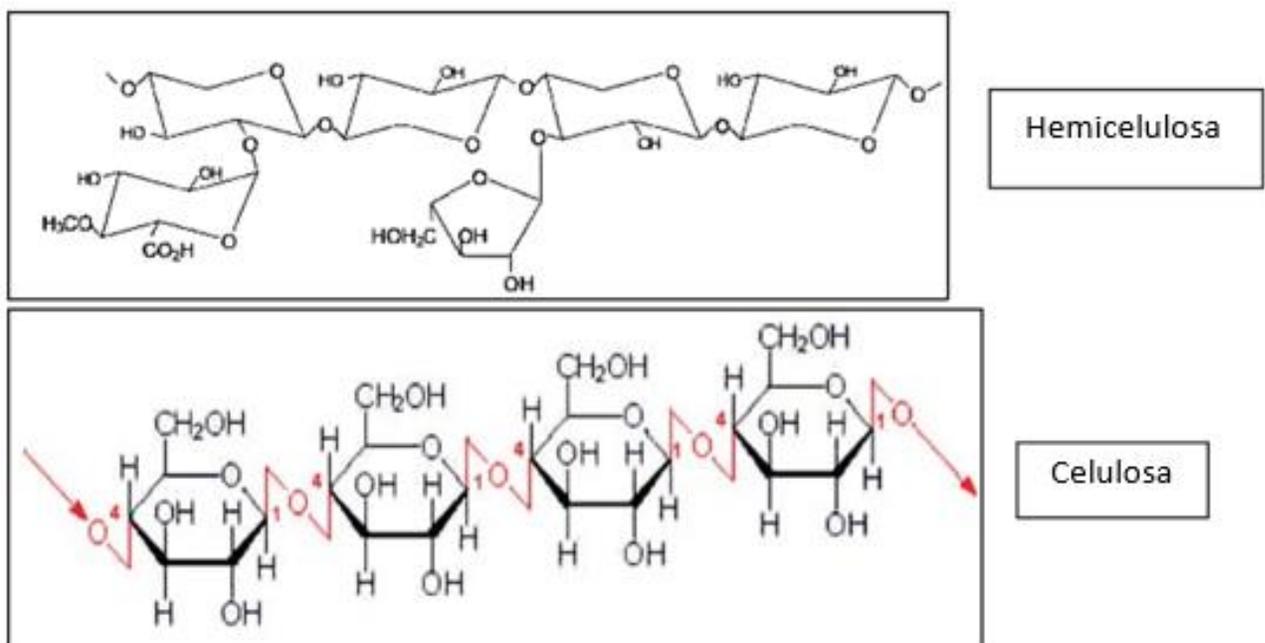
### **1.3 Pasos en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos.**

La producción de bioetanol a partir de biomasa vegetal rica en carbohidratos consta de diferentes etapas. Por mencionar las más importantes, se agrupan en 4: pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables (Sacarificación), la fermentación de los azúcares obtenidos y finalmente la purificación del biocombustible obtenido (Aden *et al.*, 2002; Maurya, *et al.*, 2015).

El pretratamiento se encarga de la desorganización de la estructura de la celulosa y hemicelulosa así como de eliminar la mayor cantidad de lignina posible, esto debido a que la arquitectura de la pared celular (estructura cristalina de la celulosa y hemicelulosa) genera una resistencia natural a su degradación impidiendo la interacción de las enzimas capaces de degradar estos azúcares que las componen. También la eliminación de la lignina es importante ya que se ha observado que la presencia de este compuesto en el proceso de sacarificación reduce el rendimiento de esta hidrólisis, debido a un bloqueo físico de las enzimas por parte de la lignina

y a la adsorción de las enzimas por parte de la lignina. Estos pretratamientos pueden llevarse a cabo con agentes físicos, químicos e inclusive biológicos (Faraco, 2015; Buckeridge y Souza, 2017).

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa se puede realizar por varios métodos, físicos, químicos y biológicos, pero lo más atractivo es el uso de extractos enzimáticos o bien organismos que sean capaces de descomponer estos compuestos. En cualquiera de los dos casos el papel de las celulasas y hemicelulasas es indispensable, esto debido a que se estima que la composición de los residuos lignocelulósicos es de un 38 a un 43% de celulosa y de un 25 a un 32% de hemicelulosa (siendo el resto lignina y cenizas). Estos polímeros son los que contienen los azúcares adecuados para el proceso de fermentación (Fig. 5), pero que en un estado polimerizado no pueden ser fermentados (Walker, 2010; de Souza *et al.*, 2012).



**Figura 5** Arquitectura estructural de la hemicelulosa y celulosa (Tomada y traducida de Walker, 2010)

Por su parte la fermentación es posible gracias al uso de microorganismos capaces de metabolizar los azúcares obtenidos de la sacarificación en el producto de interés,

que en este caso es etanol (bioetanol por su origen a partir de biomasa). Antes de realizar este paso es importante saber que la presencia de inhibidores de la fermentación alcohólica, como pueden ser el ácido acético, ácido fórmico, ácido levulinico, furfural, hidroximetilfurfural, fenol y vainillina pueden ser producidos en los pasos anteriores (up-stream), dependiendo de los métodos específicos utilizados. Por lo tanto, es importante identificarlos y separarlos de la mezcla sacarificada, aunque lo ideal es evitar su producción (Walker, 2010; Faraco, 2015).

En cuanto a la cantidad de líquido en el cultivo, se pueden distinguir dos tipos de fermentaciones, sumergidas y en sustrato sólido, siendo la más utilizada en medio sumergido y esto trae algunos retos particulares, como el control de la transferencia de masa, mantener una mezcla homogénea; la temperatura y pH. Estos dos últimos parámetros desde un punto de vista industrial se prefiere que sea una temperatura relativamente alta y un pH bajo para disminuir el riesgo de contaminación, la temperatura alta también puede disminuir costos de esterilización. Finalmente, otro punto importante es considerar el microorganismo que realizará la fermentación. Existen varias bacterias y levaduras que pueden realizar de manera nativa este proceso, sin embargo, por sus altos rendimientos de etanol se prefiere utilizar levaduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, aunque es importante estudiar sus características (pros y contras) de todas las levaduras conocidas para escoger la que mejores rendimientos tenga (Tabla1) (Walker, 2010; Faraco, 2015).

A pesar de diversos estudios realizados no se ha logrado identificar alguna especie nativa con todos los requerimientos necesarios para un bioproceso sostenible a escala industrial de biocombustibles de segunda generación por lo que se ha ido optando por el mejoramiento genético, ya sea por evolución dirigida o bien por ingeniería genética (Buckeridge y Souza, 2017).

Tabla 1. Diferentes levaduras productoras de etanol.

Especie	Características	Desventajas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microorganismo predominante en la producción de bioetanol, capaz de fermentar los principales azúcares derivados de materias primas de primera generación (ej. Glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa) bajo condiciones de producción industrial de larga escala.	Incapaz (de manera nativa) de fermentar celobiosa, pentosas (xilosa o arabinosa) derivadas de materias primas de segunda generación (residuos lignocelulósicos). La productividad de etanol de cepas genéticamente modificada a partir de xilosa continúan siendo bajas (0.23 – 0. 24 g/g de azúcar)
<i>Scheffersomyces stipitis</i> , <i>S. shehatae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i>	Levaduras de tipo no <i>Saccharomyces</i> capaz de fermentar pentosas derivadas de materias primas de segunda generación	No son particularmente tolerantes al etanol y no han sido probadas extensivamente bajo condiciones de producción industrial de larga escala.
<i>Hansenula polymorpha</i>	Fermentación de xilosa a altas temperaturas	Sin probar en escala industrial
<i>Dekker bruxellensis</i>	Levadura nativa encontrada en fermentaciones de destilería que puede ser capaz de producir etanol bajo condiciones de alto estrés.	No esta completamente comercializada y sigue en estudios previos a la explotación industrial.
<i>Candida krusei</i>	Levaduras etanologenicas que producen bajos niveles de metabolitos secundarios como acido succínico.	No está completamente comercializada y sigue en estudios previos a la explotación industrial.

(Tomado de Walker, 2010)

Finalmente, la purificación del bioetanol se consigue realizando diferentes métodos de separación para poder obtener un producto lo más refinado posible. La principal y por lo tanto más importante, es la destilación del producto crudo, para que se logre separar la fase acuosa del etanol así como otros alcoholes no deseables. Este

proceso es de los que más requiere energía, llegando en el pasado a representar más del 50% utilizada en todo el proceso, afortunadamente se ha mejorado la eficiencia energética, llegando a representar entre el 35 y 40% (Wyman, 1996; Faraco, 2015).

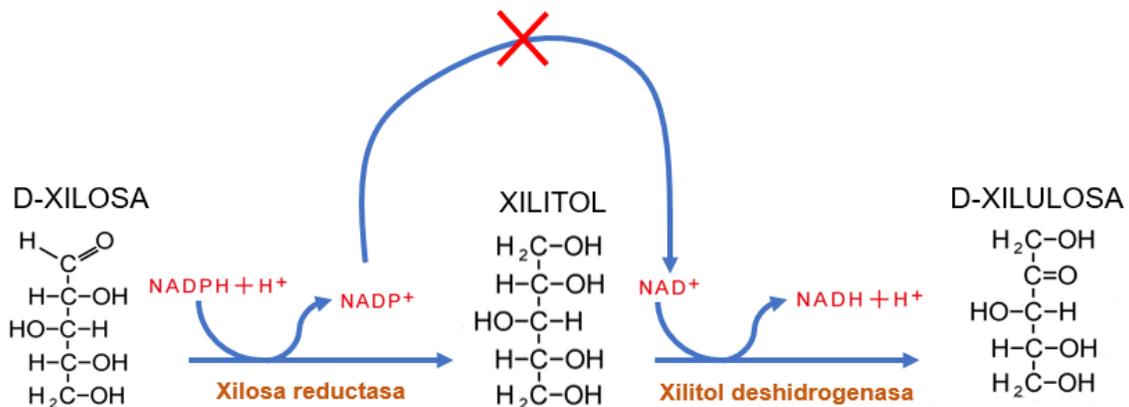
#### **1.4 Importancia del bioetanol como biocombustible**

Entre los productos de un proceso de fermentación, el etanol es importante en el área industrial, agroalimentaria y farmacéutica por mencionar algunos. Por otro lado su papel como posible biocombustible líquido ha ido en aumento, ya que su adición a motores de combustión interna a base de gasolina aumenta el octanaje lo que representa un aumento en la eficiencia del motor y una disminución en la contaminación por monóxido de carbono. Esta característica permite que el etanol sustituya al metil terbutil éter (MTBE), el cual se utiliza debido a las mismas propiedades mencionadas en el etanol. Sin embargo, el etanol presenta ventajas, ya que el MTBE es muy persistente en el ambiente, así mismo tiene una alta solubilidad en agua y puede tener repercusiones a nivel ambiental y en la salud. Es interesante mencionar que en algunos casos el bioetanol ha logrado substituir al 100% el uso de gasolina (Vázquez y Dacosta, 2007).

#### **1.5 Microorganismo fermentativo: *Clavispora lusitaniae* y fermentación de pentosas**

Como ya se había mencionado, para obtener el bioetanol de segunda generación es importante contar con microorganismos fermentativos capaces de asimilar tanto las hexosas como pentosas presentes en los sacarificados lignocelulósicos. *Clavispora lusitaniae* (también conocida como *Candida lusitaniae*) es una levadura ascomicota capaz de asimilar la xilosa, celobiosa y glucosa presentes en sacarificados de bagazo de caña (Rodrigues de Miranda, 1979). Por otro lado, es tolerante a altas concentraciones de etanol (ya que se encuentra en fermentos de mezcal, donde las concentraciones de etanol alcanzan el 55% de la mezcla), altas concentraciones de azúcares y altas temperaturas (hasta 47°C) de sacarificación y fermentación simultánea comparada con levaduras de uso más convencional como

*Saccharomyces cerevisiae* (Spindler *et al*, 1988; Escalante-Minakata *et al.*, 2008; Santiago-Benítez, 2017). En estudios previos se observó que esta levadura a pesar de metabolizar la xilosa en condiciones aerobias no es capaz de fermentarla a etanol en condiciones anaerobias. Al hacer un estudio de la ruta metabólica correspondiente, se observó que se realiza una isomerización de la D-xilosa a D-xilulosa pasando previamente por xilitol. Sin embargo, se ha identificado que la enzima que cataliza la reacción de D-xilosa a xilitol (xilosa reductasa o XR) utiliza como cofactor preferente el NADPH liberando NADP+. Mientras que la enzima que cataliza la reacción de xilitol a D-xilulosa (xilitol deshidrogenasa o XDH) utiliza exclusivamente NAD+ y libera NADH. Lo anterior conlleva un problema en el equilibrio NADP+/NAD+ ya que la segunda enzima no puede utilizar el cofactor que produce la primera (Fig. 6). Por lo que se da una acumulación de xilitol, truncando la ruta metabólica y así evitando que se forme D-xilulosa, metabolito que entra a la ruta de las pentosas fosfato para posteriormente seguir la glucólisis y para finalmente llegar a fermentación- (Bruinenberg *et al*, 1983; Santiago-Benítez, 2017).



**Figura 6** Metabolismo de la xilosa a D-xilulosa, se resalta la incapacidad del xilitol deshidrogenasa de utilizar el cofactor producido por la xilosa reductasa.

### 1.6 Modificación genética: una alternativa al desbalance de cofactores

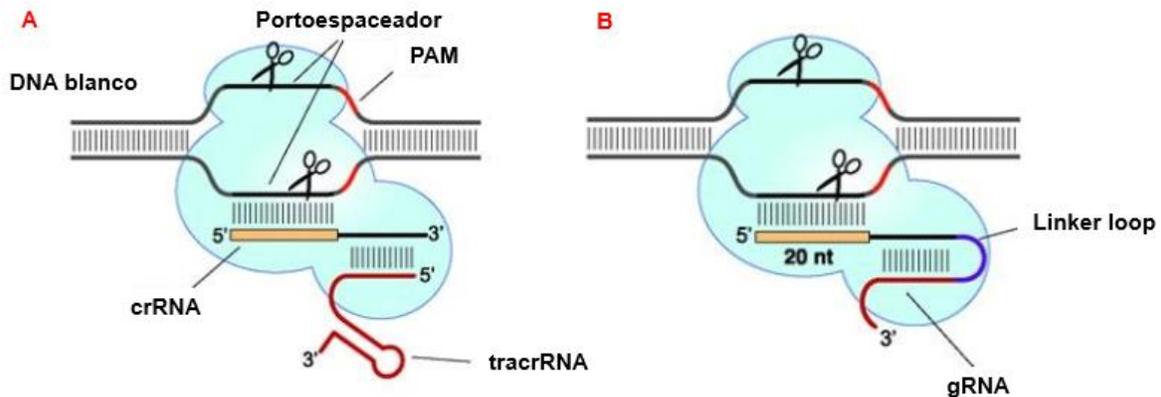
La modificación genética de organismos permite obtener características fenotípicas de interés. Una forma de obtener mutantes de un organismo es por mutagénesis

aleatoria en la cual se genera variación genética de un gen o grupo de genes. Este proceso luego debe ser sometido a una presión de selección para obtener el carácter deseado, a estos procesos en conjunto se le conoce como evolución dirigida (Brakmann y Johnsson, 2002). Para lograr una mutagénesis aleatoria existen diferentes métodos, donde el organismo debe ser expuesto a agentes físicos o químicos que propician el aumento de la tasa de mutación normal ( Stemmer, 1994). Entre los agentes físicos están los rayos de alta energía como rayos UV, rayos X, o radiación  $\gamma$ . Mientras en agentes químicos se conocen agentes análogos de base (por ejemplo, la 6-amino purina) agentes intercalantes de DNA (naranja de acridina, el bromuro de etidio, la proflavina y el 4,5',8-trimetilpsoraleno) o bien agentes que interaccionan con el DNA (hidroxilamina, agentes alquilantes o el etil-metasulfonato). Todos estos tipos de agentes interfieren con la replicación normal del DNA, de manera directa o indirecta (Benavides y Guénet, 2003; Kodym y Afza, 2003).

A pesar del amplio uso y resultados que la mutagénesis ha obtenido, cuenta con el riesgo de la utilización de sustancias mutagénicas nocivas para el manipulador. Así mismo representa un gran esfuerzo y tiempo para llevar a cabo un análisis completo de todas las posibles mutantes obtenidas con tal de escoger la indicada. Por estos inconvenientes surgen las técnicas de mutagénesis dirigida, éstas se logran modificando la secuencia de DNA en un sitio específico de un organismo, utilizando diversas herramientas de edición molecular (TALEN's, ZFN o megaTALs) que tienen afinidad por ciertas regiones del DNA. En sus comienzos esta manipulación no era más sencilla que la evolución dirigida en su metodología e incluso suponía una gran inversión de tiempo y recursos. Estas primeras investigaciones en mutagénesis dirigida ayudaron a desarrollar el conocimiento metodológico necesario para la aplicación de una futura herramienta mucho más barata y facil de aplicar, conocida como CRISPR/Cas9, hoy en día ampliamente utilizada. (Urnov, 2018).

## 1.7 CRISPR/Cas9: Una nueva herramienta de modificación genética

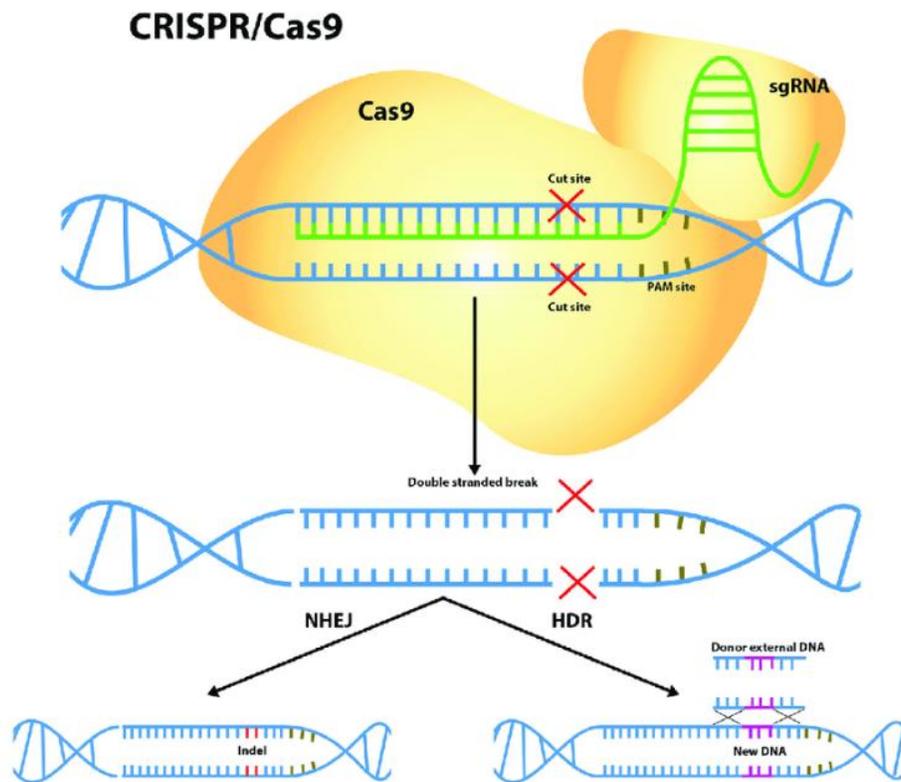
El sistema CRISPR/CAS9 (Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein) consiste en una endonucleasa de restricción (Cas9) con sitio de reconocimiento programable a través de una cadena continua de RNA denominada gRNA la cual está conformada por un fragmento de RNA que reconoce la secuencia de DNA a modificar (crRNA) y un fragmento adyacente de anclaje a la proteína Cas9 (tracrRNA), en el sistema nativo el crRNA y el tracrRNA no son una cadena continua y sólo interaccionan por puentes de hidrogeno (Fig. 7) (Jinek *et al.*, 2012; Mojica, 2018).



**Figura 7** A: Arreglo del crRNA y el tracrRNA en el sistema nativo; B: Arreglo del gRNA (quimera crRNA-tracrRNA) (Imagen tomada y traducida de Jinek *et al.*, 2012).

De esta forma la proteína Cas9 busca secuencias cortas denominadas PAM que se encuentran río abajo adyacentes a la región diana que será reconocida por el gRNA. Si la proteína Cas9 reconoce una secuencia PAM seguida de una complementariedad del 100% de su gRNA por la región diana, la endonucleasa cortará 3 pb río arriba de la secuencia PAM en ambas cadenas de DNA. Después de este punto la célula identificará que tiene una región de su DNA cortada y procederá a repararlo (Mojica, 2018).

En la célula existen dos mecanismos de reparación del DNA, reparación no homóloga y reparación homóloga, en esta última la célula utilizará una región de DNA no dañada que tenga una alta homología con el DNA cortado por Cas9 para reparar el daño, realizando una recombinación homóloga. Con este principio si a la célula además de introducirle el sistema CRISPR/Cas9 se le introduce una secuencia de DNA con alta homología y que contenga el cambio deseado que se quiere realizar, el material genético puede ser reparado con esta secuencia, insertando la mutación deseada (Fig. 8) (Lander, 2016; Mojica, 2018).



**Figura 8** Mecanismo de edición genética con el sistema CRIPR/Cas9, se observa como el DNA es cortado una vez reconocido, para posteriormente ser reparado por el sistema no Homólogo (NHEJ) o bien por el sistema de recombinación homóloga (HDR) (Cribbs y Perera, 2017).

A pesar de la aparente simplicidad del sistema CRISPR/Cas9 la clave para una mutación exitosa depende de un correcto diseño del vector de expresión del sistema. Si se desea expresar el sistema en el organismo *in vivo* se debe considerar

el organismo en el que se desea realizar la edición genética, de tal forma que la expresión de la Cas9 y el gRNA dependerán de promotores fuertes en la célula donde se quiere expresar el sistema. Otra consideración importante es el origen de la Cas9, ya que es una proteína que se expresa en procariontes de manera nativa, con el código genético “estándar”. Y es importante resaltar que existen organismos tanto procariontes como eucariontes que tienen variantes de este código y *C. lusitaniae* es uno de estos eucariontes. *Clavispora lusitaniae* pertenece al clado CUG (clado de las *Candidas*) en el cual el codón CUG, codifica para serina (en vez de leucina como en el código genético “estándar”), por lo que es necesario reemplazar este codón por uno que si codifique para leucina en este organismo, proceso conocido como optimización de codones (Vyas *et al*, 2015).

### **1.8 Avances en la modificación genética de levaduras para la producción de bioetanol mediante CRISPR/Cas9**

Particularmente hay muy pocos estudios de *Clavispora lusitaniae* en donde se realice alguna modificación genética con el sistema CRISPR y mucho menos se ha encontrado registro de algún estudio que trabaje en esta línea encaminado a la producción de bioetanol. La mayor cantidad de trabajos de este tipo se han realizado en *Saccharomyces cerevisiae*, sobre todo por ser un modelo microbiano clásico de estudio en la biología molecular además de que se tiene bien caracterizado su rendimiento como organismo modelo para realizar fermentaciones alcohólicas.

DiCarlo y colaboradores (2013) probaron la eficiencia, toxicidad y especificidad del sistema CRISPR/Cas9 en *Saccharomyces cerevisiae*. En su trabajo se enfocaron en silenciar el gen *CAN1* y un “knock in” de una mutante *ADE2-101* en dicho gen a través de la integración de homólogos de reparación después del corte realizado por Cas9. El gen *CAN1* codifica para una permeasa de arginina en la membrana celular de la levadura, mientras el gen *ADE2*, en esta cepa, está silenciado lo que evita la síntesis de una enzima involucrada en la síntesis de adenina. La mutante silenciada *CAN1* la expusieron a canavanina (análogo tóxico de la arginina) con lo cual sólo las mutantes sobrevivirían y en el caso de la mutante *ADE2* se expuso a un medio carente de adenina, en donde sólo las mutantes “reparadas” sobrevivirían.

No sólo se obtuvieron resultados positivos en ambos casos, si no también se observó que cerca del 100% de las colonias sobrevivientes tenían integrados los fragmentos de reparación, mientras que las células transformadas solamente con el homólogo de reparación (sin sistema CRISPR) no lograron sobrevivir. Dicho estudio demostró la capacidad de la tecnología CRISPR/Cas9 para modificar el genoma de una levadura como *S. cerevisiae* sin tener efectos tóxicos y con una aparente alta especificidad, lo cual abrió la puerta para aplicaciones futuras del sistema en levaduras.

Pero no es hasta 2018 en donde Xue y colaboradores enfocan la capacidad de edición del sistema CRISPR/Cas9 en la optimización de la producción de etanol. En su trabajo se enfocaron en silenciar el gen *ADH2* de *S. cerevisiae*, que codifica para la alcohol deshidrogenasa II (ADHII), que se encarga principalmente de metabolizar etanol a acetaldehído, contraponiéndose a la alcohol deshidrogenasa I que realiza la reacción inversa. De esta forma se enfocaron en dos estrategias para esta tarea, en la primera se realizó un corte único en el gen *ADH2* y en la segunda se realizaron dos cortes, con dos gRNA's distintos, flanqueando el gen *ADH2* para eliminar el gen completo. En ambos casos se utilizaron fragmentos homólogos de recombinación para que la levadura reparara el daño pero que codificaran una proteína truncada (corte único) o bien no contuvieran la secuencia del gen (corte doble). En el caso del corte único hubo una reducción de la expresión del gen que oscilaba entre el 32.8 y el 54.1%, una reducción de la actividad *in vitro* de ADHII que iba del 17 al 60.5% y una reducción de la actividad de ADHII de entre 32.2 y 45.4% en una fermentación de 36 horas. Mientras en el caso del doble corte hubo una reducción de la expresión del 99.4%, una reducción de la actividad *in vitro* de ADHII que iba del 11.7 al 30.1% y una reducción de la actividad de ADHII de entre 15. y 35.9% en una fermentación de 36 horas. En cuanto al rendimiento de etanol, la mutante de corte único obtuvo el mejor aumento, siendo de 75% a las 36 horas y del 72% a las 72 horas con respecto a la levadura nativa. Con este trabajo se confirma una vez más la eficiencia del sistema CRISPR en *S. cerevisiae*, además de que se comprueba que con un buen enfoque metabólico es posible manipular a nivel

genético las rutas metabólicas involucradas en la producción de etanol utilizando CRISPR.

Por otro lado, y como ya se había mencionado, el trabajo con otras especies de levaduras, particularmente con el género *Candida* (*Clavispora*), no es muy extenso. Vyas y colaboradores (2015) se aventuraron a trabajar con la modificación de genes esenciales y familias de genes por el sistema CRISPR/Cas9 en *Candida albicans* (un organismo de importancia clínica) para comprobar la viabilidad de este sistema en un organismo diploide. La poliploidía, y en este caso específico la diploidía, representan un desafío ya que los intentos de modificarle ciertas características fenotípicas no son muy fructíferos en estos organismos porque de sólo modificarse uno de los alelos, el gen muy probablemente seguiría expresándose, pero el sistema CRISPR prometía una modificación a todos los locus de un organismo diploide. En su trabajo los autores realizaron varias ediciones con homólogos de recombinación; la primera fue enfocada a silenciar el gen *ADE2* (gen que codifica la P-ribosyl-aminoimidazol carboxilasa, que cataliza el sexto paso en la síntesis de purinas) con un codón de paro prematuro. Con esta modificación no sólo la levadura es incapaz de metabolizar adenina, si no también las colonias toman un color rojo oscuro (por la acumulación de 5 aminoimidazol ribotido). En este caso el sistema logró modificar de un 20 a un 40% de las colonias observadas, por lo que procedieron a silenciar 2 genes pertenecientes a la misma familia con un sólo gRNA: el *CDR1* y *CDR2*. Estos genes al ser silenciados generaron un aumento en la sensibilidad a antifúngicos de tipo azoles.

Todas estas pruebas demostraron la viabilidad, precisión, especificidad y modificación de familias de genes con un sólo gRNA con el sistema CRISPR/Cas9 en una levadura diferente a *S. cerevisiae*, aunque esto no demuestra que en todas las especies del género *Candida* (*Clavispora*) se pudieran obtener los mismos resultados.

Por otro lado Norton y colaboradores (2017) trabajaron con *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) para desarrollar un sistema CRISPR/Cas9 eficiente en el genoma de este organismo. Los autores optimizaron el plásmido de Cas9 utilizado para *C. albicans*

(Vyas *et al.*, 2015) cambiando los promotores de esta última levadura por promotores nativos de *C. lusitaniae* para la expresión de los genes de Cas9 y gRNA. Con este planteamiento se procedió a comparar la eficiencia del sistema utilizado en *C. albicans* con sus promotores especie específicos y el sistema desarrollado en su propio trabajo sobre *C. lusitaniae*.

Para tener una fácil detección de las mutantes se enfocaron en modificar el gen *ADE2* (mutantes positivas=colonias rojas). Otro experimento probado en paralelo fue la comparación de la eficiencia de mutagénesis con un homólogo de recombinación con brazos cortos (80 pb) en contraste con uno de brazos largos (1000 pb). Los resultados de estos experimentos mostraron que el plásmido con promotores nativos de *C. lusitaniae* junto con la utilización del homólogo de recombinación largo, tuvieron las mejores eficiencias de mutación (36%), seguida del plásmido con promotores de *C. albicans* con un homólogo de reparación largo (17%). Estos resultados demuestran que no sólo es recomendable utilizar promotores nativos de *C. lusitaniae* en el sistema CRISPR para este organismo, sino que también un homólogo de recombinación de brazos estaría ayudando a una mayor eficiencia de mutagénesis. Cabe resaltar que éste es el único reporte hasta el momento que se ha encontrado sobre el sistema CRISPR/Cas9 en *C. lusitaniae*. Por lo anterior en el presente trabajo se plantea la construcción de un plásmido transitorio con el sistema CRISPR/Cas9, expresable en *C. lusitaniae* para su futura implementación en dicho organismo con el fin de obtener etanol a partir de xilosa modificando enzimas como lo es la XR.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de microorganismos capaces de co-fermentar hexosas y pentosas en la producción de bioetanol, ha llevado a aislar y estudiar a *Clavispora lusitaniae*. Esta levadura asimila hexosas y pentosas en condiciones aerobias, mientras que en condiciones microaerofilicas sólo fermenta las hexosas a etanol. Si bien *C. lusitaniae* posee una ruta de asimilación de xilosa, es incapaz de fermentar la xilosa eficientemente por el desbalance de cofactores NADH<sup>+</sup> y NADPH<sup>+</sup>. Por lo mencionado anteriormente, es necesario que el proceso de fermentación se optimice. Una alternativa es modificar la XR para que la levadura utilice preferentemente el cofactor NADH en lugar del NADPH y de esta forma fermente xilosa. Estos cambios se pueden llevar a cabo mediante el uso de las herramientas de biología molecular y la implementación del sistema CRISPR/Cas9 en un plásmido adecuadamente diseñado.

### 3. HIPÓTESIS

Mediante técnicas de bioinformática y biología molecular adecuadas, se logrará la construcción de un plásmido con el sistema CRISPR/Cas9 capaz de expresarse en *Clavispora lusitaniae*, para la modificación genética de este organismo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Construir un plásmido con el sistema CRISPR/Cas9 constituido con las secuencias promotor de actina, Cas9, promotor SNR52, gRNA y resistencia ampicilina con un origen de replicación para su expresión en *Clavispora lusitaniae*.

### 4.2 Específicos

Diseñar una estrategia de modificación genética mediante CRISPR/Cas9 fundamentado en la información bioinformática disponible.

Identificar a través de las herramientas bioinformáticas los fragmentos necesarios para armar el plásmido: promotor de actina, Cas9, promotor SNR52, gRNA y resistencia ampicilina con un origen de replicación.

Diseñar los iniciadores necesarios para obtener los fragmentos constituyentes del plásmido, así como el mapa *in silico* del plásmido.

Establecer y aplicar los diferentes métodos y estrategias de biología molecular para el armado *in vitro* del plásmido con el sistema CRISPR/Cas9.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Secuencias *in silico*

Se utilizaron las secuencias de los promotores de *C. lusitaniae* ATCC 42720 y sus homólogos en *C. lusitaniae* CBS 6937 (Durrens *et al.*, 2017).

### 5.2 Softwares y páginas bioinformáticas

La base de datos utilizada para buscar las secuencias fue GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) y para la búsqueda de homologías se utilizó el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los alineamientos fueron realizados utilizando el programa ClustalW a través del software UGENE (<http://ugene.net/>).

El análisis de las características de los iniciadores y su T<sub>m</sub> se determinó con la herramienta <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> en línea.

La construcción de los mapas de plásmidos se realizó en el software SnapGene 3.2.1.

### 5.3 Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

*Clavispora lusitaniae* CDBB-L-2031 fue aislada de mosto de mezcal, Oaxaca, México. La cepa fue cultivada en medio YPD a 30°C y 150 rpm por 72 horas.

*Escherichia coli* DH5α fue cultivada en medio LB a 37° y 150 rpm por 12-18 horas, con o sin ampicilina a una concentración de 1 mg/mL, dependiendo del experimento. Se utilizó tanto medio líquido como en placa a lo largo de todo el trabajo.

### 5.4 Medios de Cultivo

#### 5.4.1 Medio YPD

Composición (en g/L): extracto de levadura 10; peptona 20; dextrosa 10

#### 5.4.2 Medio LB

Composición (en g/L): extracto de levadura 5; triptona 10; NaCl 10; en el caso de medio sólido se adicionaba 8 de agar bacteriológico.

#### 5.4.3 Medio MacConkey

Composición (en g/ L): peptona 17; proteosa peptona 3; lactosa 10; sales biliares No.3 1.5; NaCl 5; agar bacteriológico 13.4; rojo neutro 0.03; Cristal violeta 0.001.

#### 5.5 Extracción de DNA genómico de *C. lusitaniae*

El número de células de un cultivo de *C. lusitaniae* de 72 horas de crecimiento se ajustó a una absorbancia de 12 a una longitud de onda de 600 nm. Se centrifugó 1 mL de esta suspensión celular, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 200 µL de regulador de rompimiento, se adicionó aproximadamente 200 µL de perlas de vidrio y 200 µL de fenol-cloroformo (1:1) y se llevó a vortex a máxima velocidad por 5 min. Al terminar se adicionó amortiguador TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) y se mezcló en vortex brevemente para posteriormente centrifugar por 5 min a 12, 000 rpm. El sobrenadante se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga y a éste se le adicionaron 400 µL de fenol-cloroformo. Esta mezcla se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga y se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló perfectamente y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 400 µL de amortiguador TE. A este tubo se le adicionaron 30 µL de RNAsa y se mezcló bien para dejarlo incubando 15 min a 37 °C. Al terminar se adicionaron 10 µL de acetato de sodio 3 M y 1 mL de etanol absoluto, se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en amortiguador TE. La extracción de DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 5.6 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

##### 5.6.1 Soluciones

**Solución A o amortiguador de resuspensión:** (por mL) 50 µL de Tris-HCl (pH 8) al 1M; 20 µL de EDTA (pH 8) al 0.5 M; 100 µg de RNAsa tipo A; 930 µL de agua desionizada estéril; se esteriliza en autoclave.

**Solución B o amortiguador de lisis:** (por mL) 860 µL de agua desionizada estéril; 100 µL de SDS al 10%; 40 µL de NaOH al 5M; esta solución se prepara al instante.

**Solución C o amortiguador de neutralización:** (por mL) 236.3 mg de guanidina; 50.06 mg de acetato de potasio; 1 mL de agua desionizada; se esteriliza con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Tanto solución A como solución C se conservan a 4°C.

### 5.6.2 Metodología

Si el cultivo celular era líquido se tomó un alícuota 1 mL en 2 tubos de microcentrífuga por extracción, y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, las pastillas se resuspendieron y se juntaron en un sólo tubo, éste se centrifugó una vez más a 5,000 rpm por 5 min. Al terminar se desechó el sobrenadante y se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de la solución A y se resuspendió.

En caso de que el cultivo estuviera en placa, se raspó con un asa bacteriológica suficiente biomasa y se resuspendía en un tubo de microcentrífuga con 250  $\mu\text{L}$  de solución A. Una vez que se tenía esta resuspensión se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de solución B, se mezcló por inversión y se dejó reposar 2 min en hielo, para posteriormente adicionar 350  $\mu\text{L}$  de solución C. Se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo 5 min, una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugó 15 min a 10,000 rpm. Al terminar se recuperó el sobrenadante con pipeta teniendo mucho cuidado de no perturbar la pastilla y se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga, desde este punto, independientemente si se había empezado con cultivo líquido o sólido, se podían realizar dos metodologías distintas.

#### **5.6.2.1 Extracción fenol cloroformo**

Al sobrenadante recuperado se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex un minuto para posteriormente centrifugarlo 3 min a 12,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, al terminar se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 10,000 rpm 10 s, se desechó el sobrenadante y se colocó el tubo abierto de manera invertida hasta que se evaporó todo el etanol residual y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular.

### **5.6.2.2 Extracción por columnas de silica (Qiagene)**

Una vez transferido el sobrenadante se adicionó 0.7 volúmenes de isopropanol, posteriormente se incubaba 15 min a -20 °C, posteriormente se transfirió a una columna de silica de Qiagene para DNA plasmidico, se centrifugó 7,000 rpm 1 min, se desechó la elución. A la columna se le hizo dos lavados con 500 µL del amortiguador de lavado (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 4 volúmenes de etanol absoluto) centrifugando 7,000 rpm 1 min, después de esto se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm 2 min para eliminar cualquier residuo de lavado. Finalmente, se eluyó con 50 µL de agua grado biología molecular.

### **5.7 Protocolos de PCR**

Para la estandarización de la temperatura de alineamiento de los iniciadores se utilizó la Taq polimerasa (Amplificasa) con los componentes recomendados por el manual. El ciclaje de la PCR se realizó con 3 min de desnaturalización inicial para DNA genómico o 5 min de desnaturalización inicial para DNA plasmídico a 95°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C 30 s, alineamiento a la Tm (5 réplicas en un intervalo de Tm +/- 5°C) 30 s, amplificación a 72° C 1 min/kb, para terminar con un ciclo de amplificación final a 72°C por 5 min. En el caso de las PCR's para obtener fragmentos de DNA involucrados en el armado del plásmido se utilizaron enzimas de alta fidelidad como Phusion (Thermo Fisher) y Q5 (NBL) siguiendo las indicaciones de mezcla y ciclaje recomendados por el proveedor.

### **5.8 Geles y desarrollo de electroforesis**

#### **5.8.1 Gel de TAE**

Por cada gel en 20 mL de amortiguador TAE se disolvió 0.2 g de agarosa grado biología molecular, se fundió y vertió en la cama de electroforesis con el peine de 8 o 15 pozos. Al solidificar se cargaron las muestras (1 µL de DNA, 2 µL de colorante de DNA y 7 µL de TAE) y se desarrolló el gel a 90 Volts por 40 min.

#### **5.8.2 Gel de LAB**

Por cada gel en 20 mL de amortiguador LAB se disolvió 0.2 g de agarosa grado biología molecular, se fundió y se vertió en la cama de electroforesis con el peine de 8 o 15 pozos. Al solidificar se cargarón las muestras (1 µL de DNA, 2 µL de

colorante de DNA y 7  $\mu$ L de TAE) y se desarrolló el gel a 210 Volts de 15 a 20 min, este gel separa bien bandas de DNA menores a 5000 pb.

### **5.9 Digestión de DNA**

La digestión de DNA se llevó a cabo con los protocolos del proveedor (Thermo Fisher) especificados para cada enzima, en este trabajo se realizaron digestiones con enzimas normales y Fast Digest,

Las enzimas utilizadas en el trabajo fueron Spel, SacI, XmaI, EcoRI, XhoI y EcoRV.

### **5.10 Ligación de DNA**

La ligación de DNA se realizó con T4 DNA Ligasa (Thermo Fisher), se ocuparon tanto el protocolo de fragmentos romos y fragmentos cohesivos.

### **5.11 Preparación de *E. coli* calcio-competentes**

Con un cultivo de *E. coli* de toda la noche se inoculó un matraz con medio LB, el volumen de inóculo era una centésima parte del volumen del medio, dicho cultivo nuevo se incubó a 37°C con agitación a 150 rpm hasta que el cultivo alcanzará una densidad óptica de entre 0.6 y 0.8 ( $\lambda=600$  nm). Una vez que se alcanzó esta densidad el cultivo se enfrió inmediatamente en hielo, posteriormente se prepararon tubos de microcentrífuga en hielo y se alicuotaron con 1.5 mL del cultivo frío. Estos se centrifugaron 1 min a 12,000 rpm y se descartaban los sobrenadantes, la pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ L de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y glicerol al 15%, se mezcló en vortex a por 10 segundos, se enfriaron inmediatamente en baño de hielo y se centrifugó 1 min a 12,000 rpm, para descartar el sobrenadante. Este lavado con CaCl<sub>2</sub> + glicerol se repitió y la pastilla residual se resuspendió en 33  $\mu$ L de la solución fría de CaCl<sub>2</sub> + glicerol. Finalmente se congelaron en un ultracongelador a -70°C hasta su uso.

### **5.12 Transformación de *E. coli* calcio-competente (Choque térmico)**

Para cada transformación se descongeló una alícuota de células competentes en hielo, una vez descongeladas se agregó 1  $\mu$ L de DNA y se dejó en hielo reposando por 5 min, al terminar este tiempo se colocó en termoblock o baño María a 43°C por un minuto o minuto y medio, después se colocó nuevamente en hielo durante 5 min. Posteriormente se agregó 1 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C por 1 hora,

para finalmente plaquear en una placa con medio LB con el antibiotico adecuado (1 mg/mL). Estas placas se dejaron toda la noche a 37°C.

### 5.13 Selección de las transformantes positivas de *E. coli* por $\alpha$ complementación con agar MacConkey

Se seleccionaron colonias individuales de la transformación de *E. coli* calcio-competentes y se plaqueó con estría masiva en medio MacConkey con 1 mg/mL de antibiótico. Previamente las placas se dividían en 8 partes de manera radial, las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias positivas crecen con un color amarillo, mientras que las negativas en un color fucsia rojizo.

### 5.14 Plásmidos e iniciadores requeridos en el proceso

Para la obtención del sistema optimizado de Cas9 y el gRNA a utilizar en *C. lusitaniae*, se requirió el plásmido pV1093 (Vyas *et al*, 2015).

Como plásmido de sitio de clonación múltiple se utilizó a pBlueScriptII (pBSII) y a pDrive junto con los iniciadores M13 (Tabla 2) que reconocen y amplifican el sitio de clonación de éstos.

Tabla 2. Nombre y secuencia de los iniciadores M13 utilizados en el presente trabajo

Iniciador	Secuencia
pUC/M13 Forward	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Búsqueda de información bioinformática

Con la finalidad de identificar un sitio específico (blanco) para la edición que realizaría el sistema CRISPR se comenzó buscando la secuencia del gen *XYL1* y la secuencia de aminoácidos de xilosa reductasa (XR) de *Clavispora lusitaniae*. Lo anterior con el fin de corroborar que la secuencia de nucleótidos que se encontrara fuera el templado fiel para la traducción a la proteína y evitar errores por la presencia de intrones o exones. En esta búsqueda se encontró la secuencia del mRNA de la XR de *C. lusitaniae* culture-collection CICC:1461 (GenBank: KJ701349.1), así mismo se encontró la secuencia putativa tri-funcional aldehído reductasa/xilosa reductasa/glucosa-1-deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>) de *C. lusitaniae* (UniProtKB - A0A068L6W4). Con esta información se procedió a corroborar que la secuencia de mRNA correspondiera con la secuencia de aminoácidos en Ugene. Una vez que se confirmó que esta secuencia de mRNA traducía fielmente la secuencia de aminoácidos de XR, se procedió a utilizar este mRNA en un BLAST en el genoma de *C. lusitaniae* CBS 6937 (Shothun sequence) y se encontró un 100% de identidad solamente en el scaffold09 lo que significa que el gen *XYL 1* se encuentra en este scaffold y dicho gen está fielmente representado por este mRNA. Para esto se utilizó la cepa *C. lusitaniae* CBS 6937 ya que fue aislada de cáscaras de cítricos (Durrens *et al.*, 2017). El ambiente donde fue aislada la cepa CBS 6937, que es relativamente similar a la cepa trabajada en el presente trabajo (CDBB-L-2031), hace más probable que la funcionalidad de sus genes sea similar. Posteriormente se buscaron las secuencias de aminoácidos de las XR de levaduras filogenéticamente cercanas a *C. lusitaniae* tomado en cuenta las que son empleadas en procesos biotecnológicos (laboratorio o industrial), como la producción de etanol o producción de enzimas (Tabla 3). Estas secuencias se alinearon con la secuencia de *C. lusitaniae* en UGENE utilizando clustalW. En la información consultada a través de UniProt de la XR de *S. stipitis*, *K. lactis*, *C. tenuis* y *C. tropicalis*, se mencionan 3

motifs de unión al cofactor NADPH (de 2, 9 y 11 aminoácidos) (Fig. 9) por lo que el análisis del alineamiento se enfocó en estas 3 regiones del gen (Figs. 10, 11, 12).

Tabla 3. Fuentes de xilasas reductasas usadas para el alineamiento.

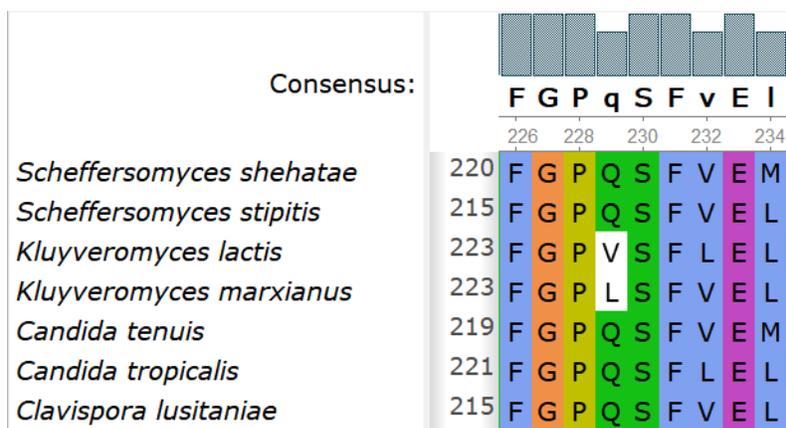
Levadura	Clave UniProt
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	Q9P430
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	P31867
<i>Kluyveromyces lactis</i>	P49378
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	W0T4K1
<i>Candida tenuis</i>	O74237
<i>Candida tropicalis</i>	O13283



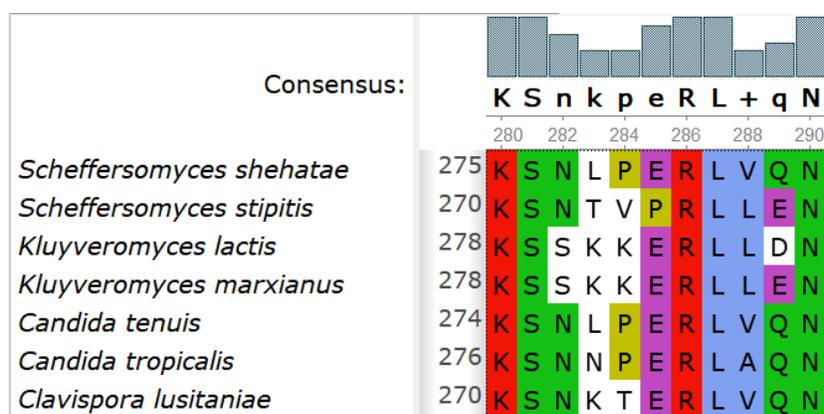
**Figura 9** Mapa general del gen *XR* de *S. stipitis* donde se observan los 3 motifs de interacción al NADP+ (óvalos rojos).

Consensus:		S	N
		175	
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	170	S	N
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	165	S	N
<i>Kluyveromyces lactis</i>	173	S	N
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	173	S	N
<i>Candida tenuis</i>	169	S	N
<i>Candida tropicalis</i>	171	S	N
<i>Clavispora lusitaniae</i>	165	S	N

**Figura 10** Motif 1 de unión al NAD(P)+.



**Figura 11** Motif 2 de unión al NAD(P)+.

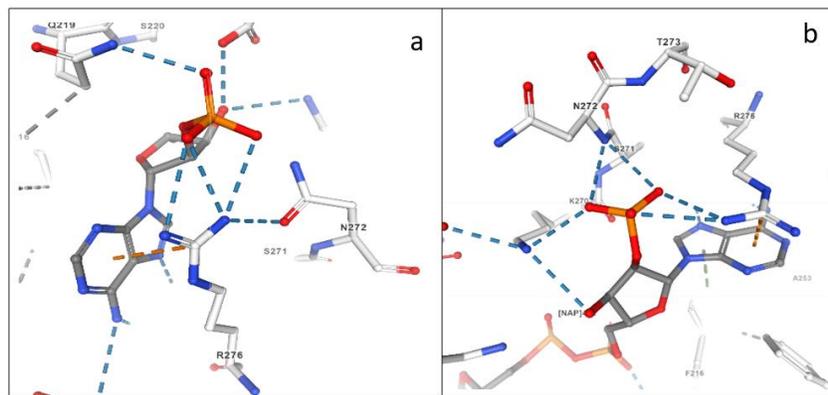


**Figura 12** Motif 3 de unión al NAD(P)+.

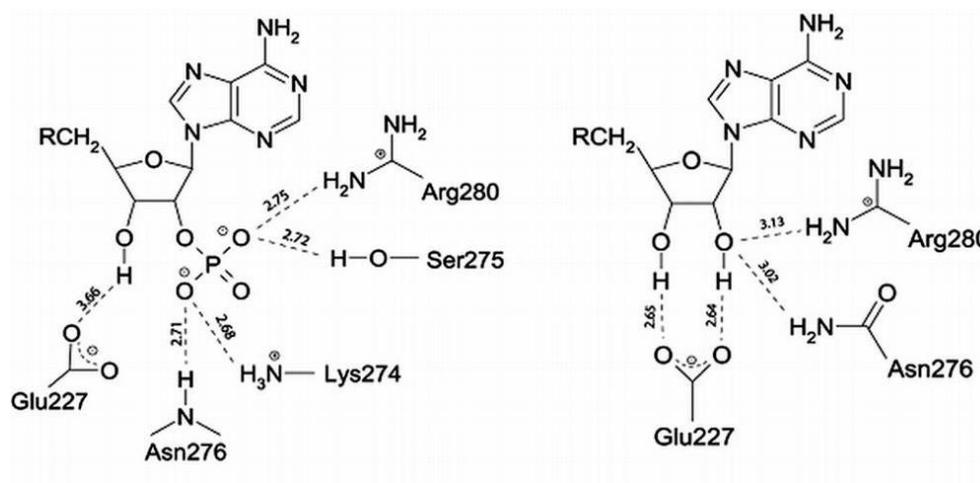
Con los alineamientos anteriores, se observa que el motif 1 es 100% conservado en todas las secuencias analizadas (Fig. 10) mientras en el motif 2 existen variaciones mínimas, aunque la naturaleza química de los aminoácidos es similar exceptuando en el género *Kluyveromyces*, (Fig. 11). Lo anterior se explica por ser un género alejado filogenéticamente del resto. Diezmann *et al.*,(2004) llevaron a cabo un trabajo filogenético utilizando varias levaduras, entre las que se encuentran las utilizadas en este alineamiento, analizando diversos genes. Los autores en su estudio observaron que estas levaduras divergen en 3 ramas distintas, siendo las *Candidas*, *Scheffersomyces* (antes *Picha* y *Candida*) y *Clavispora* los organismos que divergieron tempranamente en el árbol, mientras el género *Kluyveromyces* es el último en divergir por lo que su distancia genética es mayor con respecto al resto de las levaduras.

Por otro lado, en la búsqueda realizada, se observó que el motif 3 es el que más variación tiene entre las secuencias alineadas (Fig. 12).

Para observar cómo es la interacción que la XR tiene con el cofactor NADP+ se revisó la estructura 3D de la XR de *Scheffersomyces stipitis* (5Z6T) en PDB y se encontró que el motif 3 es el que interacciona con el grupo fosfato del NADP+ (Fig. 13). Este es el grupo sustituyente que diferencia el NADP+ del NAD+, por lo que la conformación en la secuencia del motif 3 es el principal (si no es que el único) responsable de que la XR utilice preferentemente un cofactor u otro. Esta información corresponde con lo reportado por Kavanagh *et al.*, (2003) quienes realizaron la cristalografía de XR de *Candida tenuis* interaccionando con sus cofactores y observaron que el sitio de unión es el mismo tanto para el fosfato del NADP+ como para el hidroxilo del NAD+. Con lo anterior lograron esta capacidad de unión a uno u otro sustituyente por un cambio en la conformación tridimensional de la estructura que forman los aminoácidos involucrados en esta interacción. (Fig. 14).



**Figura 13** Imagen cristalográfica que muestra la interacción del motif 3 de XR de *S. stipitis* (en blanco) con el NADP+ (negro y naranja), resalta la interacción con el grupo fosfato, donde se observan dos variantes de interacción (a y b) entre cada monómero del dímero del modelo 3D.



**Figura 14** Esquema de la interacción entre los aminoácidos codificados por el motif 3 de XR en *Candida tenuis* con el grupo fosfato de NADP+ (izquierda) o con el grupo OH de NAD+ (derecha) (Petschacher et al, 2004).

## 6.2 Diseño *in silico* del plásmido con el sistema CRISPR

De los organismos seleccionados para alinear su secuencia de XR con la de *C. lusitaniae*, se realizó la búsqueda de aquellos que son capaces de fermentar etanol a partir de xilosa. Se encontró que *S. stipitis* es aquel que tiene mejores rendimientos en la producción de etanol de manera nativa (Tabla 4) (Toivola. *et al*, 1984; Silva *et al*, 2011; Veras *et al*, 2017).

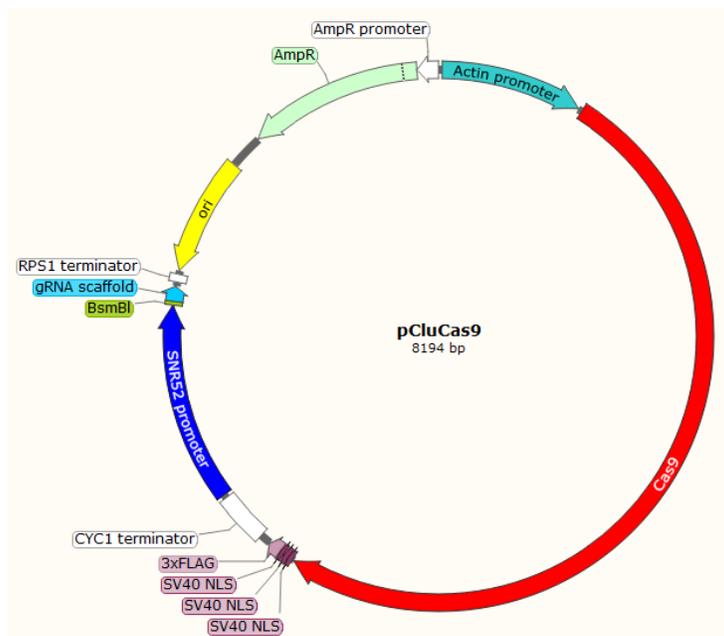
Tabla 4. Productividad de etanol y xilitol de algunas cepas de levaduras.

Especies de levaduras	Condiciones de oxígeno	Xilitol ( $g L^{-1}$ )	Etanol ( $g L^{-1}$ )	Rendimiento de xilitol [ $Y_{x/s}$ ( $g g^{-1}$ )]	Rendimiento de etanol [ $Y_{e/s}$ ( $g g^{-1}$ )]	Rendimiento de biomasa [ $Y_{b/s}$ ( $g g^{-1}$ )]	Consumo específico de xilosa [ $(g g_{cdw}^{-1} h^{-1})$ ]	Producción específica de etanol [ $(g g_{cdw}^{-1} h^{-1})$ ]
<i>S. stipitis</i>	Anaerobia	0.41 ± 0.06	8.05 ± 0.91	0.01 ± 0.00	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.30 ± 0.09	0.08 ± 0.03
<i>S. passalidarum</i>		0.04 ± 0.00	10.06 ± 0.48	0.00 ± 0.00	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.01
<i>S. arborariae</i>		0.27 ± 0.08	8.65 ± 1.16	0.01 ± 0.00	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.03 ± 0.01
<i>C. tenuis</i>		8.03 ± 1.48	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.06	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>S. stipitis</i>	Oxígeno limitado	0.37 ± 0.01	16.48 ± 0.83	0.01 ± 0.00	0.45 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.29 ± 0.09	0.10 ± 0.02
<i>S. passalidarum</i>		0.05 ± 0.02	16.36 ± 1.40	0.00 ± 0.01	0.44 ± 0.04	0.13 ± 0.04	0.22 ± 0.10	0.10 ± 0.05
<i>S. arborariae</i>		1.82 ± 0.66	11.47 ± 2.37	0.04 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01
<i>C. tenuis</i>		15.43 ± 1.90	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00

(Veras *et al*, 2017).

Con base en esta información se planteó cambiar el motif 3 de *C. lusitaniae* por el equivalente de *S. stipitis*, ya que basado en los estudios de Bruinenberg *et al.*, (1983), Kavanagh *et al.*, (2003) y Petschacher y Nidetzky (2005) *S. stipitis* no podría fermentar la xilosa de manera tan relativamente eficiente si no hubiera resuelto el desbalance de cofactores y esto se logra si su XR tiene mayor afinidad al NAD<sup>+</sup>. El sistema CRISPR/Cas9 permite realizar este cambio de secuencias por las características de esta mutación.

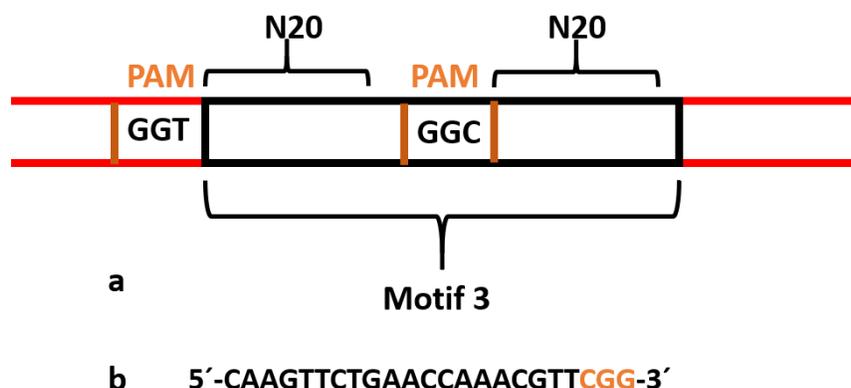
Para realizar el cambio de secuencia mencionado anteriormente se planteó la modificación del plásmido pV1093 (Vyas *et al* 2015), optimizándolo con las especificaciones de Norton y colaboradores (2017). Dicha optimización consiste en utilizar promotores de genes especie específica de *C. lusitaniae* para expresar la proteína y RNA que el plásmido contiene. Este diseño se realizó mediante el programa Snapgene (v3.2.1) para obtener el vector con el sistema CRISPR/Cas9 (Fig. 15).



**Figura 15** Plásmido del sistema CRISPR/Cas9 optimizado para *C. lusitaniae* (pCluCas9).

Como se observa en la figura 15 el plásmido contiene la Cas9 optimizada para el clado de las *Candidas*, así como el gRNA con una secuencia de restricción para insertar el crRNA deseado, también cuenta con un caset de replicación en bacterias y una resistencia a ampicilina para su mantenimiento en *E. coli*.

Una vez que se contaba con el diseño del mapa del plásmido, se procedió a buscar secuencias PAM (5'-NGG-3') adyacentes al "protoespaciador" a usar, necesarias para la selección del crRNA en el motif 3 de la XR de *C. lusitaniae*. Se encontraron 2 secuencias PAM en la cadena complementaria (TGG y CGG). La primera de éstas está adyacente al motif 3, mientras la segunda está dentro del motif 3. Se seleccionó la segunda PAM (CGG) para obtener el crRNA con el fin de evitar que la Cas9 realice un corte en el recombinante homólogo ya que éste no contiene dicha secuencia PAM. De esta forma se copió la secuencia de 20 bases río arriba de esta PAM, que corresponde, una vez expresado en nuestro plásmido, al crRNA de nuestro gRNA (Fig. 16).



**Figura 16** a: Esquema del motif 3 de *C. lusitaniae* y la localización de las secuencias PAM encontradas junto con las secuencias de 20 bases tentativas a usar como crRNA; b: Secuencia de 20 bases seleccionada como crRNA y su correspondiente PAM (Café), cabe resalta que la PAM no se debe agregar a la secuencia de crRNA.

Finalmente, para el diseño del recombinante homólogo de reparación para insertar el motif 3 de *S. stipitis* se utilizaron las especificaciones de Norton y colaboradores (2017) y se tomó el motif 3 de *C. lusitaniae* (CBS 6936 scaffold09) más 1000 bases río arriba y río abajo, obteniendo así una secuencia de una longitud total de 2033 bases. Una vez delimitada la región de homología de recombinación, la secuencia

del motif 3 de *C. lusitaniae* (33 bases) en esta region se cambi6 por la secuencia (motif 3) de *S. stipitis* (Fig. 17).

```
GGGGTTCGGGCTCATACTTTCTAATCCGTGTGGCCAATGATGTAAAGATACAGAGCAACGTCTCGT
TGCTGCAACCAGTAGGGTGTGTATATAGAGGCGCCGTGCCCTCCACATTTGCCGTTGAGGAAATATA
TAAGTGGAGTGACCGCCGAAAATTAGAGCTCAGTGTGATCAATTGACAAACAAAACCTACAATGGC
CACTATTAAGTTGAACTCAGGATACGAGATGCCTCAGGTTGGTTTCGGCTGCTGGAAAAGTCGACAA
CAAAACCTGTGCTGACCAAATCTACAATGCCATCAAAGTCGGTTACAGATTGTTTTGACGGCGCTGA
AGATTATGGTAACGAAAAAGAAGTGGGCGAAGGTATCAACAGAGCCATTGCTGATGGATTGGTTGC
TCGTGACGAGTTATTCGTTGTCTCGAAGCTCTGGAACAACTTCCATCACCCCTGACAATGTGGAAAA
AGCTTTGGACAAGACATTGAGCGACTTGAACCTCGAGTACCTTGACTTGTTTTTGATCCATTTCCC
AATTGCTTTCAAGTTTGTTCCTTTTCGAAGAAAAGTACCCTCCAGGATTCTACTGTGGAGACACCAA
CAAGTTCATTTACGAAGACGTTCCAATCATTGACACTTGGAGAGCTTTGGAAAAGTTGGTCGAAAA
GGGAAAGATTAGATCCATTGGTGTTCCAACTTCAATGGCTCCTTGCTTCTCGACTTGCTTAGAGC
TGCTAAGATCAAGCCTGCTGTTTTGCAAATCGAGCACCACCATACTTGCAACAACCACAGTTGAT
CAAATGGGTCAAGAGCAAAGGAATTGCTGTTACTGCGTACTCTTCGTTTGGTCCTCAATCATTTCGT
TGAGTTGAACCACCCTAAGGTGGTAGCTGCACCACGTTGTTTGAACACGAAGACATTGCTCCAT
CGCCAAAAGCATGGAAAGAGCCCTGGCCAAGTCTTGTTGAGATGGGCTACTCAGAACGGTCTTGC
TGTTATTCCAAGTCCAACACTGTCCCAAGATTGTTGGAAAACTTGAATGTCAACGATTTTGACCT
TTCTGCTCTGGACTTGAGTGCCATTGCTAAATTGGACATTGGTTTGCCTTTCAATGATCCATGGGA
CTGGGATGAAATCCCAATCTTCCACTAGGTACGTTTTAATGTATAGAAAATACAAAATTACCTTC
TATTAGTCATATTTCTTTTTTTTTCTAGATATTCGGGGTTCAAATCAGATCCAAAACGTTGTGACG
CCCCAAGTTCACAATTTTAACTAGACACAAAATCGTCTCTGTTGATATATGCACCACAAAGTCT
TCTTTTGCCTGTGAATTCGGTTCTGGAATGGAACATCTCCAATTGTGCAAGATCAAACATTGACC
CGGTTTCAATTGATAAAAAGATTTTCGTTTTTCAGGAGAGCTAATGATTTTATACCAGCTGCGAATAGC
TTTATAGAATTTAGGAACGTCCGTTGGATCGGCCAGCAGTCCATGCAAGAACGGTCAGTTTGGTT
CCATCTGACTGGATCAAATTGCCCTCCAAGTCAAGCTTGAAAACAGGTTGAGGAATATCAGGCTG
AATACAAAACCTTTTCTTACCTGCAGAATGGGCTGGAACCTGGAATTCTCGTAAGAAGTTCGTAGCT
CTCTGGATCAGTTTGCCTTCAATTGTTTCGGCGCATTGAAAGGCGTCAACCAAGGAGGTAGTGCCTCC
CGTCCCATCGTGATACAAAAGATGAAACAATTGTAAACCGGGAGTATCTGACCAATAAGTACCGTC
TGTATGGGCAGAGATGTCAAATTAGTATAGGCTGTGTCCTTTTTCCCAAATCCGAGGTGAAATC
CCAAAACCACCATAATGGGTTGGTCTGATGTACATAAGCTTCTCACATAACTTCTGTGTGTCTTC
AGGCGTCACAGGGACATTGTCAATGAGAGTGAAACCGTGTTCATATCTTCAAACACCCTCTTT
TATCGCAAGTTCAGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
```

**Figura 17** Secuencia del recombinante hom6logo, en amarillo se resalta la secuencia a cambiar de *S. stipitis*.

Paralelo a este hom6logo, se dise1o un hom6logo de reparaci6n para truncan el gen ADE5, con el cual, como ya se haba mencionado, se puede lograr que las levaduras se tornen de un color rojizo, esto con el fin de probar el sistema CRISPR a construir (Vyas *et al.*, 2015; Norton *et al.*, 2017).

### 6.3 Diseño de iniciadores y estandarización de las PCR's

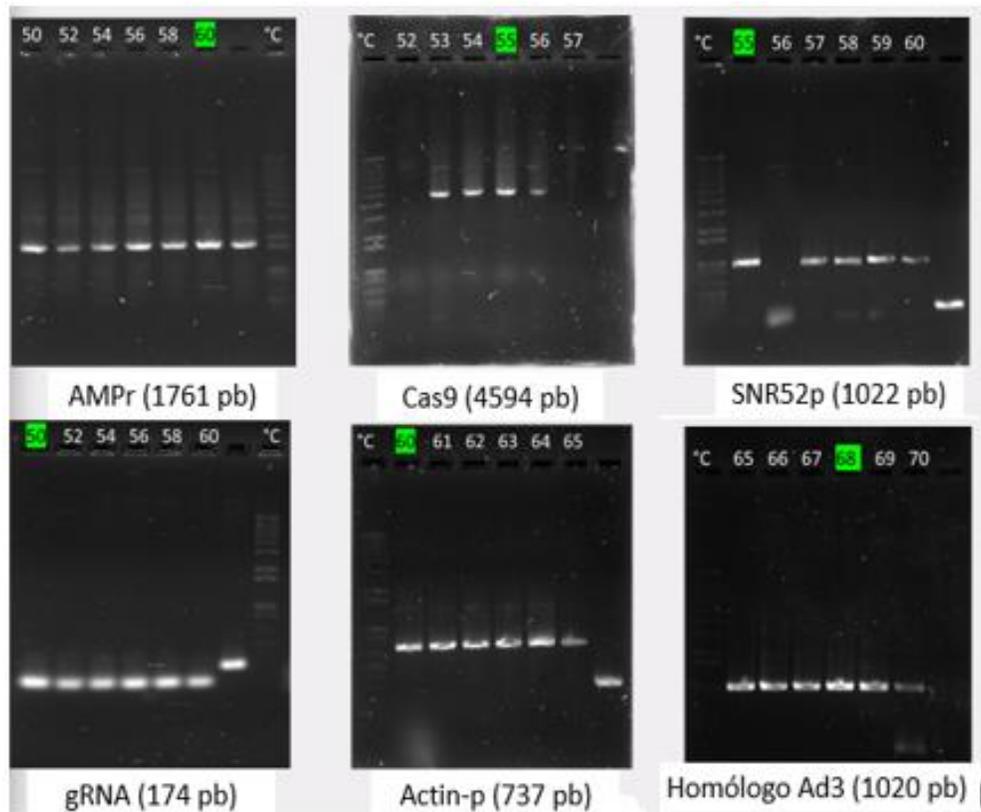
Para realizar la construcción del plásmido pCluCas9 y del homólogo de recombinación se optó por un armado con enzimas de restricción, de tal forma que se procedió a diseñar los iniciadores necesarios para amplificar los fragmentos de DNA que conforman ambas construcciones (Tabla 5). Sin embargo, para la unión del promotor SNR52 y el gRNA la estrategia principal fue por solapamiento de secuencias no obstante la secuencia contaba con un sitio EcoRI lo que permitió tener una estrategia alterna de unión.

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores para construir el sistema CRISPR

Casete/fragmento	Nombre de los iniciadores	Secuencia de los iniciadores	CG (%)	Tm (°C)
Actina promotor	Fw Actin Sec	ATTGACCCCGGGACCGGAACCGGAACCGTTGTCGATAACCAATGCAG CAACTTCTTCTAG	47	68.9
	Rv Actin Sec	TAATCAGAGCTCCTTGTACACAAAATGACACCGATTTCTTTTTCCGTC TTTCTGGTTTT	30	57.3
AMPr	Fw_AMPr_1093	GTTGCTACTAGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT	58	65.1
	Rv_AMPr_1093_AL	TACAAGGAGCTCTGATTACGCGGAACCCCTATTTGTTTAT	43	64.5
Cas9	Fw Cas9 Sec	TCCGGTCCC GGGTCAATCATGGATAAAAAGTATAGTATT	50	56.5
	Rv Cas9-Iso	CTGCTACTCGAGTAGCAGGCAAATTAAGCCTTCGAGCGT	63	73.3
SNR52 promotor	Fw SNR52	CTGCTACTCGAGTAGCAGGCATCAAGCTGGTCTCATTGAT	50	55.5
	Rv SNR52	ACGAGACGGAATTCCGTCTCGTTGTTCCCGAAGGAATCG	55	56.7
BsmBI+RNAscaff	Fw sgRNA	ACGAGACGGAATTCCGTCTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	45	45.7
	Rv sgRNA	AACGCCACTAGTAGCAACAAAATAATTCTTCTCTCAGT	37.5	47.3
ADE 5'	Fw_ADE5_Sec	ACATCCATAGTCACATAAAGGGGACAGAGAAAGAAAGGTA	35	63
	Rv_ADE5_Sec	GTTGACTAGAATTCTTATCAAGCTGCTTCAACAAGCATACGGCCCAAC TGACCACCGCCT	35	72
ADE 3'	Fw_ADE3_Sec	CAGCTTGATAAGAATTCTAGTCAACGTTAAAACCATCATTTTAGACCAG CCCAATTCTCC	35	63.4
	Rv_ADE3_Sec	ATTTTTCTCTTTGGTTTGCTTTCTTTCCGTACAAGTACA	45	62.3
crRNA_ADE2.1	Fw_crRNA_Sec	ACAACGTGCTTGTGAAGCAGCTCAGC		
	Rv_crRNA_Sec	AAAACGTGAGCTGCTTCAACAAGCAG		

De los iniciadores mencionados se estandarizaron las  $T_m$  de 6 pares (Tabla 6) (Fig. 11). La estandarización se llevó a cabo desarrollando PCR's en gradientes de temperatura con base en la  $T_m$  y revelando el producto de éstas en geles electroforéticos de agarosa.

En los geles de agarosa (Fig. 18) se puede observar qué se obtuvieron las bandas correspondientes a los tamaños esperados de los amplicones en casi todo el espectro de temperaturas evaluadas. Así mismo las mejores temperaturas de alineamiento se determinaron por la intensidad de la banda amplificada vista en cada gel y se resumen en la tabla 6.



**Figura 18** Geles de la estandarización de la temperatura de alineamiento, resalta en verde la temperatura de alineamiento óptima para cada PCR.

Tabla 6. Temperatura de alineamiento óptima basada en la Tm para la amplificación de 8 fragmentos de DNA con Taq amplificasa (marca BioTecnol).

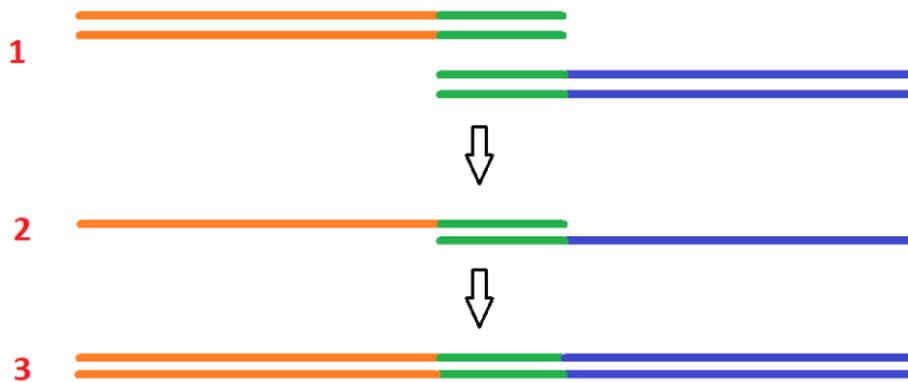
Fragmento amplificado	Temperatura de alineamiento óptima (°C)
Homólogo 3' ADE	70
Promotor SNR52	55
Resistencia ampicilina (AmpR)	60
gRNA	50
Cas9	55
Promotor Actina	60

La temperatura de alineamiento al homólogo ADE5 no se logró estandarizar, se intentaron varias estrategias para conseguir esta PCR como el probar un alto intervalo de temperaturas de alineamiento, uso de DMSO, “touchdown” PCR. Por lo anterior se rediseñó el iniciador forward seleccionando una secuencia a dela primera 7 pb río abajo (5'-TTATACAATATCCTTCAATTAAGTTTCAGTAAACTGGGGG-3') pero con este nuevo oligo tampoco se logró obtener un amplicón. El problema para lograr dicha amplificación puede residir en la Tm de cada iniciador, ya que para el iniciador reverso es de 78°C mientras que la del primer y segundo iniciador forward fue de 71 y 68 °C respectivamente, esta diferencia de Tm's impide un alineamiento simultaneo de los oligos utilizados en la PCR. Sin embargo no se cambió el iniciador reverso (60 bases) ya que éste es un iniciador químérico encargado de editar la secuencia que truncaría el gen, lo que significa que solo parte de su secuencia (30 bases) son responsables de hibridar para realizar la amplificación, mientras las otras 30 bases son las que llevan la secuencia con un codón de paro. Este diseño igual serviría para eventualmente unir este amplicón con el amplicón ADE3 formando asi el fragmento de reparación por recombinación homóloga. Por esta razón el cambiar este iniciador implicaría mover la región donde hibridaría cambiando la secuencia de reparación homóloga lo que la llevaría a ya no ser un brazo homólogo útil para insertar una mutación puntual en el sitio específico para el que fue diseñado.

Aunque no se probaron más soluciones posibles, dada la finalidad de este proyecto, se plantea que con una PCR asimétrica se podría obtener algún resultado positivo. En dicha metodología se colocan cantidades diferentes de un iniciador con respecto al otro (entre 30:1 y 20:1) y con esto utilizando la  $T_m$  del iniciador predominante, el resultado sería ssDNA que podría ser utilizado como templado para una PCR overlapping generando el fragmento de recombinación homóloga (Citartan *et al.*, 2012; Heiat *et al.*, 2017). Exceptuando este último fragmento (y el ADE3), las demás PCR's fueron escaladas con enzimas de alta fidelidad, con lo que se alcanzó el volumen de 100  $\mu$ L de cada PCR.

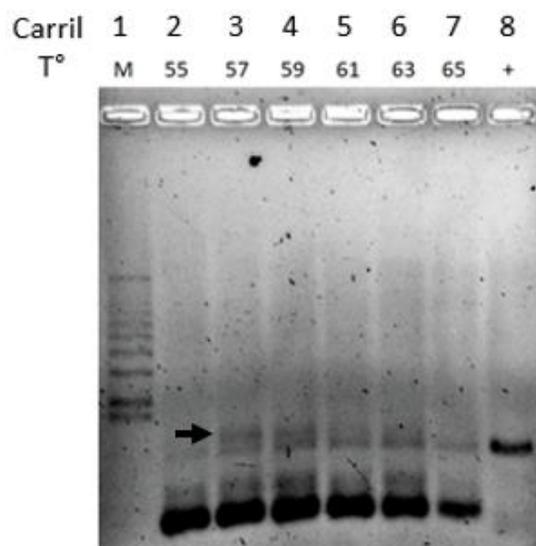
#### **6.4 Unión del promotor SNR52 con el gRNA mediante PCR “overlapping”**

La PCR “overlapping” o PCR de solapamiento consiste en el solapamiento, que puede ser de entre 20 y 40 pb, entre los extremos de dos fragmentos distintos (Shevchuk *et al.*, 2004). Dicho solapamiento se diseñó previamente en uno de los iniciadores de cada uno de los fragmentos a unir, con lo que se generan iniciadores quiméricos. El método consiste de la realización de una PCR con los dos fragmentos y sin ningún iniciador, cada fragmento se solapa entre sí y así mismo funge como iniciador para la extensión de cadena. El resultado es la unión de dichos fragmentos, una vez terminada esta primer PCR (PCR de solape de secuencias) (Fig. 19) se procede a una segunda PCR (PCR de extensión), donde se usa como templado el producto de la primera PCR y se utilizan los iniciadores de los extremos del nuevo fragmento formado, de esta forma se obtiene un amplicón del nuevo fragmento.



**Figura 19** Esquema de la PCR overlapping, específicamente de la PCR de solape de secuencias (1) primero se tienen los fragmentos de DNA con extremos solapados/complementarios (verde) posteriormente (2) se procede a realizar un PCR donde dichos fragmentos se desnaturalizan y se alinean entre sí (3) finalmente cada fragmento funge como iniciador del otro y la DNA polimerasa termina el trabajo sintetizando las cadenas complementarias.

De tal forma se realizó una PCR de solape de secuencias utilizando Taq amplificasa con gradiente de temperatura de alineamiento de 55 a 65 °C, con un  $\Delta$  de 2°C y una relación entre el fragmento largo y corto de 1:2 (50 ng de SNR53 y 100 ng de gRNA). Posteriormente se realizó la PCR de extensión a la temperatura de alineamiento de 55°C ya que se observó que ambos amplicones se podían obtener por separado a esta temperatura como se observa en la figura. 18. Con este overlapping se obtuvieron resultados positivos (Fig. 20) ya que se observa la unión aparente del fragmento deseado de 1196 pb a 57, 59 y 61°C de temperatura de alineamiento (carril 3, 4 y 5) . Sin embargo, este fragmento se obtuvo en baja cantidad (flecha azul) y se distingue claramente que se desarrolla en el gel por encima del SNR52, fragmento que se corrió en el carril 8 como testigo positivo.



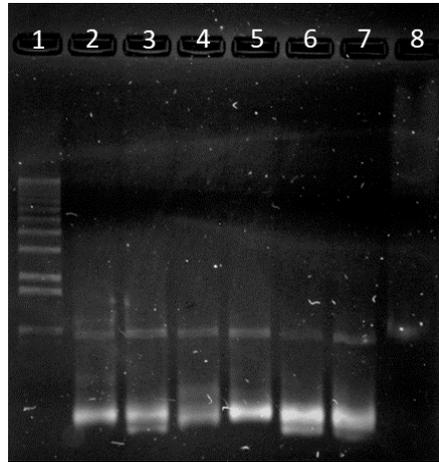
**Figura 20** Amplificación por PCR overlapping, desarrollados en el gel según el gradiente de temperatura utilizado en la PCR de extensión. La flecha azul señala la banda del tamaño esperado al unir los fragmentos del gRNA con el SNR52.

Resalta el alto grado de amplificación de los fragmentos sin unirse, principalmente el gRNA que se observa en gran cantidad en todos los carriles. Por lo que se procedió a realizar diversas variantes del overlapping cambiando la relación de ambos fragmentos y las enzimas utilizadas para este proceso, sin embargo, no se tuvo éxito (Tabla 7; Fig. 21).

Tabla 7. Pruebas de PCR overlapping

# de carril	2	3	4	5	6	7
Razón	1:2	2:1	2:1	Equimolar	1:2	2:1
SNR52:gRNA	100ng:200ng	100ng:50ng	100ng:50ng	100ng:18ng	100ng:200ng	100ng:50ng
Polimerasa en PCR overlapping	Amplificasa	Phusion	Amplificasa	Amplificasa	Amplificasa	Phusion
Polimerasa en de PCR extensión	Amplificasa	Phusion	Amplificasa	Amplificasa	Phusion	Amplificasa
Amplicón	Si	No	No	No	No	No
Observación	Bajo rendimiento	ND	ND	ND	ND	ND

ND=No detectado



**Figura 21** Amplificación de fragmentos por overlapping. Del carril 2 al 7 corresponde con el orden de la Tabla 5, el carril ocho muestra el SNR52.

Como se había mencionado anteriormente, en las figuras 20 y 21 se observa que la banda correspondiente al gRNA es más intensa que las demás bandas presentes, por lo que se concluye que este pequeño fragmento acapara los iniciadores limitando la extensión de los demás fragmentos. Lo anterior puede explicarse debido a la naturaleza exponencial de la PCR y la corta longitud del gRNA que permite que por cada ciclo de amplificación para el fragmento más grande (~1200 pb), el gRNA (174pb) se amplifique 4 veces. Dicha conjetura o incluso pruebas de ésta, no se encontraron reportadas en las referencias consultadas, sin embargo, la tendencia de una PCR a amplificar un producto por encima de otros ya se ha observado antes en la PCR multiplex. Para dicho problema se han desarrollado una serie de explicaciones, que algunas han sido probadas y muchas otras no. Por ejemplo eventos estocásticos en los ciclos iniciales; afinidad diferente de los iniciadores a los DNA blancos; energía de alineamiento diferente entre el iniciador forward y reverse; el efecto del número de ciclos de amplificación sobre la afinidad por uno u otro templado; efectos del realineamiento de los iniciadores que progresivamente inhiben la formación del híbrido iniciador-templado conforme avanzan los ciclos de PCR; o inclusive combinaciones de estos factores donde se ha demostrado que la importancia de éstos para determinar sí un producto se sobreexpresa con respecto a otro cambia conforme avanza la PCR (Suzuki y Giovannoni, 1996; Polz y

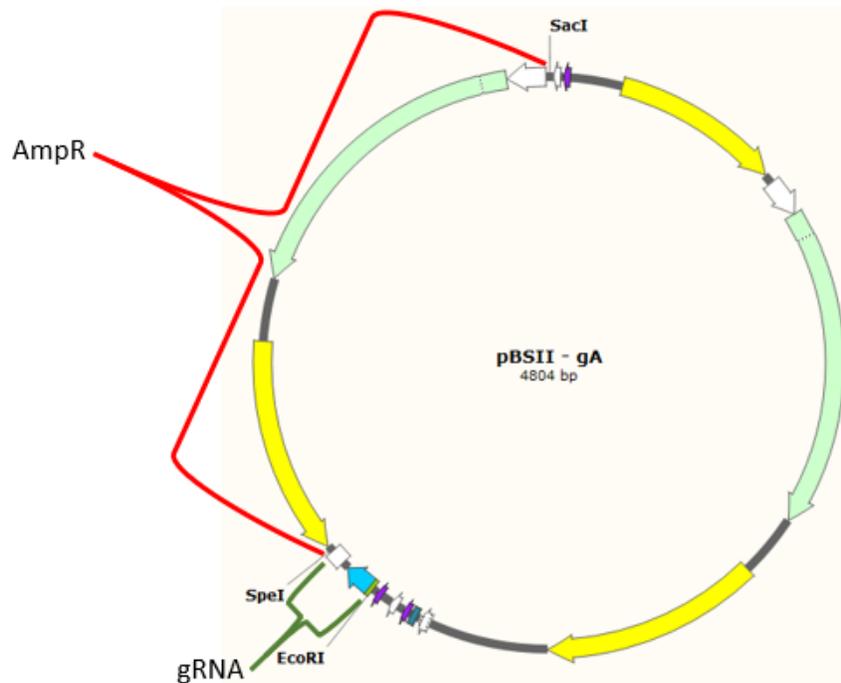
Cavanaugh, 1998). Inclusive para PCR's multiplex específicas, no se ha podido determinar la razón de esta sobreexpresión de un fragmento con respecto a los demás (Farrelly *et al.*, 1995).

Sin embargo, Sint *et al.*, (2012) sugieren que una forma de balancear los productos de una PCR es optimizando la cantidad de cada par de iniciadores utilizados en este tipo de PCR's. Los autores en su investigación hacen la observación que la causa de la sobreexpresión de un fragmento, en la mayoría de las veces está relacionada con la cantidad de iniciadores en la reacción. No obstante, en nuestro trabajo no existe más que un par de iniciadores, si cabe la posibilidad de que disminuyendo la cantidad del iniciador que se une al gRNA y manteniendo o aumentando la cantidad de iniciador que se une al SNR52, se disminuya la cantidad gRNA que se produce ya que se limitaría su amplificación con respecto al fragmento SNR52-gRNA. Dicha posible solución es bastante similar a la propuesta para el fragmento de ADE5 (Citartan *et al.*,2012; Heiat *et al.*, 2017), con la diferencia de que en el caso del gRNA-SNR52 se busca obtener un fragmento de doble cadena de DNA (dsDNA) por lo que la diferencia de la relación entre los iniciadores no sería de 30:1 o 20:1 (como con la propuesta con el ADE5) ya que éstas proporciones favorece la amplificación de ssDNA. La proporción debe ser de menor magnitud (de 10:1 o 5:1) donde ésta permitiría, teóricamente, la amplificación de dsDNA.

Con base en lo anterior fue que se optó, por una variación de la estrategia de unión de fragmentos. Primero se planeó unir el gRNA con el AmpR, para así obtener un fragmento de gRNA-AmpR de 1917 pb, para posteriormente intentar el overlapping con el promotor SNR52 de 1022 pb. Esta metodología, en principio, evitaría que pasara un acaparamiento de iniciadores ya que entre los fragmentos no habría una diferencia tan grande como entre el gRNA solo y el SNR52. Además de que las estrategias de overlapping se realizarían con fragmentos de tamaño similar (Shevchuk *et al.*, 2004).

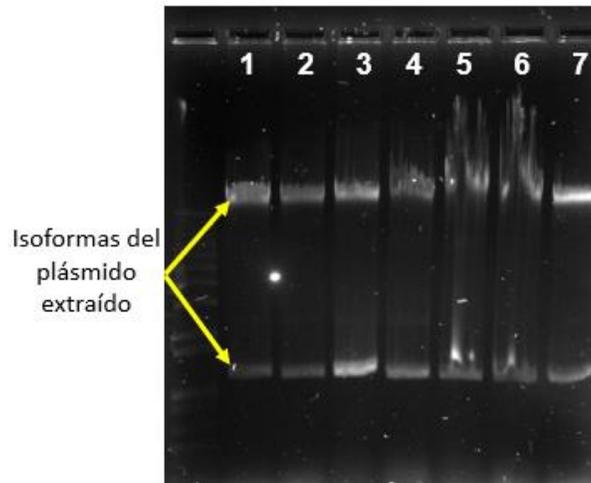
## 6.5 Unión del gRNA con el AmpR mediante enzimas de restricción

En este cambio de estrategia se buscó unir el gRNA con el AmpR dentro de un plásmido pBSII (Fig. 22).

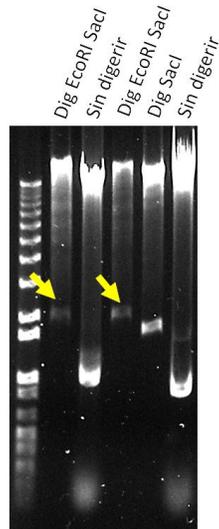


**Figura 22** Mapa in silico del plásmido pBSII-gA.

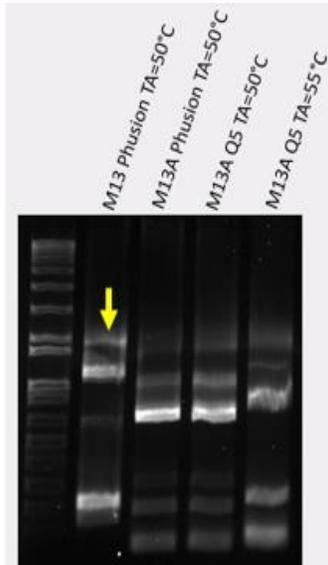
El plásmido presuntamente obtenido anteriormente se denominó pBSII-gA y con éste se transformó a *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se extrajo el plásmido de 7 colonias positivas (Fig. 23). Cabe mencionar que los carriles donde se observa barrido el gel, se deben a la alta cantidad de DNA obtenido. De estas 7 extracciones, solo a 2 se les procedió a realizar un análisis de restricción con EcoRI y SacI para liberar el fragmento de interés, el cual se observó en el tamaño esperado (~2000pb) (Fig. 24).



**Figura 23** Extracción del plásmido pBSII-gA.

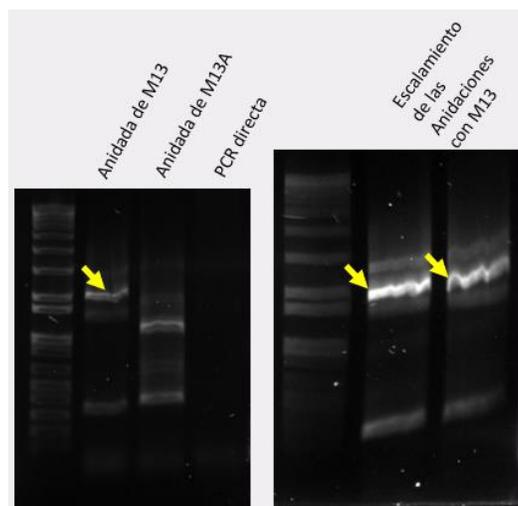


**Figura 24** Análisis de restricción de pBSII-gA, Las flechas amarillas señalan la banda. Con base en estos resultados se procedió a amplificar el fragmento gRNA-AmpR (gA) con los iniciadores M13 y probando dos enzimas diferentes de alta fidelidad (Phusion de Thermo Scientific y Q5 de NEB) a 50 y 55°C de alineamiento de iniciadores. Al realizar el gel se observaron múltiples bandas que amplificaron por PCR, entre ellas la del tamaño esperado (Fig. 25).



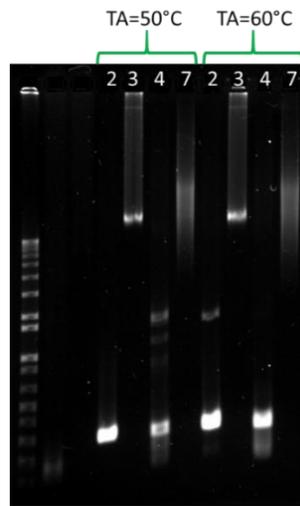
**Figura 25** Gel de electroforesis de la PCR con diferentes condiciones y oligos M13. En amarillo se señala la banda esperada en el carril 2 (Enzima Phusion, TA=50°C), donde se observa mejor definida esta banda.

El amplicón obtenido se utilizó para realizar una PCR anidada, utilizando los iniciadores específicos diseñados (el Forward del gRNA y el Reverse del AmpR) (Tabla 5) con lo cual se logró obtener un mejor resultado ya que se favorecía la amplificación de la banda de 2000 pb por encima del resto que se obtuvo en la primer PCR (Fig. 26).



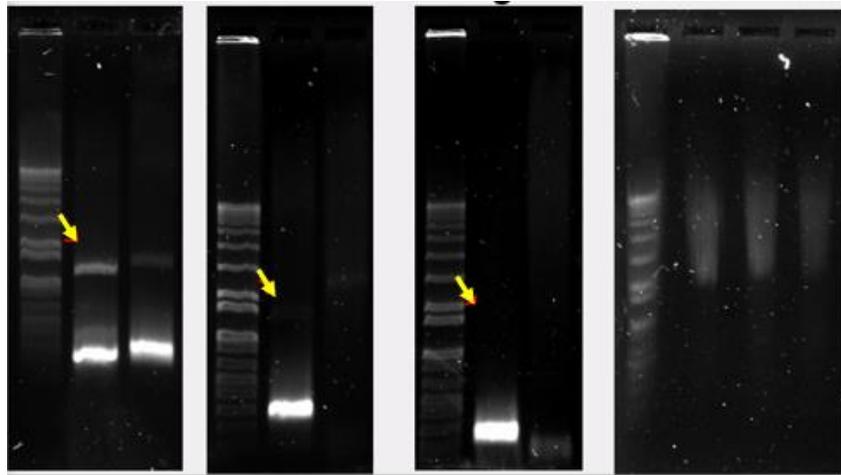
**Figura 26** PCR anidada con los iniciadores específicos partiendo del producto de la PCR con iniciadores M13 y escalamiento de la misma.

Dado que se obtenían otras bandas además de la de interés de 2000 pb se pensó que esto se debía a ligaciones inespecíficas y se procedió a recuperar la banda de gRNA-AmpR amplificado con la PCR anidada, para posteriormente ligarlo en un plásmido pBSII cortado con EcoRV (ligación de extremos romos). Una vez realizada la ligación, transformación y recuperación del plásmido, denominado pBSII-gA2, procedente de 4 colonias distintas, se continuó a realizar PCRs con iniciadores M13 a una TA de 50 y 60°C (Fig. 27).



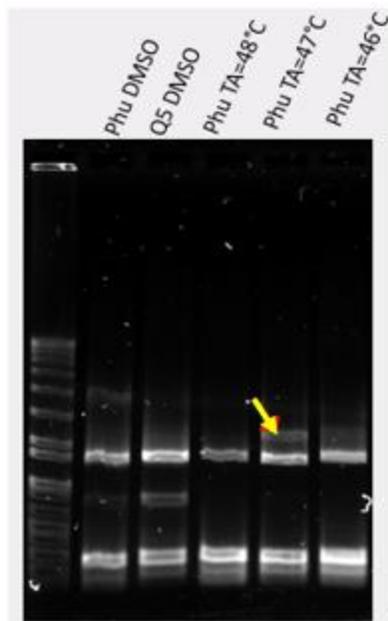
**Figura 27** PCRs con oligos M13 del plásmido pBSII-gA2.

En la figura 27 se observa que el plásmido pBSII-gA2 4 a 50°C y el plásmido pBSII-gA2 2 a 60°C amplificaron un fragmento de la longitud esperada. Sin embargo, se seguían amplificando fragmentos inespecíficos, preferentemente uno de 340 pb (50°C colonia 4, 60°C colonia 2), mismo que se había observado en amplificaciones del plásmido pBSII-gA. Este resultado lleva a descartar la hipótesis de las ligaciones inespecíficas ya que en esta nueva ligación no existían fragmentos más pequeños de 1950 pb. Por lo anterior se regresó a trabajar con el plásmido pBSII-gA para obtener más fragmentos, pero la PCR con iniciadores M13 dejó de mostrar la banda de interés y amplificaba solo las demás bandas o se degradaba el material (Fig. 28).



**Figura 28** Geles de diversos intentos de obtener el fragmento gRNA-AmpR con oligos M13 sin éxito (Flechas rojas).

Ya que con los resultados anteriores se observó dimerización de oligos, se decidió utilizar DMSO en la siguiente PCR y probar un gradiente de temperaturas por debajo de 50°C, la cual es  $T_m$  mínima recomendada para los oligos M13. Con este gradiente, se logró obtener la banda de ~2000 pb a una  $TA=47^\circ\text{C}$ , por lo que se concluye que lo más probable es que la primera vez el pozo del termociclador donde se logró amplificar a 50°C no calentaba bien a la temperatura que se había programado (Fig. 29).

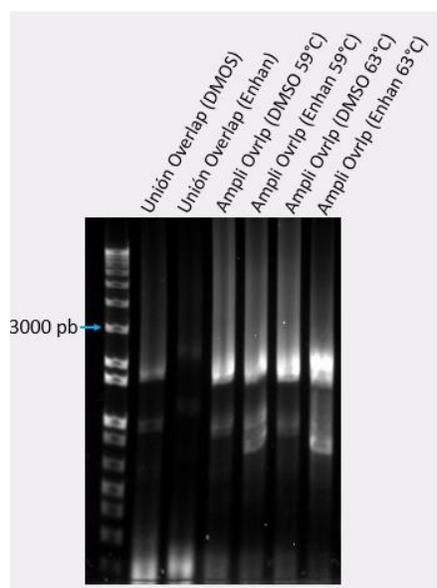


**Figura 29** Amplificación del fragmento gRNA-AmpR con oligos M13.

Posteriormente mediante una PCR anidada fue posible obtener preferentemente el fragmento de 2000 pb una vez más.

## 6.6 Unión del gRNA-AmpR con el SNR52 mediante PCR overlapping

Con este amplicón se procedió de nuevo con el overlapping con el promotor SNR52 utilizando las polimerasas Phusion y Q5 con DMSO y enhancer respectivamente, para el paso de unión (extensión TA= 55°C). Mientras en el paso de amplificación (Duplicados: TA= 59°C y 63°C) se omitieron estos aditivos (Fig. 30).



**Figura 30** Gel de electroforesis de la PCR overlapping para el fragmento SNR52-gRNA-AmpR (SgA).

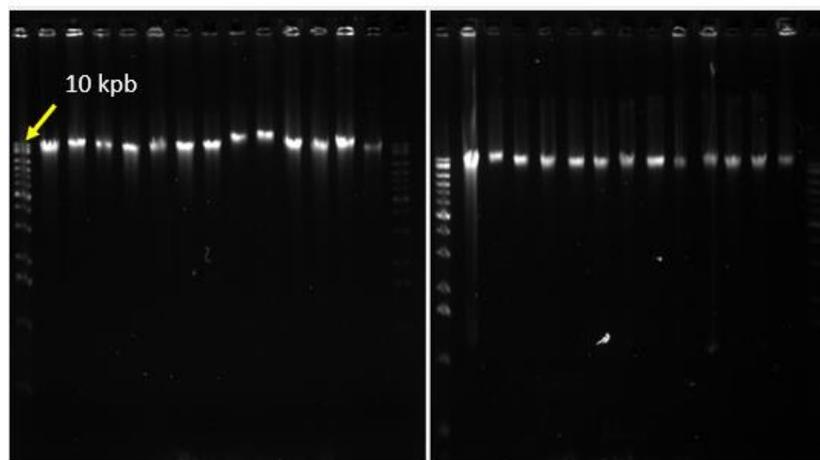
A diferencia del último intento ya no se observó una amplificación tan intensa por parte del fragmento más pequeño, y aunque esta vez el fragmento gRNA-AmpR fue más intenso, no se compara con la saturación del gRNA del overlapping observado anteriormente. Por otro lado, la ausencia del amplicón de 3000 pb pero la amplificación de los fragmentos por separado, indican que la unión falló en la PCR

de solape de secuencias por lo que lo más probable es que con un cambio de temperatura en esta PCR se lograría obtener el fragmento deseado.

Se requirió obtener más fragmento de gRNA-AmpR ya que con los que se contaba eran insuficientes. Desafortunadamente la anidación de la PCR de los oligos M13 mostraba degradación del material (Fig. 44 en anexos). Se había planteado la repetición de más experimentos de overlapping pero desafortunadamente como la PCR para obtener más gRNA-AmpR a partir del pBSII-gA no se logró obtener, se decidió un cambio de estrategia.

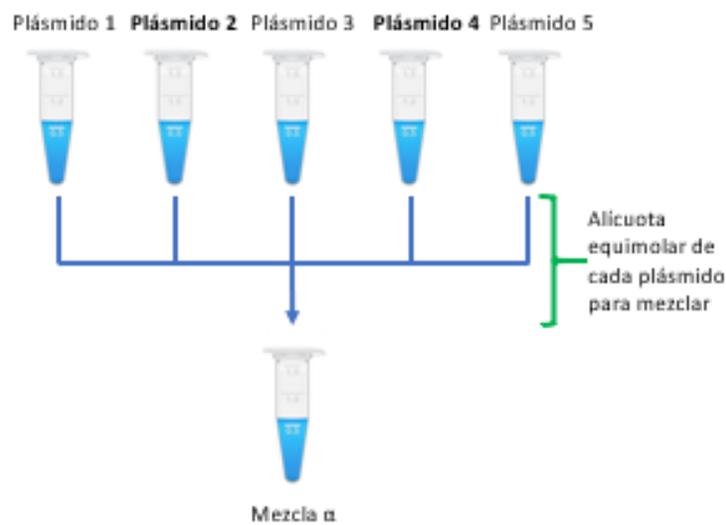
### 6.7 Unión del gRNA, AmpR y SNR52 por sitios de restricción

Considerando que aún se contaba con fragmentos de gRNA, AmpR y SNR52 digeridos en los extremos con XhoI y EcoRI; EcoRI y SpeI; SpeI y SacI, respectivamente), la estrategia fue ligarlos junto con un plásmido pBSII y de esta forma obtener el fragmento SNR52-gRNA-AmpR (SgA), para posteriormente transformar y recuperar el plásmido. En este caso se recuperaron 26 colonias a las cuales se les realizó a cada una extracción de plásmido con fenol cloroformo y se desarrolló un par de geles de agarosa para observar la calidad de dichas extracciones (Fig. 31).



**Figura 31** Geles de las extracciones de 26 plásmidos pBSII-SgA, se infiere que las bandas intensas a 10 Kpbs son el plásmido esperado.

Para asegurarse de la presencia del plásmido de manera rápida, se realizaron 5 mezclas distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), conformadas cada una por 5 extracciones de distintas clonas, esto con la finalidad de realizar un “escaneo” de todos los plásmidos con el mínimo de pruebas posibles (Fig. 32). A dichas 5 mezclas se les realizó una digestión doble con *SacI* y *XhoI* para observar el fragmento SgA que se habría insertado en el plásmido, pero no se observó la banda esperada de dicho fragmento en ninguna de las mezclas (Fig. 45: anexos).



**Figura 32** Diagrama de la metodología de mezclado de 5 extracciones diferentes.

Se intentaron realizar PCRs de colonia con los oligos M13 para observar el fragmento insertado, pero estas tampoco tuvieron éxito alguno para observar el fragmento SgA (Fig. 46 anexos).

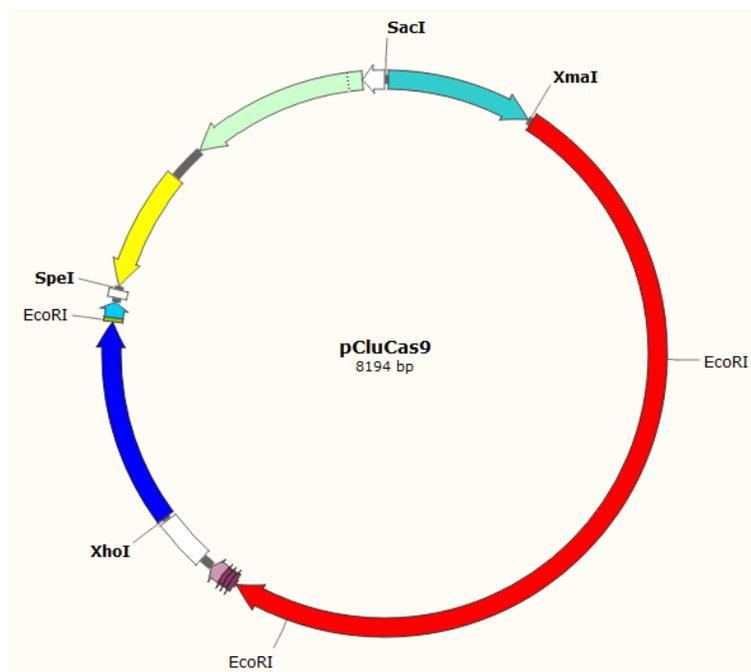
El tamaño aparente de bandas en la extracción de plásmido (10,000 pbs) y la aparente nula respuesta del DNA al corte con enzimas de restricción, llevan a concluir que lo que se logró extraer era DNA genómico de la bacteria y nunca el plásmido. Se procedió a analizar la extracción usada hasta el momento que era la de fenol-cloroformo, una revisión de los reactivos mostró que el fenol ya estaba en proceso de oxidación y esto pudo afectar la calidad de la extracción o incluso llegar a degradar el DNA plasmídico (Altshuler, 2006). El DNA genómico permanecía ya

que al ser más largas sus cadena, la degradación no sería total y éste se seguiría viendo en el gel de manera aparentemente normal. Esta hipótesis es respaldada parcialmente por el estudios de Harris y colaboradores (1994) en donde se demostró que el uso de fenol-cloroformo es seguro para mantener un estado del DNA no oxidado a menos que no se utilice fresco, en cuyo caso los niveles de 8-oxo-desoxiguanosina (un indicador de daño por oxidación del DNA) aumentan significativamente. Por otro lado Finnegan y colaboradores (1996) probaron que al usar fenol cloroformo en la extracción de DNA existe una sensibilización a la oxidación de éste, también observaron que si el organismo *a priori* fue estresado, el fenol-cloroformo aumentó el daño por oxidación comparado con otro método de extracción menos agresivo. Así mismo, el fenol oxidado actúa en la PCR ya que un producto de la oxidación del cloroformo es el fosgeno el cual es tóxico y puede interacciona con varias biomoléculas, tal como el DNA (Hardie, 1964). Dicha interacción se piensa que se puede deber a que el fosgeno actúa similar a un agente alquilante (Shah, 1979), que como se sabe son fuertes inhibidores de los procesos de replicación, transcripción y traducción del DNA. El hecho de que el cloroformo afectara la calidad de las extracciones se corroboró cuando se realizó una extracción de plásmido (pBSII-gA) con un método doméstico que utilizaba columnas de sílica (Qiagene) y dicha extracción fue exitosa.

La PCR de colonia que se realizó pudo no haber funcionado por la polimerasa usada (Amplificasa), que ésta no tolere el hotstart o sea más sensible a los componentes celulares de *E. coli*. Esta polimerasa no se había probado antes para hacer PCR de colonia y no hay registro de su uso para esta técnica.

### **6.8 Unión del gRNA, AmpR, SNR52, promotor de Actina y Cas9 por sitios de restricción en un solo paso**

Esta estrategia de clonación consiste en juntar los 5 fragmentos (AmpR, ActinP, SNR52, Cas9 y gRNA) previamente digeridos con sus enzimas correspondientes para posteriormente ligarlos todos juntos en una sola reacción. Cada corte de restricción es único y por lo tanto esta estrategia generaría el plásmido en un sólo paso (Fig. 33).

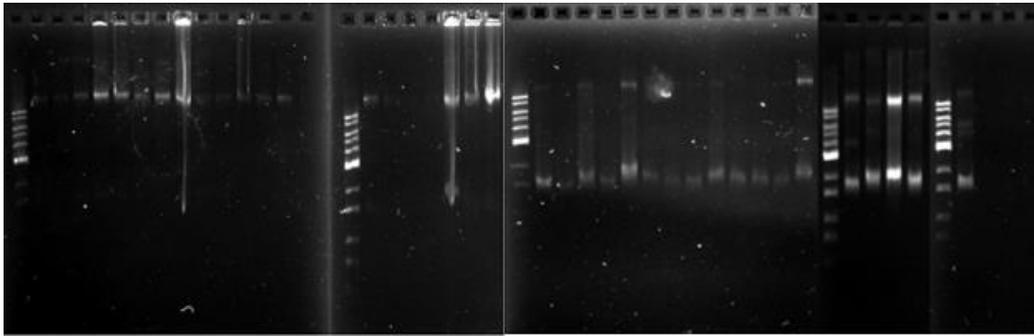


**Figura 33** Diagrama del plásmido a armar, resaltan los nombres de las enzimas a utilizar para digerir y unir los fragmentos

Cabe mencionar que a pesar que EcoRI no aparece como de corte único, ésta solo se usó en el fragmento de gRNA junto con SpeI, por lo que no hay riesgo de degradar la Cas9. Una vez realizado lo anterior, se procedió a lavar y realizar una ligación equimolar de todos los fragmentos en una sola reacción (Tabla 8), se procedió a transformar y extraer los plásmidos formados. Se realizaron 37 extracciones que posteriormente fueron desarrolladas en 4 geles de agarosa (Fig. 34).

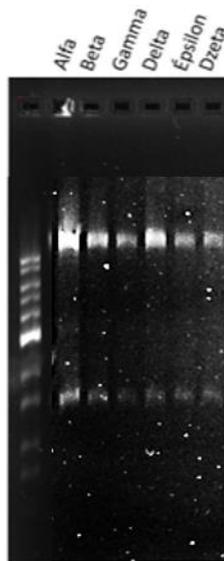
Tabla 8. Relación de ng de cada fragmento de DNA.

Fragmentos	Femto-mole	ng	μL
Cas9	60	169.68	5.05
AmpR	60	72.55	1.34
ActinP	60	26.95	0.44
Grna	60	6.45	0.10
SNR52	60	37.89	0.96
	Total (ng o μL)	313.54	7.91



**Figura 34** Geles de la extracción de diferentes colonias con el plásmido putativo pCluCas9 (SgAAC por las siglas de sus fragmentos: SNR52,gRNA,ActinP,AmpR y Cas9) cada carril de cada gel desarrollo una de las 40 extracciones.

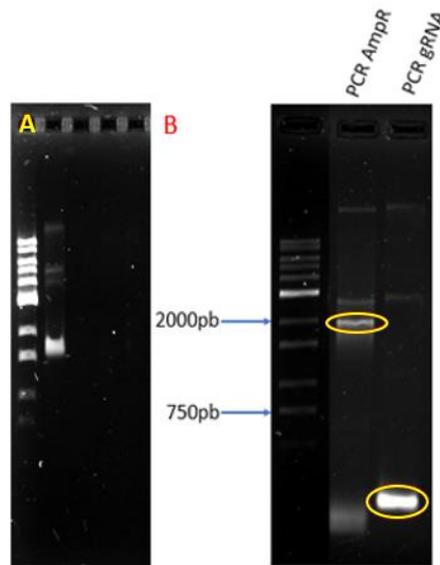
Dado que se recuperaron 40 posibles plásmidos, se realizó un análisis general simplificado, de tal forma que se realizaron 6 mezclas (Alfa,Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Dzeta) conformadas por 6 o 5 extracciones. Se mezclaron 166 ng de cada extracción (similar a lo descrito en al Fig. 32), todo esto con el fin de optimizar las digestiones que se realizarían. Las mezclas mencionadas se sometieron a doble digestión con SpeI y XhoI (Fig. 35).



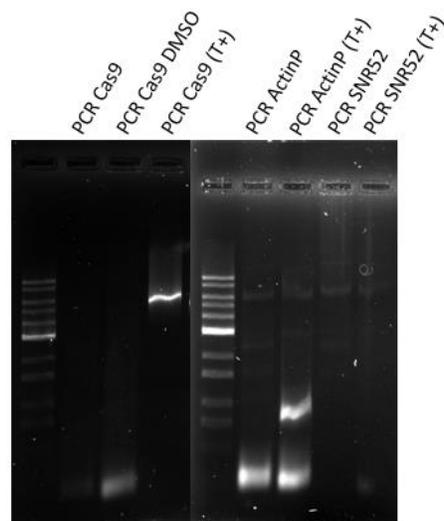
**Figura 35** Gel de electroforesis de las mezclas digeridas con SpeI y XhoI.

Dicho análisis de restricción no mostró ninguna diferencia en el patrón de bandeos con el observado en el gel de las extracciones del plásmido (Fig 34). En esta digestión se esperaba observar dos bandas: una de ~2000 pb y otra de ~6000 pb.

Por esta razón se procedió a realizar las PCR's de los fragmentos constituyentes del plásmido pCluCas9 putativo, trabajando sobre la extracción 38 ya que fue la que en el patrón de bandeo de la extracción se observan 3 isoformas muy claras (Fig. 36 A) a diferencia del resto de las extracciones. La PCR del AmpR (1761 pb) y del gRNA (174 pb) mostraron los amplicones esperados (Fig. 36 B), mientras en las PCR's de Cas9(4594 pb), ActinP(737 pb) y el SNR52(1022 pb) no se observó ninguna amplificación (Fig 37).

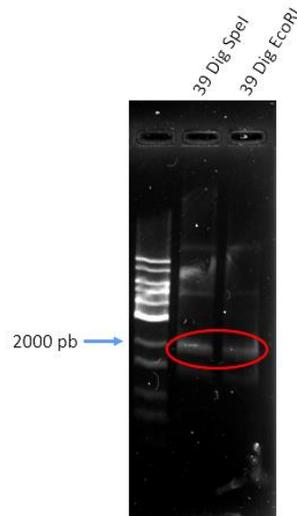


**Figura 36** A. Patrón de bandeo de la extracción 38; B: Gel de agarosa de las PCRs de AmpR y de gRNA, marcado en rojo se observan las bandas de los fragmentos esperados.



**Figura 37** Gel de agarosa de las PCR's de Cas9, ActinP y SNR52, utilizando como templado la extracción 38.

Otros dos análisis de restricción fueron realizados con *SpeI* y *EcoRI* por separado (overnight), para posteriormente desarrollarlos en un gel de agarosa (Fig. 38).



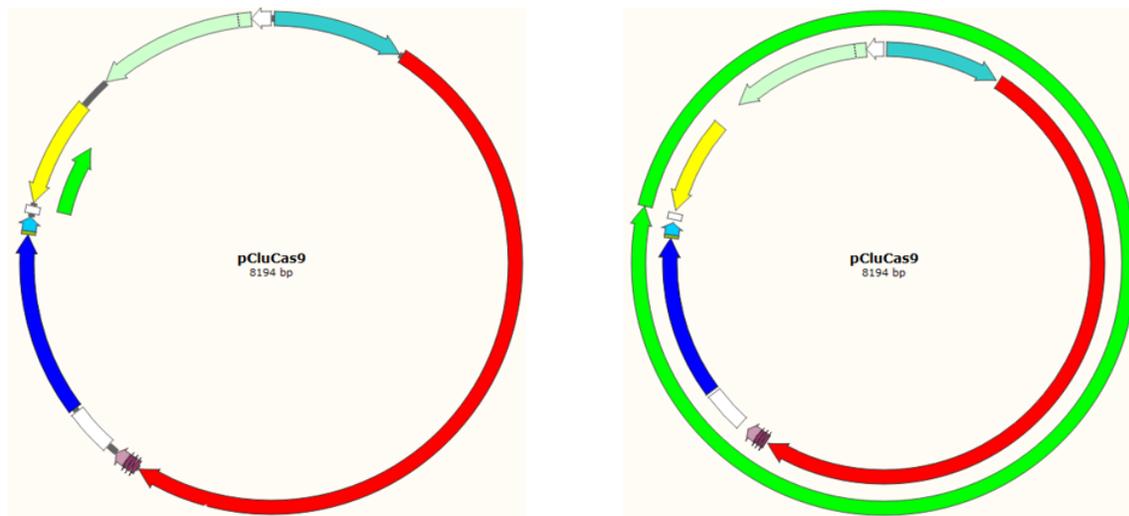
**Figura 38** Digestión de la extracción 38, en rojo se resalta la aparición de una banda de ~2000 pb.

Con lo anterior se logró observar una digestión parcial ya que se observó tanto con *SpeI* como con *EcoRI* la aparición de una banda de ~2000 pb (que era la más intensa). Esta banda extra a a las bandas del plásmido sin digerir se continuaban observando, lo que contrasta con el resultado esperado ya que el plásmido putativo con *SpeI* debería desarrollarse en forma de una banda de ~8000 pb mientras que con *EcoRI* se esperaba observar 3 bandas: de 4000, 2500 y 1700 pb aproximadamente.

La evidencia obtenida apuntaba a que el plásmido 39 estaba compuesto por dos fragmentos exclusivamente, el fragmento de *AmpR* y el *gRNA* (Fig. 36). Estos fragmentos juntos suman una longitud de 1917pb, muy similar a la banda obtenida al digerir tanto con *EcoRI* como con *SpeI* (enzimas que se encuentran en los fragmentos ya mencionados). Aparentemente estas enzimas están linealizando el plásmido en una longitud ~2000 pb.

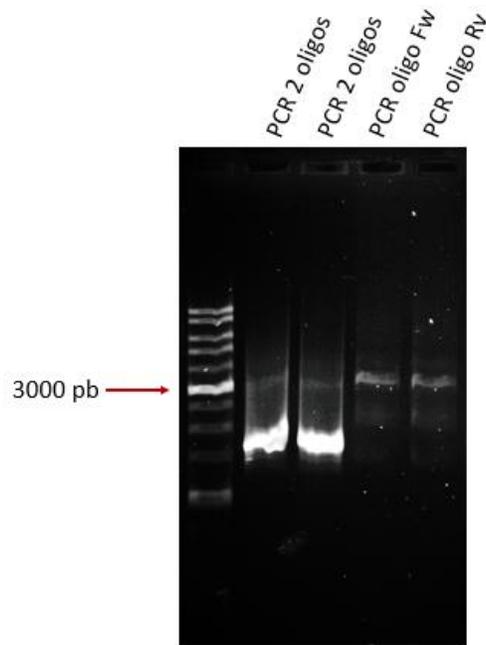
Se decidió probar una metodología de PCR asimétrica con el plásmido circularizado, está consta de todos los componentes de una PCR normal, a excepción de que solo se adiciona uno de los dos iniciadores (el forward o reverse). En el programa de

PCR el tiempo de enlongación es el suficiente para amplificar todo el plásmido putativo pCluCas9 utilizando una enzima de alta procesividad (Phusion). Lo anterior con el fin de determinar la longitud total de algún plásmido recuperado (Fig 39). Con esto se realiza una amplificación lineal, y no exponencial, deteniendo la enlongación cuando la polimerasa se encuentra con el iniciador con el que comenzó la amplificación.



**Figura 39** Diagrama del proceso de PCR asimétrica para determinar la longitud de un plásmido. En la izquierda se observa un estado inicial de la enlongación (en verde), y a la derecha se observa una enlongación completa.

La PCR asimétrica desarrollada en un gel de agarosa debería mostrar una banda que represente el tamaño total del plásmido que en este caso en particular sería una banda de ~8000 pb. Esta metodología se realizó tanto con el iniciador forward como con el reverse junto con dos testigos positivos de PCR con ambos iniciadores. El resultado fue una banda de 3000 pb (Fig. 40).



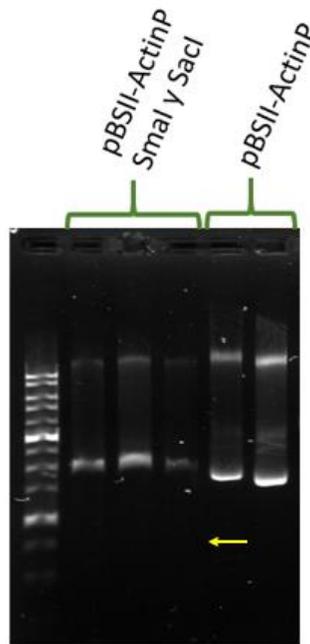
**Figura 40** Resultado de la PCR asimétrica, plásmido 38, en los últimos dos carriles se muestra la banda de 3000 pbs.

Estos resultados discrepan con los análisis de restricción con *SpeI* y *EcoRI* (Fig. 38) así como con las PCR's positivas del gRNA y del SNR52 (Fig 36), ya que estos resultados apuntan a un plásmido de 2000 pb.

A pesar de esta discordancia es posible que exista un plásmido de 3000 pb si además de los fragmentos *Ampr* y gRNA, también se encuentra el fragmento del SNR52 (de 1022 pb), ya que juntos tendrían una longitud de 2917 pb. Aunado a esto puede ser que la PCR del promotor SNR52 no funcionara ya que en este caso se realizó con la enzima *Pfusion* y esta PCR solo había funcionado con Q5, por lo que a pesar de estar ahí no se logró amplificar nuevamente. Aun así lo anterior no explica por qué las dos digestiones no revelaron un fragmento linealizado de 3000 pb si no uno de 2000 pb. Es importante recordar que estas digestiones no fueron totales pues aún se observaba plásmido sin reaccionar.

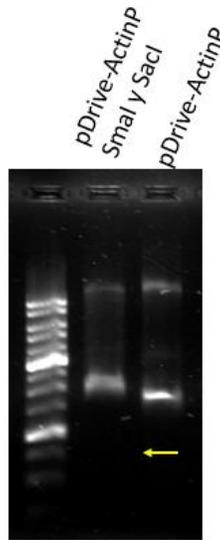
## 6.9 Re obtención de fragmentos para el plásmido pCluCas9 de un vector de clonación

En el proceso de obtención de los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción mencionadas (Fig 33) para el armado del plásmido es imposible observar o saber si las enzimas realizaron su trabajo adecuadamente ya que los extremos que cortan son de tan solo 10 pb como máximo, lo que hace que un fragmento cortado y uno no cortado no puedan distinguirse en un gel de agarosa. Por lo tanto se planteó que antes de cortar estos fragmentos, el amplicón de la PCR fuera ligado a un plásmido previamente cortado con EcoRV, de esta forma si el corte resulta exitoso en un gel se distinguirían dos bandas, correspondientes al plásmido y al fragmento de interés liberado. Este procedimiento se realizó con el promotor de actina en el plásmido pBSII, y se digirió con SmaI y SacI para liberar el promotor de actina, pero no se observó fragmento alguno (flecha amarilla) (Fig. 41).



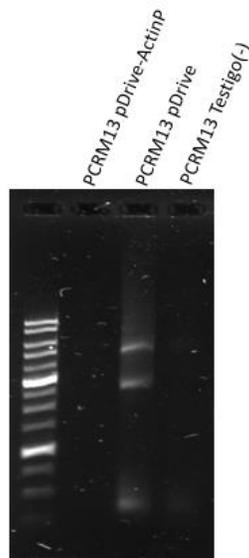
**Figura 41** Bandas de 3 digestiones del plásmido pBSII-ActinP y dos del mismo plásmido sin cortar.

El mismo proceso se repitió, pero ahora con el plásmido pDrive, sin embargo, los resultados fueron similares (flecha amarilla) (Fig. 42).



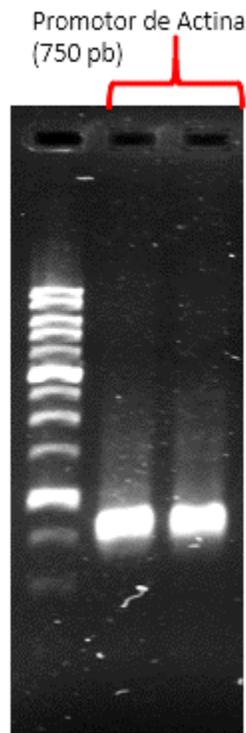
**Figura 42** Banda de digestión del plásmido pDrive-ActinP y del mismo plásmido sin cortar.

En este último plásmido se realizó una PCR con los iniciadores M13, esto para corroborar la presencia del fragmento pero las PCR's realizadas no mostraron amplificación alguna (Fig. 43).



**Figura 43** PCR's con iniciadores M13 de los plásmidos pDrive-ActinP y pDrive.

En este caso la PCR confirma que el fragmento no se encontraba en el plásmido de transporte. Sin embargo el patrón de bandeo del plásmido *a priori* del procedimiento no es el mismo al patrón de bandeo del plásmido una vez realizada la ligación, transformación y extracción, por lo que algo debió haberse ligado. En una revisión más detallada del gel de agarosa donde se desarrolló el promotor de actina después de haberlo limpiado, se observa que hubo una muy ligera degradación de este fragmento de DNA (Fig. 44). Este material degradado pudo haber interferido en la ligación del plásmido con el promotor de actina lo que explica los resultados observados.



**Figura 44** Promotor de actina desarrollado den gel de agarosa posterior a su lavado en columnas de sílica.

En el presente trabajo se muestran una serie de implicaciones en un desarrollo exclusivamente basado en la biología molecular como herramienta experimental. Desde la investigación bioinformática y el diseño *in silico*, así como la estrategia experimental y la implementación de la misma son factores importantes para lograr el éxito de los objetivos. En estas estrategias es de gran importancia la investigación

bioinformática exhaustiva que conlleva un cuidadoso diseño *in silico*, ya que es la base del trabajo. Así mismo la experiencia en biología molecular permitirá hacer un seguimiento más cuidadoso de los resultados, los cuales se pueden apreciar a través de los geles de agarosa y las expresiones fenotípicas de los genes que se construyen, mediante el crecimiento de las cepas recombinantes. De esta forma el diseño del plásmido llevado a cabo *in silico* mostro ser exitoso a este nivel ya que contaba con todos los elementos de un vector de expresión además de estar optimizados para su expresión con el código genético alternativo en levaduras (*Candidas*), aun así queda pendiente de probar su aplicación práctica, pero promete resultados satisfactorios.

También la estandarización de la mayoría de los oligos necesarios para obtener los fragmentos constituyentes del plásmido fue un éxito, lo a su vez demuestra que el diseño de estos *in silico* fue satisfactorio. Demostrando que con una cuidadosa investigación y aplicación de las herramientas bioinformáticas se pueden diseñar oligonucleótidos específicos, pero siempre es necesario probarlos para corroborar su utilidad práctica.

Por otro lado, en cuanto al ensamblaje de múltiples fragmentos para la formación de un plásmido en un solo paso, mostró ser completamente factible en condiciones cuidadosamente diseñadas, por lo que esta metodología no debe ser descartada, en cambio, es importante realizar la búsqueda cuidadosa de la razón de una ligación incompleta. Así mismo el proceso de ensamblaje con enzimas de restricción es un método práctico de unión de fragmentos de DNA, pero es necesario trabajar con templados purificados cuidadosamente y evitar los residuos de reactivos con potencial de inhibir reacciones de digestión, ligación, o amplificación de DNA, como lo es con el fenol. La pureza de fragmentos de DNA para ligar, no se limita a agentes químicos, si no también a otro DNA diferente al de interés en la reacción, por lo que hay que evitar este tipo de material en la reacción, ya que puede ligarse interfiriendo con la reacción deseada.

Finalmente, la expansión de técnicas de biología molecular con base en conocimientos previos sólidos quedó claro al implementar la alta procesividad de

algunas polimerasas para determinar la longitud de un plásmido utilizando solo un oligonucleótido. Proceso que, en otras circunstancias, sería un impedimento para amplificar un fragmento específico pero con el enfoque correcto resultó ser una herramienta útil para el análisis molecular de cadenas circulares de DNA.

## 7. CONCLUSIONES

La evidencia bioinformática analizada sugiere que, en levaduras con potencial de fermentar xilosa a etanol, la preferencia de XR por NADH+ o NADPH+ depende de la secuencia de una región de 11 aa conocida como motif 3. Mediante manipulación genética de este motif 3 en *C. lusitaniae*, podría adquirirse la capacidad de fermentar xilosa.

Los fragmentos necesarios para la construcción *in vitro* del plásmido pCluCas9 fueron amplificados satisfactoriamente, con excepción de los iniciadores ADE5, lo que demuestra un buen diseño *in silico* de estos.

La PCR overlapping es un método prometedor de ensamblaje de fragmentos de DNA, sin embargo, es necesario tener en cuenta varios factores típicos de una PCR (Tm, longitud de los templados, componentes de reacción, etc) además de la relación entre las longitudes de los fragmentos involucrados en dicho proceso ya que como se observó es totalmente factible unir fragmentos de DNA tomando en cuenta estas consideraciones.

La alta procesividad de algunas polimerasas permite utilizarlas en la determinación de la longitud de plásmidos circularizados sin necesidad de utilizar enzimas de restricción.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Wallace, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B.,  
Montague, L., Slayton, A., y Lukas, J. (2002). *Lignocellulosic Biomass to Ethanol  
Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and  
Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover*. National Renewable Energy Laboratory.  
<https://www.nrel.gov/docs/fy02osti/32438.pdf>
- Altshuler, M. L. (2006). *PCR Troubleshooting: The essential guide*. Caister Academic  
Press.
- Benavides, F. J., y Guénet, J. (2003). Las mutaciones. En *Manual de genética de  
roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (pp. 201-227).  
Universidad de Alcalá Laboratory Animals Ltd. SECAL. [https://secal.es/wp-  
content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf](https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf)
- Brakmann, S., y Johnsson, K. (Eds.). (2002). *Directed molecular evolution of proteins: or  
how to improve enzymes for biocatalysis*. Wiley-VCH.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527600647>
- Browne, J. (2013) Proposal—The energy crisis and climate. Global economic symposium  
change.  
[http://www.global-economic-symposium.org/knowledgebase/the-global-  
environment/the-energy-crisis-and-climate-change/proposals/the-energy-crisis-  
and-climate-change](http://www.global-economic-symposium.org/knowledgebase/the-global-environment/the-energy-crisis-and-climate-change/proposals/the-energy-crisis-and-climate-change)
- Bruinenberg, P. M., Bot, P. H. M., Dijken, J. P., y Scheffers, W. A. (1983). The role of  
redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *European*

*Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 287-292.

<https://doi.org/10.1007/bf005004933>

Buckeridge, M. S., y Souza, A. P. (Eds.). (2017). *Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane* (1st,2017 ed.). Springer Publishing.

Diezmann, S., Cox, C. J., Schonian, G., Vilgalys, R. J., y Mitchell, T. G. (2004). Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related Taxa: a Multigenic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5624-5635.

<https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5624-5635.2004>

Citartan, M., Tang, T.-H., Tan, S.-C., Hoe, C.-H., Saini, R., Tominaga, J., y Gopinath, S. C. B. (2012). Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(2), 125-131. <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/34-2/0125-3395-volume-125-131.pdf>

de Souza, A. P., y Perera, S. M. W. (2017). Science and bioethics of CRISPR-Cas9 gene editing: An analysis towards separating facts and fiction. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(4), 625-634. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29259526/>

de Souza, A. P., Leite, D. C. C., Pattathil, S., Hahn, M. G., y Buckeridge, M. S. (2012). Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *BioEnergy Research*, 6(2), 564-579. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>

DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., y Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7), 4336-4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>

- Durrens, P., Klopp, C., Biteau, N., Fitton-Ouhabi, V., Dementhon, K., Accoceberry, I., Sherman, D. J., y Noël, T. (2017). Genome sequence of the yeast *clavispora lusitaniae* type strain CBS 6936. *Genome announcements*, 5(31), e00724-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00724-17>
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., y De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 626-630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02359.x>
- Faraco, V. (Ed.). (2015). *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production* (Softcover Reprint of the Original 1st 2013 ed. ed.). Springer.
- Farrelly, V., Rainey, F. A., y Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and environmental microbiology*, 61(7), 2798-2801. <http://doi.org/10.1128/aem.61.7.2798-2801.1995>
- Finnegan, M., Herbert, K. E., Evans, M. D., Griffiths, H. F., y Lunec, J. (1996). Evidence for sensitisation of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 93-98. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02003-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02003-9)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *La fauna silvestre en un clima cambiante*. Fao Inter-Departmental Working Group. <http://www.fao.org/3/i2498s/i2498s.pdf>

- González, A. F. Jiménez, I. C. Susa, M. R. Restrepo, S. y Gómez, J. M. (2008). Biocombustibles de segunda generación y biodisel: mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. *Rev. Ing. N.28* Bogotá  
<http://dx.doi.org/10.16924%2Fria.v0i28.268>
- Hardie, D.W.F. in Kirk-Othmer. (1964). *Encyclopedia of chemical technology*. Second Edition. Interscience Publisher, New York, New York, Volume 5.
- Harris, G., Bashir, S., y Winyard, P. G. (1994). 7, 8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in DNA is not simply an artefact of isolation. *Carcinogenesis*, 15(2), 411-413. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.2.411>
- Heiat, M., Ranjbar, R., Latifi, A. M., Rasaee, M. J., y Farnoosh, G. (2017). Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(4), 541-548. <https://doi.org/10.1002/bab.1507>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., y Charpentier, E. (2012). A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <http://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kavanagh, K. L., Klimacek, M., Nidetzky, B., y Wilson, D. K. (2003). Structure of xylose reductase bound to NAD<sup>+</sup> and the basis for single and dual co-substrate specificity in family 2 aldo-keto reductases. *Biochemical Journal*, 373(2), 319-326.  
<https://doi.org/10.1042/bj20030286>
- Kodym, A., y Afza, R. (2003). Physical and chemical mutagenesis. *Plant Functional Genomics*, 189-204. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:189>

Kullander, S. (2010). Food Security: Crops for people not for cars. *AMBIO*, 39(3), 249-256.  
<https://doi.org/10.1007/s13280-010-0032-5>

Manieniyar, V., Thambidurai, M., y Selvakumar, R. (Eds.). (2009). *Study on energy crisis and the future of fossil fuels*. <https://doi.org/10.13140/2.1.2234.3689>

Lander, E. S. (2016). The heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1-2), 18-28.  
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

Maurya, D. P., Singla, A., y Negi, S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5), 597-609. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>

Norton, E. L., Sherwood, R. K., y Bennett, R. J. (2017). Development of a CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing of *Candida lusitanae*. *mSphere*, 2(3), e00217-17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00217-17>

Mojica F. J en Colegio Nacional. (2018, 23 octubre). *CRISPR: los retos de la edición genómica. Mesas redondas* [Vídeo]. YouTube.  
<http://www.youtube.com/watch?v=kPalrp3DG48>

Petschacher, B., Leitgeb, S., Kavanagh, K. L., Wilson, D. K., y Nidetzky, B. (2004). The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochemical Journal*, 385(1), 75-83. <https://doi.org/10.1042/bj20040363>

Petschacher, B., y Nidetzky, B. (2005). Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain Replacements and Performance of Site-Directed Mutants under Simulated In Vivo

Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6390-6393.

<https://doi.org/10.1128/aem.71.10.6390-6393.2005>

Polz, M. F., y Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.

<https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3724-3730.1998>

Ritchie, H. (2017, 17 diciembre). *Renewable energy*. Our World in Data.

<https://ourworldindata.org/renewable-energy>

Rodrigues de Miranda, L. (1979). *Clavispora*, a new yeast genus of the

Saccharomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45(3), 479-483.

<https://doi.org/10.1007/bf00443285>

Salaet, S., y Roca, J. (2010). Agotamiento de los combustibles fósiles y emisiones de CO<sub>2</sub>: Algunos posibles escenarios futuros de emisiones. *Revista Galega de*

*Economía*, 19(1), 1-19. <https://www.redalyc.org/pdf/391/39113124001.pdf>

Santiago-Benítez. A. J. (2017). Estudio de la regulación de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31. Tesis de grado.

CINVESTAV.CDMX

Shah H, Hartman SP, Weinhouse S.(1979). Formation of carbonyl chloride in carbon tetrachloride metabolism by rat liver in vitro. *Cancer Res.* 39(10):3942-3947.

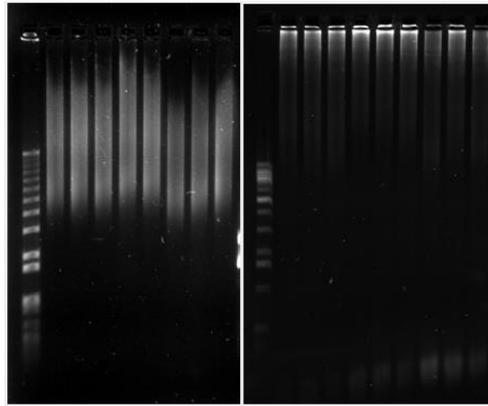
Shevchuk, N. A. (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*, 32(2), 19e-

119. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh014>

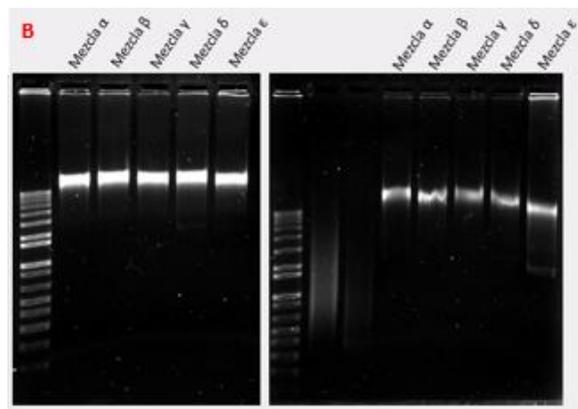
- Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., y Teixeira, J. A. (2011). Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 151-156. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322011000100016>
- Sint, D., Raso, L., y Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898-905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00215.x>
- Spindler, D. D., Wyman, C. E., Mohagheghi, A., y Grohmann, K. (1988). Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 17(1-3), 279-293. <https://doi.org/10.1007/bf02779163>
- Stemmer, W. P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10747-10751. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10747>
- Suzuki, M. T., y Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 625-630. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.625-630.1996>
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P., y Scheffers, W. A. (1984). Alcoholic fermentation of d-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1221-1223. <https://doi.org/10.1128/aem.47.6.1221-1223.1984>

- Urnov, F. D. (2018). Genome Editing B.C. (Before CRISPR): Lasting lessons from the “Old Testament”. *The CRISPR Journal*, 1(1), 34-46.  
<https://doi.org/10.1089/crispr.2018.29007.fyu>
- Vázquez, H. J., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4), 249-259.  
<https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2007.08n4.020>
- Veras, H. C. T., Parachin, N. S., y Almeida, J. R. M. (2017). Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0766-x>
- Vyas, V. K., Barrasa, M. I., y Fink, G. R. (2015). A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Science Advances*, 1(3), e1500248. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500248>
- Walker, G. M. (2010). *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. Ventus publishing ApS.
- Wyman, C. E., y Abelson, P. H. (1996). *Handbook on bioethanol: production and utilization: production y utilization*. Routledge.
- Xue, T., Liu, K., Chen, D., Yuan, X., Fang, J., Yan, H., Huang, L., Chen, Y., y He, W. (2018). Improved bioethanol production using CRISPR/Cas9 to disrupt the ADH2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2518-4>

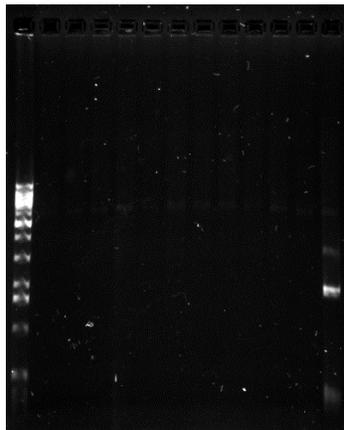
## ANEXO 1



**Figura 45** Geles donde se muestra el resultado de los diversos intentos de anidación de la PCR M13 del fragmento gRNA-AmpR.

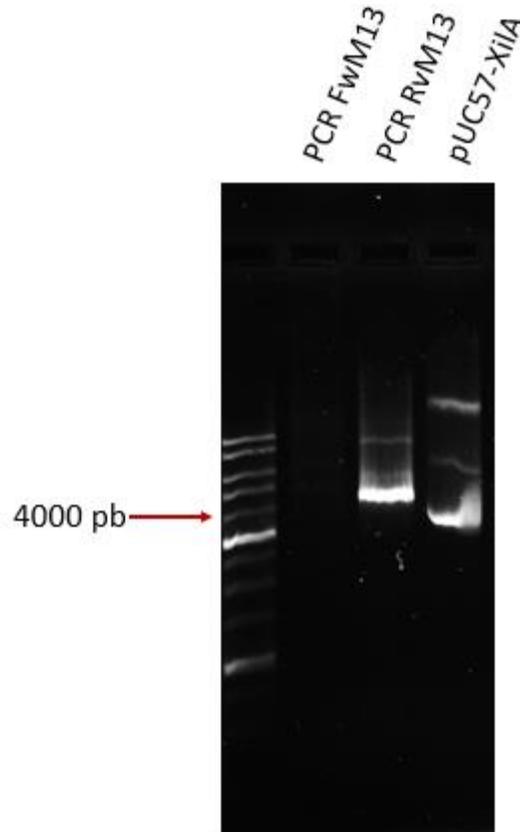


**Figura 46** Geles de dos intentos de digerir con *SacI* y *XhoI* las extracciones de pBSII-SgA.



**Figura 47** Gel de las PCRs colonia, el ultimo carril corresponde a una PCR del plásmido pBSII-gA como control positivo.

Ya que esta metodología fue ideada con este fin en el laboratorio, se procedió a probarla en pUC57-XilA con los iniciadores M13, dicho plásmido de 4020 pb fue probado con el oligo forward y el reverse, dando como resultado con el reverse la banda de aproximadamente 4000 pb (Fig. 47) demostrando su exactitud en la determinación de la longitud de un plásmido.

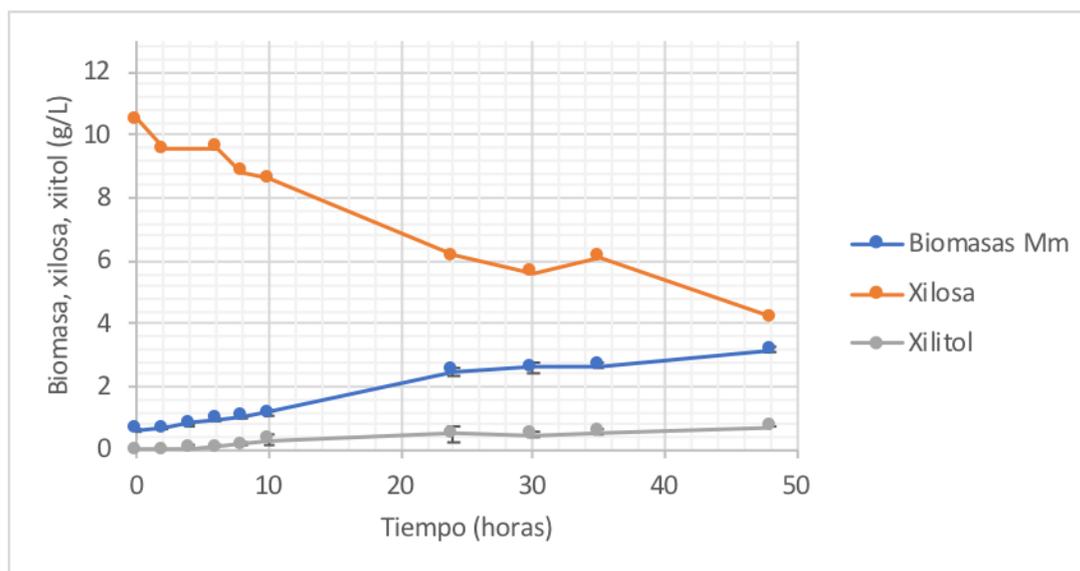


**Figura 48** Prueba de la PCR asimétrica, pUC57-XilA.

## ANEXO 2

### CINETICA DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE XILOSA Y PRODUCCION DE XILITOL

Con el fin de tener datos de control para comparar los resultados de la modificación de la XR de *C. lusitaniae*, se realizó una cinética de crecimiento ( $DO_{600}$ ) el consumo de xilosa y producción de xilitol (medido en HPLC) . La cinética se siguió por 48 h tomando lecturas cada 2 h las primeras 12 horas para después tomar lecturas cada 12 horas (Fig. 46es). Con dichos datos se observa que después de 48 h, la xilosa no se termina de consumir y hubo acumulación de xilitol. Cabe mencionar que también se realizó la medición de etanol en las muestras y no se registró lectura alguna, lo que corrobora que *C. lusitaniae* no tiene la capacidad de producirlo a partir de xilosa (Santiago-Benítez, 2017).



**Figura 49** Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de xilitol por *C. lusitaniae*.