



Posgrado en Biotecnología-Facultad de Ciencias Udelar

*Ingeniería genética en una cepa industrial de
Saccharomyces cerevisiae orientada a la
producción de bioetanol de segunda generación*

Lic. Lucía Coimbra Baglivo

Tutora: Dra. Silvia Batista

Co-tutor: Dr. Rodrigo Achigar

10 DE NOVIEMBRE DE 2022

Laboratorio de Microbiología Molecular-Departamento de Bioquímica y Genómica
Microbiana
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



ÍNDICE

2	Resumen.....	8
3	Introducción	10
3.1	Biocombustibles	11
3.1.1	Biocombustibles de segunda generación.....	12
3.1.2	Producción de bioetanol	14
3.1.2.1	Producción de etanol de segunda generación a nivel industrial.....	15
3.2	Transporte y metabolismo de D-xilosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
3.2.1	Permeasas	16
3.2.2	Vías metabólicas para la asimilación de D-xilosa	17
3.2.2.1	Vía Xilosa Isomerasa.....	19
3.3	Estrategias de edición génica CRISPR.....	20
3.4	Antecedentes del proyecto: cepas de estudio	23
3.5	Estado de arte	26
4	OBJETIVO GENERAL	27
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6	Materiales y métodos	29
6.1	Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento	29
6.2	Aislamiento de las cepas del <i>pool</i> de células de la 10 ^{ma} evolución CAT-1 XIT (pRS42K::XI) y curado del plásmido (pRS42K::XI).....	31
6.2.1	Consumo de D-xilosa y producción de etanol.....	32
6.2.1.1	Determinaciones analíticas de la concentración de D-xilosa y etanol.....	32
6.2.1.2	Ensayos estadísticos.....	32
6.2.2	Curado del plásmido pRS42K::XI	33
6.3	CRISPR-Cas9.....	34



6.3.1	Diseño del ARNg	34
6.3.2	Obtención del plásmido pCAS con el ARNg: RF Cloning	35
6.3.2.1	Amplificación del plásmido.....	36
6.3.2.2	Digestión con enzima DpnI	38
6.3.2.3	Transformación E. coli TOP10 (químicamente competentes) ⁸⁴	39
6.3.2.4	Confirmación de inserción del ARNg: PCR colonia.....	39
6.3.3	Obtención del fragmento <i>xyIA</i> con las colas de homología	40
6.3.3.1	Inserción del fragmento amplificado <i>XylA</i> en el plásmido pSKII	42
6.3.3.1.1	Digestión del plásmido pSKII con <i>EcoRV</i>	43
6.3.3.1.2	Ligación.....	43
6.3.4	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> CAT-R	44
6.3.4.1	Transformación química (protocolo modificado a partir de ⁸⁶).	44
6.3.4.2	Transformación química protocolo 2 (protocolo adaptado de ⁸⁷)	45
6.3.4.3	Electroporación ⁸⁸	46
6.3.5	Verificación de mutaciones.....	48
7	Resultados	49
7.1	Aislamiento de las cepas del “pool” de células de la 10ma evolución CAT-1 XIT (pRS42K::XI) y curado del plásmido (pRS42K::XI).....	49
7.2	CRISPR-Cas9.....	51
7.2.1	Diseño del ARN guía	52
7.2.2	<i>RF Cloning</i>	53
7.2.2.1	Amplificación del plásmido pCAS	53
7.2.2.2	Amplificación del gen a insertar	56
7.2.3	Co-transformación del amplicón conteniendo el gen <i>XylA</i> y el plásmido pCAS derivado para cada gen a modificar	58
7.2.4	Obtención de ADN donante y electroporación.....	61



7.2.5	Ensayo práctico de la Universidad ORT 2018.. ¡Error! Marcador no definido.	
7.2.6	Volviendo a nuestro modelo: Electroporación en cepa CAT-R	63
7.2.7	Mayor número de pares de bases de homología	63
8	DISCUSIÓN.....	66
8.1	Elección del sistema de modificación genética: ¿Por qué CRISPR CAS?	66
8.2	¿Transformación Química o electroporación?	68
8.3	Diseño del sistema CRISPR.....	71
8.4	Revisión de proyecto y modificaciones a aplicar	74
9	Conclusión	79
10	Bibliografía.....	80
11	Anexo	91
11.1	Materiales y métodos	91
11.1.1	Medios de cultivo	91
11.1.1.1	Medio LB Diluido	91
11.1.1.2	Medio MM.....	91
11.1.1.3	Medio YPD	91
11.1.1.4	Medio YPX	91
11.1.2	Soluciones y <i>buffers</i> utilizados	92
11.1.2.1	Solución Transformación química.....	92
11.1.2.1.1	5X LITE	92
11.1.2.1.2	1X LITE	92
11.1.2.1.3	PEG LITE.....	92
11.1.2.2	Solución Transformación química 2.....	92
11.1.2.2.1	Solución Pli	92
11.1.2.3	Soluciones de lisis alcalina	93
11.1.2.3.1	Solución I.....	93



11.1.2.3.2 Solución II	93
11.1.2.3.3 Solución III	93
11.1.2.4.....	94
11.1.3 Técnicas Moleculares	94
11.1.3.1 Lisis celular de levaduras contenidas en una colonia	94
11.1.3.2 Gel de agarosa.....	94
11.1.3.3 Preparación de células competentes E. coli TOP10 ⁸⁴	95
11.1.3.4 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina ¹¹⁴	95
11.1.3.5 Purificación de fragmento	96
11.2 Resultados	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vía de la D-xilosa isomerasa y vía oxo-reductiva..	18
Figura 2: Bloques con genes en tándem insertos en los alelos <i>GRE3</i> de las cepas CAT-1 mutantes	24
Figura 3: Mapa del plásmido pCAS.	36
<i>Figura 4: Diseño del megaprimer para insertar el ARNg en el plásmido pCas por la técnica RF Cloning.</i>	<i>37</i>
Figura 5: Plásmido pSKII en el que se insertó el gen XylA con las colas de homología utilizando el sitio de restricción EcoRV.	43
Figura 6: Consumo de D-xilosa y producción de etanol de los 10 clones aislados del “pool” celular CAT-1-XIT(pRS42K::XI)10ma evolución crecida en YPX G418..	49
<i>Figura 7: Curado del plásmido (pRS42K::XI).</i>	<i>50</i>
Figura 8: Perfil electroforético en gel de agarosa en donde se visualiza el fragmento de ADN amplificado por PCR correspondiente al gen KanMX..	51
Figura 9: Ubicación del ARN guía respecto al sitio PAM en el genoma..	52
Figura 10: Ejemplo de ARN guía diseñado.	53
Figura 11:. Perfil electroforético de las reacciones PCR Pool colony..	56



Figura 12: Perfil electroforético de los plásmidos pCAS modificados..	56
Figura 13: Perfil electroforético de la reacción de amplificación del gen XylA con colas de homología para el gen target.....	57
Figura 14: Perfil electroforético de la amplificación de los genes target donde se encuentra la región complementaria al ARNg.	58
Figura 15: Perfil electroforético de los productos resultantes de protocolos de clonado del fragmento donante en el plásmido pSKII.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo	30
Tabla 2: ARNg diseñados para los genes target	35
Tabla 3: Megaprimers diseñados para insertar cada ARNg en el plásmido pCAS por la técnica <i>RF-Cloning</i>	37
Tabla 4: Cebadores diseñados para confirmar la modificación del plásmido pCAS.	40
Tabla 5: Cebadores diseñados para amplificar el gen XYL A con colas de homología para la inserción en el gen target.	41
Tabla 6: Cebadores diseñados para confirmar la modificación genética de la cepa CAT-R (Inserción del gen XylA en el gen target).....	48
Tabla 7: Resultados obtenidos mediante los diferentes protocolos de RF Cloning.....	55
Tabla 8: Ensayos de transformación.....	59

1 AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Silvia por permitirme desarrollar este trabajo con total libertad, apoyo y confianza. Fuiste uno de los pilares más importantes en este proceso, estoy agradecida de haberte tenido como tutora y como persona en otro ciclo más de mi vida que hoy se cierra. De vos aprendí no solo a desarrollarme como profesional, sino como ser humano. También quiero agradecer a Rodrigo por los materiales brindados, el tiempo y los consejos a lo largo del trabajo.

A la Dra. Sonia Rodríguez por acompañarme en la evaluación de este trabajo a lo largo de todo el proceso. Sus aportes como evaluadora en las instancias de “proyecto de tesis” y “avances de tesis” fueron claves para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del Depto. De Bioquímica y Genómica Microbiana de IIBCE por la compañía y el apoyo. Muchos de ustedes se han vuelto grandes amigos y juntos hemos compartido las alegrías y tristezas que conlleva el camino arduo de la ciencia académica.

A las evaluadoras de este trabajo por aceptar corregirlo, por la excelente disposición, sobre todo en esta época del año que todo se junta.

A mis amigos, por escucharme innumerables veces hablar de la tesis y todo lo que conllevó este proceso. Saben bien lo que implica para mí cerrar este ciclo. Agradezco cada segundo de mi vida compartido con ustedes.

A Flo, no tengo ni palabras para expresar el lugar que ocupás en mi vida y en este proceso. Juntas empezamos y juntas terminamos. Nadie mejor que vos para compartir esto. Agradecida de tenerte.

Y por último, a mi familia, especialmente a mis padres. Las palabras nunca van a ser suficientes para expresar lo que siento por ustedes y el lugar que ocupan en mi vida. Simplemente gracias por ser y existir.

2 RESUMEN

La producción de biocombustibles de 1era-generación requiere de áreas exclusivas para el cultivo de plantas capaces de acumular carbohidratos o lípidos en alta proporción. Esta práctica compite con la siembra de cultivos con fines alimenticios. Esto ha impulsado la producción de biocombustibles de 2da-generación, como el bioetanol, a partir de biomasa lignocelulósica. La misma está compuesta de: celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa contiene mayoritariamente D-xilosa, glucosa y arabinosa.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, usualmente empleada para producir bioetanol de 1era-generación por fermentación de las hexosas, es incapaz de fermentar D-xilosa y arabinosa. Disponer de una cepa capaz de fermentar todos los azúcares contenidos en la biomasa lignocelulósica permitirá mejorar los rendimientos de producción de este biocombustible. En el caso de D-xilosa, las estrategias desarrolladas involucran la expresión de genes heterólogos de las vías oxo-reductiva y/o D-xilosa isomerasa.

En trabajos previos se obtuvo la cepa recombinante CAT-1-XIT(pRS42K::XI), derivada de *S. cerevisiae* CAT-1. CAT-1-XIT(pRS42K::XI) contiene en el genoma (dos alelos *GRE3*) una copia extra de los genes D-xilosa isomerasa de *Streptomyces coelicolor* (*xylA*; XI), *XKS1*, *TAL1* y *Gal2-N376F* (metabolismo y transporte de D-xilosa). Además, alberga el plásmido pRS42K::XI(G418^R) portando el gen *xylA* (XI) de *Piromyces* sp.. Luego de un protocolo de evolución dirigida, el *pool* de células fue capaz de crecer en medio salino y en caldo YP (1/5) con D-xilosa 20g/L y produjo 7g/L de etanol en condiciones no optimizadas ($Y_{global}=0.31g/g$).

En este trabajo se propuso diseñar, mediante CRISPR-Cas9, una cepa recombinante derivada de CAT-1-XIT(pRS42K::XI), capaz de fermentar D-xilosa y glucosa en presencia de hidrolizado de lignocelulosa y sin requisitos de selección antibiótica (sin plásmido). La estrategia propuesta implicaba incorporar copias extra del gen *xylA* de *Piromyces* sp. en el cromosoma de la levadura, en genes cuya mutación no afectara o incluso mejorara la producción de bioetanol en presencia de hidrolizado de hemicelulosa. Como primer paso, se aislaron 10 clones del *pool* resultante de la evolución de CAT-1-XIT(pRS42K::XI) para



seleccionar el que presentara mayor producción de etanol al consumir D-xilosa. Para poder trabajar con este clon recombinante sin plásmido, se prepararon sub-cultivos sucesivos del mismo en caldo YPD sin antibiótico y se aislaron colonias sensibles a geneticina (G418). La pérdida del plásmido se verificó mediante el análisis de productos de PCR. Se seleccionó así un clon, denominado CAT-R, para la edición génica posterior. Se diseñaron y obtuvieron todos los componentes necesarios para realizar el ensayo CRISPR-Cas9, incluyendo el gen *cas9*, la región ARNg y el fragmento *xy/A* con regiones adyacentes para la recombinación homóloga. Sin embargo, ninguno de los clones resultantes de los protocolos de transformación usados incorporó la copia extra del gen *xy/A* en el genoma. Los resultados obtenidos sugieren que los protocolos empleados para la edición génica mediante CRISPR-Cas9 en levaduras diploides requieren ser ajustados. En la estrategia propuesta se asocia en un solo ensayo el evento de transformación de un plásmido y de un fragmento de ADN donante (lineal o en inserto en un plásmido no replicable) para dar lugar al proceso de edición génica (corte de doble hebra de ADN) y la recombinación homóloga para la reparación del ADN. Se discuten los potenciales pasos limitantes que podrían haber estado involucrados en no alcanzar el objetivo deseado.



3 INTRODUCCIÓN

En el año 2020 se estimó que el consumo energético mundial iba a aumentar un 49% desde 2007 al 2035, junto con el crecimiento de la economía y expansión de la población¹. La producción de biocombustibles ha experimentado un intenso desarrollo en las últimas décadas, asociado a la incertidumbre sobre el futuro de las reservas petroleras, las variaciones en el precio del petróleo debido a la inestabilidad geopolítica mundial y la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero². El uso de biocombustibles se considera una opción más amigable con el medio ambiente. Esto se debe a que, considerando el ciclo de vida de los mismos (en cuyo cálculo se incluye el consumo de carbono por fotosíntesis), el balance de carbono es casi neutro en comparación con el de los combustibles derivados del petróleo (como la nafta, el diesel o el queroseno)³.

Según el informe de la Agencia Internacional de Energía (AIE), la producción mundial de biocombustible fue récord en 2019, alcanzando valores de 162 mil millones de litros (aumento anual del 7%)⁴. La pandemia COVID-19 alteró todos los escenarios, incluida la producción de biocombustibles que se habría reducido en un 13% a nivel mundial, alcanzando los niveles de 2017. La misma también retrasó la implementación de la política de biocombustibles en diversos países como Indonesia, Malasia y Tailandia, para los cuales previamente se había previsto un crecimiento en la producción. Por otro lado, India anunció recientemente que aumentará anualmente en un 10% la producción de biocombustibles⁴. El objetivo de este país es que los biocombustibles alcancen un porcentaje de hasta un 20% (v/v) en la mezcla con combustibles fósiles. Este compromiso implica establecer varias instalaciones de producción de bioetanol y otros biocombustibles en todo el país y reemplazar parte de los sustratos actualmente usados a base de azúcar por materia prima lignocelulósica⁵.

Por otro lado, se espera que en EE.UU. e Indonesia, la producción de biocombustible sea un 7% más alta en 2022 que en 2021, considerando la expansión de la producción del aceite vegetal hidratado (HVO, según su sigla en inglés) y así del biodiesel. En el caso de Brasil, se espera que en 2022 se alcancen niveles de producción de bioetanol similares a los de 2019⁴ y el actual gobierno adhirió, de palabra, a los objetivos planteados en la



Convención del Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC). Este documento, anunciado en diciembre de 2015 en la Conferencia de París (COP 21) y actualizado en 2020, establece como objetivo la reducción mundial de emisión de gases (37% para 2025, 43% para 2030).

3.1 BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles se generan a partir de biomasa como plantas, desechos animales, estiércol, lodos, etc⁶. Dependiendo de la biomasa de la que parten, se clasifican en cuatro grupos generacionales⁷. Los de primera generación se producen a partir de biomasa vegetal o animal, involucrando los disacáridos, polisacáridos o ácidos grasos presentes en la misma, que podrían eventualmente usarse para la alimentación humana y/o animal. Los de segunda generación, implicaron el desarrollo de bioprocesos modernos y sustentables para utilizar la biomasa residual, como la lignocelulosa sobrante de las industrias madereras. Los biocombustibles de tercera generación se caracterizan por la conversión directa de energía solar en moléculas (como carbohidratos o lípidos), a través de la fotosíntesis por parte de algas y microalgas. Por último, los de cuarta generación que aún se encuentran en la etapa experimental, utilizan la biomasa de algas modificadas con el objetivo de acumular mayores cantidades de lípidos, tener mayor capacidad de captura de carbono y facilitar los procedimientos de cultivo, cosecha y fermentación⁶. La producción de biocombustibles de primera generación es el área industrial más desarrollada hasta el momento.

El bioetanol es uno de los biocombustibles más utilizados en América. En el año 2019, el bioetanol producido en este continente representó el 65% de la producción mundial de biocombustibles. EE.UU. y Brasil lideran la producción mundial de etanol, juntos producen poco más del 80% del alcohol que se utiliza y comercializa en el mundo⁸.

De todas formas, el rápido crecimiento de la producción de biocombustibles no ha estado exento de controversias. El apoyo de la opinión pública por los biocombustibles de primera generación se redujo, al menos en parte, debido a que algunos estudios destacaron que su producción requiere el uso de materias primas que pueden tener fines alimenticios, cuestionando su capacidad para desplazar la energía fósil y analizando su



potencial contribución al monocultivo y la deforestación⁹. Como se mencionó anteriormente, desde el punto de vista económico, la producción de etanol a partir de caña de azúcar compite con el mercado del azúcar. La materia prima se está volviendo cada vez más costosa, afectando el costo final del bioetanol¹. El impacto de estos efectos combinados ha estimulado la producción de biocombustibles producidos a partir de biomasa no alimentaria.

3.1.1 Biocombustibles de segunda generación

La biomasa lignocelulósica es una materia prima con gran potencial para producir biocombustibles y productos de valor agregado¹⁰. Su uso no solo está relacionado con la prevención de la contaminación ambiental, sino que también implica los tres pilares de la sustentabilidad: las personas, el planeta y las ganancias, es decir, los elementos sociales (fuente de trabajo), ambientales (ej. menor superficie de áreas de cultivo) y económicos (ej. mayor aprovechamiento de materia prima reduce costos), contribuyendo así a una economía sustentable¹¹.

Para la producción de biocombustibles de segunda generación, la biomasa suele dividirse en tres categorías: homogénea, como las astillas de madera blanca; cuasi homogénea, como el desecho agrícola y forestal; y no homogénea, incluyendo materia prima de bajo valor como los desechos sólidos municipales¹². El precio de esta biomasa es significativamente menor que el precio del aceite vegetal, el maíz y la caña de azúcar, lo cual es un incentivo para utilizarla como materia prima. A su vez, algunas materias primas, como por ejemplo el maíz, permiten generar una variedad de productos, adhiriéndose así al concepto de "biorrefinería" y siendo clave para lograr una economía circular¹³. La biorrefinería implica separar los recursos de la biomasa (madera, pastos, planta de maíz, etc.) en sus componentes básicos (carbohidratos, proteínas, triglicéridos entre otros) y convertirlos en una gran variedad de productos con valor agregado, comercializables como biocombustibles y productos químicos¹⁴.

Se investigan numerosas estrategias para producir biocombustibles de segunda generación, pero en general se basan en dos vías: termoquímica o bioquímica. La primera consiste en un tratamiento térmico de la biomasa a una concentración baja o ausente de un agente oxidante. Los procesos de esta categoría conducen a la conversión de biomasa



en tres fracciones: un sólido conocido como biocarbón, un líquido denominado aceite pirolítico o bioaceite, y un gas conocido como gas de síntesis, que generalmente está compuesto de CO, H₂, alcanos de cadena corta y CO₂. Cuando se procesa a bajas temperaturas (250 a 350°C) sin oxígeno, la biomasa se somete a un proceso de torrefacción y el principal producto de conversión es el biocarbón. A mayores temperaturas (550 a 750°C), también sin oxígeno, el proceso se conoce como pirólisis y el principal producto es el bioaceite. A temperaturas más altas (750 a 1200°C) y con entradas de oxígeno limitadas, se produce gasificación, siendo el producto principal el gas de síntesis (con biocarbón y bioaceites como subproductos). La vía bioquímica se basa en el uso de microorganismos, generalmente levaduras, para la conversión de los azúcares fermentables de la biomasa en biocombustibles. Este tipo de proceso puede usar una fracción de los azúcares de la biomasa o aspirar a consumir todos. Así, la estrategia se suele incorporar en las cadenas agrindustriales denominadas “biorefinerías”, las cuales pueden instalarse para producir biocombustibles y otros productos con valor agregado³.

La biomasa lignocelulósica utilizada para la producción de biocombustibles de segunda generación está compuesta por diferentes polímeros como polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), y la lignina, de composición compleja, incluyendo moléculas poli-aromáticas¹⁵. La celulosa es un polisacárido muy estable con moléculas compuestas de más de 10,000 unidades de glucosa, unidas entre sí por enlaces β -1-4-O-glucosídicos, que contribuyen a la linealidad de la molécula. La hemicelulosa representa entre el 15 y 25% del peso seco de la biomasa lignocelulósica y es un heteropolisacárido ramificado amorfo, compuesto por hexosas (glucosa, manosa y galactosa), pentosas (D-xilosa y arabinosa), ácidos urónicos y desoxihexosas (ramnosa y fucosa), con una longitud de cadena más corta en comparación con la celulosa. La composición de azúcares de las hemicelulosas depende de la naturaleza de la biomasa. Sin embargo, en general la D-xilosa es el azúcar más abundante de la hemicelulosa y el segundo, luego de la glucosa, en la biomasa lignocelulósica. La estructura amorfa y ramificada de la hemicelulosa la hace más susceptible a procesos de pretratamiento, siendo la primera fracción de la biomasa en degradarse, incluso en condiciones suaves. Por último, la lignina está constituida por polímeros complejos incluyendo compuestos poli-aromáticos, que muchas veces resultan tóxicos y de difícil degradación¹⁶.



La conversión de biomasa lignocelulósica en alcohol requiere de un proceso de tres pasos: un pretratamiento de la biomasa, una etapa de hidrólisis ácida o enzimática y una etapa final de fermentación/destilación¹⁷. Cada proceso del pretratamiento tiene un efecto específico sobre la fracción de celulosa, hemicelulosa y lignina. Las diferencias físicas y químicas entre los sustratos provocan diferencias durante la fermentación, que incluyen: rendimiento de producción de etanol, título de etanol, velocidad de fermentación, tiempo de finalización de la fermentación, mezcla y solubilización del sustrato, lo que sugiere que el pretratamiento influye directamente en la operación, así como en el rendimiento de la hidrólisis, fermentación y separación del producto final¹⁸. Por otro lado, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica genera, además de una mezcla de pentosas y hexosas, compuestos inhibidores, como por ejemplo, furfural, fenoles, ácido acético y disolventes tóxicos producidos durante el pretratamiento, los cuales dificultan no solo la etapa de fermentación microbiana, sino también la propia hidrólisis (reduciéndola entre un 5 a un 81%)¹⁹.

3.1.2 Producción de bioetanol

La fermentación es el proceso biológico en el que los microorganismos, principalmente levaduras y bacterias, convierten los azúcares monoméricos en ácidos, gases y etanol²⁰. Las levaduras utilizadas en la producción industrial de etanol generalmente emplean la glucólisis para degradar la glucosa y producir etanol a partir de los intermediarios generados en esta ruta metabólica. Dicho proceso convierte la glucosa en un producto parcialmente oxidado, el piruvato, al mismo tiempo que suministra ATP para la producción de biomasa. Posteriormente, en condiciones anaeróbicas, el piruvato puede fermentarse generando varios productos, entre ellos el etanol. Este proceso ocurre mediante reacciones secuenciales de la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH), en las cuales el piruvato pierde un carbono en forma de CO₂²¹.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura utilizada por excelencia a nivel industrial en el proceso de fermentación y producción de alcohol, debido a su alta productividad y rendimiento de producción de etanol a partir de diferentes materias primas²⁰. Además, estos organismos presentan gran tolerancia a altas concentraciones de etanol²² a pH



bajos y buena resistencia frente a muchos de los compuestos nocivos presentes en los hidrolizados lignocelulósicos²³. *S. cerevisiae* no puede fermentar los azúcares de 5 carbonos o pentosas. Es por esto que, en busca de un mayor aprovechamiento de los azúcares disponibles en la biomasa lignocelulósica, se ha invertido en la bio-prospección de nuevos organismos capaces de consumir hexosas y/o pentosas como *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida shehatae*²⁰ y en la obtención de cepas de *S. cerevisiae* modificadas a través de técnicas de ingeniería metabólica-ingeniería genética, capaces de fermentar también D-xilosa y lograr un proceso de co-fermentación²⁴. Para las modificaciones genéticas se han considerado distintos pasos limitantes del proceso de fermentación y algunas de las estrategias generadas para enfrentarlos son: (1) identificación y expresión de enzimas con mejores actividades catalíticas; (2) control de flujo de intermediarios y precursores; (3) eliminación de vías competitivas; (4) equilibrio redox y regeneración de cofactores; y (5) modificación de los mecanismos reguladores²¹.

3.1.2.1 Producción de etanol de segunda generación a nivel industrial

A pesar de que se reconoce la potencial sustentabilidad de la producción de bioetanol celulósico por vía enzimática, el principal argumento en contra se basa en los elevados costos de producción del mismo. En este sentido, muchos países otorgan subsidios gubernamentales a los biocombustibles para competir con los combustibles derivados del petróleo. Además, la agroindustria podría ser más rentable mediante la incorporación de procesos secundarios dirigidos a la producción de nuevos compuestos con valor agregado, en una biorrefinería integrada. Por ejemplo, se podría utilizar la lignina para agregar valor en comparación con su aplicación convencional en la generación de calor⁵. Un ejemplo, es la utilización de la misma como uno de los componentes del biocombustibles de aviones²⁵.

En cuanto al etanol de segunda generación, en Brasil están instaladas actualmente las plantas comerciales Bioflex-I de GranBio, en São Miguel dos Campos (AL), con una capacidad nominal de producción de 60 millones de litros/año, y de Raízen, en Piracicaba (SP), con 42 millones de litros/año. Raízen llegó a producir 20 millones de litros de bioetanol en 2019. En junio de 2021, la empresa anunció que invertirá en una nueva



planta de segunda generación, cuya capacidad de producción será de 82 millones de litros por año²⁶. La previsión es que las actividades inicien en 2023²⁷.

Las dos plantas de etanol de segunda generación existentes en Brasil adoptaron diferentes rutas tecnológicas. GranBio se basó en una ruta tecnológica llamada “stand alone”, caracterizada por una planta industrial dedicada exclusivamente a la producción de etanol de segunda generación, sin integrarse a otra de primera generación. Por otro lado, Raízen (*joint venture* entre Shell y Cosan) optó por construir una planta integrada. Una ventaja del proceso tecnológico adoptado por Raízen es la posibilidad de fermentar el hidrolizado de celulosa junto con la sacarosa, para obtener etanol proveniente de azúcares de seis carbonos, mientras que las pentosas pueden ser fermentadas aisladamente. Las dos plantas han enfrentado desafíos tecnológicos para producir el etanol de segunda generación, principalmente en la fase de pretratamiento del material²⁸.

Si bien en Brasil ha habido avances en los últimos años, aún se requieren innovaciones tecnológicas para liberar todo el potencial de la conversión de biomasa a biocombustibles y productos bioquímicos, aunque ya existen algunos ejemplos exitosos a lo largo del mundo. Por ejemplo, la empresa estadounidense “Amyris Inc.” ha desarrollado productos renovables para cosméticos (escualeno), cuidado de la salud (artemisinina) y sabores/fragancias, y la empresa brasilera “Suzano Papel e Celulose” ha desarrollado tecnologías sostenibles para la producción de papel y adhesivos derivados de la lignina (Ecolig). La producción a bajo costo de etanol de segunda generación sigue siendo un desafío a escala comercial, y empresas como Raízen y GranBio continúan esforzándose por mejorar la viabilidad económica de los procesos adoptados²⁹.

3.2 TRANSPORTE Y METABOLISMO DE D-XILOSA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

3.2.1 Permeasas

Uno de los problemas claves para el metabolismo de D-xilosa en *S. cerevisiae* es la ausencia de un transportador de D-xilosa de alta afinidad, debido a que la mayoría de los transportadores son inespecíficos y tienen mayor afinidad por otros azúcares como la



glucosa. Se han empleado dos estrategias para resolver este problema: inserción de genes heterólogos que codifiquen para transportadores de D-xilosa y la modificación por ingeniería genética de genes de transportadores ya presentes en *S. cerevisiae*^{30,31}. En *S. cerevisiae* se han identificado 18 genes que codifican para permeasas implicadas en el transporte de hexosas (*Hxt1-17* y *Gal2*)³². Algunas de estas permeasas cumplen diferentes funciones durante la fermentación alcohólica en la elaboración de vinos. Por ejemplo, *Hxt-2* está involucrado en la etapa inicial de crecimiento y *Hxt-6* y/o *Hxt-7* son requeridos en la etapa final de la fermentación alcohólica³³. Las permeasas *Hxt1*, *Hxt4*, *Hxt5*, *Hxt7* y *Gal2* pueden transportar D-xilosa, pero sus afinidades por esta pentosa son 200 veces menores en comparación con las determinadas para glucosa³². Sin embargo, se han logrado modificar los genes de transporte endógenos de *S. cerevisiae*, obteniendo cepas con mejor capacidad para transportar D-xilosa³⁴. Farwick y col. (2014) analizaron una colección de mutantes en los genes de transporte *Gal2* y *Hxt718*. La sustitución de asparagina en la posición 376 por fenilalanina en el gen *Gal2* (*Gal2-N376F*) fue la modificación más efectiva, ya que eliminó la actividad de transporte de glucosa, obteniendo una alta afinidad por D-xilosa³⁵.

3.2.2 Vías metabólicas para la asimilación de D-xilosa

Se han identificado diferentes vías metabólicas para asimilar D-xilosa. Por un lado están las rutas Weimberg³⁶, Dahms³⁷ y la ruta de pentosa no-fosforilativa^{38,39}, descritas en bacterias y arqueas, las cuales no generan intermediarios de la ruta de la pentosa fosfato (PPP). Dichas rutas forman el intermediario 2-keto-3 deoxi-xilonato, mediado por una D-xilosa deshidrogenasa y otras enzimas, que luego puede convertirse en α -cetoglutarato por la vía Weimberg o en piruvato y glicolaldehído por la ruta Dahms⁴⁰ o en glicolato^{38,39}. Por otro lado, existen otras rutas en las que la D-xilosa se convierte primero en xilulosa y luego en xilulosa-5-fosfato, un compuesto intermediario de la ruta PPP. Básicamente, se han descrito dos vías diferentes para la conversión de pento-aldosas a xilulosa: la ruta de reducción/oxidación y la de isomerización.



En levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas⁴¹ que pueden crecer utilizando pentosas como fuente de carbono, la D-xilosa se reduce primero mediante la xilosa reductasa (XR) a xilitol⁴², que a su vez se oxida a xilulosa por la xilitol deshidrogenasa (XDH). Esta vía es conocida como vía oxo-reductiva⁴³. En bacterias y algunos hongos anaerobios, la D-xilosa isomerasa (XI) es responsable de la conversión directa de D-xilosa a xilulosa. Luego, en ambas vías, la xilulosa se fosforila finalmente a xilulosa-5 fosfato por la xiluloquinasa (XK)⁴²(Figura 1). Los estudios sobre producción de bioetanol a partir de D-xilosa por *S. cerevisiae* se han centrado principalmente en estas dos vías expresadas de forma heteróloga. La expresión heteróloga de los genes que codifican para la vía oxo-reductiva (XR/XDH) de *S. stipitis*⁴⁴ y la ruta XI (gen *xylA*) de *Piromyces* sp. han sido las estrategias más comúnmente empleadas⁴⁵.

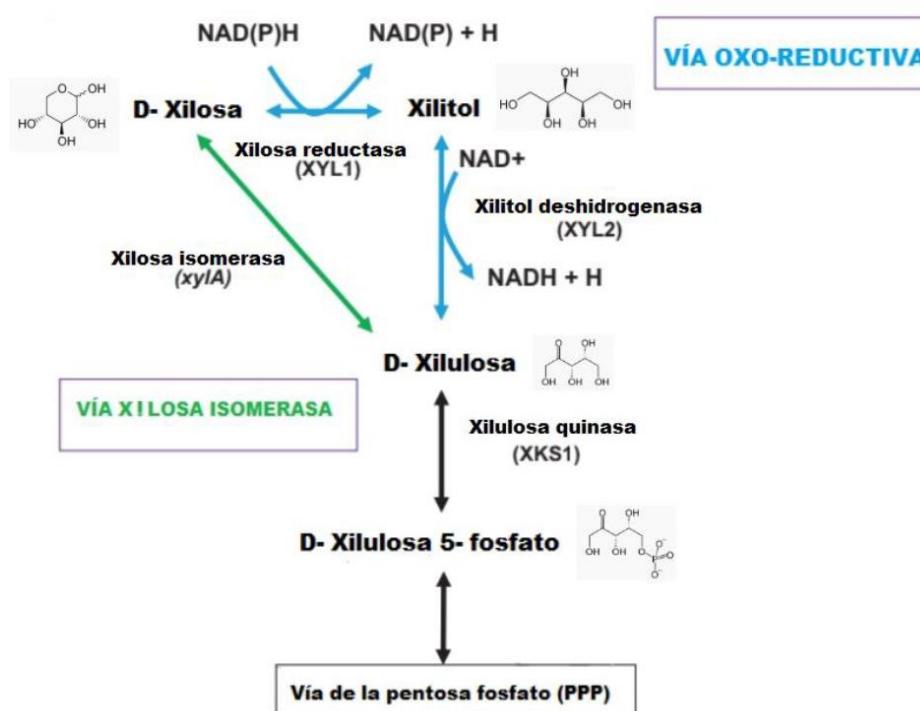


Figura 1 Vía de la D-xilosa isomerasa y vía oxo-reductiva. Figura extraída y modificada de Malan y col., 2016. La reacción específica para la vía de D-xilosa isomerasa se muestra en verde y las reacciones específicas para la ruta oxo-reductiva en azul. Las reacciones compartidas se muestran en negro. A los costados de cada compuesto intermediario se detallan las estructuras químicas de los mismos. Entre paréntesis y debajo de cada enzima, se muestra el nombre del gen que codifica para cada una.



A pesar de tener todas las enzimas de la vía oxo-reductiva, *S. cerevisiae* no puede asimilar D-xilosa y producir etanol, produciendo principalmente xilitol⁴⁶. Esta incapacidad se debe a un desbalance redox en la producción y el consumo de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) durante la conversión de D-xilosa a etanol⁴⁷. El gen *GRE3* codifica una reductasa que sintetiza xilitol a partir de D-xilosa y utiliza principalmente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cofactor. Este gen es inducible por D-xilosa. Por otro lado, el gen *XDH* codifica para la xilitol deshidrogenasa, la cual utiliza preferentemente NAD^{+41} . El NADPH requerido en el primer paso se genera en la ruta de hexosa monofosfato (HMP) por la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa⁴⁷. El problema es que, bajo estas condiciones de crecimiento, no habría una fuente renovable de NAD^{+} en *S. cerevisiae*. El NADH podría reoxidarse mediante la formación de glicerol⁴⁷. Sin embargo, la fermentación de D-xilosa en etanol requeriría la conversión de una molécula de triosa fosfato a glicerol por cada molécula de D-xilosa metabolizada. La cuestión es que no se puede metabolizar suficiente triosa fosfato para producir etanol, dando como resultado una escasez de ATP. En cambio, si las dos enzimas (XR y XDH) utilizaran el mismo cofactor, por ejemplo NADH, teóricamente se daría una retroalimentación positiva, en la cual el NADH oxidado en una reacción sería reducido en la siguiente. Además, la sobreexpresión de la xilulosa quinasa o de algunas enzimas de PPP como la transaldolasa (TAL1), transquetolasa (TKL1), L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (RPE1) y ribosa-5-fosfato isomerasa (RKI1) de *S. cerevisiae*, pueden mejorar significativamente la producción de etanol⁴⁸.

3.2.2.1 Vía Xilosa Isomerasa

La formación de xilitol y el desbalance redox pueden evitarse expresando una D-xilosa isomerasa (XI) en lugar de la vía XR-XDH. Esta vía no promovería la acumulación y excreción de xilitol⁴⁹. La expresión heteróloga y funcional de esta enzima en *S. cerevisiae* ha sido un gran desafío que requirió 16 años de investigación para obtener la primer cepa de *S. cerevisiae* que la contenga y exprese correctamente⁵⁰. Hasta la fecha solo se han reportado catorce enzimas XI que evidencian su correcta expresión en *S. cerevisiae*⁵¹. Los genes que codifican para la enzima de la ruta XI se han descrito principalmente en bacterias. Por consiguiente, los intentos iniciales para introducir y expresar la vía XI en *S.*



cerevisiae implicó el uso de genes de este origen. Sin embargo, la mayoría de ellos no tuvieron éxito debido a la dificultad para expresar de forma funcional una enzima de origen bacteriano en un eucariota³⁰. De hecho, se intentaron expresar los genes *xylA* de *Escherichia coli*⁵², *Bacillus subtilis*⁵³ o *Clostridium thermosulfurogenes*⁵⁴ en *S. cerevisiae* sin resultado, seguramente debido a una incapacidad de la levadura para expresar *xylA* o de sintetizar la enzima activa⁵⁵. El primer intento exitoso se concretó con el gen *xylA* de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* en una cepa de *S. cerevisiae* (H158(pMA91)), la cual fue capaz de producir 1,3 g/L de etanol con un consumo de 10.4 g/L de D-xilosa⁵⁵. Además, se ha demostrado que la optimización de codones mejora el rendimiento de las vías heterólogas de D-xilosa isomerasa en *S. cerevisiae*, logrando un aumento significativo en el rendimiento de etanol y la productividad específica del mismo⁴². Por otro lado, la evolución dirigida también es una estrategia efectiva para mejorar la expresión de la ruta XI en *S. cerevisiae*³⁰. Cuando se combinó la expresión XI de *Piromyces* sp. (hongo) en plásmidos de copias múltiples con extensos protocolos de evolución, se obtuvo una cepa de *S. cerevisiae* recombinante (RWB202-AFX) capaz de fermentar D-xilosa. En los ensayos, la cepa recombinante logró producir 8,4 g/L de etanol con un consumo de 20 g/L de D-xilosa aproximadamente⁵⁶. Esta cepa superó ampliamente en cuanto a producción de etanol a la cepa H158(pMA91) que contenía el gen *xylA* de la bacteria termófila *T. thermophilus*. Por otro lado, en nuestro laboratorio, diseñamos una cepa de *S. cerevisiae* recombinante derivada de la cepa industrial CAT-1 (diploide), capaz de producir 6,78 g/L de bioetanol a partir de 18,25 g/L de D-xilosa a través de la vía XI, debido a la transferencia del gen *xylA* del hongo *Piromyces* sp. clonado en un plásmido (entre otros genes). La construcción y el fenotipo de esta cepa se encuentran descritos en la sección Antecedentes.

3.3 ESTRATEGIAS DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR

La manipulación genética de las cepas industriales de *S. cerevisiae* representa un desafío debido a su condición diploide o incluso poliploide⁵⁷. En las cepas de laboratorio haploides, los genes individuales pueden alterarse y los mutantes resultantes pueden seleccionarse y estudiarse fácilmente. Esto es difícil de lograr en cepas industriales que a



menudo exhiben aneuploidía, debido a que las copias del gen a inactivar están presentes en múltiples alelos⁵⁸. La estrategia de depleción basada en el reemplazo del alelo objetivo con un cassette (amplificado previamente por PCR) que contiene un marcador de selección, se basa en varios procesos laboriosos de selección y depende de la disponibilidad de un marcador de selección apropiado⁵⁹. Para las cepas industriales, este procedimiento lleva mucho tiempo y, a veces, incluso no es factible. Un sistema de edición genética que ofrece varias características ventajosas en comparación con el método anteriormente mencionado y con otros métodos convencionales, como por ejemplo dedos de zinc o TALEN (nucleasa de actividad similar a activador de transcripción), es CRISPR-Cas (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas asociadas a la nucleasa Cas, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)⁶⁰. Dicho sistema funciona como sistema inmunitario en algunas bacterias y arqueas.

CRISPR-Cas se compone de un repertorio de pequeños ARNs que reconocen por homología secuencias de ADN invasor y guían un complejo enzimático para degradarlo. Dicho sistema inmune funciona en tres pasos: adaptación, expresión e interferencia. La etapa de adaptación implica el reconocimiento y la escisión de un protoespaciador (pequeño fragmento de ADN invasor) por parte de los genes Cas. La posterior inserción (adquisición) de ADN extraño en el *locus* CRISPR también se denomina adquisición de espaciadores o inmunización. La etapa de expresión refiere a la expresión de genes Cas y sus proteínas accesorias que conducen a la transcripción de la matriz CRISPR, una molécula de ARN larga llamada ARN precursor (pre-crARN). Una vez sintetizado el ARN precursor, las proteínas Cas y otros factores procesan dicha molécula para formar una molécula de ARN más corta llamada crARN maduro. En la etapa de interferencia final, este crARN maduro y otras proteínas Cas reconocen el ácido nucleico extraño y lo destruyen. Esto también se conoce como la etapa de inmunidad. Tanto la etapa de expresión como la de interferencia ocurren de manera diferente en cada uno de los sistemas CRISPR. En los sistemas de tipo I, la enzima Cas6e/Cas6f corta la unión del ARN monocatenario (ssARN) y el ARN bicatenario (dsARN) que se encuentran en forma de horquilla. En sistemas de tipo II participan ARN transactivadores (tracr), escindidos por Cas9 y RNaseIII, para formar dsARN en forma de horquilla. Los sistemas de tipo III utilizan



la enzima homóloga Cas6 para la escisión de los ARN y no requieren de la formación de horquillas⁶¹.

En el 2012, Jinek M. y col. demostraron que el sistema CRISPR-Cas podía programarse para cortar ADN *in vitro*⁶². Por otro lado, Cong L. y col. en el año 2013, adaptaron con éxito el sistema CRISPR-Cas9 (de tipo II) para la edición del genoma de células eucariotas⁶³. A modo de resumen y a grandes rasgos, la edición de ADN mediada por CRISPR requiere de dos componentes: una enzima Cas9 capaz de expresarse y localizarse en el núcleo celular del organismo de interés, y un ARN guía (ARNg), el cual debe imitar la estructura de horquilla característica del crARN de tipo II, con una secuencia homóloga a la región *target* de interés. Esta secuencia espaciadora debe estar localizada inmediatamente en el extremo 5' de un PAM. Las secuencias PAM son secuencias cortas de ADN específicas (3-5 pb) que son reconocidas por las diferentes endonucleasas Cas en el ADN a invadir o a editar. El reconocimiento por parte de la enzima Cas, junto con la unión del ARNg al ADN objetivo resulta en la escisión de dichas hebras de ADN. La endonucleasa Cas9 frecuentemente utilizada proviene de *Streptococcus pyogenes*⁶⁴. La secuencia PAM es muy importante para los sistemas de tipo I y II. En el caso del sistema de tipo II, en *S. pyogenes*, la secuencia PAM es NGG.

Existen dos tipos de ediciones que pueden llevarse a cabo utilizando CRISPR-Cas9, que se diferencian entre sí por el uso o no de un ADN donante y por el tipo de sistema de reparación propio del organismo que se activa luego del corte. NHEJ (*Non Homologous End Joining*) es un tipo de mecanismo de reparación del ADN capaz de introducir errores en la doble hebra. Una vez que se produce el corte mediado por Cas9, este mecanismo vuelve a unir los extremos de la doble hebra cortada y en el proceso insertan o eliminan bases al azar. Estas inserciones o deleciones pueden causar el silenciamiento del gen objetivo. Por otro lado, el mecanismo de reparación conocido como HDR (*Homology Directed Repair*), necesita de un ADN donante para reparar la doble hebra que se ha cortado. Dicho ADN donante debe poseer regiones de homología contiguas a la región del corte en cada extremo. Al co-transformar el sistema el sistema CRISPR-Cas9 junto con un ADN donante, pueden realizarse inserciones dirigidas a cualquier lugar del genoma con cualquier tipo de marcador o incluso sin la necesidad de marcadores de selección.



3.4 ANTECEDENTES DEL PROYECTO: CEPAS DE ESTUDIO

Este estudio se focalizó en la cepa diploide *S. cerevisiae* CAT-1⁶⁵ comercializada por Fermentec, ampliamente utilizada a nivel industrial en Brasil y Uruguay para la producción de etanol. En nuestro país es una de las utilizadas por la empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR). La cepa CAT-1 fue previamente modificada en nuestro laboratorio para expresar, de forma independiente, las dos vías de catabolismo de D-xilosa mencionadas previamente: oxo-reductiva (XR / XDH) y la vía de D-xilosa isomerasa (*xyIA*).

Se construyeron dos cepas recombinantes derivadas de *S. cerevisiae* CAT-1: CAT-1-XRT y CAT-1-XIT, obtenidas por inserción a nivel cromosomal, de genes involucrados en la asimilación y transporte de D-xilosa. Se insertó 1 bloque en cada alelo del gen *GRE3*, que codifica para la D-xilosa reductasa de *S. cerevisiae*, los bloques detallados en la Figura 2, generando así la eliminación de la mayor parte del gen. Todos los bloques de genes estaban flanqueados por 300 nucleótidos idénticos a alguna parte del gen *GRE3*, lo que permitió la inserción de los bloques por recombinación homóloga a partir de ADN lineal. Todos los bloques contenían un gen de resistencia a antibiótico flanqueado por regiones lox, lo que permitió la selección de los recombinantes y posterior eliminación de los genes de resistencia mediante la expresión de la recombinasa sitio específica Cre⁶⁶. La cepa de interés para este trabajo es la cepa CAT-1-XIT, la cual contiene dos bloques de ADN insertos en cada alelo *GRE3*, los bloques 2 y 3 (Figura 2). El bloque 3 contiene el ORF del gen heterólogo que codifica la D-xilosa isomerasa de *Streptomyces coelicolor* (*xyIA*, representado en la figura como XI) con uso de codones optimizado para la levadura) y el ORF del gen propio *XKS1*, que codifica para la xilulosa quinasa (Figura 2). Este bloque tiene las regiones que recombinan con el alelo *GRE3* ubicadas en los extremos del gen, de modo de eliminar la mayor parte de este. El bloque 2 se compone de la región codificante del gen *Gal2* (transportador mutado en N376F¹⁸) y el ORF de uno de los genes de la vía PPP de *S. cerevisiae*, *TAL1*, que codifica una transaldolasa. Este bloque (2) se encuentra flanqueado por regiones idénticas al gen *GRE3* de la levadura, que recombinan en una zona interna a la que recombina el bloque 3, evitando así la pérdida de este último. Cabe mencionar que las secuencias de los genes heterólogos (XR, XDH y *xyIA*) extraídas de la base de datos GenBank, fueron optimizadas para el uso de codones de *S. cerevisiae*.

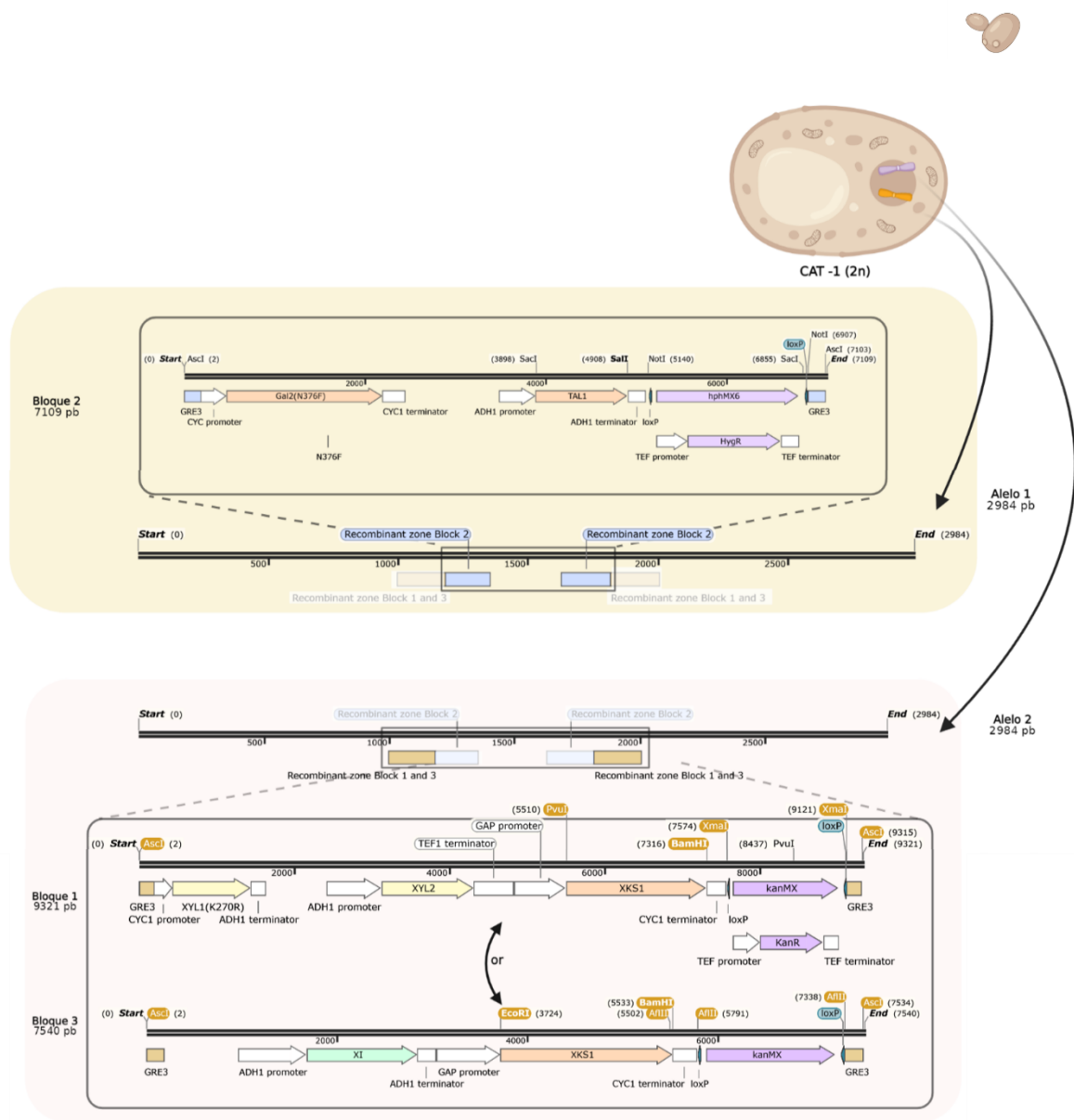


Figura 2: Bloques con genes en tándem insertos en los alelos GRE3 de las cepas CAT-1 mutantes

Estos bloques fueron sintetizados por la empresa GeneCust (Luxemburgo). Los promotores utilizados en cada gen fueron elegidos específicamente (Figura 2). Las regiones codificantes de los genes *XKS1* y *TAL1* provenientes de *S. cerevisiae* S288c, el gen *kanMX* de resistencia a Geneticina (G418) contenido en el plásmido pUG652 y el gen *hph* de resistencia a higromicina contenido en el plásmido pUG7553, se amplificaron por PCR y se clonaron dentro de los bloques en sitios de restricción especialmente diseñados para tal propósito. Una vez insertados estos genes, los bloques quedaron completos. El bloque 3 (vía D-xilosa isomerasa) se integró en primer lugar. Los clones recombinantes se seleccionaron por resistencia a G418. En una segunda instancia se transformó con el bloque 2 que tiene el gen de resistencia a higromicina. Como resultado, los clones



transformantes se seleccionaron por ser simultáneamente resistentes a G418 y a higromicina. Una vez seleccionados los clones recombinantes, se extrajeron los genes de resistencia a antibióticos empleando el sistema Cre/lox. El gen de resistencia antibiótica de cada bloque se encontraba flanqueado por regiones lox. Las secuencias lox consisten en dos repeticiones directas de 34 pb, las cuales son reconocidas por la recombinasa sitio específica Cre⁶⁷. Para ello, se incorporó el plásmido pSH66 que porta el gen Cre bajo el control del promotor GAL1 inducible por galactosa⁶⁸. La expresión de Cre se indujo incubando las levaduras en un medio que contenía galactosa⁶⁷ y se verificó la pérdida de la resistencia a los antibióticos y del plásmido. Estas cepas no lograron crecer en D-xilosa de forma apreciable, aún después de los ensayos de evolución. Estimando que el fenotipo obtenido se debía a la baja o nula expresión de los genes heterólogos incorporados, en mi tesis de grado nos centramos en la vía XI construyendo un plásmido de alto número de copias (pRS42K:XI) con el gen *xylA* de *Piromyces* sp., precedido por el promotor fuerte pTPI1 y seguido por el terminador tCYC1⁶⁶. Este plásmido se transfirió a las cepas CAT-1, CAT-1-XRT y CAT-1-XIT para evaluar el fenotipo final. Los clones resultantes se sometieron a un protocolo de evolución de 10 subcultivos en un medio definido MM con presión selectiva. Se determinó la biomasa generada, el consumo de D-xilosa y la producción de etanol en cultivos de las diferentes cepas, incubados durante 72 horas a 30°C. Las cepas que portaban el gen *xylA* de *S. coelicolor* en su genoma (Bloque 3-Bloque 2) y el plásmido multicopia, pRS42K::XI, mostraron diferencias significativas, tanto en la producción de etanol como en el consumo de D-xilosa, en comparación con CAT-1. Además, los clones contenidos en el cultivo de CAT-1-XIT(pRS42K: XI)(10mo paso de evolución) superaron con creces la producción de etanol y el consumo de D-xilosa en comparación con el resto. En un ensayo comparativo entre las cepas construidas, CAT-1-XIT(pRS42K::XI)(10mo paso de evolución) produjo 6,8 g/L de etanol, consumiendo el 91% del total de D-xilosa presente en el medio YP(1/5)X (20 g/L). El rendimiento de etanol ($Y_{EtOH/Xil}$) de esta cepa fue 0,40 g/g. Por otro lado, estos clones cultivados en MM 20 g/L de D-xilosa produjeron una menor concentración de etanol (2.6 g/L), consumiendo solo el 30% del total de D-xilosa, pero alcanzando un mayor rendimiento de etanol (0.45 g/g). En cualquier caso, cabe señalar que tanto los medios MM como YP(1/5)X contienen otros componentes que pueden utilizarse como fuentes de carbono fermentables⁶⁹. Por lo tanto, aunque estos sustratos carbonados se encuentren presentes en cantidades bajas, estos rendimientos



no pueden asignarse específicamente a la D-xilosa. En cuanto a la biomasa, en ambos medios no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos. Cabe señalar que la productividad ($g_{\text{Etanol}}/L.h$) de etanol fue baja en las condiciones de cultivo ensayadas, las cuales no eran óptimas. Además, el uso de antibióticos no es deseable en la industria por costos y contaminación ambiental. Es por esto que en este trabajo de tesis se buscó solucionar dichos inconvenientes.

3.5 ESTADO DE ARTE

En el marco de esta línea de trabajo, nuestro grupo de investigación construyó previamente una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (a partir de la cepa industrial diploide CAT-1), capaz de producir bioetanol a partir de D-xilosa, aunque con baja productividad. En este proyecto se espera diseñar una cepa recombinante derivada de la cepa industrial CAT-1, capaz de fermentar D-xilosa y glucosa en presencia de hidrolizado de lignocelulosa y sin requerimientos de selección (antibióticos). Para lograrlo se decidió insertar varias copias del gen que codifica D-xilosa isomerasa (XI) de *Piromyces* sp., en genes cuya mutación se espera que promuevan o no afecten la producción de etanol. Algunos de los genes afectados son:

- *PHO13*: Este gen codifica para una p-nitrofenilfosfatasa. De acuerdo con estudios previos, el efecto tóxico de la sobreexpresión de xilulosa quinasa durante la fermentación de xilosa se puede aliviar mediante la interrupción de *PHO13*⁷⁰.
- *ISU1*: XI es una metaloenzima que requiere hierro como cofactor. Los estudios previos indican que la interrupción de *ISU1* aumenta los niveles de hierro mitocondrial y reduce la actividad de la enzima aconitasa $[4Fe-4S]$ ⁷¹.
- *APJ1*: Aunque este gen no se ha asociado directamente con la tolerancia al etanol, su eliminación mejora la tolerancia al mismo^{72,73}.
- El acetato es un subproducto que resulta de la fermentación de D-xilosa. Este compuesto tiene efectos negativos sobre las levaduras y afecta el rendimiento de producción de etanol. La eliminación de la enzima aldehído deshidrogenasa (*ALD6*) reduce la generación de acetato^{74,75}.



- *XYL2*: Codifica a la enzima xilitol deshidrogenasa presente en la vía oxo-reductiva de metabolismo de xilosa.
- *TY*: Retro-transposón que cuenta con más de 80 copias en el genoma de *S. cerevisiae*.

Mutar los *PHO13*⁷⁰, *APJ1*^{72,73}, *ISU1*⁷¹ y *ALD6*^{74,75} incrementa la producción o tolerancia al etanol, mientras que la expresión del gen *XYL2*, presumimos que es inútil, ya que la ruta oxo-reductiva está inactiva en la cepa a modificar. Por último, *TY* es un *target* que permite la integración de varias copias del gen *XylA* en el genoma utilizando un único ARN guía.

4 OBJETIVO GENERAL

Diseñar una cepa recombinante derivada de la cepa industrial CAT-1, capaz de fermentar D-xilosa y glucosa en presencia de hidrolizado de lignocelulosa a niveles económicamente viables y sin requerimientos de selección.



5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener una cepa recombinante de *S. cerevisiae* conteniendo varias copias del gen *xylA* de *Piromyces* sp.⁴⁵ a nivel cromosomal, capaz de producir etanol por fermentación de D-xilosa.
- Asociar la incorporación del gen *xylA* con la eliminación de la totalidad o alguno de los genes *PHO13*⁷⁰, *APJ1*^{72,73}, *ISU1*⁷¹, *ALD6*^{74,75}, *Ty*^{76,77} y *XYL2*⁴² en esa cepa, hasta alcanzar niveles de producción de etanol industrialmente aceptables.
- Obtener cultivos de la cepa recombinante capaces de producir bioetanol en un medio con glucosa, D-xilosa e hidrolizado de lignocelulosa, mediante una estrategia de propagación.



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CEPAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En la Tabla 1 se describen los microorganismos y los plásmidos utilizados en este trabajo.

Escherichia coli se cultivó en medio rico LB⁷⁸ (diluído al medio) a 37°C. Cuando se utilizó caldo LB para el crecimiento, los cultivos se incubaron en un agitador orbital New Brunswick Scientific, modelo Excella E24 (EE.UU.) ajustado a 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se incorporó 18g/L de agar.

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron a 30°C en el medio YPD⁷⁹, exceptuando los ensayos de producción que se hicieron en medio YPX. La composición de los medios se describe en el Anexo. Cuando se utilizó medio de cultivo líquido, éstos se incubaron en un agitador orbital New Brunswick Scientific, modelo Innova[®]43 (EE. UU.), ajustado a 220 rpm. Para preparar los cultivos en medio sólido se incorporó 18g/L de agar. Los medios se prepararon sin la fuente de carbono y esterilizaron por autoclave. La fuente de carbono se preparó como solución stock a una concentración de 200 g/L, se autoclavó y se agregó al medio estéril en una concentración de 20 g/L.

Las soluciones *stock* de antibióticos, Ampicilina (Amp), Kanamicina (Kan), Cloramfenicol (Cm), se prepararon a una concentración de 50 mg/mL y Geneticina (G418) a 200 mg/mL. Todos los antibióticos se esterilizaron por filtración con filtros PES Syringe Filter (0.45µm) de Starlab Scientific (China), se alicuotaron en tubos de microfuga y se almacenaron en freezer a -20°C hasta su utilización. Estas soluciones se adicionaron a los medios de cultivo estériles antes de inocularlos, a una concentración final de 50 µg/mL para Kan o Cm y 200 µg/mL para G418. El antibiótico empleado se indica en cada caso.

En el caso del Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), el mismo se disolvió en dimetilformamida (DMF). Se partió de una solución stock de 20 mg/mL y se adicionó a los medios de cultivos estériles a una concentración final de 20 µg/mL.

Todas las cepas obtenidas en este trabajo se almacenaron a -80°C en tubos de 1,5 mL conteniendo 0,6 mL de suspensión celular crecida durante toda la noche en medio líquido



YPD con el antibiótico adecuado (en caso de ser necesario) y 0,4 mL de solución de glicerol estéril (50%), como fuente de respaldo por períodos prolongados.

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo

Características relevantes		Referencia
Cepa Bacteriana		
<i>Escherichia coli</i> TOP10	<i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R)	Invitrogen, USA
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
CAT -1	Cepa diploide utilizada para la producción industrial de bioetanol	65
CAT-1-XIT (pRS42K::XI)	Δ <i>GRE3</i> :: <i>XYLA</i> , <i>XKS1</i> /Δ <i>GRE3</i> :: <i>Gal2</i> , <i>TAL-1</i> . Con el plásmido pRS42K::XI. Evolucionada en medio MM (10 pasajes).	69
CAT-R	Cepa CAT-1-XIT (pRS42K::XI) curada del plásmido pRS42K::XI	Este trabajo
Plásmidos		
pAKX002	Plásmido <i>shuttle</i> con el promotor pTPI1, el gen <i>xylA</i> , que codifica para XI de <i>Piromyces</i> sp. y el terminador tCYC1. Amp ^R , URA3, 2μ ori.	80
pRS42K::XI	Vector pRS42K (Vector <i>shuttle</i> de alto número de copias, Amp ^R y Kan ^R , 2μ ori) que contiene el promotor pTPI1, el gen <i>xylA</i> de <i>Piromyces</i> sp. y el terminador tCYC1 insertados en el sitio de restricción <i>EcoRV</i> interrumpiendo el gen α- <i>lacZ</i> .	69
pCAS	Vector <i>shuttle</i> que expresa la enzima Cas9 de <i>S. pyogenes</i> . Promotor RNR2 y la señal terminadora. Además, el vector recrea la horquilla característica del crARN maduro de	81



CRISPR de tipo II, seguida por el guía seleccionado.		
pBluescript II SK(-) 2961 pb (pSKII)	Vector de expresión para bacterias. Este vector se utilizó para introducir los ADN donantes mediante la escisión del sitio <i>EcoRV</i> , interrumpiendo a su vez el gen α - <i>lacZ</i> .	82
pSKII:: <i>pho13</i> - <i>XylA</i> - <i>pho13</i>	Vector pSKII que contiene el promotor pTPI1, el gen <i>xylA</i> de <i>Piromyces</i> sp. y el terminador tCYC1 flanqueado por dos zonas homólogas al gen <i>PHO13</i> de <i>S. cerevisiae</i> 50 pb cada una insertados en el sitio de restricción <i>EcoRV</i> interrumpiendo el gen α - <i>lacZ</i> .	

6.2 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DEL *POOL* DE CÉLULAS DE LA 10^{MA} EVOLUCIÓN CAT-1 XIT (PRS42K::XI) Y CURADO DEL PLÁSMIDO (PRS42K::XI)

El objetivo de esta actividad fue aislar del “*pool*” de células de la 10^{ma} evolución de CAT-1-XIT(pRS42K::XI), los clones con mejor “*performance*” de crecimiento y producción de etanol.

Se partió de un cultivo primario en un tubo con tapa rosca con septo de capacidad de 30 mL, con 4 mL de YPX y G418. Este tubo se inoculó con 20 μ L de una suspensión stock refrigerada a -80°C de la comunidad de células CAT-1 XIT(pRS42K::XI). El tubo fue incubado a 30°C con agitación orbital. Luego de 48 horas (hs), se prepararon diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000) y se sembraron 200 μ L de las últimas 3 diluciones, mediante rastrillado, en placas con YPX agar G418. Las mismas se incubaron a 30°C. Luego de las primeras 24 hs de incubación se marcaron las colonias aisladas que presentaban mayor crecimiento y se continuó con la incubación a 30°C. A las 48 hs se seleccionaron 28 colonias (24 de ellas colonias anteriormente marcadas) y se aislaron en placas con YPX agar y G418, manteniendo las condiciones de incubación.



6.2.1 Consumo de D-xilosa y producción de etanol

Para seleccionar la cepa con la que se continuó trabajando se evaluó el consumo de D-xilosa y la producción de etanol de cada clon previamente aislado. Se realizaron ensayos de fermentación en YP(1/5) con D-xilosa 20g/L [YP(1/%)X] y G418 en tubos con tapa rosca con septo (capacidad total del frasco 30 mL).

Se inocularon cultivos primarios conteniendo 20 mL de YPX y G418 de cada clon aislado y se incubaron durante 48 hs a 30°C con agitación orbital. A partir de estos cultivos se inocularon frascos conteniendo 20 mL de YP(1/5)X y G418 a una DO_{600nm} inicial de 0,5 (para todos los cultivos). Los ensayos se efectuaron por triplicado para cada una de los clones aislados y seleccionados (10 clones totales). Se colectaron muestras a las 0 y 72 hs para determinar las concentraciones de D-xilosa y etanol en el medio de cultivo.

6.2.1.1 Determinaciones analíticas de la concentración de D-xilosa y etanol

Las determinaciones de D-xilosa y etanol se realizaron en el Departamento de Bioingeniería (Facultad de Ingeniería, UdelaR), mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción (HPLC-IR, marca Shimadzu, Japón), equipado con una columna Aminex 87H (Bio-Rad, EE.UU.) y empleando ácido sulfúrico 0,05 N como fase móvil. El flujo de corrida fue de 0,6 mL por minuto a 35°C. Se realizaron dos curvas estándar, una para D-xilosa (concentraciones entre 0,1 g/L y 0,4 g/L) y otra para etanol (concentraciones entre 0,25 g/L y 4 g/L). Los sobrenadantes obtenidos en los ensayos de producción se diluyeron de acuerdo a las curvas de calibración empleadas y se filtraron con filtros descartables con tamaño de poro 0,2 μ m. Se calculó la concentración de D-xilosa consumida (X_{ilc}) para cada caso ($X_{ilfinal} - X_{ilinitial}$) y la concentración de etanol producida.

6.2.1.2 Ensayos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Infostat usando ANOVA. Los datos que cumplieron con los supuestos para el modelo ANOVA, se compararon usando el test de Tukey. En caso de no cumplir con los supuestos del ANOVA, se realizó el test no paramétrico Kruskal Wallis. En todos los casos se usó un p-valor < 0.05.



6.2.2 Curado del plásmido pRS42K::XI

Para curar del plásmido pRS42K::XI al clon CAT-1 XIT (pRS42K::XI), seleccionado en los ensayos de fermentación, se inoculó a partir de una colonia única, un cultivo primario conteniendo 20 mL de YPD. Este cultivo se incubó durante 48 hs a 30°C con agitación orbital. Se realizaron 5 pasajes sucesivos de las células en 20 mL de caldo YPD, sin presión antibiótica, en tubos de tapa rosca con septo cada 24 hs. Dicho pasaje se realizó inoculando 200 µl del cultivo anterior al siguiente.

A partir del 5^{to} cultivo, se transfirió un volumen de 100 µl de una dilución 1/10⁵ de la suspensión celular a placas con medio YPD sólido. Las placas se incubaron durante 48 hs a 30°C. Luego, se transfirieron 96 colonias en dos placas de YPD sólido.

Se realizó un ensayo de crecimiento durante 48 hs a 30°C de dichas cepas en medio sólido YPD con y sin presión selectiva por agregado de antibiótico (G418). Se utilizó el *replica plate* para transferir las 96 células de la placa con antibiótico a la placa sin G418 (con el objetivo de asegurar que la ausencia de crecimiento en la placa YPD G418 se deba a la ausencia de resistencia antibiótica de la cepa y no a falta de material en el *replica plate*). Se seleccionaron los clones que crecieron solo en la placa de YPD.

Para confirmar la pérdida del gen de resistencia, e indirectamente del plásmido, se amplificó mediante PCR el gen que codifica para la resistencia a G418 partir del lisado de los clones seleccionados (protocolo en Anexo). Para esto, se usaron los cebadores G418 F4 y G418 R4 previamente diseñados usando el software Primer- Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Estos cebadores, sintetizados en Macrogen (República de Corea), amplifican un fragmento de 1714 pb a partir del plásmido pRS42K::XI. Las secuencias de los cebadores utilizados son: G418 F4 5' TTGGGAGCTCTCGGGGCTGGCTTAACTATG 3' (desde la posición 8616 pb a la 8636 pb del plásmido pRS42K::XI), y G418 R 5' ACGTGAGCTCTCGCCCTGATAGACGGTTTT 3' (desde la posición 1654 pb a la 1666 pb del plásmido pRS42K::XI). Las reacciones se realizaron en un volumen final 25 µl, conteniendo 12,5 µL de MangoMix (BIOLINE, UK), 1 µL de cada cebador (10 µM), 9,5 µL de agua ultrapura y 1 µL de lisado de células (Protocolo en el Anexo). Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). Los programas empleados consistieron en una etapa inicial de 2 minutos (min) a 95°C; seguida por 35



ciclos de: 95°C durante 30 segundos (seg), 60°C durante 30 seg, 70°C durante 1,30 min. La reacción culminó con una etapa final a 70°C durante 5 min.

Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1% TAE 1X para verificar si los tamaños de los fragmentos amplificados coincidían con lo esperado (Anexo). Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de Thermo Scientific, EE.UU (0.1 µg/µl).

La levadura resultante se nombró CAT-R.

6.3 CRISPR-Cas9

El objetivo de esta actividad fue diseñar un sistema de edición genética capaz de insertar varias copias del gen *xylA* de *Piromyces* sp. en el genoma del clon aislado en la etapa anterior, aprovechando simultáneamente la depleción de los genes *PHO13*, *XYL2*, *Ty*, *ALD6*, *ISU1* y *APJ1*.

En este trabajo se seleccionó el sistema de edición genética CRISPR-Cas9. Tal como se desarrolló en la introducción, este sistema consta de dos componentes principales: una nucleasa Cas9 y un ARN que guía a dicha enzima (ARNg) unido a un ARN estructural que forma una horquilla característica. La enzima Cas9, guiada por el ARNg, reconoce un sitio PAM presente en el genoma y corta el ADN a modificar; por recombinación homóloga se inserta, en dicha región, el gen de interés (que presenta colas de homología con el gen *target*).

6.3.1 Diseño del ARNg

Se extrajeron las secuencias de los genes *PHO13*, *XYL2*, *Ty*, *ALD6*, *ISU1* y *APJ1* de la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae* (SGD, <https://www.yeastgenome.org/>). Se utilizó el software <http://chopchop.cbu.uib.no/> para diseñar diversos ARNg para cada gen y posteriormente se verificó la especificidad de cada ARNg con el gen *target*. Dicha especificidad se evaluó mediante BLAST contra el genoma completo de *S. cerevisiae* S288C, depositado en la base de datos de NCBI. Se seleccionaron los ARNg cuya secuencia *seed* (8 primeros pares de bases después del sitio PAM NGG) coincidió únicamente con el gen de interés y el cromosoma en el que el mismo se encuentra. A partir de los ARNg seleccionados, se eligieron 6 ARNg (uno por gen *target*) en base a los siguientes criterios:



GC 40-80%, longitud (20 pb), menor cantidad de pegado inespecífico, proximidad a la región N-terminal del gen^{58,83}. Además, se corroboró la presencia de secuencias PAM(NGG) en los genes *target* (Tabla 2).

Tabla 2: ARNg diseñados para los genes target

Gen target	Secuencia 5'3'
<i>PHO13</i>	TGGCATTCTCATCTAATAGG
<i>RXYL2</i>	GCAGAGCCTTGCGTTCGAGC
<i>Ty</i>	TGTCATATCAGAGTCCGCTG
<i>ALD6</i>	CAGCCAACTTACTTAGTAGA
<i>ISU1</i>	CTAGTGGGTGCGCCAGCGTG
<i>APJ1</i>	GTCTTGCTTCATTAAGGAG

Se confirmó la presencia de todos los ARNg (Anexo) y una de las zonas de homología en los genes amplificados.

6.3.2 Obtención del plásmido pCAS con el ARNg: RF Cloning

Se utilizó el vector pCAS para introducir el sistema CRISPR dentro de la levadura CAT-R y así incorporar el gen *xylA* de *Piromyces* sp. en el cromosoma, eliminando a su vez los genes *target* o diana (Figura 3). Este vector tiene un origen de replicación para bacterias y otro para levaduras, por lo que puede ser utilizado para transformar células de *Escherichia coli* y *S. cerevisiae*. El plásmido posee un marcador de selección *kanMX*, que le otorga resistencia a kanamicina a *E. coli* y a geneticina (G418) al replicarse en *S. cerevisiae*. Dicho vector expresa la enzima Cas9 de *S. pyogenes*. El gen se expresa bajo el control del promotor RNR2 (promotor del gen ribonucleótido difosfatoreductasa), posee fusionada al extremo 3' una señal de localización nuclear del antígeno T grande del *Papovirus* SV40 y la señal terminadora del gen *CYC1* (Citocromo c isoforma 1). Además, el vector contiene una secuencia 3' conservada, que recreará la horquilla característica del crARN maduro de CRISPR de tipo II. La misma está seguida por una secuencia de 20 pb sustituible por el guía seleccionado, la secuencia codificante para la ribozima del virus de la hepatitis D, y por último, en el extremo 5', la secuencia codificante para el tARN fenilalanina.

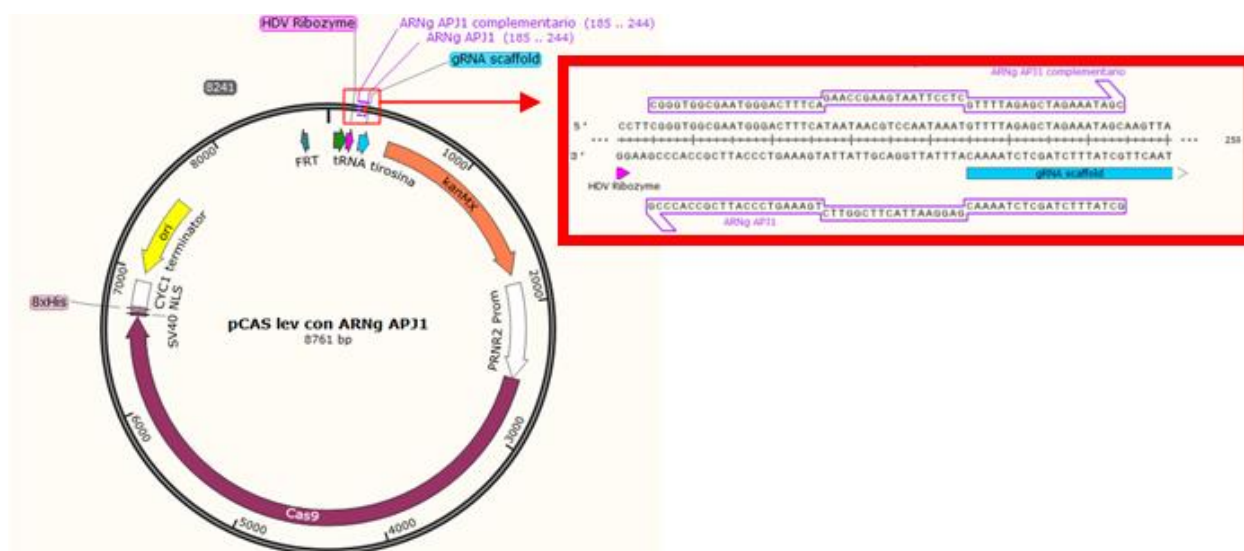


Figura 4: Diseño del megaprimers para insertar el ARNg en el plásmido pCas por la técnica RF Cloning. Se ejemplifica con los cebadores diseñados que contienen el ARNg para APJ1.

Tabla 3: Megaprimers diseñados para insertar cada ARNg en el plásmido pCAS por la técnica RF-Cloning. En rojo se resalta la secuencia correspondiente a cada ARNg de los genes target. En negro se observan las secuencias que hibridan con el plásmido pCAS.

Cebadores con ARNg y homología a pCAS	Secuencia 5'3'
RF.ARNgc.ALD6_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT CAGCCAACTTACTTAGTAGA GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.ALD6_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC TCTACTAAGTAAGTTGGCTG AAAGTCCCATTCGCCACCCG
RF.ARNgc.Ty_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT TGTCATATCAGAGTCGCTG GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.Ty_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC CAGCGGACTCTGATATGACA AAAGTCCCATTCGCCACCCG
RF.ARNgc.Xyl2_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT GCAGAGCCTTGCCTTCGAGC GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.Xyl2_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC GCTCGAACGCAAGGCTCTGC AAAGTCCCATTCGCCACCCG
RF.ARNgc.Pho13_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT TGGCATTCTCATCTAATAGG GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.Pho13_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC CCTATTAGATGAGAATGCCA AAAGTCCCATTCGCCACCCG
RF.ARNgc.Apj1_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT GTCTTGGCTTCATTAAGGAG GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.Apj1_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC CTCCTTAATGAAGCCAAGAC AAAGTCCCATTCGCCACCCG
RF.ARNgc.Isu1_F	CGGGTGGCGAATGGGACTTT CTAGTGGGTGCGCCAGCGTG GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
RF.ARNgc.Isu1_R	GCTATTTCTAGCTCTAAAAC CACGCTGGCGCACCCACTAG AAAGTCCCATTCGCCACCCG



Para optimizar la reacción de PCR se realizaron distintas reacciones de PCR en un gradiente de temperatura (54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C) con los cebadores que contienen el ARNg para el gen *APJ1*. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0,5 µL de High-Fidelity Velocity DNA polymerase (BIOLINE, MERIDIAN Bioscience, UK), 10 µL de 5X Hi-Fi *Reaction Buffer*, 1,7 µL de dNTP's (10 mM), 2,25 de DMSO, 2,5 µL de cada cebador (10 µM), 28,55 µL de agua ultrapura y 1 µL de una dilución 1/5 de una miniprep del plásmido pCAS. Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). EL programa empleado consistió en una etapa inicial de 2 min a 95°C; seguida por 35 ciclos de: 95°C durante 30 seg, temperatura variable (°C) durante 30 seg, 70°C durante 5 min. La reacción culminó con una etapa final a 70°C durante 5 min.

Para cada gen *target* se obtuvo un plásmido pCAS con el ARNg específico para cortar el gen objetivo. Para la reacción de PCR se realizaron dos aproximaciones: La primera consiste en una única reacción de amplificación a una temperatura de 56°C. La segunda aproximación consiste en dos reacciones de amplificación independientes por cebador de 30 ciclos cada una y luego un paso posterior de amplificación, de 8 ciclos, empleando la mezcla de estos dos productos de reacción en un único tubo (modificación sugerida por la Dra. Sonia Rodríguez). La reacción de PCR de la primer etapa se efectuó en un volumen final de 20 µL, conteniendo 0,2 µL de High-Fidelity Velocity DNA polymerase (BIOLINE, MERIDIAN Bioscience, UK), 4 µL de 5X Hi-Fi *Reaction Buffer*, 0,68 µL de dNTP's (10 mM), 0,9 µL de DMSO, 1 µL de un solo cebador (10 µM), 11,72 µL de agua ultrapura y 1 µL de una dilución 1/5 de una miniprep del plásmido pCAS. La segunda reacción PCR consistió simplemente en unir las reacciones de juegos de primers (quedando en un volumen final de 40 µL). En ambos ciclos se utilizaron las mismas temperaturas y tiempos de la primera aproximación, con la diferencia de la cantidad de ciclos. Como control negativo se realizó una reacción de PCR con el molde de ADN (plásmido pCAS) pero sin los cebadores.

6.3.2.2 Digestión con enzima *DpnI*

Con la enzima de restricción *DpnI*, la cual degrada ADN metilado, se eliminaron los vectores utilizados como molde para la reacción de amplificación en el paso anterior, es decir, aquellos que no contienen la secuencia del ARN guía de interés. Para la digestión



se utilizaron 25 μL de la reacción de amplificación, 3 μL de *buffer* 10X, 1 μL de enzima *DpnI* (NZYtech, Portugal) y 1 μL de agua ultrapura. Luego, la reacción se incubó durante 6 hs a 37°C.

6.3.2.3 Transformación *E. coli* TOP10 (químicamente competentes)⁸⁴.

A un tubo de microfuga conteniendo 100 μL de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 preparadas previamente, se le agregó 15 μL de la reacción de clonación tratada con *DpnI* en condiciones asépticas (ver protocolo de células competentes en Anexo). Se incubó la mezcla en baño de hielo durante 30 min, luego se incubó 2 min a 42°C y 2 min más en hielo. Inmediatamente se le agregó 1 mL de caldo LB al tubo de reacción y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. En paralelo, en otro tubo de reacción, se realizó el mismo proceso pero sin el agregado de la reacción de clonación tratada con *DpnI*, siendo éste el control negativo. Alícuotas de la mezcla de transformación y del control negativo se sembraron en placas de LB agar Kan. La presencia de antibiótico selecciona las células que hayan incorporado el plásmido. Se repicaron las colonias a placas nuevas con LB agar Kan. Se verificó la presencia del ARNg en el vector por PCR colonia.

6.3.2.4 Confirmación de inserción del ARNg: PCR colonia

Para verificar la inserción del ARNg en el vector pCAS construido en el ensayo de *RF cloning* se diseñaron cebadores *forward* (Conf.RF.ARNg."target") homólogos a cada ARNg y un único cebador *reverse* (G418R-Tnos) complementario a una zona del gen que codifica para la resistencia G418 (Tabla 4). Estos cebadores, sintetizados en Macrogen (República de Corea), amplifican un fragmento de 1383 pb a partir del plásmido pCAS construido para cada gen *target*.



Tabla 4: Cebadores diseñados para confirmar la modificación del plásmido pCAS.

Cebador de confirmación de	Secuencia 5'3'
<i>RF cloning</i>	
Conf.RF.ARNg.PHO13 F	TGGCATTCTCATCTAATAGG
Conf.RF.ARNg.TyF	TGTCATATCAGAGTCCGCTG
Conf.RF.ARNg.XYL2F	GCAGAGCCTTGCGTTCGAGC
Conf.RF.ARNg.APJ1F	GTCTTGGCTTCATTAAGGAG
Conf.RF.ARNg.ALD6F	CAGCCAACTTACTTAGTAGA
Conf.RF.ARNg.ISU1F	CTAGTGGGTGCGCCAGCGTG
G418R-tNOS	TGCCAAATGTTTGAACGATCTTAGAAAACTCATCGAGCA

La reacción de amplificación presenta un volumen final 25 µl, conteniendo 12,5 µL de MangoMix (BIOLINE, UK), 1 µL de cada cebador (10 µM), 9,5 µL de agua ultrapura y se usó como molde una colonia. Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). Los programas empleados consistieron en una etapa inicial de 2 min a 95°C; seguida por 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos (seg), 56°C durante 30 seg, 70°C durante 1,30 min. La reacción culminó con una etapa final a 70°C durante 5 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de aquellas colonias que dieron un resultado positivo (protocolo en Anexo).

6.3.3 Obtención del fragmento *xylA* con las colas de homología

Para la amplificación del *cassette* con promotor pTPI1, el ORF *xylA* de *Piromyces* sp. y el terminador tCYC1, se diseñaron cebadores de 20 pares de bases que hibridan en los extremos del *cassette*. En la región 5' de cada cebador, a partir de las secuencias de los genes *PHO13*, *XYL2*, *Ty*, *ALD6*, *ISU1* y *APJ1* extraídas de la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae* (SGD, <https://www.yeastgenome.org/>), se adicionaron 50 pares de bases con secuencias homólogas a regiones de cada gen *target* (Tabla 5.A). Además, con el fin de ver el efecto del aumento de la zona de homología, para el gen *target PHO13*, se diseñó otro par de cebadores de 90 pares de bases. El extremo 3' de este nuevo par contiene cada uno una región de 20 nucleótidos que hibrida con las regiones 5' de los cebadores



XI.PHO13.F y XI.PHO13.R (tabla 5.A). Estos nuevos cebadores aumentan la región de homología del fragmento a incorporar a un total de 120 pb (Tabla 5.B). Esta región es imprescindible para que ocurra la recombinación homóloga que da lugar a la inserción del gen *xylA* en el genoma. Los cebadores, sintetizados en MacroGen (República de Corea), se diseñaron de modo de amplificar un fragmento de 2752 pb a partir del plásmido pAKX002 que contiene el gen *XylA*.

Tabla 5: Cebadores diseñados para amplificar el gen *xylA* con colas de homología para la inserción en el gen target. En rojo se señalizan las zonas homólogas al gen *XylA*.

5.A	
Nombre de los cebadores	Secuencia 5'3'
XI.XYL2.F	AGGCAGTTTGGTGCCACCCACATCGTCAACTCAGGTGATCTC CCACATGGGAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.XYL2.R	ATTTAACGGGTGGTGGCTTGTTTCTTCGAATGCCTCGACAGC ATCCTTAACAATACGCAAACCGCCTCTC
XI.PHO13.F	AGGATGTTAGTTGTGTTATTGCTGGGTTAGACACGAAGGTA AATTACCACGAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.PHO13.R	CCACTCAAAACGAGTAGTGTGCCACCTAACCCACCTTCAACA CCGAATTTCAATACGCAAACCGCCTCTC
XI.ALD6.F	GAATGTGCCGACCGTGCTTTCCACGACACTGAATGGGCTAC CCAAGACCCGAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.ALD6.R	GTAACATCCCCACGGGCTAAGGCCAAAGTTTTACCATTGTCC AAAGCTTCCAATACGCAAACCGCCTCTC
XI.ISU1.F	CAAGGTCATAGAGCATTATACACATCCAAGAAACGTCGGCT CATTAGATAGAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.ISU1.R	CCGCTAACATAGAGCAATGCAACTTGACTGGGGGCAAGCTC AACTCCTTCAATACGCAAACCGCCTCTC
XI.Ty F	ACGCCTCTGAGCACTCCATCACCTGAGTCAGGTAATACATTT ACTGATTCGAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.Ty R	ACCACCGAGATTCGAGTTTTGTAAAAATTTGATGTATGTTTT AACCCAATCAATACGCAAACCGCCTCTC



XI.APJ1.F	TGTTTGTGATGGGCACGGTGGTCTAAAGAAATGCACTTGTA AAACATGCAGAAAGTGTAGGGGTACGCTG
XI.APJ1.R	TCACCAGGTATTACCTTTTCGTGACCGCCTCCCTTAGTACTAA TAACTTCCAATACGCAAACCGCCTCTC

5.B

Nombre de los cebadores	Secuencia 5'3'
Nueva.homología.PHO13.F	GGTGCCGATTCCAGATTGGATACGCCGTTTCGATGCAGCTAA ATCACCATTTTTGGTGAACGGCCTTGATA AGGATGTTAGTTGTGTTATT
Nueva.homología.PHO13.R	TTTATCAATGTAAAATTTAGGTCTTGGATAATCGTGCGAAAT CTTCAAGGCTCTCTCTTCGGTTTCAATACCACTCAAAACGAGT AGTGT

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 0,5 µL de High-Fidelity Velocity DNA polymerase (BIOLINE, MERIDIAN Bioscience, UK), 10 µL de 5X Hi-Fi *Reaction Buffer*, 1,7 µL de dNTP's (10 mM cada uno), 2,25 µL de DMSO, 2,5 µL de cada cebador (10 µM), 28,55 µL de agua ultrapura y 1 µL de una dilución 1/5 del plásmido pRS42K::XI (cebadores de tabla 5.A) o pSKII::pho13-XylA-pho13 (cebadores de tabla 5.B). Se usó un termociclador BIOER, modelo TC-E-48D (China). Los programas empleados consistieron en una etapa inicial de 2 min a 95°C; seguida por 35 ciclos de: 95°C durante 30 seg, 48°C durante 30 seg, 70°C durante 3 min. La reacción culminó con una etapa final a 70°C durante 5 min.

Se purificó el producto amplificado mediante el kit "Agarose gel DNA extraction kit"(Roche, EE.UU.) (ver Anexo).

6.3.3.1 Inserción del fragmento amplificado XylA en el plásmido pSKII

Con el objetivo de obtener mayor concentración de ADN donante, se insertó el fragmento amplificado para cada gen *target* en el plásmido pSKII (Figura 5). Dicho plásmido contiene un sitio de restricción de multiclonado para 21 enzimas de restricción, entre ellas *EcoRV* y *SacI*. Dicho sitio se encuentra en el gen *lacZ* (codifica para una β-galactosidasa), de modo que si ocurre la inserción del fragmento dará como resultado colonias blancas.

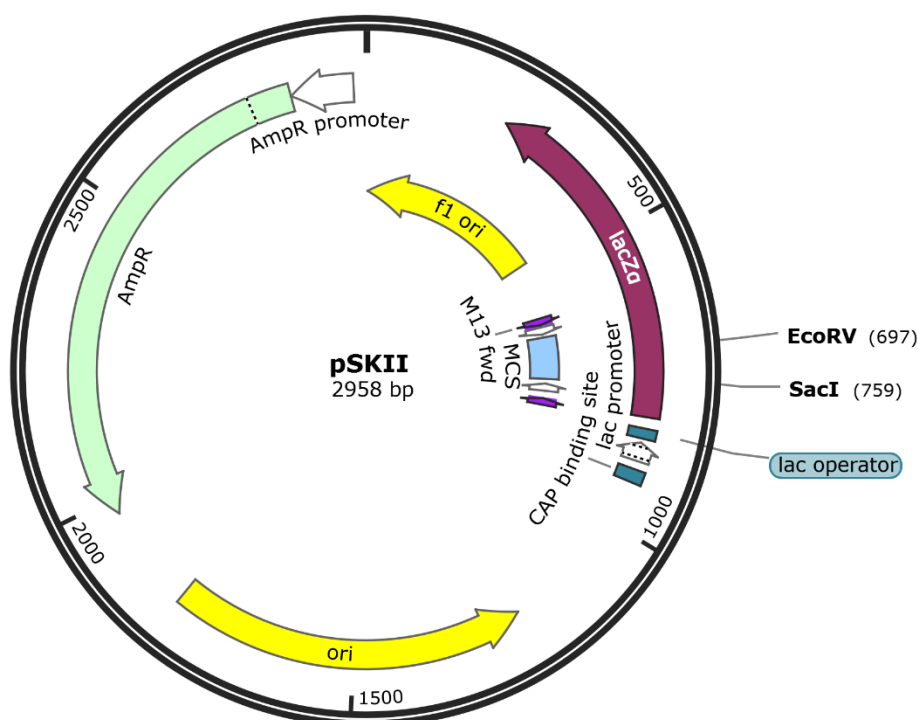


Figura 5: Plásmido pSKII en el que se insertó el gen *xylA* con las colas de homología utilizando el sitio de restricción *EcoRV*.

6.3.3.1.1 Digestión del plásmido pSKII con *EcoRV*

El vector pSKII, previamente purificado mediante el método de lisis alcalina (ver Anexo), se digirió con la enzima de restricción *EcoRV*. Para ello, se mezcló en un volumen final de 30 μL (siguiendo las instrucciones del fabricante), 1 μL de la enzima *EcoRV* (10 U/ μL Thermo New England BioLabs, EE. UU.), 3 μL de *buffer* 3 (10X) (New England BioLabs, EE. UU.), 11 μL de agua ultrapura y 15 μL del vector. La mezcla de digestión se incubó por 24 hs a 37°C. Se verificó que la reacción de digestión hubiese sido exitosa y completa mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE 1X (ver Anexo).

6.3.3.1.2 Ligación

La mezcla de ligación se preparó en un volumen final de 10 μL . La mezcla de reacción contenía 6 μL del producto de PCR purificado, 2 μL de la mezcla de digestión que contiene pSKII digerido, 1 μL de *buffer* 10X de ligación y 1 μL de T_4 DNA ligasa (360 U/ μL) de TaKaRa (Japón). La mezcla de ligación se incubó durante 30 min a 16°C en un *thermoblock* Thermolyne modelo 17600 (EE.UU.). En teoría, el número de moléculas del fragmento a insertar en relación a las del vector debería ser 1:1. En general se usó una relación mayor, de modo de aumentar la probabilidad de que el fragmento se una al vector, en vez de



que la reacción intra-molecular generara la recircularización del mismo. El volumen de ligación pequeño también favorece las reacciones de ligación intermoleculares.

Posteriormente, se realizó una transformación química de *E. coli* TOP10 con la totalidad de mix de ligación (ver protocolo en sección Anexo). Se replicaron las colonias blancas, se realizó una extracción plasmídica por lisis alcalina de dichas colonias (ver Anexo) y, por último, se realizó la digestión de dichos plásmidos con *SacI* (10 U/ μ L Thermo New England BioLabs, EE. UU.). Dicha digestión se realizó en las mismas condiciones que la digestión anteriormente realizada con la enzima *EcoRV*. Mediante electroforesis de agarosa (1%) se verificó el tamaño esperado para el vector con inserto.

6.3.4 Transformación de *S. cerevisiae* CAT-R

Para la edición génica mediante CRISPR-Cas9, se ensayaron tres protocolos diferentes para la transformación de levaduras. En los tres protocolos se usaron cultivos de CAT-R hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 1,0 aproximadamente. Según lo publicado previamente por Gietz et. al. 2002 dicho valor de densidad óptica se corresponde con una concentración de 1×10^6 células/mL⁸⁵ para levaduras de laboratorio. Sin embargo, en un ensayo realizado por la Bach. Melanie Rodriguez en nuestro laboratorio, se determinó una concentración de 2×10^7 UFC/ml en un cultivo con $DO_{600nm} = 1$, para la cepa industrial CAT-1 y para CAT-R. En este trabajo, nos basamos en este último dato para el cálculo de las eficiencias de transformación: UFC/ug de plásmido utilizado/N° de células de partida.

6.3.4.1 Transformación química (protocolo modificado a partir de⁸⁶).

Se inocularon tubos conteniendo 10 mL de caldo YPD con células frescas CAT-R crecidas en placas con YPD agar y se incubaron durante 24 hs aproximadamente. Se utilizaron 0,5 mL del cultivo para inocular frascos conteniendo 50 mL de caldo YPD. Estos frascos fueron incubados a 30°C con agitación orbital (aproximadamente por 4 hs) hasta alcanzar a una DO_{600nm} de 1,0 aproximadamente (espectrofotómetro visible-UV Shimadzu modelo UV-1800, Japón) (2×10^7 UFC/mL x 50mL = 1×10^9 células viables aproximadamente).

Luego se colectaron las células por centrifugación durante 3 min a 3000 rpm en tubos Falcon® estériles de 50 mL. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de 1 X LITE (ver Anexo). Se transfirió la suspensión celular a tubos de microfuga de 1,5



mL estériles y se centrifugaron durante 2 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en 300 μ L de 1 X LITE. Se transfirieron 100 μ L de la suspensión celular a dos tubos nuevos de microfuga estériles (correspondiente a 3.3×10^8 células; 1×10^9 /3). Seguidamente, a cada tubo se le añadió 10 μ L de ADN de espermatozoos de salmón (10 mg/mL) (Invitrogen, EE.UU.) previamente desnaturalizado a 100°C durante 10 min en *thermoblock* (Thermolyne modelo 17600, EE.UU.) seguido de incubación en hielo hasta su utilización. Se le adicionó a cada tubo, además, ADN plasmídico pCAS purificado previamente y ADN donante aproximadamente (cantidades indicadas en cada caso en la sección Resultados). Todas las concentraciones de ADN se cuantificaron por espectrofotometría en Nanodrop.

Luego, a todos los tubos se les adicionó 750 μ L de PEG LITE (ver Anexo) y se incubaron a 30°C durante 30 min en *thermoblock*, agitando las suspensiones de forma manual cada 10 min. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de DMSO a cada tubo de transformación, se incubó a 42°C durante 10 min y se centrifugó durante 2 min a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante de cada tubo, los *pellets* celulares se resuspendieron en 300 μ L de caldo YPD y los tubos se incubaron en estufa durante 1 hora a 30°C grados para recuperar las células.

Finalmente, se sembró por rastrillado en superficie la totalidad de cada suspensión celular en placas con YPD agar con G418 y las mismas se incubaron por 72 hs a 30°C.

En todos los casos se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin el agregado de ADN plasmídico. Este control se sembró en YPD agar sin antibiótico para comprobar la viabilidad de las células y en YPD con G418 para verificar que no hubiese crecimiento.

6.3.4.2 Transformación química protocolo 2 (protocolo adaptado de ⁸⁷)

Se inocularon tubos conteniendo 10 mL de caldo YPD con células frescas CAT-R crecidas en placas con YPD agar y se incubaron durante 24 hs aproximadamente. Se utilizó dicho cultivo para inocular frascos conteniendo 50 mL de caldo YPD a una DO_{600nm} de aproximadamente 0,3. Estos frascos fueron incubados a 30°C con agitación orbital (aproximadamente por 4 hs y media) hasta alcanzar a una DO_{600nm} de 1 aproximadamente



(espectrofotómetro visible-UV Shimadzu modelo UV-1800). (2×10^7 UFC/mL x 50mL = 1×10^9 células viables aproximadamente).

Luego se colectaron las células por centrifugación durante 5 min a 3000 rpm en tubos Falcon® estériles de 50 mL. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de acetato de Litio (LiAc) 0,1 M. Se transfirió la suspensión celular a tubos de microfuga de 1,5 mL estériles y se centrifugaron durante 2 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en 300 μ L de LiAc 0,1 M. Se incubaron las células 10 min a temperatura ambiente. Se transfirieron 50 μ L, correspondientes a 1.7×10^8 células, de la suspensión celular a dos tubos nuevos de microfuga estériles. Seguidamente, a cada tubo se le añadió 5 μ L de ADN de esperma de salmón (10 mg/mL) (Invitrogen, EE.UU.) previamente desnaturalizado a 100°C durante 10 min en *thermoblock* (Thermolyne modelo 17600) seguido de incubación en hielo hasta su utilización. También se añadieron 300 μ L de solución Pli (ver Anexo), ADN de fragmento donante y ADN del vector pCas (cantidades definidas en la sección Resultados). Luego, se mezcló en *vortex* durante 10 seg y se incubaron a 42°C durante 30 min en *thermoblock*, agitando las suspensiones de forma manual cada 5 min. Posteriormente, se centrifugó durante 2 min a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante de cada tubo. Los *pellets* celulares se resuspendieron en 1 mL de caldo YPD y los tubos se incubaron en estufa durante 3 hs a 30°C grados para recuperar las células.

Finalmente, se sembró por rastrillado en superficie la totalidad de cada suspensión celular en placas con YPD agar con G418 y las mismas se incubaron por 72 hs a 30°C.

En todos los casos se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin el agregado de ADN plasmídico. Este control se plaqueó en YPD agar sin antibiótico para comprobar la viabilidad de las células y en YPD agar con G418 para comprobar que no hubiese crecimiento.

6.3.4.3 Electroporación⁸⁸

Se inocularon tubos conteniendo 10 mL de caldo YPD con células frescas CAT-R crecidas en placas con YPD agar y se incubaron durante 24 hs aproximadamente. Se utilizó dicho cultivo para inocular frascos conteniendo 50 mL de caldo YPD a una DO_{600nm} de 0,2 aproximadamente. Estos frascos fueron incubados a 30°C con agitación orbital



(aproximadamente por 5 hs) hasta alcanzar a una DO_{600nm} de 1 aproximadamente (espectrofotómetro visible-UV Shimadzu modelo UV-1800).) (2×10^7 UFC/mL x 50mL= 1×10^9 células viables aproximadamente).

Luego se colectaron las células por centrifugación durante 5 min a 3000 g a 4°C en tubos Falcon® estériles de 50 mL. Se descartó el sobrenadante y, en hielo, se resuspendió el *pellet* en 50 mL de agua destilada estéril fría. Se colectaron las células por centrifugación durante 5 min a 3000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se reiteró el paso de lavado con agua destilada estéril fría. El *pellet* celular se resuspendió en 4 mL de sorbitol 1 M frío y se transfirió la suspensión a un tubo Falcon® estéril de 15 mL. Se centrifugaron las células en las mismas condiciones. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 100 µL de sorbitol 1M frío.

Se transfirieron 40 µL de la suspensión celular correspondiente a 4×10^8 células, a un tubo de microfuga estéril (para cada reacción). Seguidamente, a cada tubo se le añadió ADN de pCAS y ADN donante (las cantidades se especifican en la sección Resultados). Se homogeneizó el preparado con micropipeta y incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación fría y estéril. En el electroporador (BioRad), con el programa “Sc2” se descargó un pulso sobre la cubeta. Inmediatamente después, se agregaron 940 µL de caldo YPD a temperatura ambiente. La suspensión se traspasó a tubos de microcentrífuga estériles y se incubó durante 1 hora a 30°C y con agitación (200 rpm).

Luego, se centrifugó el tubo durante 2 min a 1000 g. Se descartó parte del sobrenadante y se sembró por rastrillado en superficie, la totalidad de cada suspensión celular en placas con YPD agar con G418. Las mismas se incubaron por 72 hs a 30°C.

En todos los casos se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin el agregado de ADN plasmídico. Este control se plaqueó en YPD agar sin antibiótico para comprobar la viabilidad de las células y en YPD agar con G418 para comprobar la ausencia de crecimiento. Además, se realizó un control positivo de transformación (transformación con 1 µg de pCAS con ARNg que no corta en la levadura) y un control de transformación/edición NHEJ donde se transformó con 1 ug del vector pCAS con el ARNg



correcto pero sin ADN donante. Estos dos últimos controles se sembraron en YPD sólido con G418.

6.3.5 Verificación de mutaciones

Para verificar la inserción del fragmento donante en el *target* se diseñó un par de cebadores por zona a modificar (Tabla 6). Uno de los cebadores complementario a la zona de homología en la que se inserta el ADN donante y el otro cebador por fuera de dicha zona. Cada juego de cebadores, sintetizados en MacroGen (República de Corea), se diseñaron de modo de amplificar un fragmento de tamaño diferente dependiendo de si se insertó o no el ADN donante en la zona a evaluar.

Tabla 6: Cebadores diseñados para confirmar la modificación genética de la cepa CAT-R (Inserción del gen xylA en el gen target). Los últimos pares de cebadores de la Tabla se diseñaron para verificar el inserto con 120 pb de homología para el gen PHO13.

Nombre del primer	Secuencia 5' 3'	Tamaño esperado del Fragmento Con inserción / sin inserción
Conf.XI.Ty F	TGAGCACTCCATCACCTGAG	2798pb / 219pb
Conf.XI.Ty R	CAGTGATCTGACGTACGGGT	
Conf.XI.ALD6R	CTACCGTTGACTTTGTCGGC	2797pb / 208pb
ALD6F	ACGACACTGAATGGGCTACC	
Conf.XI.APJ1R	AGTTGATAACCTGGAAATTC	2807pb / 369pb
APJ1 R	ATGGGCACGGTGGTCTAAAG	
Conf.XI.ISU1F	TGAGAGCGTCCAGCATAACG	2786pb / 344pb
ISU1R	GCAATGCAACTTGACTGGGG	
Conf.XI.PHO13F	CTAGGAGGTGCCGATTCCAG	2780pb / 406pb
PHO13 R	ACCCACCTTCAACACCGAAT	
Conf.XI.XYL2 F	GCTGGGCCCATAGGTTTGCT	2858pb / 498pb
XYL2 R	TAACGGGTGGTGGCTTGTTT	
Sec.homología.PHO13.F	CCGTTTAGCATACACGAAAA	3092pb/718pb
Sec.homol.PHO13R	GGTTAAGGTGTAGATGTCACC	



7 RESULTADOS

7.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DEL “POOL” DE CÉLULAS DE LA 10MA EVOLUCIÓN CAT-1 XIT (PRS42K::XI) Y CURADO DEL PLÁSMIDO (PRS42K::XI)

Se recuperaron del *pool* de células de la 10^{ma} evolución de la construcción CAT-1-XIT(pRS42K::XI), los clones con mejor “*performance*” de crecimiento y producción de etanol. Se sembró 20 μ L de una suspensión del “*pool*” almacenada a -80°C en glicerol, en 4 mL de medio líquido YPX. Luego de 48 hs de incubación, se sembraron en medio sólido YPX con G418, 200 μ L de distintas diluciones ($1/10^3$, $1/10^4$ y $1/10^5$) del “*pool*” celular. Se seleccionaron y aislaron 10 clones al azar. Se sembró un cultivo primario de cada clon en 20 mL de YPX con G418 y a partir de los mismos se sembraron en igual concentración y por triplicado, 20 mL de caldo YP(1/5)X con G418, para medir la producción de etanol y la concentración de D-xilosa al comienzo del ensayo y al cabo de 72 hs de incubación (Figura 6).

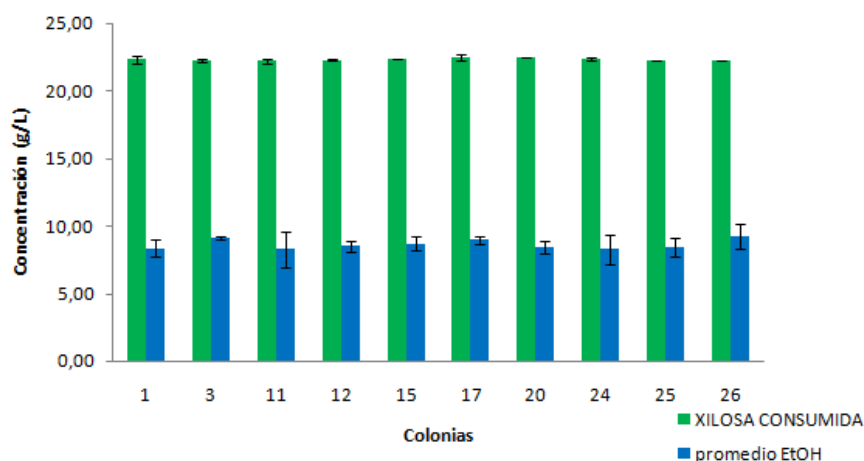


Figura 6: Consumo de D-xilosa y producción de etanol de los 10 clones aislados del “pool” celular CAT-1-XIT(pRS42K::XI) 10^{ma} evolución crecida en YPX G418. Las determinaciones se efectuaron a las 72 horas de incubación. En el eje X se identifican los diferentes clones aislados a partir del “pool” celular CAT-1-XIT(pRS42K::XI) resultante de la 10^{ma} evolución.



El eje de las ordenadas representa las concentraciones (g/L) de etanol producido (azul) y D-xilosa consumida (verde). Las barras de error representan la desviación estándar.

Los análisis estadísticos no paramétricos para ambos datos (producción de etanol y consumo de D-xilosa) indicaron que no había diferencias significativas entre los 10 clones. Este resultado sugiere que la población celular es homogénea en términos de rendimiento de producción ($g_{\text{etanol}}/g_{\text{D-xilosa consumida}}$). A partir de estos resultados se continuó trabajando sobre el clon 3 (elección al azar).

Para curar el clon seleccionado en el paso anterior (clon 3) del plásmido pRS42K::XI, se realizaron 5 subcultivos sucesivos del mismo en 20 mL de caldo YPD, sin antibiótico, cada 24 hs. A partir del 5to cultivo, se transfirieron 100 μL de una dilución $1/10^5$ de la suspensión celular a medio YPD sólido y se incubó la misma durante 48 hs a 30°C . Luego, se aislaron 96 colonias en dos placas de YPD sólido. Estas colonias se transfirieron a placas con YPD agar e YPD agar G418 y se incubaron durante 48 hs a 30°C (Figura 7).

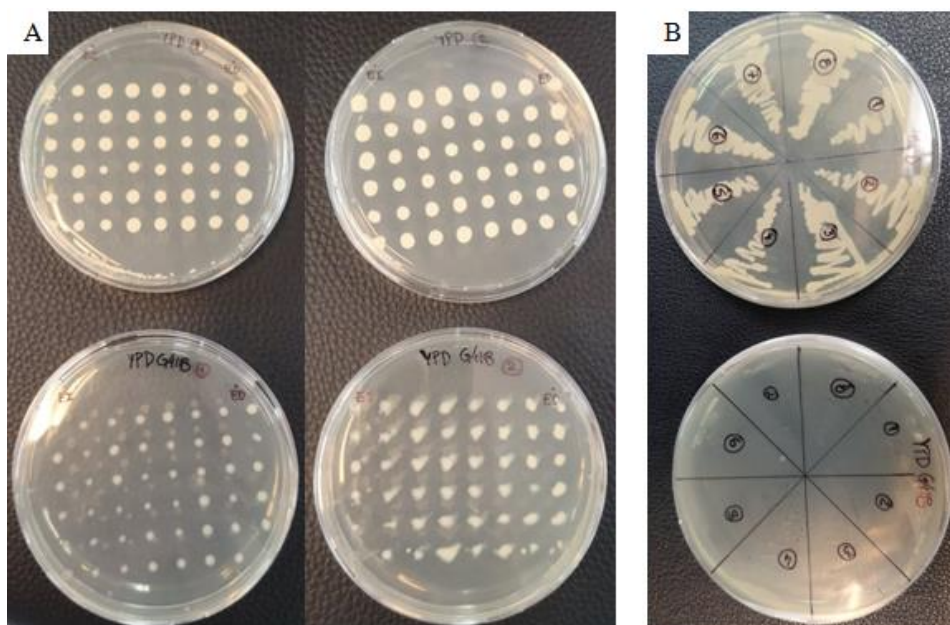


Figura 7: Curado del plásmido (pRS42K::XI). (A) Crecimiento de 96 colonias aisladas a partir del clon 3 en YPD y en YPD G418 durante 48 hs a 30°C . (B) Re-aislamiento de 8 de las 96 colonias de partida.

Observando el crecimiento de los clones en YPD y la ausencia de crecimiento en las placas YPD + G418, se aislaron 8 clones posiblemente carentes del gen *kanMX* que codifica para



la resistencia a G418. Para verificar la pérdida del gen y presuntivamente el plásmido, se amplificó mediante PCR el gen que codifica para dicha resistencia a partir del clon 3 (clon original del que partió el proceso de curación) y de las células de la colonia 7 (una de las colonias resultantes incapaz de crecer en G418) (Figura 8).



Figura 8: Perfil electroforético en gel de agarosa en donde se visualiza el fragmento de ADN amplificado por PCR correspondiente al gen *kanMX*. Carril 1: 5 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de Thermo Scientific (0.1 μ g/ μ L). Carril 2: 5 μ L del producto de amplificación del gen *kanMX* correspondiente a las células de la colonia 7. Carril 3: 5 μ L de la amplificación del mismo gen para la cepa parental 3.

Se observó la presencia de una banda de amplificación entre 1500 y 2000 pb en la mezcla de reacción de PCR de la cepa 3 (cepa parental del proceso de curación). El tamaño coincide con el esperado para el producto de amplificación del gen *kanMX*. La ausencia de amplificación al emplear como templado el ADN del clon 7 permite presumir la pérdida del plásmido pRS42K::XI. Como se mencionó previamente, el clon 7 se denominó CAT-R.

7.2 CRISPR-Cas9

El objetivo de esta actividad era insertar mediante CRISPR-Cas9 varias copias del gen *xylA* de *Piromyces* sp. en el genoma del clon aislado en la etapa anterior (CAT-R), aprovechando simultáneamente la mutación de los genes *POH13*, *XYL2*, *Ty*, *ALD6*, *ISU1* y *APJ1*.



7.2.1 Diseño del ARN guía

A partir de las secuencias extraídas de la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae* (SGD) (<https://www.yeastgenome.org/>), se diseñaron 6 ARN guías (ARNg) específicos para cada gen *target* tal como se detalla en Materiales y métodos.

El diseño del ARNg conforma una de las partes más complejas del ensayo CRISPR-Cas9. Existen múltiples fuentes de información sobre cómo diseñarlo. Uno de los posibles errores que se puede cometer al momento de diseñarlo refiere a la posición en la cual el ARNg se encuentra respecto al sitio PAM. El ARNg debe interactuar con la hebra contraria a la del sitio PAM NGG (Figura 9A) y no con la que lo contiene (Figura 9B).

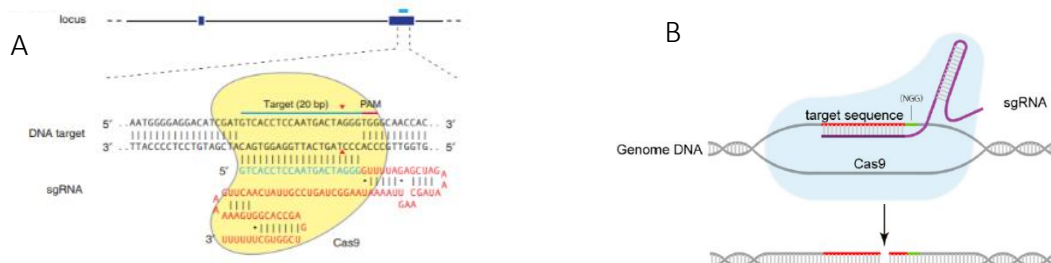


Figura 9: Ubicación del ARN guía respecto al sitio PAM en el genoma. (A) Extraída del artículo “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system”⁸⁹. (B) Extraída del artículo “Application of CRISPR-Cas9 Technology to HBV”⁹⁰.

Este dato, no menor, se encuentra errado en varias fuentes de información. Se diseñaron 6 ARNg que hibridan con la hebra que contiene el sitio PAM NGG. Se llevaron a cabo repetidos intentos para transformar las levaduras con los plásmidos contruidos variando las condiciones y metodología y los resultados siempre fueron negativos. En junio del 2020, durante el curso de Aplicaciones a la Microbiología Molecular (Facultad de Química, Udelar), se logró dilucidar el error en las construcciones utilizadas hasta el momento. Se concluyó que la ubicación del sitio PAM respecto al ARNg, es fundamental para que el sistema CRISPR-Cas9 funcione correctamente.

En base a lo siguiente se diseñaron nuevamente los ARNg de forma correcta. Los plásmidos contruidos previamente se utilizaron como controles positivos de



transformación y negativos para la mutación, ya que la única diferencia con los posteriormente construidos es que no cortan en el gen *target* debido a la ausencia del sitio PAM. Los resultados expuestos a continuación refieren a las nuevas construcciones.

7.2.2 RF Cloning

Para la inserción del ARNg en el plásmido pCAS se diseñaron cebadores de 60 pb que contuvieran la secuencia del ARNg (20 pb) flanqueada en cada extremo por 20pb homólogos a la secuencia del sitio de inserción en el plásmido (Figura 10).

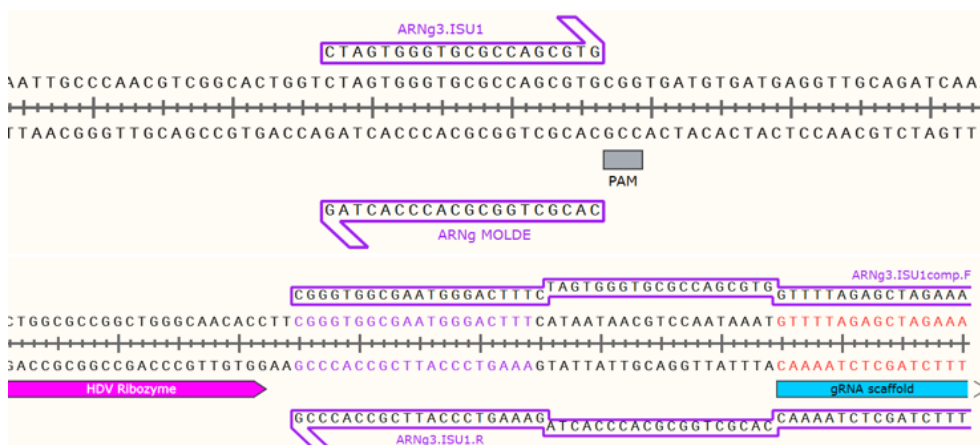


Figura 10: Ejemplo de ARN guía diseñado. En la figura superior se observa parte de la secuencia del gen ISU1. Se destaca en violeta la secuencia correspondiente al ARNg diseñado para dicho gen y en gris, la secuencia PAM (NGG). En la figura inferior, se observa parte de la secuencia del plásmido pCAS. Se destaca en violeta los cebadores diseñados para insertar el ARNg de ISU1 por la técnica RF cloning.

7.2.2.1 Amplificación del plásmido pCAS

Se ajustó la técnica de RF-Cloning realizando distintas reacciones de PCR en un gradiente de temperatura de *annealing* (54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C y 64°C), con los cebadores que contienen el ARNg para el gen *APJ1*. Luego de efectuada la amplificación, se trató cada reacción de PCR con la enzima *DpnI* durante 6 hs y se transformaron células químicamente competentes *E. coli* TOP10 con cada mix de reacción por separado. Se sembró, para cada caso, el volumen total de cada transformación (1mL) en placas con medio LB-agar-Kan. Se observó el crecimiento de colonias aisladas en todas las placas, exceptuando la placa con el control negativo. La placa que presentó mayor cantidad de



colonias (5) fue la que contenía las células transformadas con la reacción efectuada a 56°C como temperatura de *annealing*.

Como se mencionó en Materiales y métodos, para la construcción de los plásmidos con los ARNg correctos se utilizaron dos protocolos diferentes. El primero de ellos muy similar al utilizado para poner a punto la técnica, con la única diferencia que las reacciones de PCR se realizaron a una temperatura de *annealing* de 55°C y 62 °C por separado y para cada gen. El segundo, involucró básicamente el mismo protocolo de RF-*Cloning* ajustado previamente, excepto por modificaciones en la etapa de amplificación. En este caso, el protocolo abarcó dos reacciones de amplificación independientes por cebador y un paso posterior de amplificación empleando la mezcla de estos dos productos de reacción como templado (modificación sugerida por la Dra. Sonia Rodríguez, quién evaluó mi defensa de proyecto). Todas las amplificaciones realizadas con este protocolo se efectuaron a una temperatura de *annealing* de 56°C.

Se obtuvo un elevado número de colonias aisladas por placa para ambas aproximaciones, siendo notoriamente mayor para la segunda de estas (Tabla 7). Debido a la falta de certeza sobre la eficiencia del método, se realizó un *screening* de las colonias transformadas crecidas a partir del ensayo RF-*Cloning* con el objetivo de encontrar algún clon que contuviera el plásmido de interés. Dicho *screening* se llevó a cabo mediante un protocolo de PCR *colony* a partir de un *pool* celular. El *pool* se preparó suspendiendo, con ansa estéril, 5 colonias en 20 µl de agua estéril. Se utilizaron 2 µl de esta preparación como molde de ADN.



Tabla 7: Resultados obtenidos mediante los diferentes protocolos de RF Cloning.

Gen diana para el vector construido	Protocolo de ciclo único: Colonias positivas/colonias obtenidas		Protocolo ciclo de dos ciclos	
	55°C	62°C	Total de colonias obtenidas	Colonias positivas/colonias analizadas
<i>APJ1</i>	0/4	0/17	240	1/5
<i>ISU1</i>	0/13	0/16	124	1/5
<i>Ty</i>	0/11	0/24	218	5/5
<i>XYL2</i>	0/12	0/18	151	3/5
<i>PHO13</i>	0/12	0/13	483	4/5
<i>ALD6</i>	0/0	0/0	173	5/5

Los *pools* que generaron amplicones del tamaño esperado (1383 pb) se analizaron para identificar cual clon contenía la construcción buscada (por ejemplo, carriles 5, 8, 12 de Figura 11 izquierda). Es así que, mediante el mismo ciclado, se desarrollaron las reacciones de PCR a partir de cada clon de forma individual y se identificaron los clones positivos.

Se verificó mediante *PCR pool colony* la presencia de ARNg en cada uno de los vectores construidos (Figura 11 derecha).

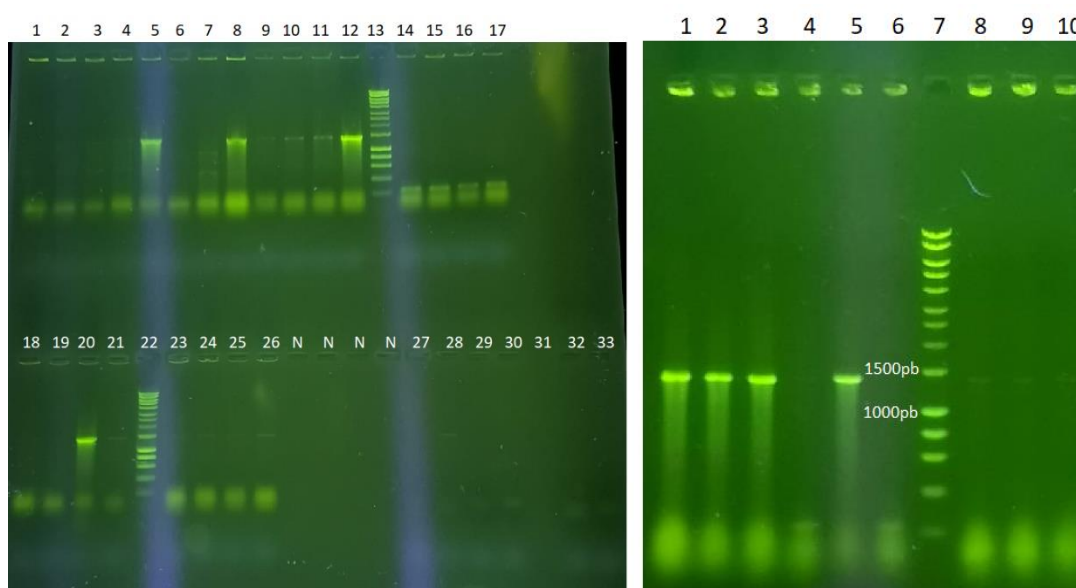




Figura 11: Perfil electroforético de las reacciones PCR Pool colony. (Izquierda)(1-4) *pCAS:XYL2*, (5-8) *pCAS:ISU1*, (9-12) *pCAS:ALD6*, (13) Marcador de peso molecular *Hyperladder 1kb Bioline (MPM)*, (14-17) *pCAS:PHO13*, (18-19) *pCAS:Ty*, (20) *MPM*, (23-26) *pCAS:APJ1*, (27-33) controles negativos (reacción sin ADN) de *XYL2*, *ISU1*, *ALD6*, *PHO13*, *APJ1* y *Ty* respectivamente. (Derecha) (1-6) *pCAS:PHO13*, (7) *MPM*, (8- 10) *pCAS:XYL2*.

Una vez obtenidos los 6 clones positivos se procedió a purificar los plásmidos mediante el protocolo de lisis alcalina para obtener los 6 vectores nuevos con los ARNg para *XYL2*, *PHO13*, *ALD6*, *ISU1*, *Ty* y *APJ1*. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1X para confirmar la concentración y pureza de las preparaciones plasmídicas (Figura 12).

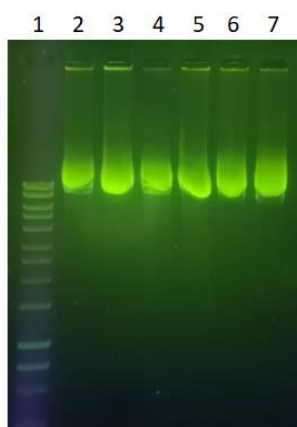


Figura 12: Perfil electroforético de los plásmidos pCAS modificados. (1) 5μL Marcador de peso molecular *AccuRuler 1 kb DNA RTU Ladder, Maestrogen*, (2)*pCAS:APJ1*, (3)*pCAS:ALD6*, (4)*pCAS:PHO13*, (5)*pCAS:XYL2*, (6)*pCAS:ISU1*, (7)*pCAS:Ty*. En todos los pocillos se cargaron 3μL de muestra.

7.2.2.2 Amplificación del gen a insertar

Se diseñaron cebadores para amplificar el gen *xylA* de *Piromyces* sp. incluyendo en sus extremos 50 pb homólogos a regiones de cada gen *target* flanqueantes al sitio de corte del sistema CRISPR-Cas. Además, para el gen *target PHO13*, se diseñó un par de cebadores que agregan mediante amplificación 70 pb de homología adicionales a los 50pb incluidos en los cebadores previamente descritos.



Se realizaron las reacciones de PCR con cada juego de cebadores incluyendo un tiempo de extensión de 3 minutos a 58°C y utilizando como molde el ADN genómico de la cepa CAT-1-XIT(pRS42K::XI). El perfil electroforético de todas las reacciones de PCR presentó un fragmento del tamaño esperado (2752 pb) y uno menor a 200 pb. Se purificó el fragmento del tamaño deseado a partir de la electroforesis en gel de agarosa 1X (Figura 13).

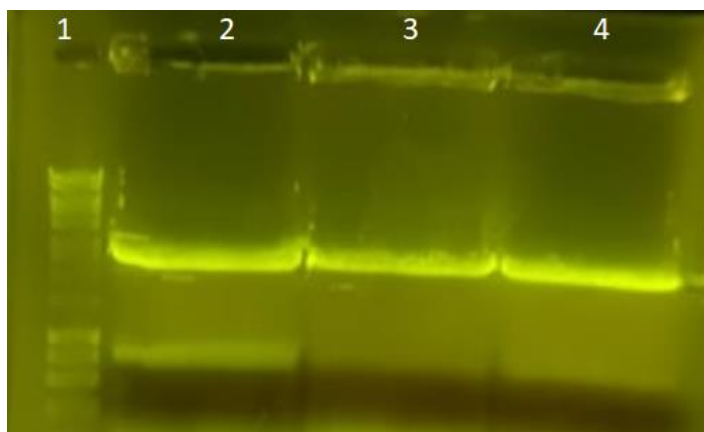


Figura 13: Perfil electroforético de la reacción de amplificación del gen *xylA* con colas de homología para el gen target. (1) 5 μ L Marcador de peso molecular Hyperladder 1kb (2)ty-*XylA*-ty, (3)*Ald6*-*XylA*-*Ald6*, (4)*Xyl2*-*XylA*-*Xyl2*. Nomenclatura: Gen target- Gen a insertar- Gen target.

Por último, se diseñaron cebadores para, una vez culminado el protocolo de transformación del sistema CRISPR-Cas, confirmar la inserción del gen *xylA* en los genes *ALD6*, *APJ1*, *PHO13*, *ISU1*, *XYL2* y *Ty* de *S. cerevisiae*. Se verificó la correcta amplificación de los genes *wild type* (wt). Todas las reacciones de PCR con dichos cebadores amplificaron un fragmento del tamaño de esperado previo a la inserción del gen *xylA* (cepa CAT-R, previa al ensayo CRISPR) (Figura 14).

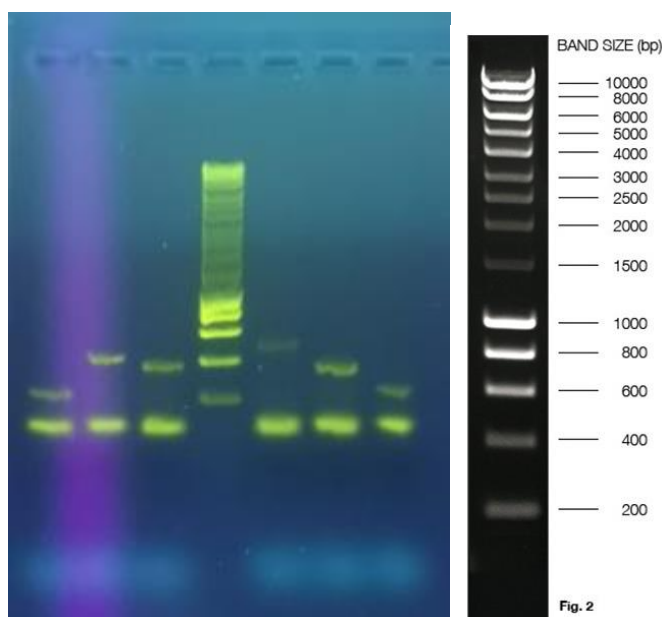


Figura 14: Perfil electroforético de la amplificación de los genes target donde se encuentra la región complementaria al ARNg. (1) ALD6 (2) PH013, (3) APJ1, (4) Marcador de peso molecular HyperLadder 1kb, (5) XYL2, (6) ISU1, (7) Ty.

Los fragmentos obtenidos se purificaron y secuenciaron. El análisis de secuencia confirmó la presencia de todos los ARNg (Anexo) y una de las zonas de homología en los genes amplificados.

7.2.3 Co-transformación del amplicón conteniendo el gen *XylA* y el plásmido pCAS derivado para cada gen a modificar

En esta etapa del trabajo se esperaba obtener clones derivados de la cepa de *S. cerevisiae* receptora (CAT-R) conteniendo el gen *xylA* integrado en cada gen *target* a mutar. Para esto, se aplicaron tres protocolos de transformación diferentes, dos de ellos por transformación química y uno por electroporación. Se probaron diferentes concentraciones de los componentes (ADN donante y plásmido pCAS) y diferentes cepas receptoras (*S. cerevisiae* haploide #851 y *S. cerevisiae* CAT-R diploide) para todos los genes *target*. Además se realizaron dos modalidades de cultivo, por un lado, se plaquearon las transformaciones en placas YPD + G418, por el otro se inoculó, con el producto de transformación, medio líquido YPX + G418. A partir de dicho medio y con el objetivo de “seleccionar” aquellas células que adquirieron la mutación que les permitiría consumir xilosa, se realizaron tres pasajes sucesivos cada 24 hs de las células presentes



en los mismos. Las condiciones (cepas utilizadas, concentración de ADN y modo de cultivo) junto con los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 8. La concentración de ADN donante se determinó en NanoDrop (EE.UU). A partir de dicha concentración, se calculó el volumen a emplear en cada una de las transformaciones a los efectos de usar la cantidad de ADN deseada. En todos los ensayos se incluyeron un control de viabilidad y un control negativo. El control de viabilidad refiere a la cepa receptora que se somete a todo el proceso de transformación (incluyendo el agregado de ADN) y que se siembra en placas de YPD sin presión antibiótica. Con este control se busca verificar que en ninguna etapa del proceso de transformación se promovió la muerte celular de la cepa a transformar. El control negativo involucra a la cepa receptora original que pasa por el proceso de transformación sin el agregado de ADN plasmídico y es sembrada en YPD con presión antibiótica. Con dicho control se busca asegurar que se parte realmente de una cepa sensible al antibiótico, que las placas con medio de cultivo y antibiótico están bien preparadas y que la resistencia adquirida luego de la transformación es debido al agregado de ADN y no a una contaminación introducida durante el proceso de transformación.

Cabe mencionar que todas las co-transformaciones detalladas fueron realizadas con los ARNg correctos, los resultados de las transformaciones con las construcciones anteriores no se exponen en la tesis.

Tabla 8: Ensayos de transformación. Las concentraciones de ADN se determinaron en Nanodrop. En todos los ensayos se utilizó como ADN donante directamente el producto purificado de PCR del gen *XylA* con las colas de homología para cada gen *target*.

Co-transformación: Electroporación				
Cepa utilizada	ADN donante [μg] (<i>xylA</i> con colas de homología)	pCAS [μg]	Modalidad de cultivo de transconjugantes	Resultados en ensayos de edición genética (no controles)
CAT-R	0,6	8	Caldo YPX G418 y YPD agar + G418	Cultivo en caldo YPX*: Se observó un aumento en la turbidez del medio de cultivo, lo cual indicaba la presencia de crecimiento en



ensayos dirigidos a genes *XYL2*, *ALD6* y *PHO13*. Se visualizó un menor crecimiento en los ensayos dirigidos a *Ty* y *APJ1*. El cultivo dirigido a *ISU1* no evidenció crecimiento.

Cultivo en medio sólido: 3 colonias en el ensayo dirigido a *APJ1*, 2 colonias en el caso de *ALD6*.

Se analizaron los medios líquidos y las colonias aisladas mediante lisis y posterior PCR para cada gen *target*. Ninguna resultó recombinante

Co-transformación: Transformación Química 1				
Cepa utilizada	ADN donante [μg]	pCAS [μg]	Modalidad de cultivo	Resultados
CAT-R	1	4	YPD agar+G418	No se obtuvieron colonias en el ensayo de edición. Control de viabilidad correcto (presencia de crecimiento) al igual que el control negativo (ausencia de crecimiento).

Co-transformación: Transformación Química 2				
Cepa utilizada	ADN donante [μg]	pCAS [μg]	Modalidad de cultivo	Resultados
CAT-R	2	17	Caldo YPX G418 y YPD agar + G418	Cultivo en caldo YPX*: Se visualizó crecimiento en los ensayos dirigidos a mutar los genes <i>XYL2</i>, <i>ALD6</i>, <i>PHO13</i>, <i>Ty</i>, <i>APJ1</i> e <i>ISU1</i>. Cultivo en YPD agar G418: Todas las placas presentaron 200/300 colonias cada una, a excepción de la transformación para modificar el gen <i>target XYL2</i> en el que solo se obtuvieron 4 colonias. Los controles negativos y de supervivencia dieron de acuerdo a lo esperado (ausencia de crecimiento en el primero y presencia en el segundo).



Ninguna de las colonias analizadas por PCR
resultó ser recombinante

				No se obtuvieron clones recombinantes en los ensayos de edición de ambas cepas. Los controles de viabilidad de ambas cepas exhibieron un crecimiento reducido, aunque notoriamente mayor para la cepa CAT-R. Probablemente las sales de las PCR ocasionaron muerte celular.
CAT-R y <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> #581	2	4	YPD agar + G418.	

*La composición del medio YPX se encuentra en el Anexo. Las condiciones de cultivo fueron a 30°C con un pasaje de las células cada 24 hs a un nuevo medio de cultivo YPX.

Como se observa en la Tabla 8, los resultados fueron negativos, ya sea por ausencia de colonias resistentes a G418 o por ausencia de clones positivos (verificados por PCR).

Se estima que uno de los problemas que quizás impidió la obtención de clones mutantes por edición/recombinación podría ser la escasez de ADN donante utilizado. De acuerdo con los protocolos disponibles^{87,88}, la concentración de ADN donante (que contiene las colas de homología para la recombinación) debe ser del orden de 5 µg. Mediante PCR y posterior purificación de fragmento fue imposible obtener esa cantidad. Es por esto que, como último recurso, se cambió la estrategia de obtención del ADN donante.

7.2.4 Obtención de ADN donante y electroporación

Con el objetivo de obtener mayor cantidad de ADN donante se clonó el producto de PCR (gen *xylA* con colas de homología al gen *target*) en el sitio de restricción *EcoRV* del vector pBluescript pSKII (Figura 16 izquierda). Se clonó así el ADN donante correspondiente a los genes *target APJ1*, *PHO13* y *Ty* obtenidos mediante PCR utilizando como ADN molde el plásmido pRS42K::XI. Se verificó la presencia del amplicón en el plásmido resultante mediante la digestión con la enzima *SacI* (Figura 15 derecha) y visualización del perfil de electroforesis en agarosa 1%, como se menciona en Materiales y métodos.

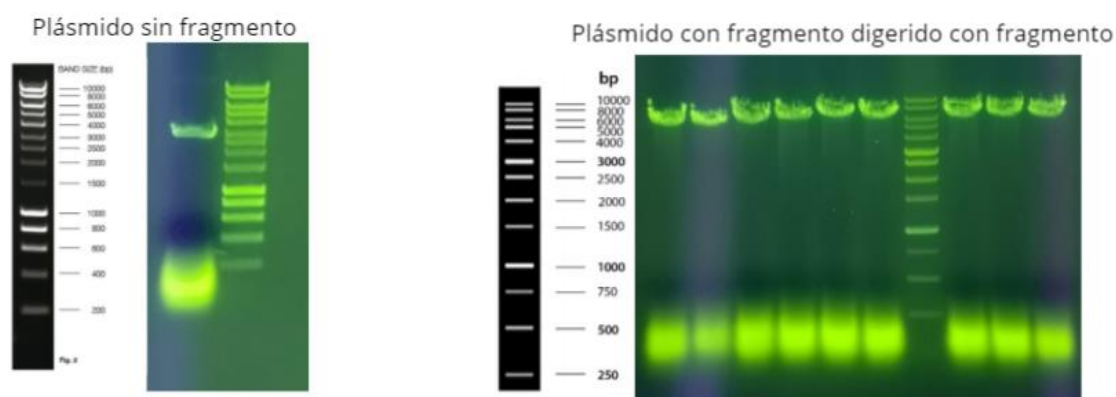


Figura 15: Perfil electroforético de los productos resultantes de protocolos de clonado del fragmento donante en el plásmido pSKII. En la figura de la izquierda, se puede observar en el carril 1 el plásmido pSKII digerido con EcoRV. En la figura de la derecha se observa la digestión con SacI de los plásmidos pSKII que contienen el gen *xylA* con las colas de homología para los genes *target*: (Carriles 1-3) *APJ1*, (Carriles 4-6) *Ty*, (Carril 7) Marcador de peso molecular Accuris SmartCheck 1kb DNA Ladder, (Carriles 8-10) *PHO13*.

Luego de obtenidos los plásmidos pSKII con el ADN donante, se procedió a cumplir el protocolo de transformación por electroporación en levaduras haploides *S. cerevisiae* #851 y en levaduras diploides CAT-R (en paralelo) para los genes *APJ1*, *Ty* y *PHO13* por separado. Se utilizaron, para cada gen *target*, 5 µg de ADN donante (vector pSKII con el inserto previamente linearizado con *SacI*) y 3 µg del vector pCAS con el ARNg. *SacI*, corta en un único sitio dentro del plásmido pSKII, a 62 pb del sitio de corte de EcoRV utilizado para insertar el gen *XylA* con las colas de homología para cada gen *target*, dicha localización del corte (próxima a las colas de homología) podría favorecer la recombinación homóloga del fragmento donante. Se realizó un control negativo de transformación y uno de supervivencia para cada una de las cepas. Para el gen *APJ1* se obtuvieron 19 colonias haploides resistentes a G418, de las cuales al replicarlas solo 6 sobrevivieron. Ninguna de ellas presentó el gen *XylA* inserto en su genoma. El resto de las placas no presentó crecimiento a excepción de los dos controles de supervivencia. Cabe destacar que el control de supervivencia de la cepa diploide CAT-R presentó escaso crecimiento.



7.2.5 Volviendo a nuestro modelo: Electroporación en cepa CAT-R

Se transformó por electroporación la cepa CAT-R con el sistema para mutar únicamente el gen *PHO13*. Para la co-transformación se utilizaron 16 µg del plásmido pSKII::*pho13-XylA-pho13* (no digerido que contiene el fragmento donante) y 8 µg del plásmido pCAS que contiene el ARN guía para dicho gen y la enzima Cas9. Se realizaron los controles de transformación: control negativo (sin ADN plasmídico), de supervivencia (cepas co-transformadas sembradas en YPD agar), control positivo de transformación (2 µg de plásmido pCAS con un ARNg que carece de sitio PAM en el genoma, construido en la etapa previa al curso de Aplicaciones en la Microbiología Molecular tomado en junio 2020) y control de edición/replicación NHEJ (8 µg del plásmido pCAS correcto pero sin ADN donante). Todos los controles, a excepción del de supervivencia, se sembraron en medio sólido YPD + G418. Las transformaciones se realizaron en cubetas de 1 mm y de 2 mm con el protocolo estándar del electroporador BioRad (para levaduras con cubetas de 2 mm). Al igual que en el ensayo anterior, el control negativo y el de supervivencia generaron resultados correctos. En cuanto a los controles positivos, se obtuvo un mayor rendimiento de transformación (UFC/µg ADN plasmídico/cantidad de células de partida) en el realizado en la cubeta de 2 mm ($9,7 \times 10^{-7}$ obteniendo 779 colonias individuales, frente a $5,5 \times 10^{-7}$ para las cubetas de 1 mm con un total de 441 colonias individuales. Para este cálculo, se consideró que se usaron 4×10^8 células por ensayo. Para este valor se tomó en cuenta la determinación realizada en el laboratorio por Melanie Rodríguez, donde se logró establecer la concentración de células/mL que se corresponde con una DO_{600nm} de 1. No se observó crecimiento ni en el control de edición/replicación NHEJ, ni en la co-transformación propiamente dicha. La única diferencia entre el control positivo de transformación y el de edición/replicación NHEJ es el plásmido pCAS que se utilizó para transformar las cepas. Por lo cual, o el plásmido pCAS con el ARNg correcto se encontraba degradado, o la mutación en el gen *PHO13* es deletérea. La segunda opción no coincide con lo reportado anteriormente.

7.2.6 Mayor número de pares de bases de homología

Zhiwei Xu et.al.⁹¹ publicaron un artículo el mes de abril del año 2021 en el cual concluyen que la cantidad de pares de bases de homología utilizados para la inserción de un fragmento de ADN donante mediante el sistema CRISPR es limitante a la hora de obtener



células diploides recombinantes. En nuestro modelo utilizamos 50 pb de homología, dicha cantidad resultó en 0% de colonias recombinantes en el artículo. Es por esto, que decidimos sintetizar un par de cebadores para agregar 70 pb de homología al gen *PHO13*, resultando en un fragmento donante flanqueado por 120 pb de homología a cada lado. Para dicha PCR se utilizó como templado el plásmido pSKII con el gen *xylA* flanqueado por las zonas de homología a *PHO13* de 50 pb construido anteriormente. Al igual que con los fragmentos anteriores, y tal como se detalla en materiales y métodos, se clonó el producto de PCR en el sitio de restricción *EcoRV* del vector modificado derivado de pBluescript SKII.

Se transformó por electroporación la cepa CAT-R con el plásmido pCAS que contiene el ARN guía para el gen *PHO13* y con el ADN donante con colas de homología de 120 pb y por separado de 50 pb. Para la co-transformación se utilizaron 9 µg del plásmido pSKII::*pho13-xylA-pho13* con colas de homología largas o 40 µg del plásmido pSKII::*pho13-xylA-pho13* con colas de homología cortas y 4 µg del plásmido pCAS en cada caso. Se realizaron los controles de transformación: control negativo (cepas sin ADN plasmidico), de supervivencia (cepas co-transformadas sembradas en YPD), control positivo de transformación (4 µg de plásmido pCAS con un ARNg que carece de sitio PAM en el genoma) y control de edición/reparación NHEJ (8 µg del plásmido pCAS correcto pero sin ADN donante). Para todas las electroporaciones de este ensayo se utilizaron cubetas de 2 mm. Todos los controles, a excepción del de supervivencia, se sembraron en medio sólido YPD con G418.

El control negativo y el de supervivencia dieron de acuerdo a lo esperado (ausencia de crecimiento en el primero y presencia de crecimiento en el segundo). En cuanto a los controles positivos de transformación, se obtuvieron 56 colonias, obteniendo una eficiencia de transformación de $3,5 \times 10^{-8}$. Se observó el crecimiento de 27 colonias individuales en el control de edición/reparación NHEJ y 5 colonias individuales en la co-transformación con el fragmento donante con colas de homología cortas. No se observó crecimiento en las placas que contenían la co-transformación del plásmido pCAS y el ADN donante con colas de homología largas. Esto probablemente se deba a que para llegar a una concentración de 9 µg del plásmido con el inserto *Pho13* con colas de homología largas (pSKII::*pho13-XylA-pho13*) se utilizaron 40 µL de miniprep, diluyendo demasiado



los componentes de la transformación y, probablemente también, la probabilidad de encuentro de las células con los ADN donantes. En cambio, para 40 µg del plásmido pSKII::*pho13-XylA-pho13* con colas de homología cortas solo fueron necesarios 10 µL de plásmido. Por diferentes razones, fue imposible llevar a cabo la evaluación de la presencia del gen *xylA* en las cepas resultantes.



8 DISCUSIÓN

En este trabajo se construyeron todos los componentes necesarios para insertar el gen *xylA* de *Piromyces* sp. en cada gen *target* (*PHO13*, *APJ1*, *ALD6*, *XYL2*, *ISU1* y *Ty*) de la cepa CAT-R mediante el sistema de edición genética CRISPR Cas9:

-Los seis vectores *shuttle* pCAS contienen el gen que codifica para la enzima Cas9 de *S. pyogenes*, el promotor RNR2 y la señal terminadora. Cada vector recrea la horquilla característica del crARN maduro de CRISPR de tipo II, seguida por el guía seleccionado para cada gen *target*.

-Los fragmentos de ADN con el gen *xylA* de *Piromyces* sp. flanqueado por zonas de homología correspondiente a cada gen *target*.

Para la modificación de cada gen *target* se transformó la cepa CAT-R con las construcciones correspondientes, incluyendo el vector *shuttle* y el gen *xylA* asociado a ese gen. La presencia del plásmido pCAS en las levaduras transformadas se evaluó únicamente por adquisición de resistencia antibiótica, de forma que el control negativo fue sensible al antibiótico G418. La identificación de las cepas mutantes que hubiesen incorporado el gen *xylA* se efectuó por PCR con cebadores que hibridan por fuera de la zona a ser modificada. Todas las cepas resultantes fueron negativas para la inserción de *xylA* de *Piromyces* sp.

8.1 ELECCIÓN DEL SISTEMA DE MODIFICACIÓN GENÉTICA: ¿POR QUÉ CRISPR CAS?

Tal como se mencionó en la introducción, para la edición génica de *S. cerevisiae* se han reportado cuatro tipos de nucleasas: endonucleasas, nucleasas TALEN, nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y nucleasas asociadas a CRISPR⁹².

La modificación de *S. cerevisiae* por endonucleasas se describió por primera vez a fines de la década del 80. Si bien este método es robusto y puede producir ediciones en hasta el 20 % de la población celular que sobrevive a la transformación, se basa en el reconocimiento de secuencias específicas que se encuentran en baja frecuencia dentro del genoma (no repetidas). Además, debido a la “baja” frecuencia de modificación, para



seleccionar las levaduras recombinantes es necesario utilizar genes que codifiquen para la resistencia a antibióticos o que permitan complementar fenotipos de auxotrofia.

El sistema de enzimas TALEN (por sus siglas en inglés, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) puede diseñarse para identificar y cortar secuencias específicas de ADN en el genoma de un organismo. Estas enzimas se obtienen mediante la fusión de un dominio de unión al ADN (repetidos de aminoácidos que se corresponden con una secuencia genética específica) y un dominio de corte (nucleasa que corta las cadenas de ADN). Si bien este sistema es mucho más fácil de diseñar que el sistema anterior, las secuencias necesarias para codificar las repeticiones de aminoácidos pueden ser difíciles de ensamblar. A pesar de esto, este sistema fue el más utilizado hasta el descubrimiento y la adaptación del sistema CRISPR como editor genético. Por último, los ZFN son proteínas de fusión artificiales que unen un dominio de unión de ADN con dedos de zinc a un dominio de nucleasa de corte inespecífico (no dependiente de secuencia)⁹³. Este sistema, al igual que el anterior, depende de una proteína que reconoce e interactúa con el ADN.

El sistema CRISPR Cas involucra una molécula de ARN en lugar de la proteína de unión al ADN. Esto implica una ventaja frente a los otros sistemas, siendo más sencillo de diseñar y sintetizar⁹⁴. Debido a su eficiencia y forma de funcionar (Cas9 reconoce la secuencia complementaria al ARN y corta ambas hebras hasta que dicha secuencia se modifica), es un sistema que permite modificar varios alelos de un gen en un único evento de transformación, implicando una ventaja frente a otros sistemas cuando se trabaja con organismos multiploides. Además, antes de la aparición de CRISPR-Cas9 como herramienta de ingeniería genética, la mayoría de los métodos utilizados para la eliminación o integración de genes se basaban en la integración simultánea de un gen marcador de selección y, por lo tanto, por cada modificación alélica requerían un ciclo de transformación, selección, confirmación y posterior de reciclaje de marcadores⁹⁵. Cabe resaltar que si bien el sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado ampliamente para la ingeniería genética multiplex de *S. cerevisiae*, su aplicación en la manipulación de cepas industriales de levadura ha tenido menos éxito, probablemente debido a la complejidad del genoma y al bajo número de copias de los plásmidos de expresión de ARN⁹⁶. En comparación con las cepas de laboratorio, las levaduras industriales son más productivas y robustas en condiciones adversas. Sin embargo, las cepas industriales son poliploides y la presencia



de múltiples copias de cromosomas hace que la ingeniería de su genoma sea muy desafiante. La eficiencia de la eliminación de genes usando el sistema CRISPR-Cas9 varía en relación con la longitud y la complementariedad de la secuencia del crARN y la ubicación particular del gen a eliminar. Por otro lado, la efectividad, la precisión (únicamente se corta el sitio deseado) y la resolución de la mutación genética dependen de varios factores, incluido el diseño del sgARN, capacidad de concretar el corte de doble hebra y los niveles de expresión de la nucleasa.

La elección del sistema para internalizar los componentes del CRISPR-Cas9 también es fundamental. La electroporación, transformación química, la micro-inyección y los tipos de vectores utilizados *in vitro* e *in vivo* sigue siendo un desafío. Además, en modelos de estudio como *Drosophila* se ha observado cierta toxicidad de los vectores y otros componentes del sistema también constituyen otro desafío a contemplar⁹⁷. De hecho, uno de los hallazgos recientes es la posibilidad de usar un *cassette* de varios ARNg para guiar el corte del ADN, estimulando así reparación por recombinación homóloga. La ventaja es que no se necesitan varios plásmidos o marcadores seleccionables para producir los ARNg funcionales en células que contienen el gen *cas9* inserto en el cromosoma, permitiendo así incorporar muchos ARNg que pueden transformarse al mismo tiempo. Esto podría permitir la modificación y selección genómica de muchos *loci* a la vez⁹⁴.

Por todo lo expuesto, a pesar de su complejidad en diseño, se cree conveniente seguir apostando la puesta a punto del sistema CRISPR Cas9 en la cepa CAT-1.

8.2 ¿TRANSFORMACIÓN QUÍMICA O ELECTROPORACIÓN?

Las levaduras se pueden transformar por diversos procedimientos: transformación química por acetato de litio y polietilenoglicol (LiAc/PEG), electroporación, agitación con perlas de vidrio, bombardeo con microproyectiles recubiertos de ADN⁸⁵ y la eliminación de la pared celular de la levadura por tratamiento enzimático para producir protoplastos⁹⁸. Estas técnicas de transformación tienen una eficiencia de recuperación de transformantes de al menos 5×10^6 transformantes/ μg de ADN plasmídico partiendo de 1×10^8 células. La eficiencia de transformación se puede determinar calculando el número de UFC transformantes/ μg de plásmido/N° de células de partida⁸⁵.



Cada técnica tiene ventajas y desventajas, y la más adecuada para cada estudio en particular dependerá de las necesidades y recursos específicos del investigador⁹⁸. En cuanto a las eficiencias, las más altas, permiten recuperar alrededor del 5% de células de levadura transformadas⁹⁸.

En este trabajo se llevaron a cabo repetidas veces y en diferentes condiciones de trabajo dos de estos procedimientos: transformación química LiAc/PEG y electroporación. Se calcularon las eficiencias de transformación de cada ensayo. Comparado con lo reportado anteriormente, dichos rendimientos son extremadamente bajos para ambos protocolos, incluso en varios órdenes de magnitud. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que el ensayo completo no consiste sólo en una transformación plasmídica. Involucra una co-transformación. Parece importante destacar que para los cálculos de eficiencia de transformación se utilizó los resultados obtenidos con el control positivo de transformación, considerando únicamente los μg de plásmido agregado (que son los que confieren la resistencia antibiótica) y no los de ADN donante. Esta consideración puede ser uno de los motivos de haber obtenido una eficiencia más baja, ya que la probabilidad de que entre un plásmido a las células disminuye si hay más material genético extra presente, haciendo poco comparables las eficiencias de los ensayos. Además, para estos cálculos se utilizaron los datos generados en el ensayo realizado por la Bach. Melanie Rodriguez en donde se observó que en un cultivo con una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ hay 2×10^7 UFC/ml. Este valor es similar al reportado en otras fuentes en donde se determina la concentración de suspensiones con cepas industriales de levaduras (<https://www.apexscientific.co.za/resources/yeast-cell-count-at-od600/>). Debe notarse que la estimación difiere bastante con la descrita por Gietz et al, 2002, en donde las suspensiones de células haploides del orden de 1×10^6 alcanzarían una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1. .

La frecuencia de inserción de un gen por recombinación homóloga en *S. cerevisiae* ronda en un evento de recombinación por cada $10^4/10^5$ células⁹⁹, por lo cual se necesitaría al menos una eficiencia de transformación de 10^5 para obtener al menos una cepa mutante. Probablemente, este sea al menos uno de los motivos por el cual no se obtuvieron clones recombinantes en este trabajo. Para continuar con este objetivo se cree conveniente ajustar un protocolo para poner a punto la técnica con células haploides y diploides (transformación química o electroporación). Una vez elegido el protocolo, se debería



poner a punto dicha técnica con la cepa CAT-R y un plásmido pCAS que no contenga un ARNg complementario al genoma de las cepas de estudio, evitando así, la alteración de su genoma. Dicho protocolo de transformación debería generar un número relativamente alto de clones transformantes (preferentemente cercana a 1×10^6 transformantes habiendo partido de 1×10^8 células). Consideramos que una vez que se alcance una eficiencia de transformación elevada, se podría proseguir con el sistema de CRISPR-Cas9 diseñado en este trabajo.

Según Gietz D. y Woods R. A., la transformación química es más eficiente y genera rendimientos de hasta 5×10^6 transformantes/ μg de ADN plasmídico/ 10^8 células con las cepas de laboratorio comúnmente utilizadas⁸⁵. La transformación de *S. cerevisiae* con cationes alcalinos fue descrita por primera vez en 1983 por Ito y col. Se han producido muchas mejoras en los últimos 20 años, haciendo que el procedimiento sea más eficiente en la generación de transformantes y acortando los tiempos de transformación¹⁰⁰.

Sin embargo la gran mayoría de los protocolos de transformación, incluyendo la última transformación reportada por Gietz y col. como la más eficiente⁸⁷, se ajustaron usando levaduras haploides. Probablemente, para levaduras diploides la eficiencia de transformación cambie, y aún más la de mutación. Algunas de las diferencias del último protocolo de transformación reportado por Gietz y col. respecto a su versión anterior (2002) son: un aumento de la cantidad de lavados con agua destilada en los pasos iniciales de centrifugación de las células, la distinción entre dos mezclas de transformación (una para transformaciones simples y otra en caso de co-transformación), el agregado de un paso de incubación durante 2-3h a 30°C (en caso de que el sistema de selección de transformantes sea por resistencia antibiótica), para asegurar la expresión del gen de resistencia presente en el plásmido⁸⁷.

Durante nuestro protocolo de transformación no tomamos en cuenta las siguientes consideraciones que podrían mejorar la eficiencia de transformación:

- Utilizar un matraz con deflectores para el crecimiento o un frasco sin deflectores con solo el 10 % del volumen de cultivo⁸⁷.



- Usar soluciones recientemente preparadas de PEG, ya que la evaporación del agua cambia la concentración de la solución, pudiendo afectar negativamente la eficiencia de transformación⁸⁷.
- Verificar que las células se dupliquen al menos dos veces antes de comenzar el protocolo. Un buen crecimiento es esencial para la transformación. Las células con tres o cuatro divisiones también deberían transformarse de manera eficiente⁸⁷.
- Extender la incubación de las placas sembradas a 30°C hasta 3-4 días⁸⁵.

Para futuros trabajos, considero sería adecuado ajustar el protocolo de transformación incluyendo estas sugerencias.

8.3 DISEÑO DEL SISTEMA CRISPR

Aunque el sistema CRISPR-Cas9 se ha aplicado para la edición del genoma en levaduras haploides de laboratorio y en levaduras industriales, en general se observó una eficiencia de desactivación de genes mucho menor para las últimas⁹⁶. Por ejemplo, el protocolo de interrupción de un solo gen en una cepa industrial triploide (ATCC 4124) exhibió un porcentaje de eficiencia entre 15 % y 60 %, en comparación con una eficiencia de casi el 100 % en cepas de laboratorio, lo que indica una clara dificultad en la ingeniería del genoma multiple¹⁰¹. Por otro lado, la presencia de un fragmento donante en la transformación de CRISPR-Cas9 aumenta la probabilidad de recombinación y reparación. Según Di-Carlo J. E. y col. 2013, la co-transformación del ADN donante con el plásmido de expresión gARN.CAN1Y aumentó la frecuencia de transformación en comparación con un control de ADN sin donante⁹⁴. Si bien la co-transformación con un fragmento de ADN donante aumenta la frecuencia de recombinación entre los sobrevivientes, el lugar en el que el mismo recombina respecto al sitio de corte y la longitud de los brazos de homología también es fundamental. Laughery & Wyrick (2019) recomiendan que el fragmento recombine a ambos lados del sitio de corte (preferentemente a 3-4 pb del sitio 5' de la región PAM)¹⁰². Zhiwei Xu y col. afirman que el largo de los brazos de homología es un factor clave que afecta directamente la eficiencia de la edición genética mediante el sistema CRISPR-Cas9 en cepas diploides de *S. cerevisiae*⁹¹. Si bien hay estudios que utilizan fragmentos de ADN reparador con brazos de homología flanqueantes de 60 pb



de manera eficientemente^{95,102}, Zhiwei Xu y col afirman que la eficiencia de mutación aumentó de 0-100% cuando se incrementó el largo del fragmento homólogo de 50pb a 120pb respectivamente en cada brazo⁹¹. Estas diferencias en la obtención de cepas mutantes podrían deberse, como ya se ha mencionado anteriormente, a la ploidía de las células.

Una limitación importante que hay que tener en consideración a la hora de diseñar el sistema CRISPR es el número de copias del plásmido que expresa ARNg. En cepas de levadura industrial, este número suele ser relativamente bajo. Hasta ahora, se han adoptado varias estrategias para la expresión de Cas9 y ARNg y la mayoría de los estudios reportan que es necesario expresar ARNg en un plásmido multicopia 2 μ para lograr una ingeniería genómica eficiente en *S. cerevisiae*⁹⁴. Curiosamente, el número de copias de un plásmido no se determina principalmente por el origen de la replicación, la elección del gen de selección puede enmascarar por completo los efectos de diferentes orígenes de replicación. Los plásmidos con origen de replicación 2 μ (alto número de copias) con marcadores auxotróficos (*HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*) como método de selección se encuentran entre 20–30 copias por célula, mientras que cuando el método de selección son genes antibióticos (por ejemplo, *kanMX* y *hygB*) el número de copias por célula suele ser entre 3–5¹⁰³. Esto podría ser evitado diseñando una serie de plásmidos que contengan debilitada la expresión de los genes codificantes a resistencia antibiótica logrando así un mayor número de copias plasmídicas¹⁰⁴.

En este estudio se utilizó el vector pCAS, que tiene un origen de replicación 2 μ y codifica tanto para la enzima pCAS como para el ARN guía. El método de selección del mismo es el gen que codifica para la resistencia antibiótica al G418. Basado en lo expuesto anteriormente, sería conveniente realizar un control de los niveles de expresión de los ARNg o del número de copias del plásmido en las células. En caso de no ser suficiente, evaluaría dos posibilidades: debilitar los niveles de expresión del gen que codifica para la resistencia antibiótica a G418 o utilizar otro sistema, con un vector para la enzima Cas9 y otro diferente para los ARNg con otro marcador de selección que no afecte tanto el origen de replicación o con la expresión del gen de resistencia debilitada. Diferentes microorganismos tienen diferentes umbrales de tolerancia hacia la expresión de la nucleasa Cas9 que deben abordarse para que el sistema CRISPR-Cas9 sea útil en dichos



organismos¹⁰⁵. Este último sistema propuesto permitiría regular diferencialmente la expresión de la enzima Cas9 de la de los ARNg, facilitando así la adaptación del sistema a los requerimientos específicos de *S. cerevisiae*.

Por otro lado, tal como se explicó en Materiales y métodos, en este trabajo la mayoría de las transformaciones se realizaron con un ADN donante que contenía brazos de homología de 50 pb largo. Sobre el final del trabajo, se realizó una transformación con un ADN donante que contenía 120 pb de homología en cada zona flanqueante pero no se obtuvieron colonias resistentes. Probablemente, esto se deba a que el protocolo de transformación no fue eficiente. En cuanto a la ubicación de los brazos de homología respecto al sitio de corte, todos los brazos de homología diseñados para cada gen *target* distaban entre 50 a 100 pb del sitio de corte. Esta podría ser otro punto a re-evaluar en el diseño del sistema CRISPR-Cas9 en caso de no obtener cepas mutantes luego de ajustar el protocolo de transformación.

Por otro lado, además de los problemas directamente relacionados a la transformación *per se* y al diseño del sistema CRISPR, otras causas de la baja eficiencia en el ensayo CRISPR-Cas9 podrían ser:

- 1) Una mutación en el gen que codifica para la enzima Cas9 o en la parte estructural del ARN guía. Esto se podría confirmar mediante la secuenciación completa del plásmido pCas diseñado por *RF cloning*. En este trabajo se confirmó por secuenciación únicamente la presencia del ARNg (20 pb) en el plásmido y en el gen *target* pero no la secuencia del gen que codifica para la enzima Cas9 ni del ARN estructural (horquilla). De todas formas, esta alternativa parece poco probable debido a que el sistema no funcionó para ninguno de los genes *target* y sería demasiada coincidencia que en los 6 protocolos de *RF cloning* hubiera ocurrido lo mismo.
- 2) Que el ARNg no sea funcional. Por razones que no se comprenden bien, algunas secuencias diana de ARNg exhiben una baja actividad de restricción⁹⁵. Es por esto que generalmente se recomienda diseñar varios ARNg para el gen *target*.
- 3) Que la enzima Cas9 no se esté expresando correctamente. La presencia del plásmido en las levaduras se confirmó mediante resistencia antibiótica, pero nunca se confirmó la expresión correcta de la enzima Cas9 luego de la



transformación. Probablemente, sería conveniente realizar un estudio de RT-qPCR para verificar que la misma se está expresando.

- 4) Un *loci* notoriamente difícil de modificar. Dependiendo del locus objetivo, se obtienen diferentes eficiencias de transformación. Esto se resuelve aumentando la concentración del plásmido de expresión de ARNg en el paso de transformación, lo que, en teoría, da como resultado más colonias.

En cuanto a los controles de la transformación con el sistema CRISPR-Cas9, es fundamental tener en cuenta que el control sin ADN de reparación debería producir muy pocas colonias (típicamente menos de 10) porque Cas9 estaría cortando el ADN repetidamente mientras no ocurra una mutación en la hebra donde hibrida el ARNg. Las pocas colonias que surgen en ausencia de un ADN de reparación suelen tener una mutación aleatoria cerca del sitio de escisión de Cas9, debido a un proceso NHEJ propenso a errores. Si aparece una gran cantidad de colonias en la placa de control edición/reparación NHEJ "sin ADN de reparación", esto indicaría un corte deficiente por parte de Cas9, probablemente debido a un problema con el diseño del ARN guía o alguna mutación en la secuencia. La reacción de transformación experimental (es decir, la que contiene el plásmido pCAS y el ADN donante) debería producir 10-100 veces más colonias que el control sin ADN donante, pero menos colonias que transformación con el vector de control vacío (es decir, el que tiene un ARNg no-complementario)¹⁰². En el último ensayo de este trabajo, se observaron 56 colonias en el control positivo de transformación, 27 colonias individuales en el control de edición/reparación NHEJ (sin ADN donante) y 5 colonias individuales en la co-transformación con el fragmento donante con colas de homología cortas. Si bien estos resultados apuntan a que la enzima Cas9 podría estar funcionando deficientemente, el ensayo debería ser repetido para asegurar que no se debe a un acontecimiento puntual de la transformación realizada.

8.4 REVISIÓN DE PROYECTO Y MODIFICACIONES A APLICAR

Hasta hoy en día, la investigación sobre la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos por parte de *S. cerevisiae* se ha centrado en el desarrollo de cepas de levadura "generalistas", capaces de fermentar mezclas de D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la especie *Spathaspora passalidarum*



fermenta D-xilosa mostrando rendimientos y productividades de etanol elevados cuando se cultiva en medios suplementados con dicha pentosa y en condiciones anaeróbicas o con oxígeno limitado. La especie también exhibe la capacidad de fermentar glucosa, D-xilosa y celobiosa simultáneamente. Estas características sugieren que *Sp. passalidarum* es un candidato potencial para la domesticación y uso en la fermentación de materiales lignocelulósicos. La alta capacidad de dicha cepa para utilizar D-xilosa, incluso en condiciones anaeróbicas, se debe en parte al equilibrio entre la oferta y la demanda de cofactores a través de las enzimas xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH), que convierten la D-xilosa en xilitol y el xilitol en xilulosa, respectivamente, mediante la vía llamada oxorreductiva. Si bien todas las enzimas XDH descritas son dependientes de NAD^+ , la mayoría de las enzimas XR prefieren o solo utilizan NADPH, lo que crea un desequilibrio de cofactores. *S. passalidarum* posee una XR que utiliza preferencialmente NADH, al igual que otras levaduras que fermentan D-xilosa. Estos resultados impulsan estudios que buscan explorar el uso de genes de *Sp. passalidarum* para modificar cepas industriales de *S. cerevisiae* generando variantes de levadura superiores a las actualmente existentes. Otra alternativa que se está explorando es domesticar *Sp. passalidarum* debido a los excelentes resultados de fermentación de D-xilosa ya logrados por representantes salvajes de esa especie. El problema principal de esta levadura es que es incapaz de soportar los inhibidores presentes en el hidrolizado hemicelulósico¹⁰⁶.

Por otro lado, desde una perspectiva teórica, la tasa de conversión máxima en condiciones de exceso de sustrato solo se puede alcanzar cuando, a través de la adaptación evolutiva o la ingeniería genética de cepas, un microorganismo asigna preferentemente sus recursos celulares (por ejemplo, capacidad ribosómica, ATP, aminoácidos) a la conversión rápida de un único sustrato¹⁰⁷. Este principio, que explica la evolución de la utilización de sustratos secuenciales durante la utilización de sustratos mixtos por parte de microorganismos de tipo salvaje, sugiere que el uso de consorcios de cepas de levadura especializadas en la fermentación de D-glucosa, D-xilosa o L- la arabinosa podría permitir una mejor cinética de fermentación de azúcares mixtos que la aplicación de una sola cepa generalista¹⁰⁸. Una ventaja potencial adicional de la conversión de azúcares mixtos por consorcios de cepas especializadas se relaciona con la estabilidad del proceso. Para optimizar la productividad volumétrica, los procesos industriales idealmente deberían reciclar la biomasa de levadura, en lugar de iniciar cada



nuevo ciclo de lote con un nuevo inóculo de biomasa de levadura recién propagado. Tal reciclaje de biomasa de levadura requiere estabilidad de la cinética de fermentación a través de un gran número de ciclos de cultivo. Sin embargo, los experimentos de evolución de laboratorio con cepas generalistas fermentadoras de glucosa y pentosas han mostrado una degeneración progresiva de su cinética de fermentación de pentosas durante el crecimiento prolongado luego de la repetición de varios lotes de cultivo¹⁰⁹. De hecho, se han reportado ensayos de producción en los cuales se pudo detectar un consumo completo de glucosa en las primeras horas de fermentación seguido del consumo de D-xilosa una vez agotada la primera¹¹⁰. Esto se puede deber a que la asignación preferencial de recursos para fermentar uno de los azúcares generalmente es a expensas de la expresión de proteínas involucradas en otras vías¹¹¹. La selección de cepas en sustratos individuales (azúcares por separado) favorece la adaptación de los mutantes a la fermentación de dichos sustratos, asignando sus recursos celulares a los procesos que contribuyen directamente al crecimiento en ese sustrato¹¹¹. Si bien una alternativa para la producción de biocombustible podría ser hacer tres tanques de producción en el cual en uno se fermente la glucosa, en otro D-xilosa y en otro arabinosa por parte de un único organismo generalista, parece más sencillo diseñar 3 cepas diferentes, cada una capaz de fermentar un único sustrato. Además, se ha demostrado que los cultivos en consorcio pueden producir etanol en un rendimiento que es de 2 a 12% mayor que la de un solo microorganismo¹¹². A pesar de estos resultados, se sigue invirtiendo tiempo y recursos en el diseño de un único microorganismo generalista para la producción de biocombustibles. Las principales ventajas que confiere éste son la facilidad del bio-procesamiento en cuanto a las dificultades asociadas a la estabilidad de los cultivos en consorcio y la simplicidad del proceso de producción. Aunque la decisión de usar una sola cepa puede basarse en dicha facilidad o en el paradigma de un solo microorganismo, no está claro si se puede diseñar un único organismo que compita con una colección de organismos especializados. La creciente evidencia descrita en los últimos años demuestra que las velocidades de fermentación de los consorcios de microorganismos son mejores que las de los microorganismos generalistas^{108,112}. Todo parece apuntar a que quizás un consorcio de microorganismos podría ser la mejor opción. El desafío principal de esta alternativa es controlar la dinámica poblacional entre los organismos, definir las proporciones de las cepas que componen dicho consorcio y la



cantidad de pasajes sucesivos posibles (reutilización de la biomasa) sin alterar la dinámica poblacional. Esto se debe a que la estrategia de reciclaje celular, en donde aproximadamente el 90% de la biomasa celular resultante del proceso de fermentación se utiliza en el siguiente ciclo de fermentación, permite trabajar con altas densidades celulares (10 a 17% (p/v) en base húmeda), acortando el tiempo de fermentación y, en consecuencia, reduciendo los costos operativos. Además, el reciclaje celular puede aumentar la tolerancia de la levadura a los compuestos inhibidores presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, promoviendo mayores títulos y productividades de etanol¹¹⁰. Por otro lado, otro aspecto a evaluar es si el diseño de dicho consorcio incluya cepas salvajes y/o sintéticas.

En base a lo expuesto anteriormente, se sugiere a futuro, diseñar un consorcio de tres cepas diferentes. Una cepa salvaje encargada de la fermentación de glucosa, una cepa capaz de fermentar D-xilosa, deficiente para el consumo de glucosa y, una última cepa, capaz de consumir únicamente arabinosa. De esta forma, se aprovecharían todos los azúcares presentes en el hidrolizado de lignocelulosa. En cuanto a la cepa que consuma únicamente D-xilosa, se sugieren las modificaciones planificadas en este proyecto, incluyendo además la depleción los dos alelos de los genes hexoquinasa (*hvk1-hvk2*), lo que asegura la anulación de la vía de fermentación de glucosa¹⁰⁸. Otra alternativa interesante a evaluar es la reportada por J. Ruchala y col. (2019) quienes crearon una proteína híbrida artificial que consiste en un transportador de D-xilosa y una enzima Xilosa Isomerasa. Dicha proteína híbrida se expresó con éxito en *S. cerevisiae* y la cepa resultante mostró un aumento en la velocidad del consumo de D-xilosa y una producción sustancialmente menor de xilitol como producto secundario no deseado, con un aumento concomitante en la producción de etanol¹¹³.

En el caso de la cepa especializada en la fermentación de arabinosa, se podría obtener eliminando los dos alelos de los genes hexoquinasa (*hvk1-hvk2*), al igual que en la cepa especializada para la fermentación de D-xilosa. Además, se podría utilizar como genes diana *POH13*, *ALD6*, *ISU1*. Los genes a incorporar son los de la vía arabinosa isomerasa de *Lactobacillus plantarum* (*araB*, *araB*, *araD*), combinado con una desregulación de la permeasa Gal2, que también transporta L-arabinosa¹⁰⁸. Por último, incluiría una etapa



de propagación en hidrolizado de hemicelulosa de todo el consorcio en conjunto con el objetivo de que las cepas se adapten a los inhibidores presentes en el mismo.



9 CONCLUSIÓN

Si bien no se logró construir una cepa modificada de *S. cerevisiae* capaz de producir etanol como producto mayoritario de la fermentación de D-xilosa a través de la vía de isomerización, se construyó todo el sistema para la modificación de dicha cepa. Se concluye que la imposibilidad de obtención de cepas mutantes se debe, probablemente, a un protocolo de edición (transformación de ADN, expresión sistema Cas y proceso de recombinación homóloga) ineficiente. Se enfatiza en la necesidad de poner a punto dicho protocolo y luego utilizar el protocolo resultante para el sistema y modelo de estudio.

Por otro lado, se concluye que el sistema de edición genética CRISPR-Cas9 es complejo de diseñar y de aplicar, teniendo varios factores a evaluar, como son el diseño de los ARNg, el número de copias de los mismos y del gen que codifica para la enzima Cas9, la presencia de un ADN reparador y el tamaño de las zonas de homología del mismo y dónde hibridan respecto al sitio de corte, entre otros factores. Al momento de realizar la discusión se dilucidaron varios puntos a re-evaluar en el diseño del sistema en caso de que el problema raíz no sea la eficiencia de transformación. Entre estos puntos se encuentran:

- Diseño de ARN guías (se recomienda diseñar varios ARN guías por gen *target*)
- Evaluar el número de copias de los plásmidos que contienen los ARN guías
- Evaluar los niveles de expresión de la enzima Cas9 (activa)
- Modificar la ubicación de brazos de homología y longitud de los mismos

A su vez, se sugieren grandes modificaciones en la globalidad del proyecto, como el uso de consorcios de cepas en vez del diseño de una única cepa generalista para la fermentación de todos los azúcares presentes en el hidrolizado de hemicelulosa.

Si bien no se logró cumplir el objetivo del proyecto, las alternativas para seguir trabajando en el mismo para encontrar la causa de la falla del sistema de edición genética son muchas y el conocimiento generado a raíz de lo sucedido ha enriquecido a nuestro grupo de trabajo. Lograr poner a punto la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 en el laboratorio implicaría un avance importante para el grupo, ya que abriría las puertas a cualquier modificación posible en *S. cerevisiae*.



10 BIBLIOGRAFÍA

1. Cheah, W. Y. et al. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: Current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Res. J.* **7**, 1115–1127 (2020).
2. Patel, A. & Shah, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *J. Bioresour. Bioprod.* **6**, 108–128 (2021).
3. Lee, R. A. & Lavoie, J.-M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Anim. Front.* **3**, 6–11 (2013).
4. Jeremy & Moorhouse. Renewable Energy Market Update. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en (2020).
5. Hemansi et al. Second Generation Bioethanol Production: The State of Art. (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-319-94797-6_8.
6. Awogbemi, O., Von Kallon, D. V., Onuh, E. I. & Aigbodion, V. S. An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications. *Energies* **14**, 1–42 (2021).
7. Bhardwaj, S., Kumar, S. & Arora, R. Bioprospecting of Microorganisms for Biofuel Production. (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-53933-7_2.
8. David, J., Medina, C. & Magalhaes, A. I. Ethanol Production, Current Facts, Future Scenarios, and Techno-Economic Assessment of Different Biorefinery Configurations. *Bioethanol Technol.* (2020) doi:10.5772/INTECHOPEN.95081.
9. Carriquiry, M. A., Du, X. & Timilsina, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy* **39**, 4222–4234 (2011).
10. Ramírez-Estrada, A., Mena-Cervantes, V. Y., Mederos-Nieto, F. S., Pineda-Flores, G.



- & Hernández-Altamirano, R. Assessment and classification of lignocellulosic biomass recalcitrance by principal components analysis based on thermogravimetry and infrared spectroscopy. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021 1–16 (2021) doi:10.1007/S13762-021-03309-Y.
11. Patel, A. & Shah, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *J. Bioresour. Bioprod.* **6**, 108–128 (2021).
 12. Lavoie, J.-M., Beauchet, R., Berberi, V. & Chornet, M. Biorefining Lignocellulosic Biomass via the Feedstock Impregnation Rapid and Sequential Steam Treatment. *Biofuel's Eng. Process Technol.* (2011) doi:10.5772/18186.
 13. Andrade, M. C., Oliveira, C. De, Silva, G., Rios, L. & Moreira, D. S. Crop residues : applications of lignocellulosic biomass in the context of a biore fi nery. (2021).
 14. Cherubini, F. The biorefinery concept : Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* **51**, 1412–1421 (2010).
 15. Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V. & Verma, P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass : An emerging biore fi nery concept. **199**, (2020).
 16. Lorenci Woiciechowski, A. et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresour. Technol.* **304**, 122848 (2020).
 17. Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. & Dalai, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**, 578–597 (2010).
 18. Bhutto, A. W. et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy* **122**, 724–745 (2017).
 19. Rosales-Calderon, O. & Arantes, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels* vol. 12 (BioMed Central, 2019).



20. Sharma, B., Larroche, C. & Dussap, C. G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **313**, 123630 (2020).
21. Kang, A. & Lee, T. S. Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond. *Bioengineering* **2**, 184–203 (2015).
22. Salusjärvi, L., Pitkänen, J. P., Aristidou, A., Ruohonen, L. & Penttilä, M. Transcription analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* reveals novel responses to xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006 1283 **128**, 237–273 (2006).
23. Patiño, M. A., Ortiz, J. P., Velásquez, M. & Stambuk, B. U. d-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Yeast* **36**, 541–556 (2019).
24. Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. & Sawayama, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009 841 **84**, 37–53 (2009).
25. Costa, J. A. El proceso catalítico con lignina podría permitir un combustible de aviación 100 % sostenible. El proceso catalítico con lignina podría permitir un combustible de aviación 100 %25 sostenible (2022).
26. Mano, A. Brazil's Raízen to build second cellulosic ethanol plant - filing. Reuters (2021).
27. IEA. Implementation of bioenergy in Brazil - 2021 update. 1–15 (2021).
28. Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025. <https://agencia.fapesp.br/etanol-de-segunda-geracao-podera-ser-economicamente-viavel-a-partir-de-2025/26272/> (2017).
29. Chandel, A. K. et al. Brazilian biorefineries from second generation biomass: critical insights from industry and future perspectives. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **15**, 1190–1208 (2021).
30. Kwak, S. & Jin, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microb. Cell Factories* 2017 161 **16**, 1–15 (2017).
31. Kuyper, M. et al. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing



- Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. FEMS Yeast Res. **5**, 399–409 (2005).
32. Moysés, D. N., Reis, V. C. B., de Almeida, J. R. M., de Moraes, L. M. P. & Torres, F. A. G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. Int. J. Mol. Sci. 2016, Vol. 17, Page 207 **17**, 207 (2016).
 33. Luyten, K., Riou, C. & Blondin, B. The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. Yeast **19**, 713–726 (2002).
 34. Malán, A.K., Fagundez, A., Batista, B. S. Engineering Hemicellulose-Derived Xylose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications, Microbial models: from environmental to industrial sustainability. Microorg. Sustain. 41–56 (2016).
 35. Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M. & Boles, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **111**, 5159–5164 (2014).
 36. Weimberg, R. Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*. J. Biol. Chem. **236**, (1961).
 37. Stephen Dahms, A. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 1433–1439 (1974).
 38. Watanabe, S. et al. Novel non-phosphorylative pathway of pentose metabolism from bacteria. 1–13 (2019) doi:10.1038/s41598-018-36774-6.
 39. Karen, A. et al. *Herbaspirillum seropedicae* expresses non - phosphorylative pathways for d - xylose catabolism. 7339–7352 (2021) doi:10.1007/s00253-021-11507-4.
 40. Stephens, C. et al. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. **189**, 2181–2185 (2007).
 41. Jeffries, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. Curr. Opin. Biotechnol. **17**, 320–326 (2006).



42. Bettiga, M., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M. F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Biofuels* **1**, 0–8 (2008).
43. Chiang, C. & Knight, S. G. d-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 454–463 (1959).
44. Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. & Hahn-Hägerdal, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3381–3386 (2000).
45. Harhangi, H. R. et al. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch. Microbiol.* **180**, 134–141 (2003).
46. Van Vleet, J. H. & Jeffries, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 300–306 (2009).
47. Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H. M., van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **185**, 287–292 (1983).
48. Xiong, M., Chen, G. & Barford, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. *Bioresour. Technol.* **102**, 9206–9215 (2011).
49. Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2304–2311 (2009).
50. Walfridsson, M., Anderlund, M., Bao, X. & Hahn-Hägerdal, B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 218–224 (1997).
51. Silva, P. C. et al. A novel d-xylose isomerase from the gut of the wood feeding



- beetle *Odontotaenius disjunctus* efficiently expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Reports* | **11**, 4766 (123AD).
52. Sarthy, A. V. et al. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1996–2000 (1987).
 53. Amore, R., Wilhelm, M. & Hollenberg, C. P. The fermentation of xylose —an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *undefined* **30**, 351–357 (2004).
 54. Moes, C. J., Pretorius, I. S. & Zyl, W. H. Van. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* d-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **18**, 269–274 (1996).
 55. Walfridsson, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* *xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4648–4651 (1996).
 56. Kuyper, M., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res.* **4**, 655–664 (2004).
 57. Ronda, C. et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 1–11 (2015).
 58. Stovicek, V., Borodina, I. & Forster, J. CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* **2**, 13–22 (2015).
 59. Wach, A., Brachat, R., Pöhlmann, P. & Petráň, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1793–808 (1994).
 60. Karimian, A. et al. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *J. Cell. Physiol.* **234**, 12267–12277 (2019).
 61. Waddington, S. N., Privolizzi, R., Karda, R. & O'Neill, H. C. A Broad Overview and Review of CRISPR-Cas Technology and Stem Cells. *Curr. Stem Cell Reports* **2**, 9–20



- (2016).
62. Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **337**, 816–822 (2012).
 63. Le Cong et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80). **339**, 816–819 (2013).
 64. Izzaty, R. E., Astuti, B. & Cholimah, N. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Angew. Chemie Int. Ed.* 6(11), 951–952. **327**, 5–24 (1967).
 65. Babrzadeh, F. et al. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Mol. Genet. Genomics* 2012 2876 **287**, 485–494 (2012).
 66. Lucía, C. B. Construcción de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* , de origen industrial , capaz de producir etanol como producto de la fermentación de xilosa. (2018).
 67. Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. & Hegemann, J. H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30, e23–e23 (2002).
 68. Strain Engineering. Elsevier. 41-67 (2018).
 69. Coimbra, L. et al. Diseño y evaluación de una cepa recombinante derivada de la cepa industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, capaz de co-fermentar D-xilosa y D-glucosa a etanol. Present. al premio Nac. Microbiol. 2021 (2021).
 70. Fujitomi, K., Sanda, T., Hasunuma, T. & Kondo, A. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. *Bioresour. Technol.* **111**, 161–166 (2012).
 71. Dos Santos, L. V. et al. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
 72. Schwartz, K., Wenger, J. W., Dunn, B. & Sherlock, G. APJ1 and GRE3 homologs work in concert to allow growth in xylose in a natural *saccharomyces sensu stricto* hybrid



- yeast. *Genetics* **191**, 621–632 (2012).
73. Swinnen, S. et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res.* **22**, 975–984 (2012).
 74. Kim, S. R., Park, Y. C., Jin, Y. S. & Seo, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol. Adv.* **31**, 851–861 (2013).
 75. Lee, S. H., Kodaki, T., Park, Y. C. & Seo, J. H. Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **158**, 184–191 (2012).
 76. Sakai, A., Shimizu, Y. & Hishinuma, F. Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 302–306 (1990).
 77. Mitsui, R., Yamada, R. & Ogino, H. Improved Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas-Mediated Genome Evolution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **189**, 810–821 (2019).
 78. BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300 (1951).
 79. Michener, J. K. & Smolke, C. D. Yeast Metabolic Engineering. *Yeast Metab. Eng. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1152**, 125–136 (2014).
 80. Kuyper, M. et al. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* **4**, 69–78 (2003).
 81. Ryan, O. W. et al. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *Elife* **3**, 1–15 (2014).
 82. States, U. pBluescript II Phagemid Vectors INSTRUCTION MANUAL LIMITED PRODUCT WARRANTY ORDERING INFORMATION AND TECHNICAL SERVICES.
 83. Ronda, C. et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 1–11 (2015).



84. Fritsch, E., Sambrook, J. & Maniatis, T. Molecular cloning a laboratory manual second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
85. Gietz, R. D. & Woods, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**, 87–96 (2002).
86. Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425 (1992).
87. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31–34 (2007).
88. Achigar, R. Aplicaciones de inmovilización e ingeniería genética en la producción de cerveza. Departamento de ingeniería genética. *Biotecnología.* (2018).
89. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013 811 **8**, 2281–2308 (2013).
90. Lin, G., Zhang, K. & Li, J. Application of CRISPR/Cas9 Technology to HBV. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, Vol. 16, Pages 26077-26086 **16**, 26077–26086 (2015).
91. Xu, Z., Chen, Z., Wang, K., Sun, J. & Zhu, T. Construction of CRISPR/CAS9 system for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain and genetic manipulation effect on 2-phenylethanol pathway. (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-364472/v1.
92. Alexander, W. G. A history of genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **35**, 355–360 (2018).
93. Porteus, M. H. & Carroll, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **23**, 967–973 (2005).
94. Dicarlo, J. E. et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4336–4343 (2013).
95. Mans, R., Wijsman, M., Daran-Lapujade, P. & Daran, J. M. A protocol for introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR/Cas9. *FEMS Yeast Res.* **18**, 1–13 (2018).



96. Lian, J., Bao, Z., Hu, S. & Zhao, H. Engineered CRISPR/Cas9 system for multiplex genome engineering of polyploid industrial yeast strains. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 1630–1635 (2018).
97. Roy, B. et al. CRISPR/cascade 9-mediated genome editing-challenges and opportunities. *Front. Genet.* **9**, 1–12 (2018).
98. Gietz, R. D. & Woods, R. A. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816–831 (2001).
99. Malone, R. E., Montelone, B. A., Edwards, C., Carney, K. & Hoekstra, M. F. A reexamination of the role of the RAD52 gene in spontaneous mitotic recombination. *Curr. Genet.* **14**, 211–223 (1988).
100. Ito, H., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations or Thiol Compounds. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 341–347 (1984).
101. Zhang, G. C. et al. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7694–7701 (2014).
102. Laughery, M. F. & Wyrick, J. J. Simple CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **129**, 1–17 (2019).
103. Karim, A. S., Curran, K. A. & Alper, H. S. Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **13**, (2013).
104. Lian, J., Jin, R. & Zhao, H. Construction of plasmids with tunable copy numbers in *Saccharomyces cerevisiae* and their applications in pathway optimization and multiplex genome integration. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 2462–2473 (2016).
105. Determination of Cas9/dCas9 associated toxicity in microbes Chitra Seetharam Misra. (2019).
106. Cadete, R. M. & Rosa, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast* **35**, 191–199 (2018).
107. Berkhout, J. et al. How biochemical constraints of cellular growth shape



- evolutionary adaptations in metabolism. *Genetics* **194**, 505–512 (2013).
108. Verhoeven, M. D., De Valk, S. C., Daran, J. M. G., Van Maris, A. J. A. & Pronk, J. T. Fermentation of glucose-xylose-Arabinose mixtures by a synthetic consortium of single-sugar-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* **18**, (2018).
 109. Wouter Wisselink, H., Toirkens, M. J., Wu, Q., Pronk, J. T. & Van Maris, A. J. A. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 907–914 (2009).
 110. Dionísio, S. R. et al. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. *Fuel* **304**, (2021).
 111. Mans, R., Daran, J. M. G. & Pronk, J. T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **50**, 47–56 (2018).
 112. Alper, H. & Stephanopoulos, G. Engineering for biofuels: Exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 715–723 (2009).
 113. Thomik, T., Wittig, I., Choe, J. Y., Boles, E. & Oreb, M. An artificial transport metabolon facilitates improved substrate utilization in yeast. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1158–1163 (2017).
 114. Ausubel, F. M. Short protocols in molecular biology Second Edicion. Inc. Jhon Wiley Sons, Inc., (1992).



11 ANEXO

11.1 MATERIALES Y MÉTODOS

11.1.1 Medios de cultivo

11.1.1.1 Medio LB Diluido

Extracto de levadura 3 g

Bactotripton 5 g

Cloruro de sodio 5 g

Agua destilada c.s.p. 1L

11.1.1.2 Medio MM

Extracto de levadura 1 g

Extracto de malta 1 g

MgSO₄·7H₂O 0.4 g

(NH₄)₂SO₄ 2 g

KH₂PO₄ 5 g

D-xilosa 200g/L 100 mL g

Agua destilada c.s.p. 1L

11.1.1.3 Medio YPD

Extracto de levadura 10 g

Peptona bacteriológica 20 g

Glucosa 200 g/L 100mL

Agua destilada c.s.p. 1L

11.1.1.4 Medio YPX

Extracto de levadura 10 g



Peptona bacteriológica 20 g

D-xilosa 200 g/L 100mL

Agua destilada c.s.p. 1L

*El medio YP(1/5)X contiene lo mismo, solo que el extracto de levadura y la peptona bacteriológica están diluidos al quinto.

11.1.2 Soluciones y *buffers* utilizados

11.1.2.1 Solución Transformación química

11.1.2.1.1 5X LITE

Acetato de litio 0,5 M

Tris-HCl 50 mM

EDTA disódico 5 mM

Tris.HCl 50 mM - EDTA disódico 5 mM (mezcla final: pH 7,6)

Autoclavar

11.1.2.1.2 1X LITE

Acetato de litio 0,1 M

Tris.HCl 10 mM - EDTA disódico 1 mM (Mezcla final: pH 7,6)

Autoclavar

11.1.2.1.3 PEG LITE

PEG200 en 1X LITE hecho de 4 partes 50% PEG2000 y 1 parte 5X LITE

11.1.2.2 Solución Transformación química 2

11.1.2.2.1 Solución Pli



Acetato de Litio 1 M	1 mL
Agua Ultrapura	1 mL
3350 PEG 50%	8 mL

11.1.2.3 Soluciones de lisis alcalina

11.1.2.3.1 Solución I

Glucosa 50 mM

Tris.HCl 25 mM - EDTA disódico 10 mM (pH 8,0)

Se verifica el pH final

11.1.2.3.2 Solución II

NaOH 10 M	0.2 mL
SDS 10%	1 mL
Agua Ultrapura	8.8 mL

Se prepara en el momento

11.1.2.3.3 Solución III

Acetato de potasio	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
Agua ultrapura	28.5 mL



11.1.2.4

11.1.3 Técnicas Moleculares

11.1.3.1 Lisis celular de levaduras contenidas en una colonia

Se tomó el material correspondiente a 1 colonia aislada en una placa y se resuspendieron las células en un tubo de microfuga, en 100 μ L de LiAc 200 mM y SDS 1%. Se incubó la mezcla durante 5 min a 70°C. Luego, se agregaron 300 μ L de etanol 100% y se mezcló todo en *vortex*. Se centrifugó a 15000 g durante 3 min. Con etanol 70% se lavó el *pellet* y se secó en rota evaporador de marca Labconco (E2M8, Inglaterra) durante 10 min aproximadamente. Una vez seco, el *pellet*, se resuspendió en 100 μ L de agua ultrapura. Por último, la mezcla se centrifugó durante 15 seg a 15000 g.

Para las reacciones de PCR se utilizó 1 μ L de sobrenadante.

11.1.3.2 Gel de agarosa

Los ensayos de electroforesis se efectuaron en geles de agarosa 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X (45 mM *buffer* Tris-acetato, 1 mM EDTA disódico, pH 8,0), en una en una cuba de electroforesis horizontal de la marca Labnet modelo E 1007-10 de 7x10 cm (EE. UU.). Las electroforesis se desarrollaron a 90 V por 1 hora aproximadamente. El ADN se visualizó bajo luz UV, ya que se utilizó como agente intercalante ADN Good View (SBS, China) incorporado previamente en el gel (2 μ L para 50 mL de gel). En todos los casos se utilizó 5 μ L del marcador molecular. En las imágenes que no se especificó, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de Thermo Scientific (0.1 μ g/ μ L).

Agarosa 1% TAE 1X

Agarosa	0.5 g
---------	-------

<i>Buffer</i> TAE 1X (<i>buffer</i> Tris-acetato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)	50mL
---	------

Calentar a potencia máxima 1 minuto en microondas

Enfriar y agregar 2 μ L Good View (SBS, China)



11.1.3.3 Preparación de células competentes *E. coli* TOP10⁸⁴

A partir de un cultivo fresco de *E. coli* TOP10 en medio LB agar, se inoculó un tubo conteniendo 5 mL de caldo LB y se incubó con agitación durante toda la noche. Se usaron 3 mL de este cultivo para inocular 300 mL de caldo LB. Este último se incubó con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,2-0,3, medida en un espectrofotómetro visible-UV Shimadzu, modelo UV-1800 (Japón) (se utilizó como blanco de absorbancia medio LB). Se colectaron las células en tubos Falcon® de 50 mL por centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4°C y se lavó el *pellet* de células con una solución estéril fría de $CaCl_2$ 0,1 M, manteniendo las mismas condiciones de centrifugación. Luego se resuspendió el *pellet* en 5 mL de $CaCl_2$ 0,1 M frío y se incubó la suspensión durante 30 min en baño de hielo. Por último, se centrifugó nuevamente la suspensión en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 2 mL de $CaCl_2$ 0,1 M, glicerol 20% (v/v). Se transfirieron volúmenes de 100 μ L de esta suspensión celular a tubos de microfuga estériles de 1,5 mL y se guardaron a -80°C hasta su utilización (durante un período máximo de 4 meses).

11.1.3.4 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina¹¹⁴.

Este protocolo se utilizó para purificar los plásmidos pCAS y pSKII construidos.

Se inocularon tubos estériles conteniendo 5 mL de caldo LB Amp con células de *E. coli* y se incubaron durante toda la noche. Luego de 24 hs, se colectaron las células contenidas en aproximadamente 4,5 mL de cada cultivo en tubos de microfuga de 1,5 mL. Para ello, el cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó varias veces hasta recuperar las células en un solo tubo de centrífuga. Se descartó el sobrenadante con un tip y las células fueron resuspendidas en 300 μ L de solución I (ver anexo) con 2 μ L de RNAsa A (10 mg/mL) de Thermo Scientific (EE. UU.).

Posteriormente se agregaron 300 μ L de solución II (ver anexo) y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. Luego se agregaron 300 μ L de cloroformo y 300 μ L de solución III (ver anexo). Los tubos fueron mezclados en vortex de forma invertida. Posteriormente, para



separar eficazmente el ADN plasmídico de los restos celulares, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, y se transfirió la fase acuosa (que contiene el ADN plasmídico) a un tubo nuevo de microfuga de 1,5 mL.

A este último tubo se le agregó 660 µL de isopropanol para precipitar el ADN y se mezcló invirtiendo el tubo. Luego, la suspensión se centrifugó durante 30 min a 14000 rpm y 4°C y se descartó el sobrenadante (que contiene las sales, los restos celulares solubles en agua y alcohol). El *pellet* se resuspendió en 500 µL de etanol 70% (v/v) y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. Se retiró el sobrenadante, el *pellet* se secó por centrifugación al vacío en un rotaevaporador de marca Labconco (E2M8, Inglaterra) y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril.

11.1.3.5 Purificación de fragmento

Para purificar el producto amplificado se utilizó el kit “Agarose gel DNA extraction kit”(Roche, EE.UU.). Para esto, el producto de la reacción de PCR se sometió a una corrida electroforética en gel de agarosa 1% (p/v), preparada en *buffer* TAE 1X (ver Anexo).

Una vez visualizada la banda en el gel, se cortó con bisturí el trozo de gel de agarosa que contenía el fragmento de ADN de interés. El fragmento se transfirió a un tubo de microfuga de 1,5 mL. Se adicionaron 700 µL de *buffer* de solubilización de agarosa (vial 2). Se dejó reposar el tubo durante 10 min a 65°C en un termoblock Thermolyne modelo 17600 (EE.UU.) o hasta que la agarosa se solubilizó totalmente. El tubo se agitó para promover la solubilización de la agarosa. Una vez obtenida una solución homogénea, se colocó el tubo en baño de hielo y se agregó 10 µL de la suspensión de sílica (vial 1). Luego de 10 min de reposo en frío, se centrifugó el tubo por 30 seg a máxima velocidad (13.300 rpm) a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió con 500 µL de *Binding buffer* (vial 3) en vortex. Se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones que la anterior, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el *pellet* con 500 µL de *Washing buffer* (vial 4) en las mismas condiciones de centrifugación. Luego, se removió todo el líquido posible con un tip y se invirtió el tubo en un papel absorbente para dejarlo secar a temperatura ambiente (T.A.) durante 15 min o hasta que el *pellet* estuviera visiblemente seco. Se resuspendió el *pellet* en 25 µL de agua Ultrapura. Se agitó el tubo en vortex y se incubó por 10 min a 56 – 60°C. Se agitó nuevamente en vortex durante 3 min y se centrifugó a máxima velocidad por 30 seg. Se transfirió el sobrenadante



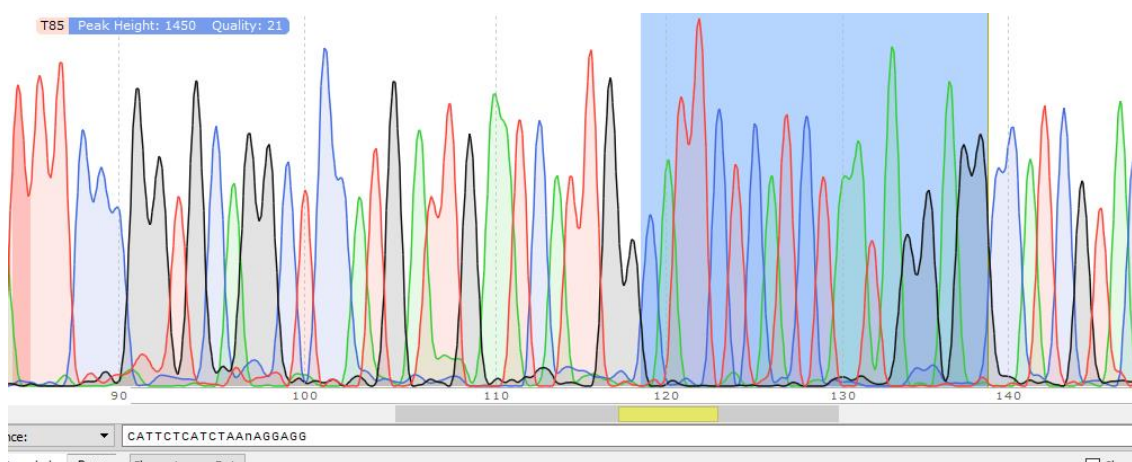
conteniendo el ADN disuelto a un tubo nuevo de microfuga. Se repitió este paso una vez más. Se guardaron ambos sobrenadantes rotulados en freezer a -20°C hasta su utilización. Se chequeó la pureza y concentración del ADN obtenido en una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), preparada en *buffer* TAE 1X (como se detalla en Anexo).

11.2 RESULTADOS

Confirmación de presencia de los ARNg. Se observan los resultados de cada secuenciación junto con la secuencia correspondiente a cada ARNg. Como se ve en la figura, algunas bases no fueron correctamente definidas en la secuenciación seguramente debido a su baja calidad.

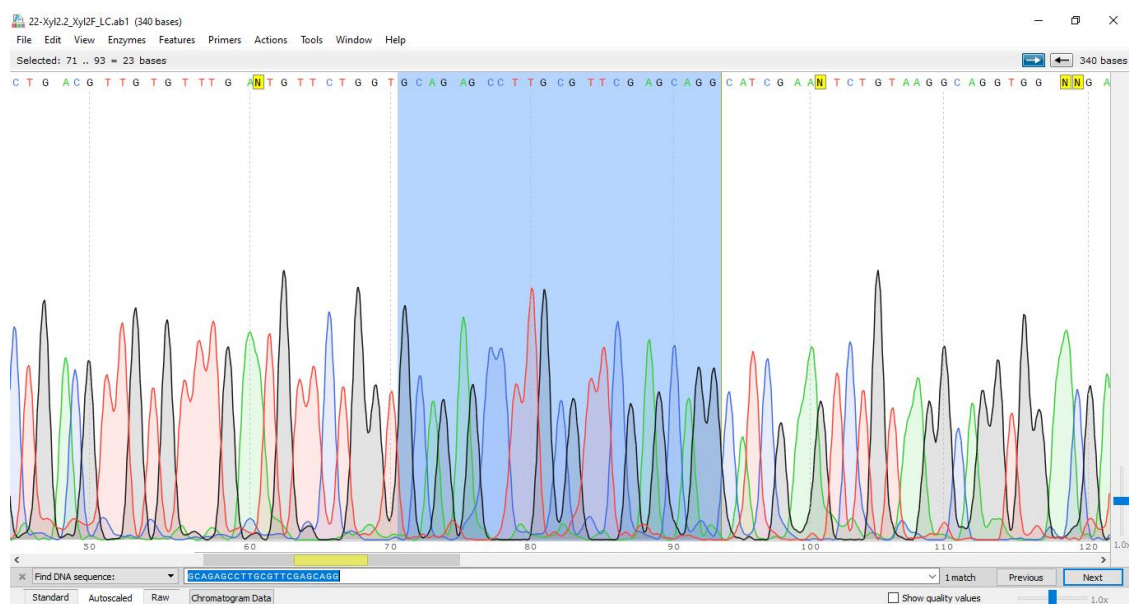
Gen *PHO13*

ARNg en hebra líder: 5' CATTCTCATCTAATAGGAGG 3'



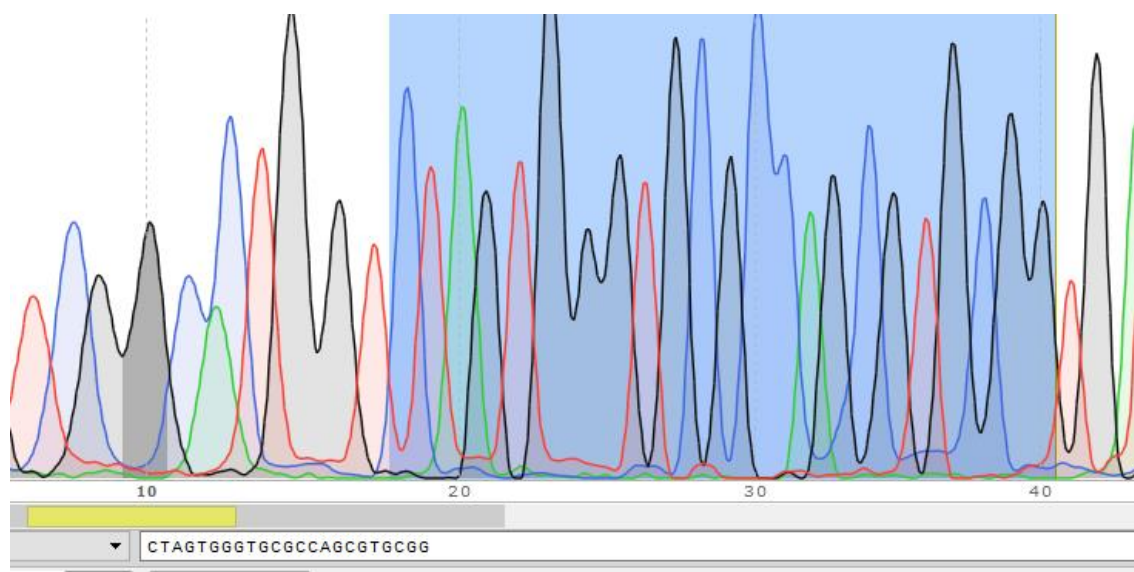
Gen *XYL2*

ARNg en hebra líder: 5' GCAGAGCCTTGCGTTCGAGCAGG 3'



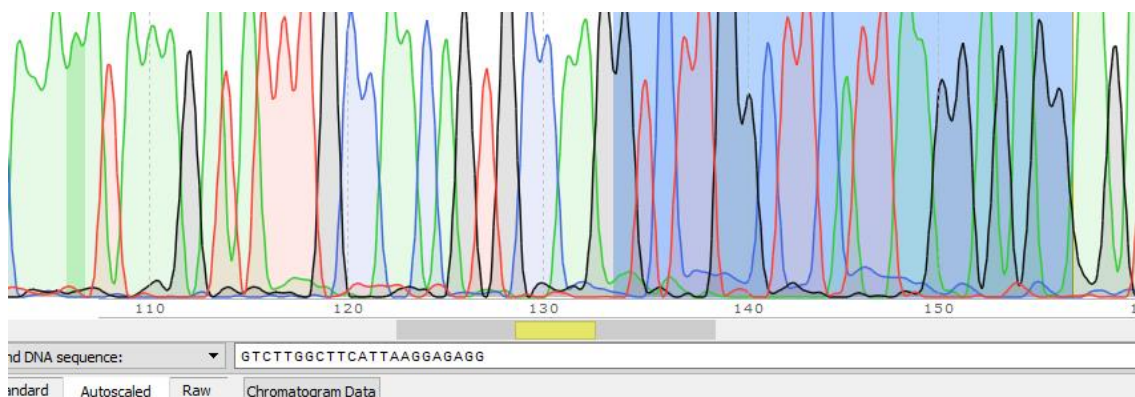
Gen *ISU1*

ARNg en hebra líder: 5' CTAGTGGGTGCGCCAGCGTGCGG 3'



Gen *APJ1*

ARNg en hebra líder: 5' GTCTTGGCTTCATTAAGGAGAGG 3'



Las calidades de secuenciación de *ALD6* y *Ty* no fueron lo suficientemente aceptables para lograr la verificación de la presencia de los ARNg en los fragmentos.

Gen *ALD6*

ARNg en hebra líder: 5' CCGTCTACTAAGTAAGTTGGCTG 3'

