



**Estrategias para el desarrollo de nuevas herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp.: un acercamiento a la tecnología CRISPR/Cas9**

Susana Torres Morales

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en  
Microbiología y Bioanálisis

Tutor

Orville Hernández Ruiz, Doctor (PhD) en Biología

Universidad de Antioquia  
Escuela de Microbiología  
Maestría en Microbiología  
Medellín, Antioquia, Colombia

2022

## **Comité Tutorial**

Angela María López García, PhD. en *Molecular Medical Mycology*

Diana Patricia Tamayo Ossa, PhD. en Biología

José Fernando Muñoz Gómez, PhD. en Biología

Oscar Mauricio Gómez Guzmán, MSc. en Biología

## **Agradecimientos**

El desarrollo de este trabajo de investigación representó un gran reto académico y personal para mí, por lo cual manifiesto los más sinceros agradecimientos con quienes me acompañaron y apoyaron durante todo el proceso.

Mi mayor agradecimiento es para mi mamá y mi hermana, son ellas mi mayor motivación y ejemplo para trabajar en mis sueños y propósitos, les agradezco el amor con el que sostuvieron mi mano.

A mi tutor el profesor Orville Hernández, por la confianza depositada en mí, durante todos estos años y especialmente por concederme la oportunidad de enfrentar este reto. Gracias por su paciencia, asesoría e inmensa colaboración.

Al Dr. Juan McEwen por abrirme las puertas en su grupo de investigación y permitirme trabajar en este proyecto tan importante para él.

A los miembros de mi comité tutorial, el desarrollo de este trabajo fue posible gracias a su orientación, ayuda y sugerencias. En ese sentido expreso mi inmensa gratitud a Ángela, Oscar, Diana y José por la generosidad y calidad humana con que guiaron cada paso.

A los compañeros del Laboratorio del Grupo Biología Celular y Molecular CIB-UdeA, donde fue desarrollado este trabajo; por el apoyo, las asesorías y la amistad construida.

A los miembros de la CIB por la amabilidad y el compañerismo brindados.

A mi familia, amigos y amigas por su incondicionalidad.

A John por acompañar mi camino durante estos años y motivarme a dar siempre lo mejor de mí.

Finalmente, a la Universidad de Antioquia, la Escuela de Microbiología, la Corporación para Investigaciones Biológicas y al Fondo de Becas de Maestría de la UdeA, por la formación académica, el apoyo financiero y la labor administrativa desempeñadas en la duración del proyecto.

Y, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, por la financiación del proyecto “Implementación del sistema CRISPR/Cas9 para la edición de genes en patógenos fúngicos”, Código 221377757686, en el cual se desarrolló este trabajo.

## Tabla de contenido

Resumen.....	10
Introducción General.....	12
Edición genética como estrategia para la comprensión de fenómenos biológicos .....	12
Sistema CRISPR-Cas como mecanismo de inmunidad en procariontes y herramienta de edición genética .....	14
CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética en el estudio de hongos patógenos.....	18
<i>Paracoccidioides</i> spp. una breve reseña.....	19
Clasificación filogenética de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	22
Características morfológicas y ciclo celular del hongo .....	22
Capítulo 1 Introducción del sistema CRISPR/Cas9 en <i>Paracoccidioides</i> spp. usando transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
1.1 Introducción .....	28
1.2 Materiales y métodos.....	29
1.2.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	29
1.2.2 Búsqueda de la secuencia del gen blanco y diseño del ARN guía única para su edición.....	30
1.2.3 Obtención del vector binario y transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	31
1.2.4 Transformación de <i>Paracoccidioides</i> spp. mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
1.2.5 Análisis de expresión relativa de genes usando RT-PCR. ....	32
1.3 Resultados.....	34
1.3.1 Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en <i>P. restrepiensis</i> .....	34

1.4	Discusión y conclusiones.....	38
Capítulo 2. Uso de ribonucleoproteínas sintéticas como estrategia para la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en <i>Paracoccidioides</i> spp. ....		
2.1	Introducción.....	40
2.2	Materiales y Métodos .....	42
2.2.1	Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	42
2.2.2	Elección del <i>Protoespaciador</i> y ensayo de edición <i>in vitro</i> usando complejo de ribonucleoproteínas .....	42
2.2.3	Amplificación del fragmento de reparación con casete de expresión del gen de resistencia a Hygromycin B.....	44
2.2.4	Transformación de <i>P. restrepiensis</i> usando complejos de ribonucleoproteínas.....	45
2.3	Resultados.....	48
2.3.1	Complejo de ribonucleoproteínas sintético como mecanismo para la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en <i>P. restrepiensis</i> .....	48
2.4	Discusión y conclusión .....	50
Capítulo 3. Resistencia adquirida al antibiótico Geneticin como nuevo marcador de selección en <i>Paracoccidioides</i> spp .....		
3.1	Introducción.....	53
3.2	Materiales y métodos .....	54
3.2.1	Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	54
3.2.2	Plásmido .....	55
3.2.3	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de G418 en <i>P. restrepiensis</i> .....	56
3.2.4	Protocolo de transformación por electroporación usando el plásmido pCas .....	57
3.2.5	Extracción de ADN.....	59

3.2.6 Confirmación molecular de la transformación con pCas y la resistencia adquirida al antibiótico Geneticin .....	60
3.3 Resultados.....	60
3.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria Geneticina en <i>P. restrepiensis</i> .....	60
3.3.2 Resistencia al antibiótico Geneticin (G418) en <i>P. restrepiensis</i> , adquirida vía vector pCas .....	61
3.4 Discusión y conclusiones.....	63
Discusión y conclusiones generales .....	64
Referencias Bibliográficas.....	69

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Genes estudiados en <i>Paracoccidioides</i> spp. por medio de técnicas de silenciamiento de la expresión.....	26
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores de PCR utilizados en este trabajo, para la amplificación en los genes <i>hph</i> y <i>cas9</i> . .....	33
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de <i>Protoespaciador s</i> e iniciadores dirigidos al gen <i>GP43</i> empleados en este trabajo. ....	43
<b>Tabla 4.</b> Iniciadores utilizados para la amplificación del fragmento de reparación PbGp43_HyB.....	45
<b>Tabla 5.</b> Secuencias de iniciadores para la amplificación en el vector pCas.....	60

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Locus CRISPR-Cas. Región en el genoma bacteriano que codifica los componentes del sistema CRISPR-Cas en procariontas..	14
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> .	15
<b>Figura 3.</b> Edición genética usando tecnología CRISPR/Cas9.	
<b>Figura 4.</b> Estrategias para el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 en la edición de genes en hongos	19
<b>Figura 5.</b> Distribución geográfica de los casos de Paracoccidioidomicosis en el mundo.	21
<b>Figura 6.</b> Morfología de <i>Paracoccidioides restrepiensis</i> ATCC 60855. Fases Saprofítica y parasítica del hongo	24
<b>Figura 7.</b> Protocolo de transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> en <i>P. restrepiensis</i> ATCC 60855. Inserción del sistema CRISPR/Cas9 en el vector pPTS608	34
<b>Figura 8.</b> Vector binario para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en <i>P. restrepiensis</i> ATCC 60855.	36
<b>Figura 9.</b> Confirmación por PCR de transformación de <i>A. tumefaciens</i> LBA1100..	37
<b>Figura 10.</b> Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en <i>P. restrepiensis</i> .	38
<b>Figura 11.</b> Protocolo de transformación de <i>P. restrepiensis</i> ATCC 60855 con complejos de ribonucleoproteínas dirigidas al gen gp43	47
<b>Figura 12.</b> Diagrama de la delección del gen gp43 en <i>P. restrepiensis</i> ATCC 60855..	48
<b>Figura 13.</b> Corte in vitro usando complejos de ribonucleoproteínas sintéticos en la molécula de ADN de <i>P. restrepiensis</i> ATCC 60855.	49
<b>Figura 14.</b> Transformación de <i>P. restrepiensis</i> en fase de levadura para la introducción del sistema CRISPR-Cas9 usando complejos de RNPs_gp43...	50
<b>Figura 15.</b> Mapa del vector pCas.	56



**Figura 16.** Protocolo de transformación de *P. restrepiensis* ATCC 60855, con el plásmido pCas (Addgene plasmid #60847). ..... 59

**Figura 17.** Establecimiento de la CMI de *P. restrepiensis* ATCC 60855 a Geneticina ..... 61

**Figura 18.** Resistencia de *P. restrepiensis* ATCC 60855 al antibiótico Geneticina adquirida vía plásmido..... 62

## Siglas, acrónimos y abreviaturas

<b>14_3_3</b>	<i>14-3-3 protein</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN-T</b>	Fragmento de ADN de transferencia
<b>AOX</b>	<i>Alternative oxidase gene</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN As</b>	ARN anti-sentido
<b>ARN In</b>	ARN de interferencia
<b>ARNg</b>	Molécula de ARN guía
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BCM</b>	Biología celular y molecular
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>Cas9</b>	<i>CRISPR associated protein</i>
<b>CAT</b>	<i>Catalase gene</i>
<b>Ccp</b>	<i>Cytochrome c peroxidase</i>
<b>cdc42</b>	<i>Cell division cycle 42</i>
<b>Cel</b>	Células
<b>CIB</b>	Corporación para Investigaciones Biológicas
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>crARN</b>	Secuencia de ARN codificada a partir del locus CRISPR
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>DAF-FM</b>	<i>4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxiribonucleic acid</i>
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>EB</b>	<i>Electroporation buffer</i>

<b>fgla</b>	<i>Fungogloblin gene</i>
<b>G418</b>	Antibiótico Geneticin
<b>GP43</b>	43 kD <i>glycoprotein gene</i>
<b>HAD32</b>	<i>Haloacid dehalogenase 32</i>
<b>HDR</b>	<i>Homology directed repair</i>
<b>HDV</b>	<i>Hepatic delta virus</i>
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>HH</b>	<i>Hammer Head</i>
<b>hph</b>	Casete de resistencia Higromicina B fosfotransferasa
<b>hsp90</b>	<i>Heat shock protein 90</i>
<b>HygB</b>	Antibiótico Higromicina B
<b>iap</b>	<i>Isozyme conversion of alkaline phosphatase gene</i>
<b>KanMX</b>	Gen de resistencia a Geneticin
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>M-L</b>	Transición de micelio a levadura
<b>MMEJ</b>	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localization signals</i>
<b>p27</b>	27 kD <i>protein</i>
<b>PAM</b>	<i>Protoespaciador adyacent motif</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>Pb60855</b>	<i>Paracoccidioides restrepiensis</i> cepa ATCC 60855
<b>PCM</b>	Paracoccidioidomicosis
<b>pcn</b>	<i>paracoccin</i>

<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b><i>PgpdA</i></b>	promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) gene from <i>Aspergillus nidulans</i>
<b>PS1 &amp; PS2</b>	<i>Phylogenetic Species</i>
<b><i>Ptef1</i></b>	<i>Promoter of Transcription elongation factor</i>
<b>rbt5</b>	<i>Repressed by Tup1</i>
<b>rcf</b>	<i>Relative Centrifugal Force</i>
<b>RGEN</b>	<i>RNA-guided engineered nucleases</i>
<b>RNP</b>	Ribo nucleoproteínas
<b>RT-PCR</b>	<i>Retro transcription Polymerase chain reaction</i>
<b>SidA</b>	<i>Siderophore A</i>
<b><i>SOD1</i></b>	<i>Superoxide dismutase 1 gene</i>
<b><i>SOD3</i></b>	<i>Superoxide dismutase 3 gene</i>
<b>TALEN</b>	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
<b>TBE</b>	<i>Tris, Boric acid and EDTA buffer</i>
<b>TE</b>	<i>Tris and EDTA buffer</i>
<b>TEF</b>	<i>Transcription elongation factor</i>
<b>TMAT</b>	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>tracr-ARN</b>	Molécula de ARN activadora de la formación del complejo cas9/ARNguia
<b>TtrpC</b>	<i>Terminator of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) gene from Aspergillus nidulans</i>
<b>Tufm</b>	<i>Mitochondrial elongation factor</i>
<b>UdeA</b>	Universidad de Antioquia
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>

**ZFN**

*Zinc finger nucleases*

## Resumen

El hongo *Paracoccidioides* spp. es el agente causal de la Paracoccidioidomicosis (PCM) una enfermedad humana endémica en Latino América. El conocimiento sobre los eventos moleculares implicados en su patogenicidad y virulencia es limitado, esto debido a la dificultad para realizar el bloqueo total de la expresión de genes mediante el uso de las técnicas de edición genética tradicionales. La tecnología CRISPR/Cas9 se caracteriza por la simplicidad y especificidad del sistema para ejecutar el corte de la doble cadena de ADN. Sin embargo, una variedad de estudios muestra la necesidad de adaptar la metodología empleada a las características biológicas de cada modelo en estudio. En este trabajo se estudiaron dos estrategias para implementar la tecnología CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*. *i)* Inicialmente se usó la transformación mediada por *A. tumefaciens* para la inserción en el genoma del hongo de un sistema para la expresión de la proteína Cas9 y el ARN guía; a pesar de realizar una transfección exitosa, no se observó producción del RNA del gen *cas9*. *ii)* En la segunda parte se utilizaron complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) formados por la proteína Cas9 y ARN guía recombinantes, ensayos en los cuales se confirmó la especificidad de corte en el ADN de *P. restrepiensis in vitro*, y la necesidad de ajustar los protocolos de transformación para el uso de esta metodología *in vivo*. *iii)* Adicionalmente, se evaluó el casete KanMX como nuevo marcador de selección dominante, encontrando su utilidad para los estudios genéticos de este patógeno.

**Palabras clave:** *Paracoccidioides*, CRISPR/Cas9, edición genética, Cas9, *A. tumefaciens*, ribonucleoproteínas, Genética.

## Abstract

*Paracoccidioides* spp. are causative agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic human disease to Latin America. The knowledge about the molecular events related with its pathogenicity and virulence are limited, due to difficulties to perform knockout gene mutations, through traditional genetic edition methodologies. CRISPR/Cas9 technology is a simple and specificity technic to carry out doble strain DNA breaks. However, a variety of studies showed the requirement to adapt the methodology for each biological model. This work studied two strategies to apply the CRISPR/Cas9 technology in *P. restrepiensis*. *i)* First, we used the *A. tumefaciens* mediated transformation to insert the Cas9 protein and RNA guide expression system into the fungus genome, although the transfection was successful, we did not observe a cas9 gene mRNA production. *ii)* In the second part we used ribonucleoprotein complexes of recombinant Cas9 protein and RNA guide, our assays confirmed the specificity cut on *P. restrepiensis* DNA *in vitro* as well the necessity to set this methodology in *in vivo* assays. *iii)* Furthermore, we evaluated the KanMX cassette as a new dominant selection marker, we found its utility for genetic studies in this pathogen.

**Key words:** *Paracoccidioides*, CRISPR/Cas9, gene edition, Cas9, *A. tumefaciens*, ribonucleoproteins, Geneticin.

## Introducción General

### Edición genética como estrategia para la comprensión de fenómenos biológicos

La descripción de la estructura del ADN (1) y la comprensión del dogma central de la biología molecular (2), abrieron el camino a la comunidad científica para realizar innumerables investigaciones relacionadas con el estudio de los organismos vivos. La necesidad de avanzar en la comprensión de los fenómenos biológicos, impulsaron el desarrollo de herramientas para la manipulación del genoma y con ello ampliar el conocimiento en áreas como las ciencias médicas, la industria farmacéutica y de alimentos, la agricultura, entre otras (3).

La modificación de un gen de interés se realiza mediante el uso de estrategias de edición genética, las cuales permiten alterar la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína y con ello su función. Los mecanismos empleados para la edición pueden realizarse a través de la inserción de un fragmento de ADN con una nueva secuencia, la cual es introducida en el gen empleando recombinación homóloga o mediante la ruptura de la doble cadena por acción de enzimas con actividad nucleasas como las Meganucleasas (4), los dedos de zinc (ZFNs del inglés *Zinc Finger Nucleases*) (5), nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN del inglés *Transcription activator-like effector nucleases*) (6) y las nucleasas guiadas por moléculas de ARN (RGEN del inglés *RNA-guided engineered nucleases*) (7,8). En la actualidad el estudio de las nucleasas guiadas por moléculas de ARN, ha impulsado el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 (9), la cual promete ser uno de los avances científicos más revolucionarios en la biología molecular (10).

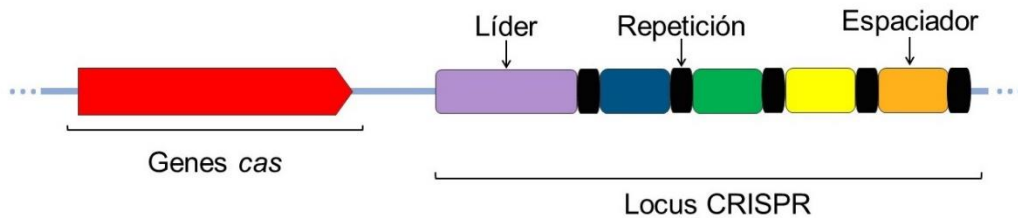
El desarrollo de la herramienta de edición genética CRISPR-Cas inicia en los años 80, con el hallazgo de secuencias cortas de nucleótidos dispuestas de manera repetitiva e interespaciada en la secuencia del gen *lap* de *Escherichia coli* (11). Años más tarde los avances en técnicas de secuenciación, permitieron identificar este tipo de secuencias en un amplio rango de genomas bacterianos y de arqueas (12), y posteriormente estas regiones fueron denominadas por la comunidad científica como regiones CRISPR (del



inglés *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), las cuales se encuentran exclusivamente en los organismos procariotas (13) y en asociación con las proteínas Cas (CRISPR-associated) (14) conforman un sistema que confieren resistencia a la invasión por fagos o plásmidos en estos microorganismos (15- 18)

Existe gran diversidad en los sistemas CRISPR-Cas, los cuales han sido clasificados en tres tipos principales: I, II y III, cada uno con una composición y mecanismo de acción característico (19). A pesar de sus diferencias, en cada uno de éstos se encuentra la secuencia del locus CRISPR, la cual contiene regiones cortas no codificantes de repetición palindrómica (repetición) (13), espaciadas por secuencias variables, las cuales fueron obtenidas a partir del ADN invasor (Protoespaciador) (15), además de una región líder compuesta de ADN no codificante, rica en residuos de Adenina y Timina, la cual se ubica corriente arriba al locus y señala el sitio para la adición de nuevos Protoespaciadores y el inicio de la transcripción de las secuencias **(Figura 1)** (20). Si bien el tamaño de los elementos de la región CRISPR varía entre los tipos de sistemas (21), la característica que da mayor variación entre ellos es la distribución y el mecanismo de acción de los complejos formados por las proteínas Cas (14).

Los sistemas CRISPR-Cas Tipo I y Tipo III poseen un mayor número de genes cas asociados al locus CRISPR y su mecanismo de interferencia depende de la formación de complejos por varios tipos de proteínas Cas (19). Por otro lado el sistema CRISPR-cas Tipo II funciona de forma más simple, ya que su acción de interferencia sobre el ADN invasor es realizada solo por una proteína Cas9 (22).

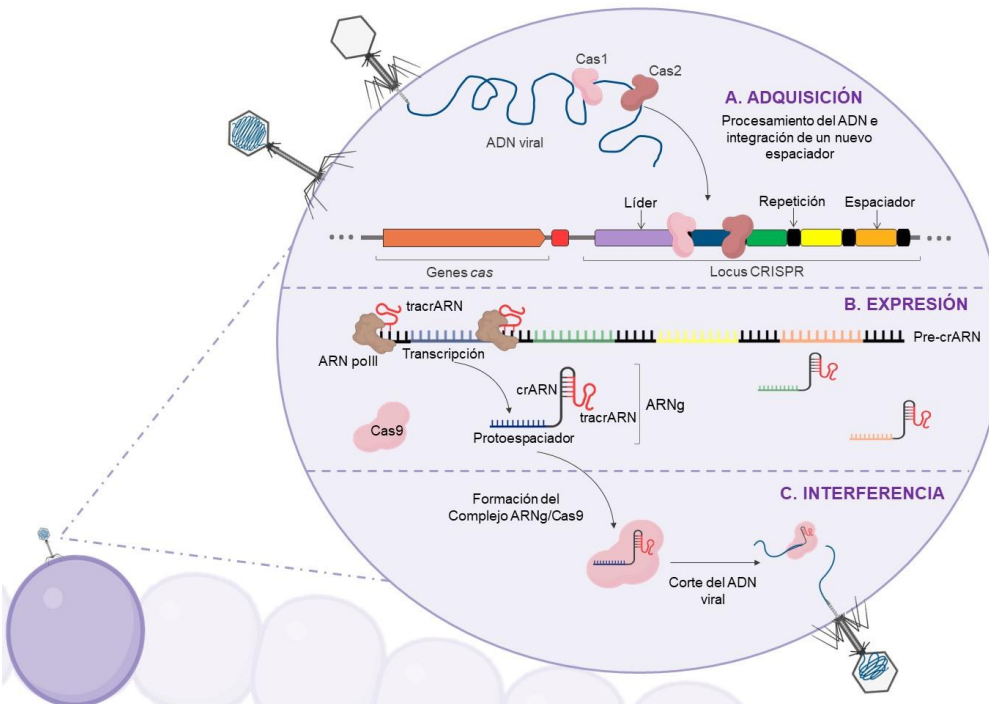


**Figura 1. Locus CRISPR-Cas.** Región en el genoma bacteriano que codifica los componentes del sistema CRISPR-Cas en procariotas. Las regiones repetitivas no codificantes (color negro), separan las secuencias espaciadoras variables obtenidas a partir del material genético foráneo (colores Azul, verde, amarillo y naranja, los cuales corresponden a una secuencia diferente). La región líder (color lila) señala el sitio de adición de los nuevos espaciadores y el inicio de la transcripción. Los genes cas (color rojo), se agrupan en una región distal al locus CRISPR, y su composición es característica de cada tipo de sistema.

### **Sistema CRISPR-Cas como mecanismo de inmunidad en procariotas y herramienta de edición genética**

En la naturaleza, las bacterias y arqueas se encuentran constantemente expuestas a la invasión por bacteriófagos o elementos extra cromosómicos como los plásmidos (23). El sistema CRISPR-Cas actúa como mecanismo de defensa a la invasión por estos elementos foráneos impidiendo su propagación en la célula (24). El principio de acción del sistema CRISPR/Cas se basa en tres eventos: adquisición, expresión e interferencia. Durante el evento de **adquisición**, el ADN invasor es reconocido por acción de las proteínas Cas (25,26) (Figura 2) y posteriormente es integrado en el locus CRISPR, como una nueva secuencia Protoespaciador específica (27) (Figura 2. **A**). Ante una nueva exposición al elemento invasor, inicia el evento de **expresión**, en el cual se induce la activación de la transcripción del locus y con ello la biogénesis de moléculas de ARN a partir del CRISPR (crARN) (27) (Figura 2.**B**). Finalmente, en el evento de **interferencia** el crARN forma un complejo efector con las proteínas Cas, que guiado por

la secuencia Protoespaciadora reconoce de manera específica ADN invasor y lo degrada (Figura 2.C) (16, 24,28).

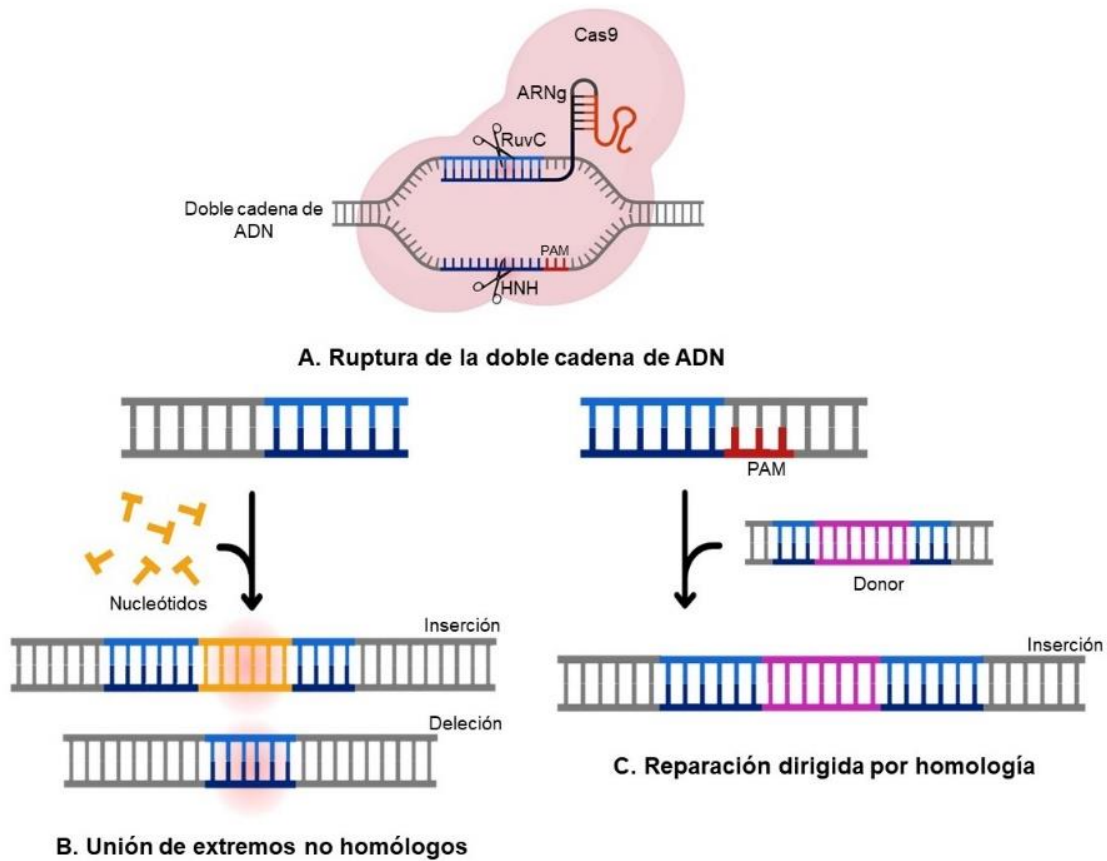


**Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*.** Representación de la infección por bacteriófago en la gráfica se observan los eventos de **A.** adaptación, **B.** expresión e **C.** interferencia, ejecutados por la célula para proteger su material genético de la infección por un virus.

Dada su baja complejidad, los sistemas CRISPR/Cas Tipo II han sido ampliamente estudiados y adoptados como modelo para el desarrollo de una herramienta de edición genética (9,29). El sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* provee a la bacteria inmunidad a la invasión por material genético de doble cadena de ADN (30) (Figura 2). En esta bacteria, el evento de expresión del locus CRISPR es acompañado por la biogénesis de una molécula trans-activadora (tracrARN), necesaria para la maduración del precursor del crARN generado a partir de la transcripción de las regiones repetitivas espaciadas (31). La unión de tracrARN y crARN forma una molécula de ARN guía (ARNg) dirigida de forma específica por el Protoespaciador al reconocimiento de la secuencia de 20 nucleótidos, homologa a la molécula de ADN foráneo (30) (Figura 2.B).

La interferencia del elemento invasor es realizada por la proteína Cas9 la cual posee dominios enzimáticos RuvC y HNH (**Figura 3**), que realizan la separación y ruptura de los enlaces fosfodiéster de la doble cadena, en el extremo 3' adyacente al Protoespaciador, sitio señalado por un motivo de tres nucleótidos (*PAM del inglés Protoespacer Adyacent Motif*) que en *S. pyogenes* corresponde a la secuencia "NGG" (**Figura 3.A**) (32,33).

La evaluación *in vitro* de la actividad del sistema CRISPR/Cas9, usando el ARNg y la proteína Cas9 de *S. pyogenes*, demostró la capacidad de modificar cualquier molécula de ADN diseñando una guía específica (9) y la aplicación de este sistema en los ensayos *in vivo* mostró que el corte de la doble cadena de ADN realizado por la Cas9, activa mecanismos de reparación del ADN en la célula, los cuales serían los responsables de generar los cambios en la secuencia del gen y con ello en el marco de lectura para la síntesis de la proteína (34,35). La reparación de la ruptura de la doble cadena, por unión de hebras del ADN en ausencia de secuencias homólogas (NHEJ del inglés *non-homologous end joining*) inducen la inserción o delección de nucleótidos causando mutaciones en el gen (**Figura 3.B**) (36), mientras que la activación de la vía de reparación dirigida por homología en presencia de un fragmento de ADN (HDR del inglés *homology directed repair*) permite insertar una secuencia conocida en el sitio de la ruptura (**Figura 3.C**) (35,36).



**Figura 3. Edición genética usando tecnología CRISPR/Cas9.** **A.** Ruptura de la doble cadena de ADN mediante la acción enzimática de los dominios RuvC y HNH de la proteína Cas9, en el sitio señalado por la región protoespaciador del ARN guía **B.** Mecanismo de reparación mediado por la unión de las hebras en ausencia de secuencias homólogas. **C.** Reparación de la doble cadena por la unión de secuencias homólogas presentes en un fragmento de reparación

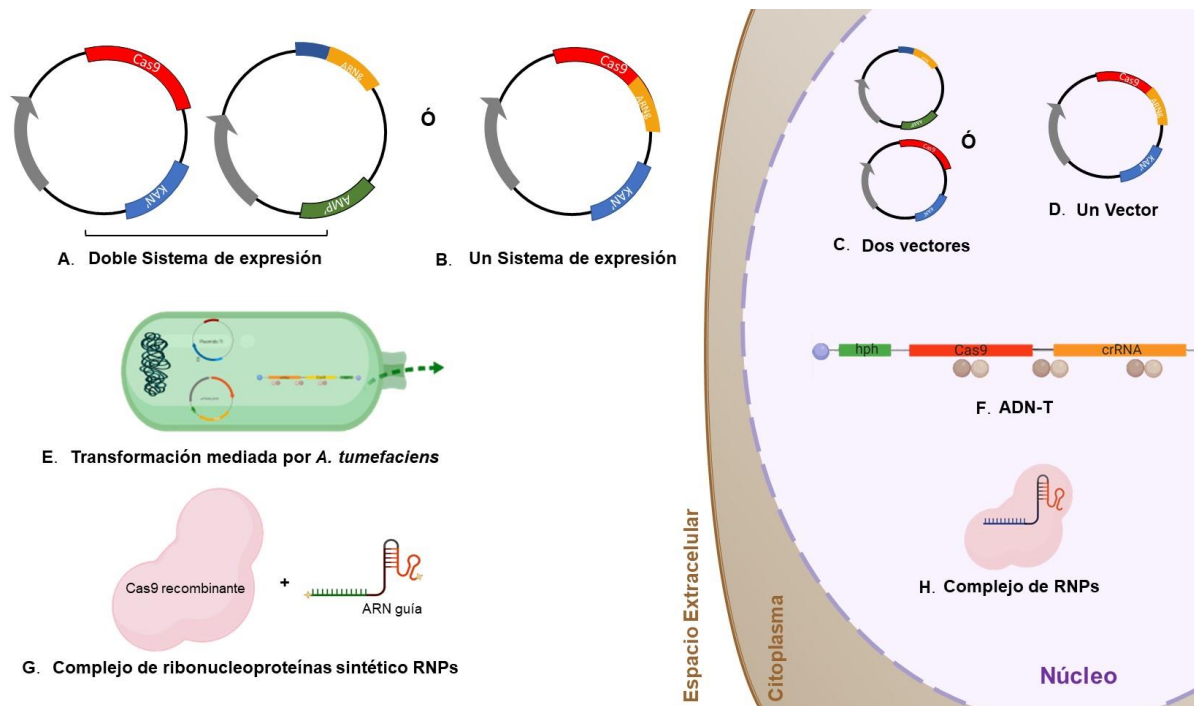
El aporte de la ingeniería genética en la optimización y producción *in vitro* de los componentes del sistema CRISPR-Cas9 ha hecho posible su aplicación con éxito en variedad de células como células humanas, ratones, bacterias, plantas, hongos filamentosos y levaduras(37-42), entre otros. El desarrollo de esta técnica ha dado a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna el premio Nobel de Química en el 2020.

## **CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética en el estudio de hongos patógenos**

Los hongos son microorganismos eucariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunos géneros y especies están asociados a enfermedades en humanos (43). Como herramienta para el estudio de su biología, patogenicidad y virulencia, se han implementado diferentes técnicas de manipulación genética (44). Estrategias como el remplazo genético por recombinación homóloga (45) y el uso de proteínas de actividad nucleasa TALENS (46) han sido empleadas en la manipulación genética de los hongos (47). A pesar de obtener resultados exitosos en algunos modelos, estas técnicas presentan limitaciones relacionadas con la ineficiencia de los mecanismos de recombinación homóloga (48), la ausencia de un amplio rango de marcadores de selección para las células transformadas y una alta demanda de recursos económicos y tiempo para la ejecución de los experimentos (49).

Con el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición de genes, las dificultades de estas técnicas pueden ser superadas (50). Su prometedora simplicidad la hace una estrategia rápida y versátil, ya que como se describió previamente este sistema requiere la acción de una proteína con actividad nucleasa guiada de manera específica por una molécula de ARN complementario a un fragmento en el gen blanco (9):(36).

En hongos la tecnología CRISPR/Cas9 se ha implementado en diversos géneros, entre éstos, patógenos humanos como *Candida albicans* (51,52), *Aspergillus fumigatus* (53), *Cryptococcus* spp. (54), *Histoplasma capsulatum* (55) y *Blastomyces dermatitidis* (56). Realizando la transformación de las células a través de estrategias como el uso de Polietilenglicol (PEG) (53), electroporación (41) y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (57), para la introducción de los componentes del sistema (ARNg y Cas9) al núcleo. En lo cual los mecanismos más usados han sido los vectores de expresión (41), el ADN de transferencia (58) y los complejos de ribonucleoproteínas sintéticos (59) (**Figura 4**).



**Figura 4. Estrategias para el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 en la edición de genes en hongos.** Estrategias empleadas para la introducción de los componentes del sistema CRISPR-Cas9 al núcleo de los hongos. **A.** Doble sistema de expresión empleando un vector para la inserción del gen Cas9 y otro para la secuencia del ARN guía, **B.** Sistema de expresión único en el cual se introduce un único vector. **C. y D.** introducción al núcleo de los sistemas de expresión doble y único respectivamente. **E.** Transformación mediada por *A. tumefaciens*, **F.** ADN de transferencia inserto en el genoma del hongo para la expresión de la Cas9 y el ARN guía. **G. y H.** Uso de proteína Cas9 recombinante y ARN guía sintetizadas *in vitro* para la formación de complejos de ribonucleoproteínas.

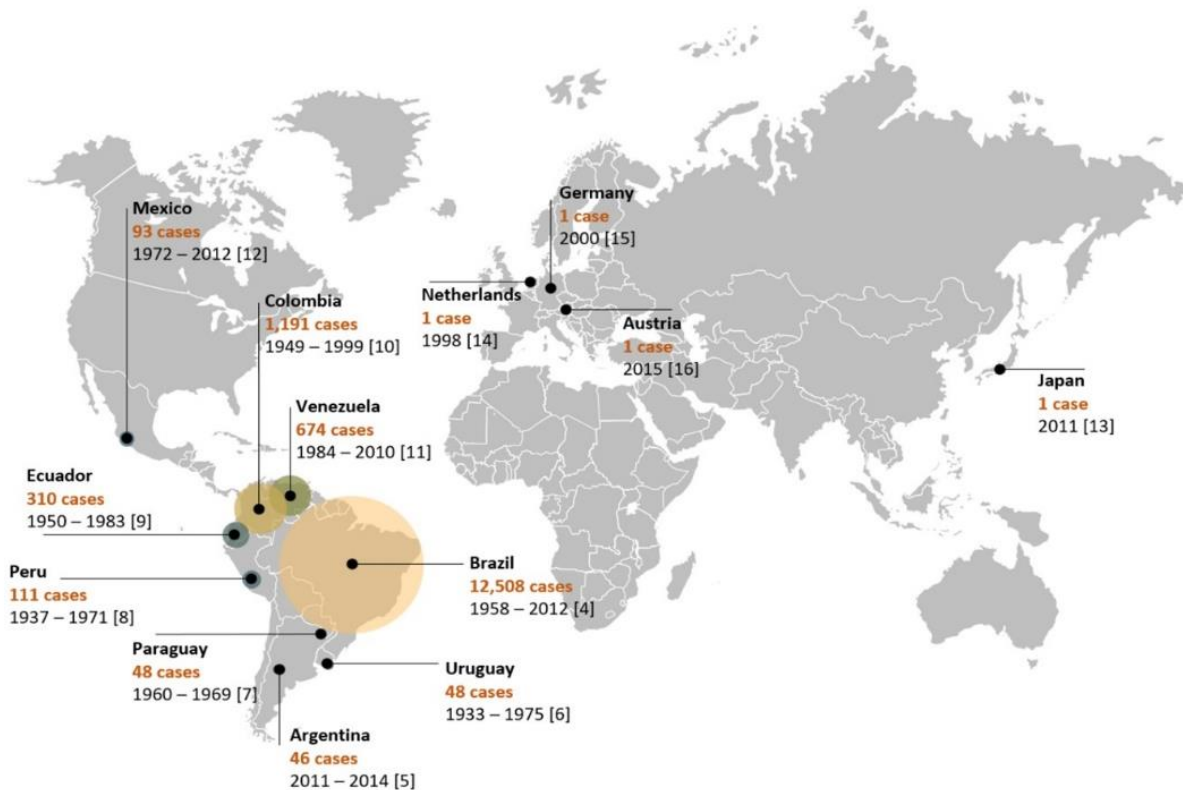
### ***Paracoccidioides* spp. una breve reseña**

Los hongos son microorganismos ampliamente distribuidos en el ambiente y poseen gran capacidad de adaptarse a su entorno. El dimorfismo es uno de los fenómenos de adaptación más relevante observados en estos microorganismos, ya que este les permite cambiar de su morfología de micelio a levadura y viceversa, esto en respuesta al cambio de temperatura, concentración de oxígeno, pH o disponibilidad de

nutrientes (60). El dimorfismo térmico es una característica particular de un grupo de hongos patógenos humanos, que crecen en el ambiente formando hifas y en el hospedero en forma de blastoconidias (61,62). Los hongos dimórficos térmicos tienen gran importancia en la salud humana y los agentes etiológicos identificados con esa característica son *Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Talaromyces marneffe*, *Sporothrix* spp. y *Paracoccidioides* spp. (63).

Las especies del género *Paracoccidioides*, son el agente causal de la Paracoccidioidomicosis (PCM) (64); una enfermedad endémica en Latino América que afecta principalmente a personas del área rural y usualmente cursa de forma crónica manifestándose en la edad adulta (65,66). El reporte de casos de PCM se ha realizado especialmente en países de la región central como Brasil, Colombia y Venezuela. Sin embargo, se han registrado algunos casos en Perú, Ecuador, Argentina, Uruguay y Paraguay (67,68) y otros fuera del continente en personas que visitaron o vivieron en zonas endémicas, años antes a presentar la sintomatología típica de esta entidad (69) (Figura 5).





**Figura 5. Distribución geográfica de los casos de Paracoccidioidomycosis en el mundo.** Se observa el mayor número de casos entre los años 1993 a 2015 en países de Latino América, principalmente Brasil, Colombia y Venezuela. Imagen tomada y modificada del artículo *Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation* (70).

A pesar de que el hábitat de *Paracoccidioides* spp. continúa siendo estudiado, su nicho se ha relacionado a zonas tropicales húmedas, de vegetación abundante y mediana pluviosidad en Suramérica (Figura 5) (69,71), donde ha sido aislado a partir de muestras ambientales (72), de animales silvestres (73) o su presencia ha sido confirmada por PCR a partir de muestras de suelo (74). Al ser un hongo dimórfico térmico, en el ambiente a temperaturas entre 18 a 25°C, la fase saprofitica del hongo, forma estructuras filamentosas a partir de las cuales se producen, las hifas y las conidias, partículas infectantes presentes en los aerosoles generados durante la remoción del suelo principalmente durante las actividades agrícolas (72). Una vez en contacto con el epitelio pulmonar del hospedero y el consecutivo aumento de temperatura (36-37°C)

estos propágulos inician la transición a la fase de levadura, forma parasítica del hongo (65,75).

La infección por *Paracoccidioides* spp., es mayoritariamente adquirida entre 10 a 20 años antes de mostrar sintomatología, por lo cual el diagnóstico se realiza con mayor prevalencia en personas mayores a 30 años en quienes se desarrolla la forma crónica de la enfermedad (65), en quienes causa una grave afectación pulmonar por la formación de granulomas y fibrosis característicos de la enfermedad (66). La presentación aguda o sub aguda de la PCM, se da en un menor número de casos, principalmente en personas jóvenes, en los cuales la rápida diseminación del hongo desde los pulmones a través del sistema reticuloendotelial, afecta órganos como el hígado, el bazo, huesos y la piel, lo cual genera un acelerado y progresivo deterioro de la condición general del paciente(76).

### **Clasificación filogenética de *Paracoccidioides* spp.**

El género *Paracoccidioides* pertenece al reino *Fungi*, *phylum* Ascomycota, familia Ajellomycetaceae y orden Onygenales (77). Por décadas la especie *P. brasiliensis* fue conocida como el agente causal de la PCM. Posteriormente, los análisis basados en marcadores moleculares mostraron que a este género pertenecían especies crípticas, que permitieron en ese momento clasificar el género *Paracoccidioides* en especies filogenéticas de *P. brasiliensis*: PS1, PS2 y PS3 y la especie *P. lutzii* (78) y en la actualidad gracias al avance en las tecnologías de secuenciación de última generación y de los análisis filogenéticos y de genómica de poblaciones, se encontraron diferencias en el genoma nuclear y mitocondrial que permitieron finalmente clasificar el género en cinco especies: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis* y *P. venezuelensis* (79).

### **Características morfológicas y ciclo celular del hongo**

Al ser un hongo dimórfico térmico *Paracoccidioides* spp. produce dos tipos de estructuras morfológicas. A temperatura ambiente (entre 18 y 25°C) forma hifas y a 36°C

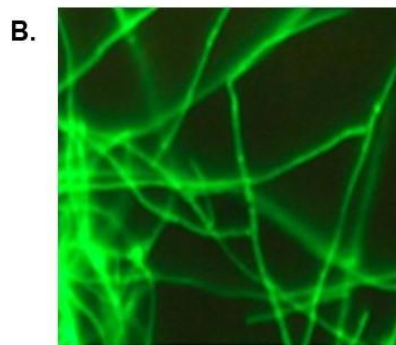
crece como levadura, formando blastoconidias multigemantes típicas en forma de timón de barco (**Figura 6**) (65). Los eventos moleculares involucrados en este fenómeno aún no han sido descubiertos. Sin embargo las investigaciones realizadas han identificado que la transición de Micelio a Levadura (M-L) en este hongo no solo implica el cambio de forma; implica además reestructuración de la pared celular (80), el incremento en la concentración de  $\beta$ -glucanos (80) y la expresión de genes involucrados en la respuesta al aumento de temperatura y al ambiente hostil del hospedero (81).

El crecimiento del hongo en temperatura ambiente puede realizarse en medio de cultivo McVeigh Morton agar (82), en el cual se puede observar la formación de colonias de borde irregular y color blanco que producen un micelio aéreo corto algodonoso (**Figura 6.A**) de hifas delgadas septadas hialinas con baja producción de artroconidias, artroaleuroconidias y clamidoconidias (**Figura 6.B**) (83).

La fase de levadura crece entre 36 y 37°C (temperatura del hospedero), en medios de cultivo ricos en nutrientes como el *Brain Heart Infusion* agar. En el cual forma colonias de apariencia cerebriforme y de color crema (**Figura 6.C**). La observación al microscopio permite visualizar la formación de blastoconidias de pared celular gruesa, tamaño variado (4-60 $\mu$ m) y producción de múltiples gemas alrededor de la célula madre (**Figura 6.D**) con una alta acumulación de vacuolas en el citoplasma (65).

## Fase saprófita

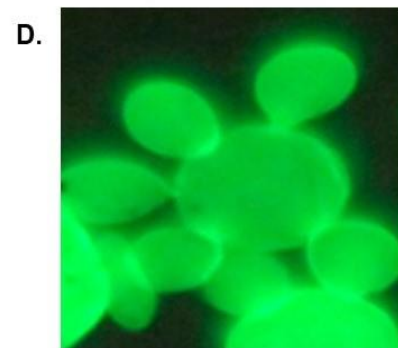
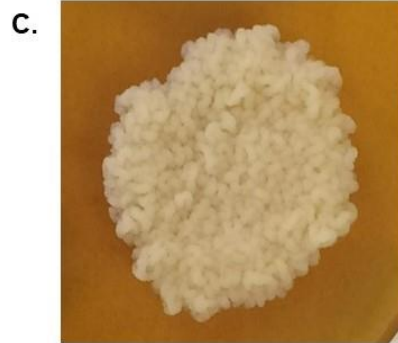
### Micelio



Ambiente 18-25°C

## Fase parasítica

### Levadura



Hospedero y cultivo 36°C

**Figura 6. Morfología de *Paracoccidioides restrepiensis* ATCC 60855. Fases Saprófitica y parasítica del hongo.** **A.** Cultivo en medio sintético McVeigh & Morton agar a 22°C, se observa la formación de una colonia algodonosa, de borde irregular y micelio aéreo corto. **B.** Montaje en fresco a partir del cultivo descrito en A. en la coloración con DAFF al microscopio en objetivo de 40X se observa la formación de hifas septadas y delgadas. **C.** Cultivo medio en BHI glucosa 1% a 36°C, se observa una colonia de levaduras de apariencia cerebriforme, **D.** Montaje en fresco a partir del cultivo descrito en C. coloración con DAF-FM al microscopio (40X) se observa la formación de blastoconidias con múltiples gemas. Imágenes B. y D. tomadas de la tesis de doctorado de Diana Tamayo Ossa.

Es poco lo que se conoce sobre el ciclo celular de *Paracoccidioides* spp. y los mecanismos de control en éste hongo, que le permiten en su fase parasítica realizar una constante replicación del material genético y la acumulación de núcleos en la célula y las gemas hijas (84,85). Siendo ésta una de las razones discutidas como un obstáculo para la manipulación genética de este microorganismo cuando se pretende emplear técnicas moleculares tradicionales para la obtención de mutantes con bloqueo total en la expresión de un gen (*knockout*) (86). Las investigaciones realizadas hasta ahora en *Paracoccidioides* spp. han realizado la inactivación parcial (*knockdown*) de algunos genes (**Tabla 1**) usando las técnicas ARN antisentido y ARN de interferencia. Para lo cual la transformación mediada por *A. tumefaciens* (TMAT), ha sido la herramienta de mayor uso en la manipulación genética de *Paracoccidioides* spp. (87) permitiendo insertar fragmentos de ADN heterólogos en el genoma del hongo.

**Tabla 1.** Genes estudiados en *Paracoccidioides* spp. por medio de técnicas de silenciamiento de la expresión.

<b>Gen</b>	<b>Cepa/Aislamiento</b>	<b>Técnica</b>	<b>Ref.</b>
<i>cdc42</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(88)
<i>HAD32</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(89)
<i>AOX</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(90)
<i>gp43</i>	Pb 339	ARN As	(91)
<i>gp43</i>	Pb18	ARN In	(92)
<i>HSP90</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(93)
<i>p27</i>	Pb 339	ARN As	(94)
<i>rbt5</i>	Pb 339	ARN As	(95)
<i>Ccp</i>	Pb 339	ARN As	(96)
<i>14_3_3</i>	Pb 18	ARN As	(97)
<i>SOD1-SOD3</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(98)
<i>Catp</i>	Pb_ATCC60855	ARN As	(99)
<i>pcn</i>	Pb 18	ARN As	(100)
<i>tufm</i>	Pb 18	ARN As	(101)
<i>fgla</i>	P18_ATCC32069	ARN As	(102)
<i>SidA</i>	P18_ATCC32069	ARN As	(103)

Nota. Genes estudiados en *Paracoccidioides* spp. se empleó la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta para la edición por ARN anti sentido (ARN As) y ARN de interferencia (ARN In).

La dificultad para realizar edición en el genoma de *Paracoccidioides* spp. podría ser superada empleando la tecnología CRISPR/Cas9, dada la sencillez del sistema y la variedad de estrategias disponibles para su implementación. Usando estrategias como la transformación mediada por *A. tumefaciens* (TMAT), la cual ha sido una herramienta clave en la manipulación genética de *Paracoccidioides* spp. (87) y la inserción de complejos de ribonucleoproteínas (RNPs), para la introducción de un sistema de

expresión de la proteína Cas9 y el ARN guía o dichos elementos de forma recombinante, respectivamente.

Para lo cual este trabajo se divide en tres capítulos los cuales incluyen las estrategias empleadas para implementar la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición de genes en *P. restrepiensis*. El primer capítulo expone el uso de la TMAT como herramienta para la inserción de un sistema de expresión de los componentes de la tecnología CRISPR/Cas9. En el segundo capítulo se presenta el uso de complejos de RNPs recombinantes para la introducción de los componentes a la célula, y finalmente el tercer capítulo, expone el uso de un nuevo gen marcador de selección dominante para el uso en técnicas de edición genética en *Paracoccidioides* spp.

Como objetivo general de este trabajo se propuso: Implementar la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición de genes en *P. restrepiensis*. Para dar cumplimiento a este objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- i. Implementar el sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis* usando la herramienta de transformación mediada por *A. tumefaciens*.
- ii. Implementar el sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis* usando complejos de ribonucleoproteínas recombinantes.
- iii. Evaluar un nuevo marcador de selección dominante para uso en las técnicas de edición genética en *P. restrepiensis*.

## Capítulo 1 Introducción del sistema CRISPR/Cas9 en *Paracoccidioides* spp. usando transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

### 1.1 Introducción

La investigación en hongos patógenos se vale de mecanismos como el bloqueo total de la expresión del gen codificante para una determinada proteína, con el fin de conocer su función en procesos biológicos y en la interacción con el hospedero. En el estudio de *Paracoccidioides* spp. no ha sido posible implementar estrategias de manipulación genética tradicionales como el reemplazo alélico, debido a que este hongo posee una baja tasa de recombinación homóloga (88). Sin embargo, actualmente en este modelo se cuenta con varios estudios en los cuales se emplean estrategias de silenciamiento en la expresión de diversos genes implicados en su virulencia; empleando las técnicas de ARN anti sentido y de ARN de interferencia (**Tabla 1**), en las cuales la transformación mediada por *A. tumefaciens* (TMAT), ha sido una herramienta de gran importancia para la inserción de los sistemas que regulan la expresión de los constructos para la aplicación de dichas tecnologías de silenciamiento en este hongo (87).

En la naturaleza algunas especies de *Agrobacterium* spp. actúan como patógenos de plantas a través de la transferencia e inserción de genes oncogénicos desde el genoma bacteriano hacia el genoma del huésped (104). Las diferentes cepas utilizadas en investigación han sido modificadas para realizar la transferencia de un fragmento de ADN (ADN-T, ADN de transferencia) de interés (105), usando los genes *vir* de la bacteria para el procesamiento, transporte e integración del ADN-T en el modelo de estudio (106). La aplicación biotecnológica de *Agrobacterium* spp., provee un método para la introducción de genes foráneos en plantas (107), hongos filamentosos (108), levaduras (49,109) e incluso líneas celulares humanas (110).

En la actualidad el desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 como herramienta para la edición genética, permite manipular el genoma de casi cualquier tipo de célula, prometiendo superar los obstáculos presentados con el uso de las metodologías clásicas (10). Recientemente Kujoth et al. (56), emplearon la transformación mediada por *A.*



*tumefaciens* (TMAT) como vehículo para la integración del sistema CRISPR/Cas9 en el genoma del hongo dimórfico *Blastomyces dermatitidis*. Para ello, usaron un ADN-T compuesto por el casete de expresión de la enzima Cas9, un casete de expresión del ARN guía única (ARNg) basado en la metodología de auto escisión por ribozimas (41), el casete de resistencia Higromicina B fosfotransferasa (hph) para la selección de los transformantes, y las secuencias necesarias para el reconocimiento por la maquinaria de virulencia de *A. tumefaciens* LBA1100 (57,106,111). Con lo cual se obtuvo mutantes de *B. dermatitidis*, con bloqueo total de la expresión de dos genes relacionados al metabolismo del zinc y con los cuales se describió la importancia de estos genes para *B. dermatitidis* en un modelo de infección en ratón (56).

En los estudios realizados para comprender las características que le permiten a *Paracoccidioides* spp., adaptarse a la respuesta del hospedero ante la infección por este hongo, Tamayo et al. (98) en 2016, identificaron la presencia de diferentes isoformas de la proteína superóxido dismutasa, que le permiten neutralizar las especies reactivas de oxígeno e impedir el daño a las blastoconidias. En este trabajo emplearon la tecnología ARN anti sentido vía TMAT, para evaluar el rol de la proteína superóxido dismutasa tres (*SOD3*), en la respuesta a agentes inductores de estrés oxidativo, interacción con células fagocíticas y en un modelo de infección en ratón (98). Los resultados mostraron que la disminución de la expresión del gen *SOD3*, no alteraba la tasa de crecimiento del hongo en comparación al genotipo silvestre, sin embargo mostró tener efecto en la resistencia a los agentes inductores de estrés oxidativo y disminución de la capacidad infecciosa (98).

El objetivo en esta primera parte del trabajo fue implementar el sistema CRISPR/Cas9 para la edición del gen superóxido dismutasa tres (*SOD3*) de *P. restrepiensis* ATCC 60855, usando la TMAT como mecanismo para la inserción de este sistema de edición, en el genoma del hongo.

## **1.2 Materiales y métodos**

### **1.2.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento**

Este trabajo se desarrolló en el hongo *P. restrepiensis*, cepa ATCC 60855 (Pb60855), aislada de un paciente colombiano y obtenida del *American Type Culture Collection*. Su fase de levadura fue mantenida en cultivo a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en medio infusión cerebro corazón (BHI del inglés *brain heart infusion*) agar, suplementado con 1% de glucosa (Becton Dickinson and Company, Sparks, BD). El cultivo de las blastoconidias se realizó en BHI líquido en agitación constante a 150 rpm, por 72 a 96 horas a 36°C.

La selección de las blastoconidias transformadas se realizó en el medio de cultivo BHI con antibiótico Higromicina B (HygB) (Sigma-Aldrich®).

La cepa LBA1100 de *A. tumefaciens*, se usó como receptor del vector binario empleado para la transformación del hongo y células competentes de *E. coli* DH5α, para la clonación, mantenimiento y propagación de los plásmidos utilizados en este trabajo. Las bacterias fueron crecidas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) con antibiótico Kanamicina (Sigma-Aldrich®) [100 µg/ml] a 28°C y [50 µg/ml] a 37°C respectivamente.

### 1.2.2 Búsqueda de la secuencia del gen blanco y diseño del ARN guía única para su edición

La secuencia del gen *SOD3*, de *P. brasiliensis* cepa Pb18 (PADG\_02842) (98), almacenada en la base de datos del NCBI, se usó como referencia para la obtención de la secuencia en la cepa Pb60855, realizando alineamiento básico de secuencias de tipo local (BLAST) contra el genoma en la base de datos del grupo de investigación Biología Celular y Molecular, CIB- UdeA. La secuencia obtenida fue ingresada en la herramienta en línea CRISPOR (112), para la elección de la región Protoespaciador Pb60855\_ *sod3* (PbSOD3) de 20 nucleótidos (Suplemento 1) (**Figura 7**). La ausencia de posibles cortes por fuera del blanco fue confirmada realizando BLAST contra el genoma completo del hongo (**Figura 7.A**).

Con base en el diseño de C. Nørdvig et al. (41) para la construcción de vectores CRISPR/Cas9 y modificaciones realizadas por Kujoth G. et al. (57), el protoespaciador elegido fue anotado adyacente a las secuencias de las ribozimas virales de auto escisión HH (del inglés *Hammer head*) y HDV (del inglés *Hepatic delta virus*), bajo el control del promotor *PgpdA* y el terminador *TtrpC* de *Aspergillus nidulans*, formando el fragmento

ARNg\_PbSOD3. El software Geneious R11 (Biomatters, New Zealand) fue utilizado para la anotación de la secuencia de dicho fragmento y la estrategia de síntesis química de gen (Macrogen, Inc. Corea) para su adquisición un vector de clonación estándar (Figura 7.B).

### 1.2.3 Obtención del vector binario y transformación de *A. tumefaciens*

El vector con el inserto ARNg\_PbSOD3, fue clonado, multiplicado en *E. coli* DH5 $\alpha$ , y posteriormente purificado empleando la técnica de Miniprep (113). Se realizó la digestión del fragmento ARNg\_PbSOD3 usando enzimas de restricción *PacI* y *BgIII* (Thermo Scientific) y posteriormente su purificación usando el juego de reactivos QIAquick® *Gel Extraction Kit* (QIAGEN). El vector binario PTS608-Cas9-hyg (pPTS608), donado por el profesor Bruce Klein de la Universidad de Wisconsin-Madison fue linealizado usando enzima de restricción *BgIII* (Thermo Scientific) y se usó como receptor del fragmento ARNg\_PbSOD3 al cual fue ligado usando enzima T4 *DNA Ligase* (Thermo Scientific), esto para la formación del vector pPTS608\_PbSOD3 (Figura 7.B) el cual fue transformado y propagado en *E. coli* DH5 $\alpha$  y posteriormente insertado por electroporación en células de *A. tumefaciens* LBA1100 ultra competentes (114). La transformación en ambas bacterias fue confirmada por la amplificación mediante PCR convencional de un fragmento del gen de resistencia al antibiótico Higromicina B (Higromycin B fosfotransferasa, hph), usando iniciadores Hph\_F y Hph\_R (Tabla 2, Figura 7.C). Este procedimiento se realizó de igual forma con el plásmido pPTS608 vacío (no contiene el casete de expresión para el ARN guía) (suplemento 2), el cual se emplea como control de los efectos de la expresión constitutiva del gen Cas9 en las células de *P. restrepiensis* transformadas.

### 1.2.4 Transformación de *Paracoccidioides* spp. mediada por *A. tumefaciens*

Las blastoconidias de *P. restrepiensis* ATCC 60855 fueron transformadas, usando los clones de *A. tumefaciens* LBA1100 transformados con los vectores binarios pPTS608 vacío y pPTS608\_PbSOD3 para la inserción del sistema CRISPR/Cas9. Este

procedimiento se desarrolló siguiendo el protocolo previamente descrito por Menino et al. (115) para la obtención de aislamientos *Knockdown* en *Paracoccidioides* spp. En el cual el co-cultivo se realiza en condiciones óptimas, para permitir la inserción del ADN-T en el genoma del hongo. El co-cultivo de *P. restrepiensis* / *A. tumefaciens* se realizó conservando una proporción de células 1:10 (Blastoconidias/ *Agrobacterium*), durante un periodo de incubación de 48 horas a 28°C y en presencia de Acetosiringona [200mM] (Sigma-Aldrich®) y Kanamicina [100 µg/ml], para la inducción de los genes de virulencia y permanencia del vector binario en la bacteria, respectivamente. Finalizado este periodo de incubación el crecimiento de *A. tumefaciens* fue inhibido empleando el antibiótico Cefotaxima, sal sódica (Sigma-Aldrich®) y se realizó la selección de transformantes en medio BHI agar suplementado con glucosa 1% y adición del antibiótico HygB [90mg/ml]. El cultivo permaneció en incubación a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta la obtención de unidades formadoras de colonias (Figura 7.D). Una vez las UFC alcanzaron un tamaño ~3mm, fueron transferidas a una placa con el mismo medio de selección fresco y fueron incubadas por 5 días a 36°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se evaluó la estabilidad mitótica de los transformantes en presencia y ausencia del antibiótico HygB, realizando tres repiques sucesivos cada 5 días (Figura 7.E).

Los posibles transformantes obtenidos se cultivaron en medio BHI con [90 µg/ml] de HygB durante 48 horas y posteriormente fueron cosechados para la extracción de ADN mediante la técnica fenol:cloroformo (113). La calidad y cantidad del ácido nucleico fue verificada usando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Posteriormente este ADN se empleó para confirmar la inserción del ADN-T en el genoma del hongo, realizando la amplificación por PCR de los genes *hph* y *cas9*. En el ensayo se usaron los iniciadores *hph\_RT\_F* y *hph\_RT\_R*, *Cas9\_RT\_F* y *Cas9\_RT\_R*. (Tabla 2, Figura 7.F).

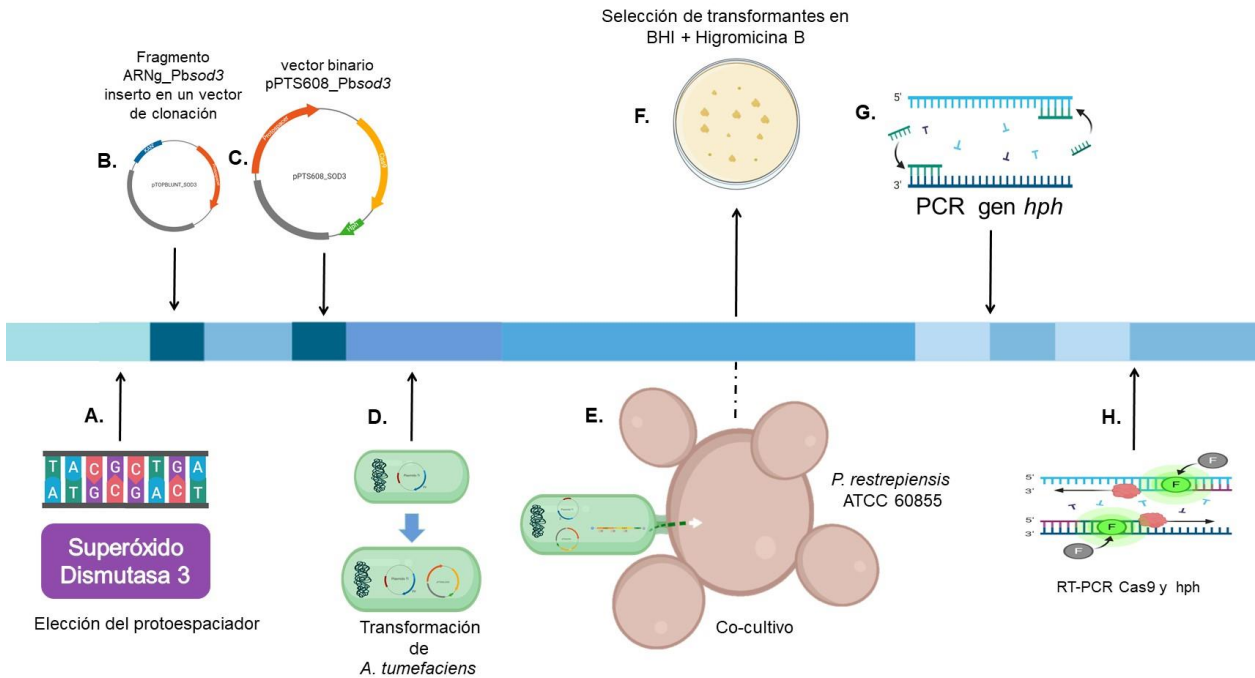
### 1.2.5 Análisis de expresión relativa de genes usando RT-PCR.

Para el análisis de la expresión de los genes *hph* y *cas9* en las levaduras transformadas se realizó una PCR en retro transcripción. Para ello se extrajo el ARN total de las células a partir de un cultivo fresco de 48 horas, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue tratado

con enzima *DNAsa I* (Thermo Scientific) y posteriormente empleado para la síntesis de ADN complementario usando juego de reactivos *Maxima First Strand cDNA Syntesis Kit* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se realizó una PCR convencional usando juego de reactivos *Platinum™ Taq DNA Poliymerase High Fidelity* (Invitrogen™) y los pares de iniciadores Hph\_RT, Cas\_RT y tef3\_RT descritos en la Tabla 2. La amplificación del gen factor de elongación tres (*TEF3*) se usó como control de procedimiento (98). El resultado se reveló en electroforesis de gel de agarosa 1% (Figura 7.G).

**Tabla 2.** Iniciadores de PCR utilizados en este trabajo, para la amplificación en los genes *hph* y *cas9*.

<b>Gen Blanco</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5' →3'</b>	
Higromicina B fosfotransferasa (hph)_BK	Hph_F	CGA TGT AGG AGG GCG TGG ATA	(116)
	Hph_R	GCT TCT GCG GGC GAT TTG TGT	
Higromicina B fosfotransferasa (hph) BCM	hph_RT_F	TAC ACT ACA TGG CGT GAT TTC ATA T	
	hph_RT_R	CTC TGA TAG AGT TGG TCA AGA C	
CRISPR <i>associated 9</i> (Cas9)	Cas9_RT_F	TAT CTG GAT GAG ATC ATT GAA CAG	
	Cas9_RT_R	TGA ACA GAT GAA TGA TAT TTT CAG C	
Factor de Elongación 3 (TEF)	Tef3_rt_f	TTT CTT GCC CAA GCT CAT GC	(98)
	Tef3_rt_r	CCT TGT TTG GTC TTC TCA CGT G	



**Figura 7. Protocolo de transformación mediada por *A. tumefaciens* en *P. restrepiensis* ATCC 60855. Inserción del sistema CRISPR/Cas9 en el vector pPTS608. A.** Elección de la secuencia protoespaciador , **B.** Anotación del fragmento ARNg\_PbSOD3 (secuencia protoespaciador), adyacente a las secuencias de las ribozimas virales de auto escisión HH (*Hammer head*) y HDV (*Hepatic delta virus*), adquirido en un vector de clonación comercial, (vector pTOP-PbSOD3) **C.** ligación del fragmento ARNg\_Pbsod3 en el vector pPTS608-Cas9-hyg, para la formación del vector binario pPTS608\_PbSOD3, empleado para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis* ATCC 60855 en fase de levadura, **D.** Transformación de *A. tumefaciens* con el vector obtenido en C., **E.** Transformación mediada por *A. tumefaciens* en co-cultivo con las blastoconidias, **F.** Selección de las UFC transformadas, **G.** confirmación de la transformación mediante la amplificación del gen *hph* inserto en el genoma del hongo, **H.** RT-PCR para confirmar la síntesis del ARN mensajero que codifica la proteína Cas9.

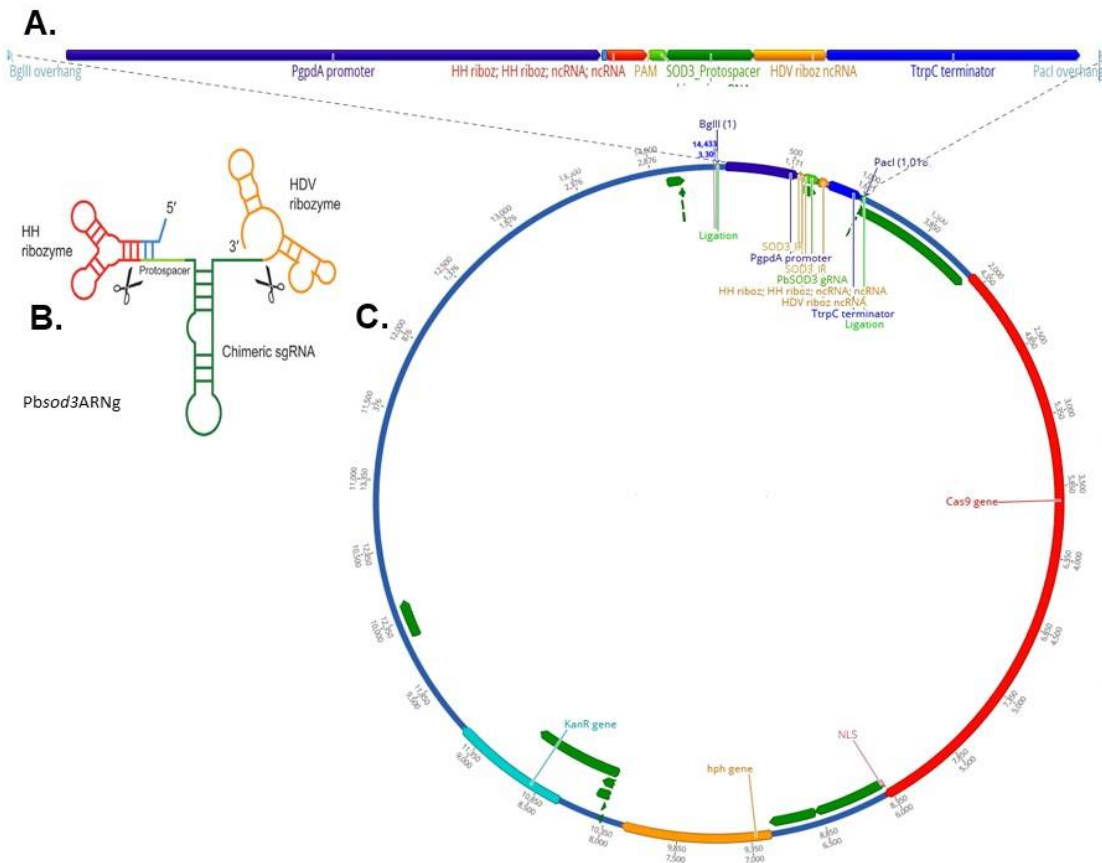
### 1.3 Resultados

#### 1.3.1 Transformación mediada por *A. tumefaciens* para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*

En este trabajo se empleó la transformación mediada por *A. tumefaciens* como estrategia para la inserción de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en el genoma

de *Paracoccidioides* spp. Para lo cual se implementó la metodología realizada previamente en *B. dermatitidis* por Kujoth et al. (56), en la cual el fragmento de ADN-T, contiene las secuencias para la expresión constitutiva del gen *cas9*, la transcripción el ARN guía (41) y el casete de resistencia al antibiótico Higromicina B como marcador de selección (56) **(Figura 8)**.

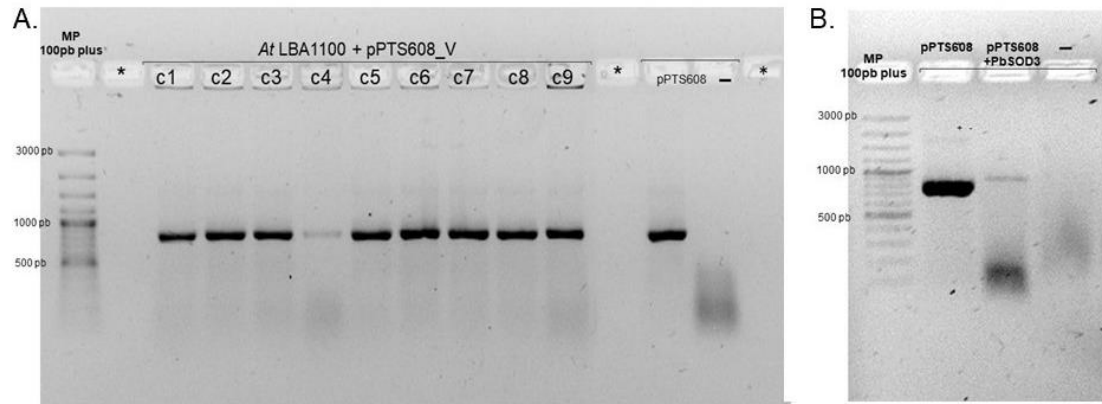
En la construcción del vector binario pPTS608\_PbSOD3, se utilizó la metodología síntesis química de gen, para la obtención del fragmento ARNg\_PbSOD3 **(Figura 8. A y B)** el cual fue posteriormente ligado al vector pPTS608 realizando clonación basada en enzimas de restricción **(Figura 8.C)**.



**Figura 8. Vector binario para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis* ATCC 60855.** **A.** Fragmento ARNg\_PbSOD3. De izquierda a derecha: Promotor *PgpdA* de *A. nidulans* (color azul); ribozima HH *hammerhead* (color rojo); Región repetida invertida IR, homologa a HH (color azul claro); protoespaciador *Pbsod3* (color verde); ribozima del virus de hepatitis delta HDV (color naranja); Terminador de la transcripción *TtrpC* de *A. nidulans* (color azul rey). **B.** Transcrito primario del ARNg\_PbSOD3, las horquillas representan el plegamiento por homología en cada una de las ribozimas (HH:Rojo y HDV:Naranja) y sitios de auto escisión, para la liberación del ARN guía (color verde)(41), **C.** Vector pPTS608\_PbSOD3, Ligación del fragmento ARNg\_PbSOD3 en el vector binario pPTS608, se observan secuencias para el gen Cas9 (color rojo), bajo el promotor y terminador *Ptef1/Ttef1* de *A. nidulans* y del gen de resistencia a Higromicina B, bajo el promotor *PtrpC* de *A. nidulans* (color naranja).

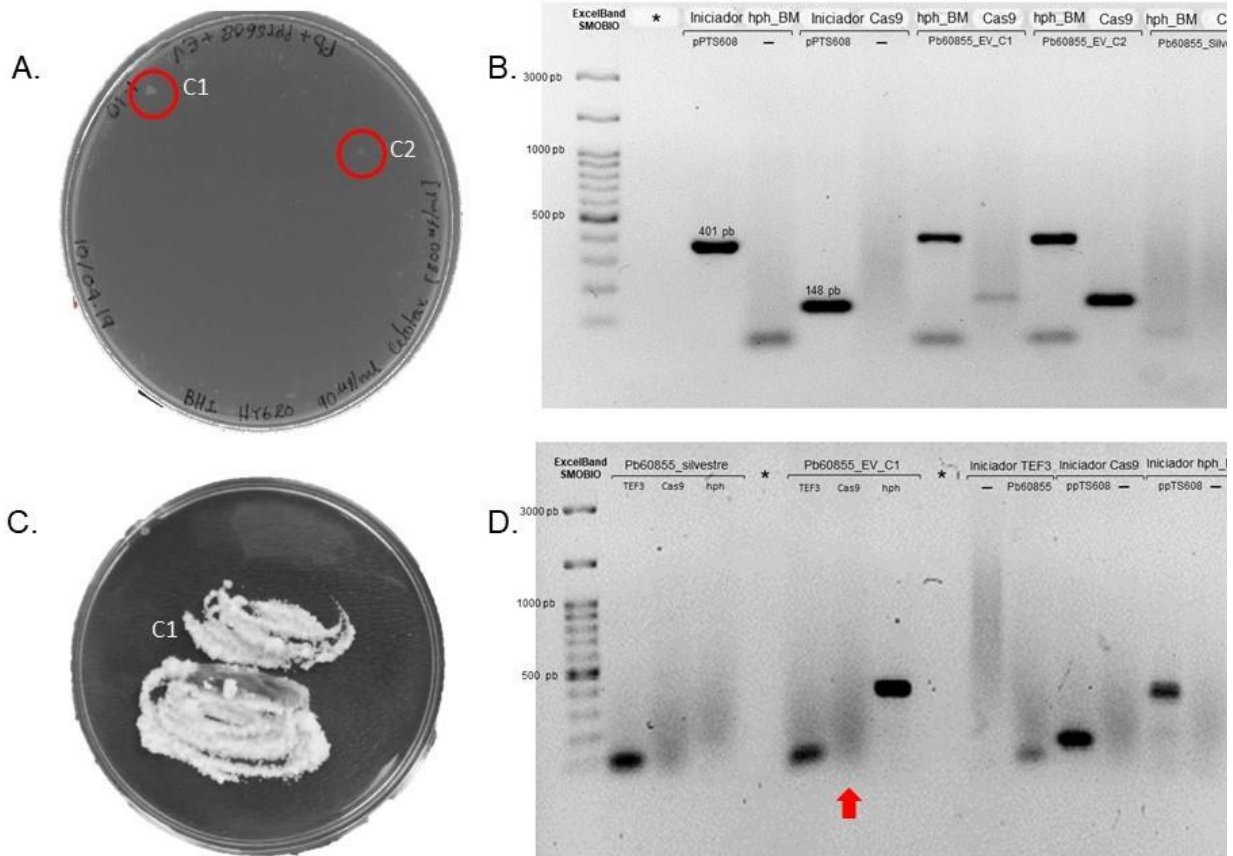
Las células de *A. tumefaciens* LBA1100, fueron transformadas por electroporación con el vector vacío pPTS608 y el vector pPT608\_PbSOD3, obteniendo una menor tasa de transformación con el ultimo (relación 20:1 UFC). La inserción del plásmido fue confirmada con la amplificación por PCR del gen *hph* (Figura 9).





**Figura 9. Confirmación por PCR de transformación de *A. tumefaciens* LBA1100.** **A.** inserción del plásmido pPTS608-Cas9-Hyg (pb). Se observa que todas las colonias elegidas al azar contenían el constructo. **B.** Inserción del plásmido con el sistema CRISPR/Cas9, pPTS608\_PbSOD3 en la colonia obtenida, la ligación del fragmento ARN guía con las ribozimas, disminuyó significativamente la capacidad de clonación en este microorganismo cepa. \* indica canales vacíos en la electroforesis.

Como resultado de la TMAT de Pb60855 usando el vector binario pPTS608 vacío (**Figura 10**), se obtuvieron dos transformantes en el medio de selección con antibiótico HygB (**Figura 10.A**). En ambos se confirmó la inserción del ADN-T (Cas9\_hyg), mediante la amplificación por PCR de los genes *hph* y *cas9* (**Figura 10.B**). Posterior al tercer subcultivo en medio BHI con HygB, solo uno de los transformantes (Clon C1) mantuvo la estabilidad mitótica (**Figura 10.C**). Se realizó el análisis de expresión de genes mediante RT-PCR y se observó ausencia de la expresión del gen *cas9* en este clon (**Figura 10.D**). A pesar de los múltiples intentos de TMAT con el vector binario pPTS608\_PbSOD3 no fue posible obtener células transformadas.



**Figura 10. Transformación mediada por *A. tumefaciens* para la inserción del sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*.** **A.** Clones de Pb60855 de TMAT con pPTS608 vector vacío (C1 y C2, respectivamente), tras 10 días de incubación en medio BHI glucosa 1% HygB [90µg/ml] a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>. (círculos rojos) **B.** Productos de PCR de la amplificación de los genes *hph* y *cas9*, a partir del ADN de clones Pb60855+pPTS608 (A). **C.** Crecimiento del clon 1 (C1) de Pb60855 transformado con el vector pPTS608-Cas9-hyg en medio BHI glu1% e HygB [100µg/ml]. **D.** Ausencia de amplificación del gen *cas9* mediante RT-PCR (Flecha roja), demostrando que no hay transcripción del ARN mensajero que codifica para síntesis de la proteína Cas9. \*indica canales vacíos en la electroforesis.

## 1.4 Discusión y conclusiones

El propósito de esta sección del trabajo fue implementar la tecnología de edición genética CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*, realizando la inserción de los genes que codifican para la expresión de los componentes del sistema a través de un fragmento de ADN transferido usando la transformación mediada por *A. tumefaciens*. En estudios previos, la estrategia utilizada en este trabajo mostró tener una alta eficiencia en la

producción de mutantes *knockout* en *B. dermatitidis* un hongo filogenéticamente relacionado (56,117). La inserción de fragmentos de ADN heterólogos usando TMAT ha funcionado con éxito en trabajos anteriores realizados en *Paracoccidioides* spp. (**Tabla 1**), en este trabajo a pesar de realizarse la inserción del ADN-T (Cas9-hyg) en el aislamiento obtenido, el uso del vector pPTS608 carece de utilidad, dado que no se observó la producción del transcrito del gen *cas9*, lo cual es fundamental para la síntesis de la proteína Cas9 y la acción de la tecnología CRISPR/Cas9 para la obtención del mutante (9).

La ausencia de expresión del gen *cas9*, podría estar relacionado al no reconocimiento de la secuencia promotora del factor de elongación de la traducción (*Ptef1*) de *Aspergillus nidulans*, empleada en el diseño del vector pPTS608 (Figura 8) (41). En el desarrollo de sistemas de expresión para uso en ingeniería genética y biología sintética, es común presentar esta limitación, ya que muchos promotores son incompatibles entre diferentes especies (118). La secuencia *Ptef1* de *A. nidulans* ha sido previamente usada en otras especies del mismo género (119), en las cuales los investigadores observaron un rango variable de la expresión de genes (120). Por lo cual a pesar de ser el promotor *tef1* un buen elemento regulador de la expresión constitutiva de genes (121,122), es necesario identificar y caracterizar la secuencia endógena en el contexto del modelo de estudio para garantizar la capacidad de inducir la transcripción del gen de interés como se realizó en *H. capsulatum* (123) y más recientemente en otros hongos, para la expresión del gen *cas9* (124).

La inexistencia de una base de datos con las secuencias promotoras específicas para uso en *Paracoccidioides* spp. y las dificultades relacionadas al aislamiento y evaluación de elementos previamente identificados (125), condujeron a que se descartara la opción de cambiar dicha región promotora y optimizar del vector binario usado. Como paso a seguir en el propósito para lograr el objetivo de este trabajo, se planteó el uso de la estrategia libre de sistemas de expresión, introduciendo el sistema CRISPR/Cas9 a la célula, empleando complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) recombinantes, lo cual se expone en el **Capítulo 2** de este documento.

## Capítulo 2. Uso de ribonucleoproteínas sintéticas como estrategia para la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en *Paracoccidioides* spp.

### 2.1 Introducción

La herramienta CRISPR-cas9 para edición genética, ha abierto la posibilidad de manipular el genoma de diferentes organismos (10). En *S. pyogenes* la resistencia a la invasión por material genético exógeno viral es mediada por el sistema CRISPR-Cas Tipo II, el cual funciona por medio de moléculas de ARN no codificantes (ARNg) que guían a la proteína endonucleasa Cas9 al reconocimiento y corte de la doble cadena del ADN del virus invasor (7). Para su acción, la enzima Cas9 se acopla de forma específica a la horquilla del ARNg a través de la secuencia *tracARN* y realiza el corte en la molécula de ADN foráneo guiada por 20 nucleótidos homólogos a la secuencia invasora (Protoespaciador) presentes en el fragmento *crARN* (19). La actividad endonucleasa sitio específica de las proteínas Cas es dada por la presencia de una secuencia señal adyacente al Protoespaciador, formada por tres nucleótidos consecutivos, 'NGG' en el caso de la Cas9 de *S. pyogenes* (126).

La comprensión de este fenómeno biológico, impulsó el desarrollo de una herramienta para la edición genética que podría ser aplicada en cualquier tipo de célula (9). Para realizar la ruptura de la doble cadena de ADN el sistema CRISPR/Cas9 requiere de la formación del complejo entre la molécula de ARNg y la proteína Cas9, por lo cual se hace necesario emplear estrategias que permitan su ingreso al núcleo de la célula e interacción con el ADN.

Como sistemas de expresión se han utilizado plásmidos (41,127) o ADN de transferencia (56), con la respectiva elección adecuada de secuencias promotoras y terminadoras para cada gen, además de la optimización de codones que permiten garantizar la transcripción y síntesis de cada elemento (128). A pesar de su uso y éxito en la aplicación de la técnica, la expresión constante y permanencia en la célula del sistema mantiene latente el riesgo de cortes fuera del gen blanco (129). Por lo cual, con el fin de superar estas dificultades y simplificar cada vez más el uso de la tecnología CRISPR/Cas9, trabajos recientes emplean esta herramienta de edición a través de la

inserción en las células de un complejo de ribonucleoproteínas formado por una molécula de ARNg sintetizada *in vitro* y la enzima Cas9 recombinante (130), dicha estrategia ha mostrado alta eficiencia y especificidad en la edición del gen blanco (53,54,131).

Si bien cada molécula de ARNg dirige la proteína Cas9 a realizar el corte en la doble cadena de ADN, la generación de una mutación en el gen de interés, depende de los mecanismos de reparación empleados por la célula para corregir el daño en el genoma (132). La unión de las hebras de ADN puede realizarse en ausencia de elementos homólogos (NHEJ) (133) o haciendo uso de fragmentos de ADN para reparar directamente por mecanismos de recombinación de las secuencias homologas (HDR) o con microhomología (MMEJ) a la región que sufrió el daño (35). Si bien mediante estos procesos se mantiene la integridad del genoma, éstos son fuente de alteraciones sobre la secuencia nativa del gen y con ello responsables del cambio en el marco de lectura, ya que en el proceso se puede generar la inserción y delección de nucleótidos o la integración de los fragmentos de reparación endógenos o inclusive fragmentos diseñados como parte del sistema de edición (53,134).

El uso del sistema CRISPR/Cas9 introducido a las células como complejos de ribonucleoproteínas RNPs, ha mostrado mayor eficiencia cuando es acompañado de una molécula que actúa como plantilla, para la inserción de una mutación específica a través de la vía de reparación por recombinación homóloga dirigida (135). Esta estrategia se ha probado con éxito en diferentes modelos, como líneas celulares de mamíferos (136), plantas (137), *A. fumigatus* (53), *Fusarium* spp. (138), *Cryptococcus* spp. (54) y *Candida* spp. (139).

En el hongo *Paracoccidioides* spp. la baja tasa de recombinación homóloga ha dificultado realizar estudios genéticos a través de técnicas tradicionales (reemplazo alélico) para la obtención de mutaciones *knockout* (88), por lo cual los estudios funcionales en este hongo se han realizado mediante estrategias como el silenciamiento de la expresión de un gen empleando tecnologías como el ARN anti sentido (**Tabla 1**) (81).

El segundo objetivo de este trabajo fue realizar la edición completa del gen *GP43*, de *P. restrepiensis* usando complejos de ribonucleoproteínas recombinantes para aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9, acoplada al mecanismo de reparación por

micro-homología, para la inserción del casete de resistencia Higromicina B fosfotransferasa *hph*, como marcador de selección de las células transformadas. El gen *GP43* codifica la síntesis de una glicoproteína de 43 kDa, secretada por el hongo, posee una alta actividad antigénica (140) y juega un papel importante en la interacción de este patógeno con el hospedero (91).

## **2.2 Materiales y Métodos**

### **2.2.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento**

*P. restrepiensis* ATCC 60855 en fase de levadura fue mantenido en medio BHI del inglés *brain heart infusion* (Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD) suplementado con 1% de glucosa (Sigma- Aldrich®) e incubado a 36°C en agitación mecánica constante de 150 rpm durante 72 a 96 horas. La selección de las células transformadas se llevó a cabo en el medio BHI agar con 1% de glucosa y adición del antibiótico Higromicina B (HygB) [90µg/ml] (Sigma-Aldrich®).

### **2.2.2 Elección del *Protoespaciador* y ensayo de edición *in vitro* usando complejo de ribonucleoproteínas**

La secuencia del gen *GP43* de *P. restrepiensis* fue obtenida mediante BLASTn contra la secuencia de *P. brasiliensis* cepa B339 ([U26160.3](#)) (140), almacenada en la base de datos del NCBI. Se utilizó el programa en línea CRISPOR (112), para la selección de las secuencias *Protoespaciador*, sobre la región 5' UTR y 3'UTR del gen, *Pbgbp43\_ARNg\_5'* y *Pbgbp43\_ARNg\_3'* respectivamente, como lo planteó Al Abdallah et al. (53) en 2017 (**Tabla 3**) y (Suplemento 3). Los cortes por fuera del gen blanco fueron descartados realizando BLAST contra el genoma completo.

**Tabla 3.** Secuencias de los Protoespaciador e iniciadores dirigidos al gen *GP43* empleados en este trabajo.

Nombre	Oligo	Secuencia 5'→3'
PbGp43_F23	PbGp43_ARNg_ 5'	GAA TTT TAG TTC TCT TAA CC
PbGp43_F776	PbGp43_ARNg_ 3'	ATT TGG GCT AGG AAG TAT GG
PbGP43_C1_F	GP43_- _61_566_F	ACT GAG AGC TAT CAC CTG TGG
PbGP43_C1_R	GP43_- _61_968_R	ATT CAT CGA CGG AGC TGC TC
PbGP43_C2_F	GP43_- _62_552_F	CGT CGC AAT TTC GGA TGC TT
PbGP43_C2_R	GP43_- _63_256_R	TAC CAT CCC TCC ATC CCT CG

Los ARNg sintéticos (PbGp43\_ARNg\_5' y PbGp43\_ARNg\_3') y la proteína Cas9 recombinante, fueron adquiridos como *TrueGuide Synthetic CRISPR gRNA* (Invitrogen™) y *TrueCut™ Cas9 Protein V2* (Invitrogen™), respectivamente. Las soluciones de trabajo se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante así: los ARNg fueron hidratados en tampón TE 1X y posteriormente almacenados en alícuotas a una concentración de [20mM]. La enzima Cas9 [1µg/ml] se preparó a partir de la concentración inicial [10µg/ml] en solución tampón de HEPES 20mM, KCl 100 mM, pH 7.5, para cada ensayo.

Previo a los ensayos *in vivo* se evaluó la actividad de los RNPs, realizando el corte *in vitro* de la secuencia de ADN blanco, para lo cual se amplificaron por PCR dos fragmentos en el gen *GP43* de *P. restrepiensis* ATCC 60855, utilizando la enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen™) y los pares de iniciadores PbGp43\_C1\_F y PbGp43\_C1\_R, sobre la región 5' UTR y PbGp43\_C2F y PbGp43\_C2\_R en la región 3' UTR (**Tabla 3**). Cada producto de amplificación fue incubado a 37°C durante una hora con el respectivo complejo de RNP sintetizado, usando 0,5 µl de Cas9 [1µg/ml] y 1 µl de ARNg [20mM] en un volumen final de 10µl en agua libre de ARNasas y ADNasas. El corte de los fragmentos de ADN fue visualizado en gel de agarosa al 1,5%. La secuencia de los ARNg y los iniciadores usados se listan en la **Tabla 3**.

### 2.2.3 Amplificación del fragmento de reparación con casete de expresión del gen de resistencia a Higromicina B

El corte de la doble cadena de ADN realizado por los complejos de RNPs en los ensayos *in vivo* es difícil de detectar por sí solo, por lo cual es útil acoplarlo a la inserción de un gen marcador de selección a través de mecanismos de reparación por homología (133). Por lo cual, en la estrategia de transformación del sistema CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis* usando complejos de RNPs y se empleó el mecanismo de reparación por recombinación homóloga directa descrita en *A. fumigatus* (53), en el cual se usó plantilla de reparación con el casete para la expresión del gen de resistencia Higromicina B fosfotransferasa (*hph*), el cual ha sido previamente utilizado en *Paracoccidioides* spp. (87). Se realizó la amplificación por PCR del fragmento con el casete *hph* (PbGp43\_HyB), obteniendo un producto final de ~2900 pb, el cual incluye la secuencia de dicho gen con sus respectivos promotor (*Pgpd*) y terminador (*Trpc*), tomados del plásmido pUR5750 (108); Los iniciadores de PCR sentido y anti-sentido, PbGp43\_hph\_F y PbGp43\_hph\_R, respectivamente (

Tabla 4), fueron diseñados con una extensión de 50 nucleótidos homólogos al gen GP43 en el extremo 5' y en extremo 3' para cada uno. La PCR se realizó con el juego de reactivos *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen™) y el protocolo: Desnaturalización inicial 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de Desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 50 segundos, extensión a 68°C por 1 minuto, y extensión final a 68°C por 20 min. El producto obtenido fue purificado usando *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), posteriormente cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop™2000 (Thermo Scientific) y visualizado en gel de agarosa 1.5% en TBE 0.5X.



**Tabla 4.** Iniciadores utilizados para la amplificación del fragmento de reparación PbGp43\_HyB.

Nombre	Secuencia 5'→3'
PbGp43_hph_F	CTTCAAGGTTTTGGTGGTCATAGGCATCATGAATTTTAGTTCTCTTAACC <b>CGAGCTCCCAAATCTGTCCA</b>
PbGp43_hph_R	AGCTGTTCTCCTACGCTCCAAGCCGTAAAAAGTCCCATCACCTGCATCC <b>AAGCTTGCATGCCTGCAGGTC</b>

Nota: Se observa la extensión de nucleótidos homologa al gen *GP43* de *P. restrepiensis* y en negrilla la secuencia de hibrida en el gen *hph*.

#### 2.2.4 Transformación de *P. restrepiensis* usando complejos de ribonucleoproteínas

En el procedimiento de transformación de *P. restrepiensis* se prepararon las células para la electroporación siguiendo el procedimiento usado por Wang P. (54) en 2018 en *Cryptococcus* spp. con algunas modificaciones. Las blastoconidias fueron cultivadas durante 72 horas en caldo BHI con 1% de glucosa y posteriormente cosechadas en tubo cónico de 50ml centrifugando a 300 rcf por 10 minutos a 4°C. El botón de células fue lavado dos veces consecutivas con agua destilada y desionizada fría (4-8°C), y posteriormente lavadas con tampón de electroporación [EB: Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub>, 1mM, sucrosa 270 mM, pH 7.5] frío centrifugando en las condiciones establecidas. El botón de células obtenido fue suspendido en EB con DTT 1mM e incubado en hielo por 30 minutos. Finalizada esta incubación las células fueron lavadas nuevamente con EB y suspendidas en 20 ml de la misma solución tampón. Las blastoconidias con mayor tamaño y los cúmulos de estas fueron retirados usando filtro estéril de nylon de 40µm (Falcon®). El número de células fue estimado usando cámara de Neubauer, y permanecieron en hielo hasta su uso.

Durante el proceso de preparación de las células, se realizó el ensamblaje de cada complejo de RNPs\_gp43, usando los ARNg y Cas9 previamente descritos. Para ello se mezcló 1 µl de ARNg [20mM] y 1 µl de proteína Cas9 [1µg/ml] hasta un volumen final de

10µl de solución tampón [20mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.5] y fue incubado a 25°C durante 10 minutos. Ambos complejos fueron mezclados con 100µl de células [ $10^7$ ] y 2µg del fragmento de reparación PbGp43\_HyB, previamente obtenido; esta mezcla fue posteriormente incubada en hielo durante 10 minutos. El proceso de electroporación se realizó siguiendo el siguiente protocolo: 0,75 kV, 25 µF, y 400Ω, en cubeta de 2mm en el equipo *Gene Pulser Xcell Bio-Rad electroporation system* ((Bio-Rad Laboratories, inc). La recuperación de la pared celular de las blastoconidias se estimuló en 2ml de caldo BHI, glucosa 1% y Sorbitol 0.5M, incubando durante 12 horas a 36°C con agitación mecánica constante a 150 rpm. Posteriormente se seleccionaron las células transformadas en medio BHI glucosa al 1% suplementado con el antibiótico HygB [90µg/ml]; los cultivos se incubaron a 36°C y 5% CO<sub>2</sub> durante dos semanas o hasta la obtención de colonias (**Figura 11**).

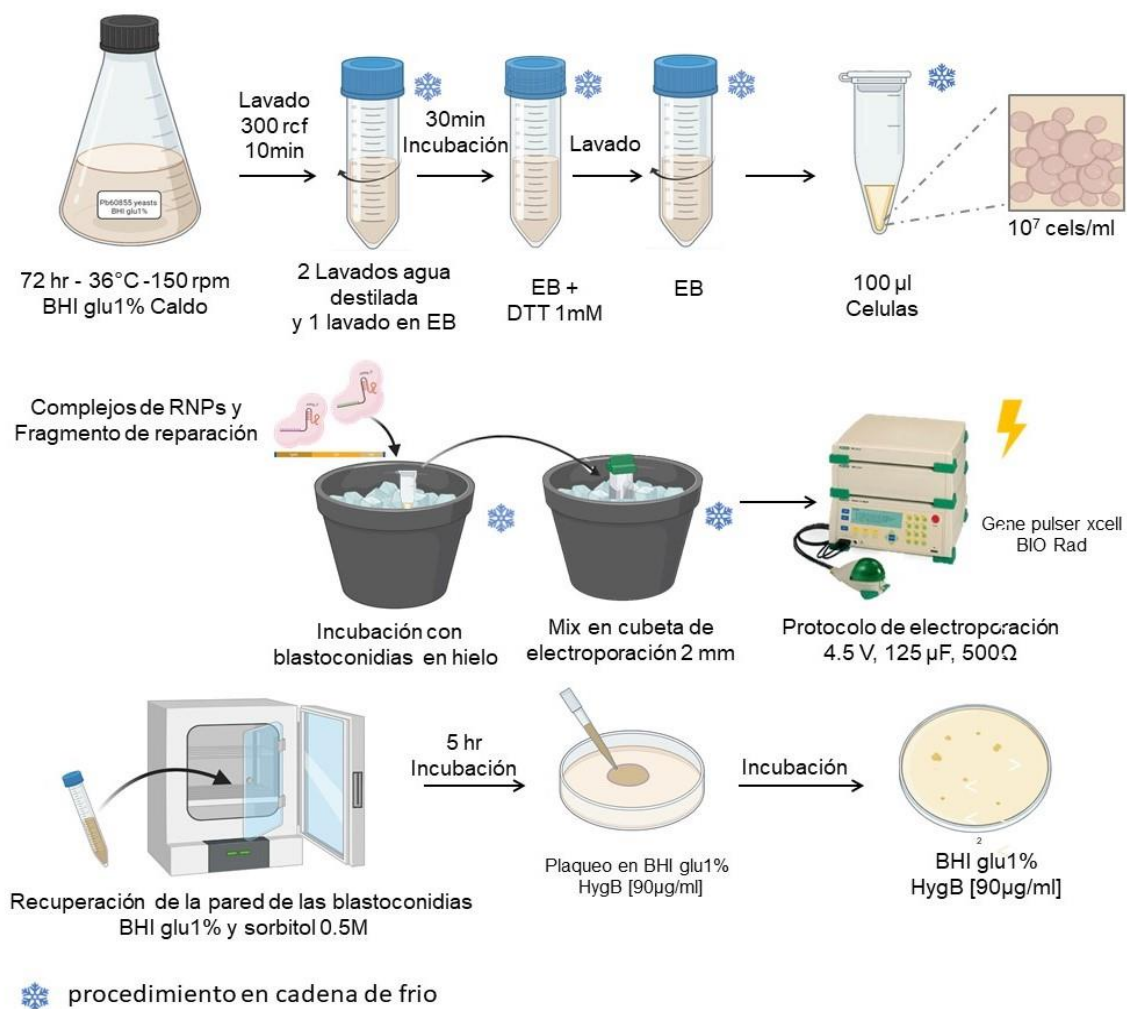


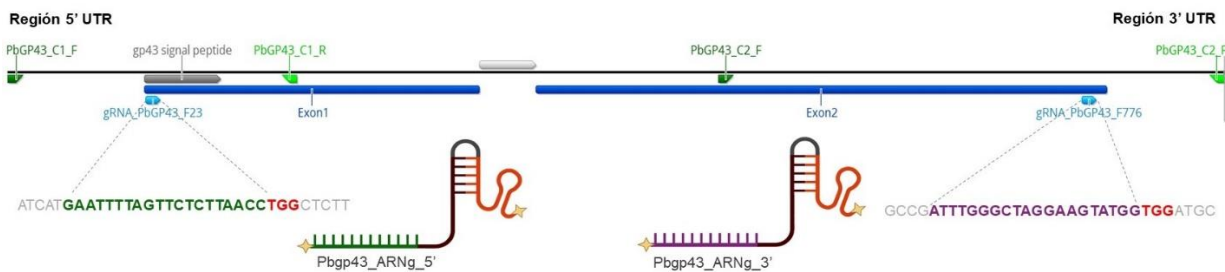
Figura 11. Protocolo de transformación de *P. restrepiensis* ATCC 60855 con complejos de ribonucleoproteínas dirigidas al gen gp43.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Complejo de ribonucleoproteínas sintético como mecanismo para la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*

Para la delección completa del gen codificante para la proteína de 43 kDa (gp43) de *P. restrepiensis*, se utilizó la estrategia libre de ADN que emplea la formación de un complejo de ribonucleoproteínas sintéticas, compuesto por un ARN guía transcrito *in vitro* y la proteína Cas9 recombinante. Los ensayos se realizaron siguiendo el mecanismo previamente descrito por Al Abdalah y colaboradores en *A. fumigatus* (53).

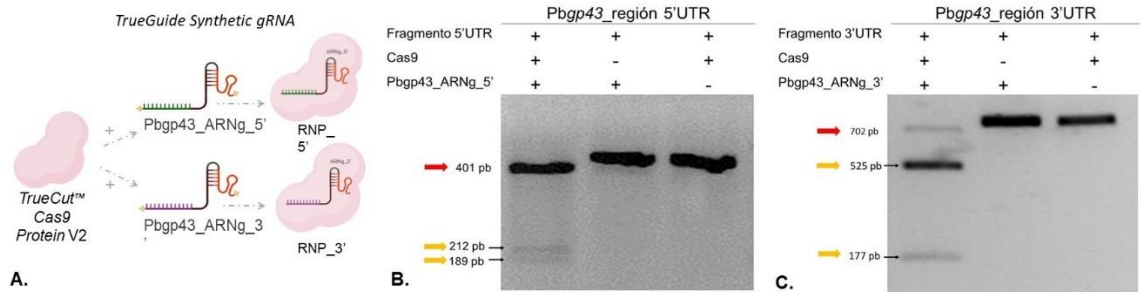
Una vez identificada la secuencia completa del gen *GP43* de *P. restrepiensis* ATCC 60855 se eligieron las secuencias Protoespaciador en las regiones 5' UTR y 3' UTR (Figura 12).



**Figura 12. Diagrama de la delección del gen *gp43* en *P. restrepiensis* ATCC 60855.** Elección de las secuencias Protoespaciador en regiones 5' UTR y 3' UTR, Pbgp43\_ARNg\_5' (secuencia en color verde) y Pbgp43\_ARNg\_3' (secuencia en color morado), respectivamente. Los cuales fueron adquiridos como ARN guía sintéticos (*TrueGuide Synthetic CRISPR gRNA*, Invitrogen™). En la gráfica se observan las regiones amplificación por los iniciadores Pbgp43\_C1 y Pbgp43\_C2, y los sitios de corte para cada complejo de RNPs.

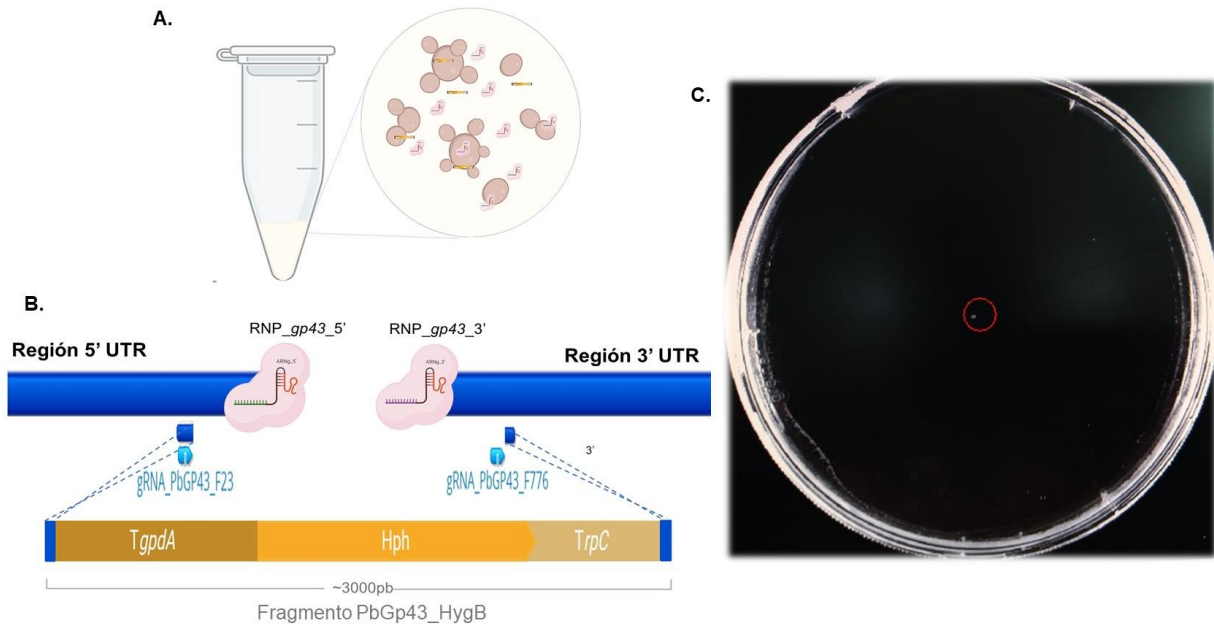
Una vez realizado el ensamblaje de los complejos de RNPs (Figura 13), se comprobó la efectividad y especificidad de los ARNg elegidos. Para ello se realizó, el corte *In vitro* del producto de PCR amplificado en cada región UTR del gen *GP43* (Figura 12). La actividad endonucleasa de los complejos fue la esperada, generando sobre la

región 5' UTR (401pb), los fragmentos de 211 y 189 pb (Figura 13. **A y B**) y sobre la región 3'UTR generó dos fragmentos de 525 y 177 pb (Figura 13.**C**).



**Figura 13. Corte *in vitro* usando complejos de ribonucleoproteínas sintéticos en la molécula de ADN de *P. restrepiensis* ATCC 60855.** **A.** Esquema de la formación los complejos de RNP, tras la unión de la proteína *Cas9* recombinante y el ARNg sintético **B.** y **C.** Evaluación de la actividad endonucleasa de los RNPs *gp43*, para la edición del gen *gp43* en las regiones 5' UTR y 3' UTR, para la edición del gen *GP43*. Las flechas rojas, indican el fragmento amplificado por PCR para casa región UTR. Las flechas amarillas, indican los fragmentos obtenidos tras el corte específico realizado por cada complejo de ribonucleoproteínas.

Los complejos RNPs\_*gp43* 5' y 3' UTR, fueron preparados de forma individual, posteriormente mezclados con el fragmento de reparación PbGp43\_HygB (sintetizado por PCR) y las células de *P. restrepiensis* preparadas como se indicó previamente, preservando la cadena de frío durante la incubación (**Figura 14**). Los complejos de RNPs y el fragmento de reparación con casete para expresión del gen de resistencia a Higromicina B, fueron electroporados en las blastoconidias (**Figura 14. A y B**). Tras el periodo de recuperación y posterior cultivo en medio de selección, se obtuvo el crecimiento de una UFC, la cual perdió viabilidad después de tres sub-cultivos en presencia del antibiótico Higromicina B (**Figura 14.C**).



**Figura 14. Transformación de *P. restrepiensis* en fase de levadura para la introducción del sistema CRISPR-Cas9 usando complejos de RNPs\_gp43.** **A.** Ilustración la incubación de las blastoconidias con los complejos RNPs y el fragmento de reparación con el gen *hph*. **B.** Diagrama del corte en las regiones 5' y 3' UTR para la edición del gen *GP43* e inserción del fragmento PbGp43\_HygB, mediado por mecanismos de reparación por micro-homología (Azul). **C.** Foto la UFC obtenida en transformación de *P. restrepiensis*, la selección se realizó empleando el antibiótico Higromicina B [90 µg/ml], esta colonia perdió viabilidad después de tres subcultivos consecutivos en presencia del antibiótico.

## 2.4 Discusión y conclusión

En búsqueda de una estrategia para realizar el bloqueo total de genes en *P. restrepiensis* por medio de la tecnología de edición genética CRISPR/Cas9, utilizamos la estrategia libre de ADN, que emplea la formación de complejos de ribonucleoproteínas recombinantes, con la cual se demostró la efectividad y especificidad de la técnica para realizar la ruptura en la doble cadena de ADN de este hongo *in vitro*.

En la implementación de la tecnología CRISPR/Cas9, las estrategias que emplean moléculas de ADN, requieren de la maquinaria celular para la transcripción y traducción de los componentes del sistema (57,141). A diferencia de esto con el uso de complejos de ribonucleoproteínas (RNPs), la proteína Cas9 recombinante ingresa al núcleo de la

célula en su forma activa, debido a la incorporación de señal de localización nuclear (NLS del inglés *nuclear localization signals*) y realiza el corte del ADN en el sitio indicado por el ARN guía diseñado (130).

El resultado de la acción de los complejos de RNPs en ensayos *in vivo* es difícil de detectar en ausencia de un cambio fenotípico macroscópico, como lo es la interrupción de la síntesis de pigmentos, lo cual mostró ser efectivo al implementar el sistema en otros hongo como *Exophiala dermatitidis* (59), por lo cual es útil acoplarlo a la inserción de un gen marcador de selección a través de mecanismos de reparación (133) y de esta forma discriminar las células transformadas de aquellas que conservan el genotipo silvestre (142). Lo cual ha sido previamente realizado con éxito en hongos como *A. fumigatus* (53) y *Cryptococcus spp.* (54).

Ante el desconocimiento de un gen implicado directamente en las características macro y microscópicas de *Paracoccidioides spp.*, que permita identificar directamente el efecto de su edición. En este trabajo se tomó la iniciativa de utilizar un mecanismo de ruptura y reparación del ADN (142), no antes evaluado en el hongo *Paracoccidioides spp.*, mediante el cual al realizar el corte de la doble cadena de ADN en dos regiones adyacentes al gen GP43 y su delección completa, activaría la maquinaria celular para el reconocimiento de un fragmento de ADN con secuencias cortas homologas al gen intervenido y de este modo realizar su inserción del caset de resistencia a Higromicina B en el genoma en remplazo del gen Gp43 (53). Los resultados obtenidos en las transformaciones realizadas no fueron los esperados, debido a la inadecuada selección de las posibles células transformadas, usando el gen *hph*. Este evento pudo ser influenciado por el tamaño del fragmento de reparación Higromicina B fosfotransferasa y las respectivas secuencias promotor y terminador (~ 2900 pb), cuya longitud supera la del fragmento eliminado en el gen Gp43 (~1300 pb), dificultando su reconocimiento por la maquinaria de reparación celular (143). Además de la incertidumbre, sobre el ingreso de forma sincrónica al mismo núcleo de la blastoconidia, de los complejos de RNPs y el fragmento de reparación, dada la naturaleza multinucleada característica de *Paracoccidioides spp.*(84)

Dado que nuestros resultados muestran una eficiente y especifica actividad de los complejos de RNPs del sistema CRISPR/Cas9 *in vitro*, se propuso la búsqueda de un

nuevo marcador de selección para uso en los ensayos genéticos de *P. restrepiensis*, el cual pueda ser empleado para reproducir esta estrategia y mejorar significativamente la eficiencia en el proceso de selección de las células transformadas, como se describe en el **Capítulo 3**.



## Capítulo 3. Resistencia adquirida al antibiótico Geneticin como nuevo marcador de selección en *Paracoccidioides* spp

### 3.1 Introducción

La aplicación de herramientas de manipulación genética ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la función de los genes(3). Independiente de la tecnología empleada en la edición del genoma, es necesario el uso de marcadores que provean una ventaja selectiva a las células transformadas sobre aquellas no modificadas, permitiendo su identificación y la evaluación de la estabilidad de la mutación generada (144). Los genes marcadores de selección más comúnmente usados son los de tipo endógenos o auxotróficos, los cuales codifican enzimas implicadas en la síntesis de *ново* de aminoácidos o nucleótidos y los de tipo dominante que confieren a las a las células transformadas la capacidad de resistencia a compuestos tóxicos como los antibióticos que son inactivados mediante un proceso enzimático (144). La inserción de estos genes marcadores con sus respectivas secuencias promotor y terminador pueden ser introducidos a la célula a través de fragmentos de ADN, plásmidos o ADN de transferencia, esto de acuerdo a la metodología empleada y el modelo de estudio (145).

En *Paracoccidioides* spp. la aplicación de herramientas como el ARN anti sentido, ha permitido acercarse a la comprensión y análisis de algunos eventos moleculares relacionados a su patogenicidad y virulencia (90,101,146). Desafortunadamente los eventos de manipulación genética para el estudio de este hongo tienen diversas dificultades entre ellas: la ausencia de cepas con mutaciones auxotróficas y la disposición limitada de marcadores de selección dominantes para la selección de las células transformadas.

A diferencia de otros hongos patógenos de humanos como *Candida* spp. (147), *A. fumigatus* (148) y *Cryptococcus* spp. (149), en los cuales además del gen *hygromycin B phosphotransferase (hph)* se cuenta con otros marcadores de selección adicionales, entre ellos *N*-acetiltransferasa (*NAT*) (147), Proteína de resistencia a *Bleomicina* (*ble*) (148) y *aminoglucósido fosfotransferasa* (*KanMX*) (149), los cuales confieren resistencia a los antibióticos *Nourseotricina*, *Fleomicina* y Geneticina, respectivamente. En *P.*

*restrepiensis*, para la implementación de estrategias de mutación u obtención de aislamientos con silenciamiento genético, solo se cuenta con el gen *hph* que otorga resistencia al antibiótico Higromicina B (86,87); por lo cual es necesario la búsqueda de un marcador adicional para los estudios que requieran múltiples mutaciones o para aquellos en los que este gen no sea eficiente.

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar el casete KanMX que codifica la enzima aminoglucósido fosfotransferasa, como un nuevo marcador de selección dominante para uso en los estudios genéticos de *P. restrepiensis*. El casete KanMX, surge de la fusión del transposón Tn903 de *E. coli* y las secuencias promotor y terminador del gen *TEF* del hongo *Ashbya gossypii* (150) y provee resistencia a los antibióticos Kanamicina y Geneticina (G418) en procariontes y en eucariotes, respectivamente (150). Desde su desarrollo en los años 90, ha sido ampliamente utilizado como marcador de selección dominante en estudios genéticos en varias especies de hongos (145) incluyendo *H. capsulatum* (151).

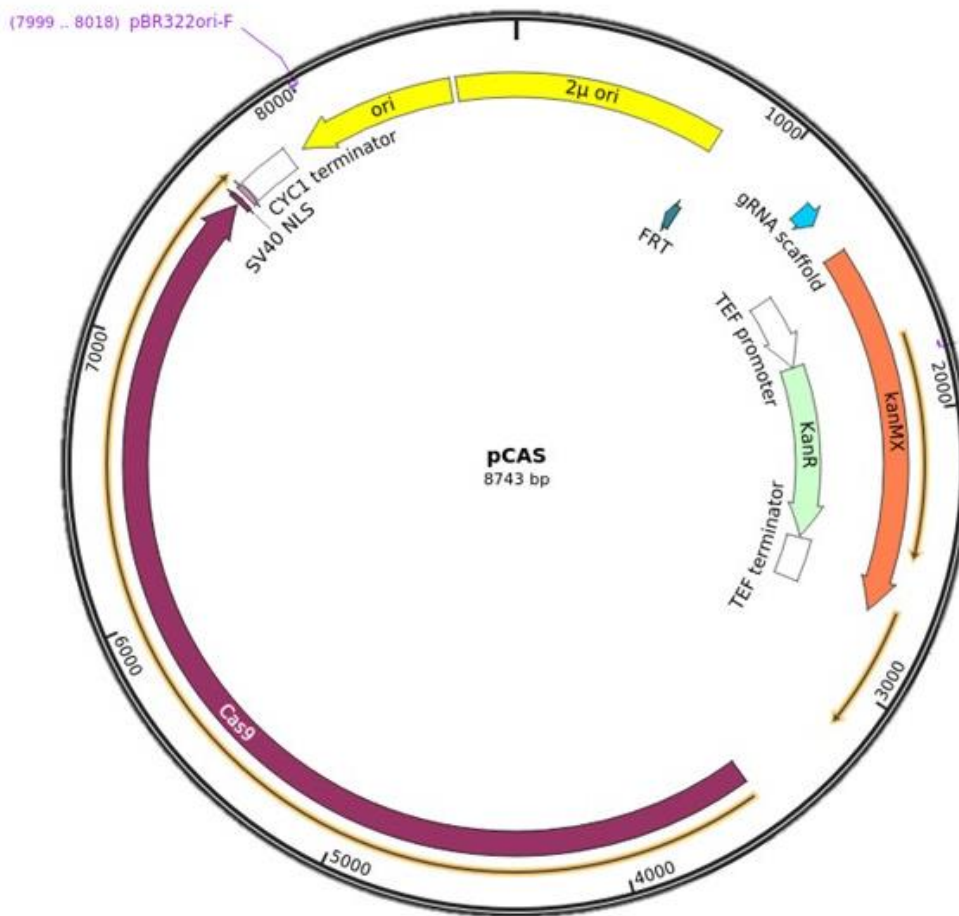
## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento**

Los ensayos de este trabajo se realizaron en las blastoconidias de *P. restrepiensis* ATCC 60855 crecidas durante 72 a 96 horas en medio BHI del inglés *brain heart infusion* (Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD) suplementado con 1% de glucosa (Sigma- Aldrich®) e incubando a 36°C con agitación mecánica constante a 150 rpm. El antibiótico Geneticin™ de Gibco™ (G418, Thermo Scientific) fue adicionado al medio de cultivo para determinar la mínima concentración inhibitoria de crecimiento y para la selección de las células transformadas. La clonación, mantenimiento y propagación del plásmido pCas, se realizó en la cepa DH5α de *E. coli* cultivada medio Luria Bertani (LB) con antibiótico Kanamicina [50 µg/ml] (Sigma-Aldrich®).

### 3.2.2 Plásmido

Como vector para la inserción del marcador de resistencia al antibiótico G418, se utilizó el plásmido pCas, el cual fue por donado por el profesor Jamie Cate de la Universidad de California - Berkeley (*Addgene plasmid #60847*; <http://n2t.net/addgene:60847>; RRID: Addgene\_60847). El plásmido pCas posee el origen de replicación de 2 micras y el casete KanMX del plásmido pUC empleado para la selección de las células transformadas (152). Este vector es un sistema de expresión para la proteína Cas9 de *S. pyogenes* y del ARN guía para implementación del sistema CRISPR/Cas9 en levaduras (Figura 15) (153).



**Figura 15. Mapa del vector pCas.** El esqueleto del plásmido contiene el origen de replicación 2-micron-pUC (color amarillo), para uso en bacterias y levaduras. Como marcador de selección posee el casete KanMX (color verde y naranja) para su expresión en procariotas y eucariotas en los cuales confiere la resistencia a Kanamicina y G418, respectivamente. Este vector fue creado para uso en biología sintética como mecanismo de expresión del sistema CRISPR/Cas9 en levaduras (152). Imagen tomada y modificada de *Addgene plasmid #60847*.

### 3.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de G418 en *P. restrepiensis*.

La sensibilidad de *P. restrepiensis* al antibiótico Geneticina se evaluó inoculando 50  $\mu$ l de una suspensión de blastoconidias del hongo con una concentración de  $10^6$

células/ml, la cual se realizó en placas con medio de cultivo BHI suplementado con glucosa al 1% y adición de concentraciones ascendentes del antibiótico G418 [0, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 µg/ml]. Las placas permanecieron en incubación por 10 días a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se determinó como concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración de antibiótico en la cual no se observó crecimiento del hongo.

### **3.2.4 Protocolo de transformación por electroporación usando el plásmido pCas**

Las blastoconidias de *P. restrepiensis* fueron preparadas para transformación siguiendo el protocolo usado en 2018 por Wang P. (54) para la electroporación de *Cryptococcus* spp., con las siguientes modificaciones. Las blastoconidias fueron cultivadas durante 72 horas en caldo BHI con 1% de glucosa y posteriormente cosechadas en tubo cónico de 50ml centrifugando a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón de células fue lavado dos veces consecutivas con agua destilada y desionizada fría y posteriormente lavadas con tampón de electroporación [EB: Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub>, 1mM, sucrosa 270 mM, pH 7.5] frío, centrifugando en las condiciones previamente descritas. El botón de células fue suspendido en EB con DTT 1mM e incubado en hielo por 30 minutos. Finalizada esta incubación las células fueron lavadas nuevamente con EB y suspendidas en 20 ml de la misma solución tampón.

Almeida et al. (84) en 2006, describen la presencia de diferentes poblaciones de células presentes en el cultivo de *P. restrepiensis*, indicando su variabilidad en razón al tamaño de la blastoconidia y el número de núcleos que estas poseen. Con el objetivo de obtener las blastoconidias individuales y de menor tamaño, la suspensión de células previamente lavada con EB, permaneció en hielo por 15 minutos, dejando precipitar las células de mayor tamaño, con múltiples gemas y/o cúmulos de estas. Posteriormente se aspiraron 5 ml de la parte superior del sobrenadante y fueron transferidos a un tubo cónico de 50 ml estéril. Las células fueron contadas usando cámara de Neubauer, y permanecieron en hielo hasta su uso. En el proceso de electroporación se usaron 100µl de la suspensión de células a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml y 2µg de plásmido pCas, los cuales fueron mezclados suavemente e incubados en hielo por 10 min. Posteriormente se empleó el protocolo de electroporación 0.45 kV, 125 µF, y 500Ω, en

cubeta de 2mm, usando el equipo *Gene Pulser Xcell Bio-Rad electroporation system* (Bio-Rad Laboratories, inc). Las células electroporadas fueron incubadas en 2ml de caldo BHI con glucosa al 1% y Sorbitol 0.5M durante 5 horas a 36°C con agitación mecánica constante a 150rpm, esto buscando la recuperación de la pared celular del hongo. Finalizado este tiempo, las células transformadas fueron cultivadas en agar BHI glucosa 1% y 30 µg/ml de antibiótico G418. Las cajas de Petri se incubaron a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 10 días o hasta observar la formación de colonias (**Figura 16**).

Las colonias obtenidas de la transformación de *P. restrepiensis* con pCas, fueron repicadas tres veces consecutivas en medio BHI con el antibiótico G418 [30 µg/ml], empleando las condiciones previamente establecidas. Con el fin de evaluar la permanencia del plásmido en las células y la estabilidad de la resistencia adquirida al antibiótico, se realizó un nuevo repique de los transformantes en medio sin antibiótico y posteriormente un nuevo cultivo en presencia de éste. En cada punto se realizó la extracción de ADN.

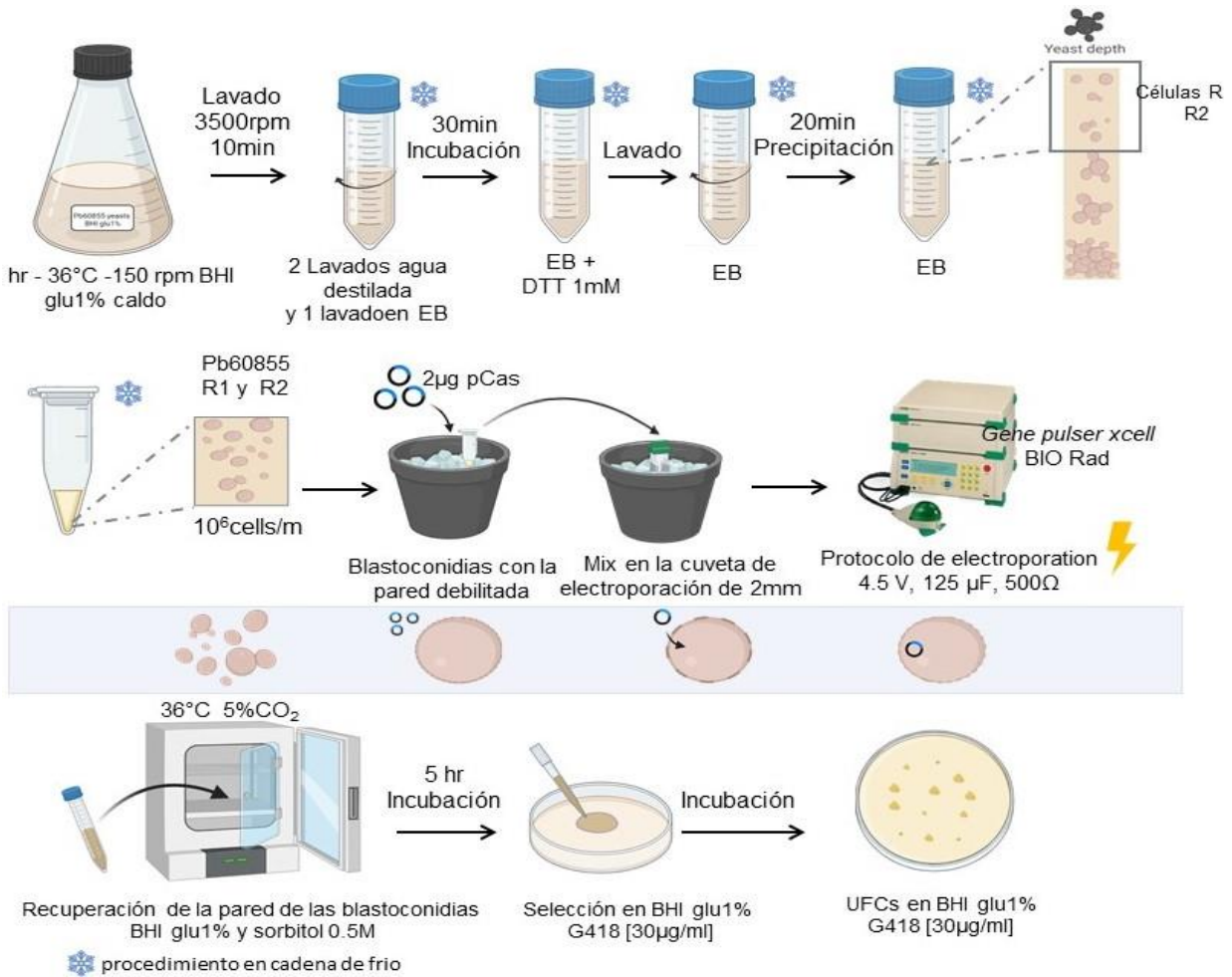


Figura 16. Protocolo de transformación de *P. restrepiensis* ATCC 60855, con el plásmido pCas (Addgene plasmid #60847).

### 3.2.5 Extracción de ADN

El plásmido pCas fue transformado en *E. coli* DH5α para su propagación, posteriormente fue purificado usando el protocolo Miniprep (113). La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos de las colonias transformadas con pCas, para lo cual se empleó la técnica de fenol:cloroformo (113). La extracción se realizó en cada punto de los repiques previamente mencionados. La calidad y cantidad de estos ácidos nucleicos se determinó usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.2.6 Confirmación molecular de la transformación con pCas y la resistencia adquirida al antibiótico Geneticina

Para confirmar la adquisición de pCas, se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del gen KanMX presente en el vector. Se emplearon los iniciadores en la **Tabla 5** y el juego de reactivos [TP1000] *ExcelTaq™ Taq DNA Polymerase* (SMOBIO Technology, Inc.). La resistencia adquirida a G418 se observó con el crecimiento de las colonias en medio de cultivo con el antibiótico Geneticina en los repiques consecutivos.

**Tabla 5.** Secuencias de iniciadores para la amplificación en el vector pCas

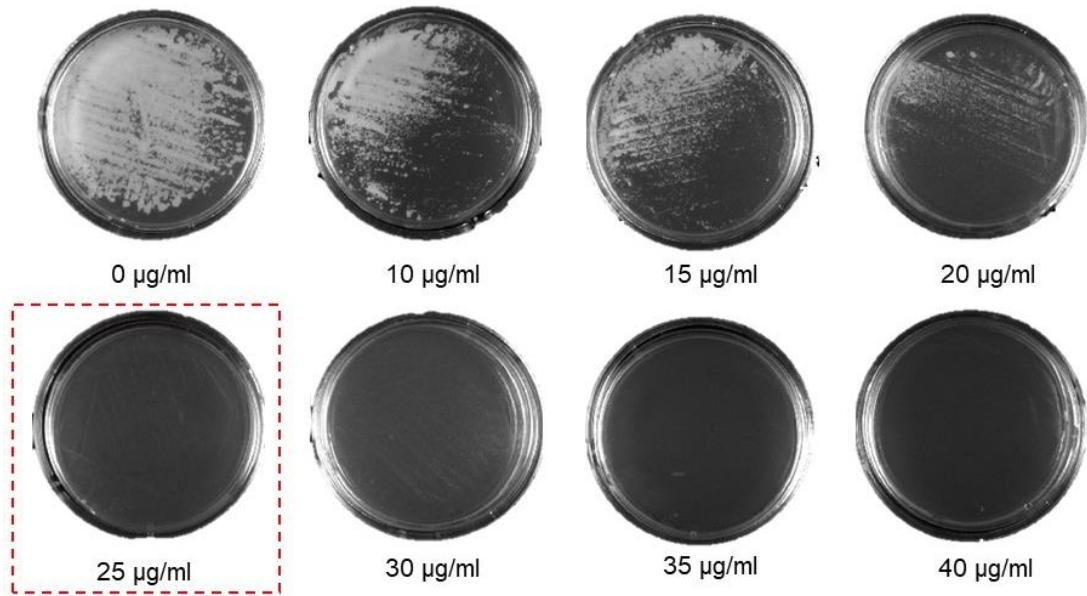
Nombre	Secuencia 5'→3'
KMX_725F	CCG GTT GCA TTC GAT TCC TG
KMX_874R	CCA GAC TTG TTC AAC AGG CC

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria Geneticina en *P. restrepiensis*

En nuestra búsqueda por un nuevo marcador de selección para los ensayos moleculares en *P. restrepiensis* se determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de las blastoconidias de la cepa ATCC 60855 en presencia de concentraciones ascendentes del antibiótico Geneticina. Se observó la inhibición total del crecimiento a la concentración de 25 µg/ml del antibiótico en medio BHI suplementado con glucosa 1% (Figura 17). Sin embargo, para la selección de las células transformadas con el vector pCas y el consecutivo seguimiento de la resistencia adquirida al antibiótico, elegimos la concentración de 30 µg/ml, dado que a esta concentración no se obtuvo crecimiento del hongo luego de cuatro semanas de incubación en las condiciones establecidas.

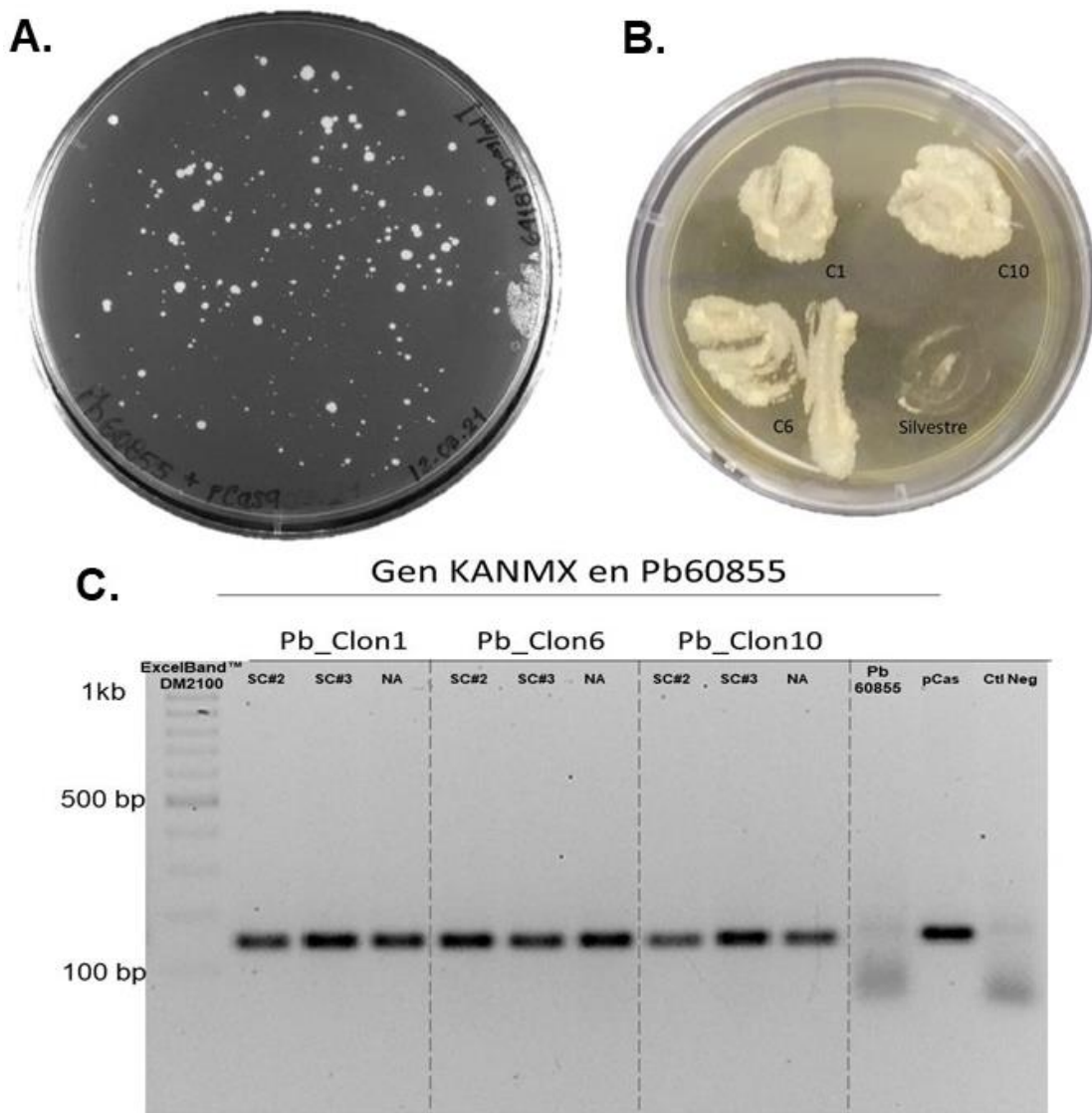




**Figura 17. Establecimiento de la CMI de *P. restrepiensis* ATCC 60855 a Geneticina.** Las blastoconidias [ $10^6$  Cel/ml] fueron cultivadas en medio de cultivo BHI suplementado con glucosa 1% y el antibiótico™ Gibco™ (G418, Thermo Scientific), las placas fueron incubadas por 7 días a 36°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se determinó como CMI [25 µg/ml].

### 3.3.2 Resistencia al antibiótico Geneticina (G418) en *P. restrepiensis*, adquirida vía vector pCas

La sensibilidad de *P. restrepiensis* ATCC60855 a G418 fue confirmada y se estableció la CMI. Como estrategia para generar clones con un fenotipo resistente a este antibiótico, se desarrolló un nuevo protocolo para la obtención de blastoconidias individuales pequeñas, las cuales fueron transformadas con el vector pCas usando un protocolo de electroporación (**Figura 18**). La transformación tuvo una alta eficiencia con la obtención de aproximadamente 100 UFC usando 2µg de plásmido (**Figura 18. A**). Diez colonias fueron sub cultivadas en medio BHI con antibiótico G418 [30µg/ml], entre las cuales los clones uno, seis y diez mantuvieron la estabilidad mitótica en un total de seis semanas (cinco subcultivos) (**Figura 18.B**). La inserción y permanencia del plásmido en las células se confirmó realizando PCR convencional para la amplificación de un fragmento de ~150 pb del gen KanMX en el vector pCas (**Figura 18.C**).



**Figura 18. Resistencia de *P. restrepiensis* ATCC 60855 al antibiótico Geneticina adquirida vía plásmido.** **A.** Colonias obtenidas de la transformación por electroporación de las blastoconidias con el vector pCas (Addgene #60847), la selección se realizó en agar BHI con glu1% y G418 [30 µg/ml], tras diez días de incubación. **B.** Aislamientos transformados, que mantuvieron el fenotipo resistente bajo la presión de selección del antibiótico G418, posterior a cinco subcultivos consecutivos realizados cada 5 días. **C.** se observa la amplificación en el gen KanMX a partir del ADN extraído de los clones obtenidos (figura 18. B) en los subcultivos (SC) dos y tres, uno en medio de cultivo sin antibiótico (NA).

### 3.4 Discusión y conclusiones

Las herramientas de manipulación genética requieren el uso de los marcadores de selección adecuados que permitan discriminar las células mutadas de aquellas que conservan el genotipo silvestre. En este trabajo, presentamos un nuevo marcador de selección dominante para uso en las herramientas moleculares empleadas en los estudios genéticos de *Paracoccidioides* spp.

El crecimiento de *P. restrepiensis* en presencia del antibiótico Geneticina, muestra su capacidad para reconocer las secuencias heterólogas del promotor y terminador TEF del hongo *A. gossypii* del casete KanMX (150), inserto en el plásmido pCas. La frecuencia de transformación obtenida fue comparable con a la reportada por Soares et al. (86) en 2005 en *P. lutzii* (cepa ATCC MYA826) y Torres et al. (154) en 2013 en *P. brasiliensis* (cepa Pb339), en las cuales se realizó la electroporación de plásmidos y su posterior selección con el casete de resistencia *hph*, único marcador de selección utilizado en la manipulación genética de *P. restrepiensis*.

La confirmación de la efectividad para el uso del gen KanMX, es de gran importancia en el progreso de la investigación de *Paracoccidioides* spp., ya que representa una alternativa en los casos en los que el casete *hph* no sea de utilidad o para el desarrollo de múltiples mutaciones. El casete KanMX posee una secuencia de menor tamaño (~1800 pb) que *hph* (~2900 pb), lo cual disminuye significativamente el tamaño de los sistemas de expresión en los que se emplee. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios para identificar la utilidad de este gen por fuera del plásmido y el uso de este marcador de selección en otras estrategias como la ATMT o CRISPR/Cas9.

El vector pCas mostró ser un sistema de expresión efectivo para la transformación de *P. restrepiensis* por lo cual se planteó usar este plásmido y la metodología diseñada por Ryan et al. (152) en 2016, para la expresión de la proteína Cas9 de *S. pyogenes* y el ARN guía para la edición del genoma en *S. cerevisiae*, usando tecnología CRISPR/Cas9.

## Discusión y conclusiones generales

El hongo *Paracoccidioides* spp. es el agente causal de la Paracoccidioidomicosis una enfermedad endémica en humanos presente en Latino América (64), las dificultades relacionadas al uso de técnicas de edición tradicionales para la manipulación genética de este hongo representan un gran obstáculo en el estudio de los eventos moleculares implicados en su virulencia y patogenicidad. Actualmente la tecnología ARN antisentido ha permitido disminuir la expresión de algunos genes (*knockdown*) siendo así el mayor aliado en el estudio de *Paracoccidioides* spp. (**Tabla 1**). Sin embargo, la ausencia de estrategias alternas que realicen el bloqueo total de la expresión del gen (*knockout*) hace necesario indagar en la aplicación de nuevas tecnologías. El sistema CRISPR/Cas9 actúa como mecanismo de inmunidad bacteriana a la infección por material genético exógeno (9) y su adaptación como herramienta de edición genética de uso universal representa uno de los avances científicos más importantes del siglo (10) (**Figura 2**). En este trabajo se emplearon dos metodologías diferentes para implementar la tecnología CRISPR/Cas9 en *P. restrepiensis*; para la obtención de mutaciones *knockout* en un gen involucrado en la respuesta al estrés oxidativo extracelular, el gen superóxido dismutasa 3 (*SOD3*) (98) y la glicoproteína (*GP43*) (91) el mayor inmuno antígeno de *Paracoccidioides*; ambos genes previamente silenciados empleando la tecnología ARN antisentido.

El uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición genética implica la optimización de las estrategias empleadas para garantizar el ingreso de los componentes del sistema (proteína Cas9 y el ARN guía) al núcleo de la célula. Debido a las características previamente descritas de *Paracoccidioides* spp., la herramienta más utilizada para realizar modificaciones en el genoma ha sido la transformación mediada por *A. tumefaciens* (TMAT) (115). Por lo cual el objetivo en la primera parte de este trabajo fue implementar la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición del gen *SOD3* de *P. restrepiensis* ATCC 60855, usando esta herramienta como mecanismo para la inserción del sistema en el genoma del hongo (**Figura 10**). En el desarrollo de este trabajo, se aplicó la metodología recientemente publicada por Kujoth et al. (56), para obtención de mutaciones *knockout* en *B. dermatitidis* y en hongos dimórficos (57). En nuestros

ensayos se confirmó la inserción del ADN de transferencia con el sistema CRISPR/cas9 en el genoma de *P. restrepiensis* mediante la amplificación por PCR del gen *hph* usando el ADN genómico de los transformantes como plantilla, sin embargo, los resultados no fueron los esperados, puesto que no se observó la expresión del gen *cas9*, lo cual invalida el uso de la secuencia genética presente en el vector binario usado (pPTS608\_Cas9\_hyg) (sección 1.3) y **(Figura 10)**.

Adicionalmente la expresión del gen *hph*, presente en el mismo ADN transferido, nos permite relacionar la ausencia de expresión del gen *cas9* al no reconocimiento de la región promotora empleada (*Ptef1* de *A. nidulans*) (Figura 8). Si bien se han identificado algunas regiones promotoras eficientes en *Paracoccidioides* (125) que podrían optimizar el gen *cas9* usado en esta estrategia, se descartó realizarlo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones. **i)** En la TMAT el ADN-T es integrado aleatoriamente en el genoma del hongo (87,125), lo cual implica la producción de cambios adicionales a aquellos directamente relacionados con la mutación del gen de interés realizada por el sistema CRISPR/Cas9. **ii)** Adicionalmente la expresión constitutiva de la proteína Cas9 puede resultar tóxica en las levaduras (155) y los hongos filamentosos (156) y por último, **iii)** la constante formación del complejo ARN guía/Cas9 ha sido reportado como un importante factor en la producción de cortes por fuera del gen blanco (130).

Con base en los resultados inicialmente obtenidos y el análisis de los eventos previamente descritos se planteó en la segunda parte de este trabajo: utilizar la estrategia libre de moléculas de ADN para realizar la edición completa del gen codificante de la glicoproteína gp43 de *P. restrepiensis*. El uso de complejos de ribonucleoproteínas recombinantes elimina la dependencia de la maquinaria celular para la transcripción y traducción de los elementos del sistema CRISPR/Cas9 (130), garantizando así el ingreso de la proteína Cas9 y ARN guía al núcleo de las células, y en su forma activa realizar el corte del ADN en el sitio blanco (157). Los resultados de los ensayos *in vitro* mostraron la eficiencia y especificidad de los complejos de RNPs diseñados para ejecutar el corte en la doble cadena de ADN de *P. restrepiensis* (Figura 13). Por otro lado, los ensayos realizados en las células nos indican que es necesario ajustar algunos parámetros en el protocolo de transformación usado, de tal forma que sea viable aislar las blastoconidias transformadas en el medio de selección. Teniendo en cuenta que el gen marcador de

selección *hph* ha sido ampliamente utilizado en *Paracoccidioides* spp. para seleccionar células transformadas vía TMAT (108), los resultados obtenidos de este trabajo pueden estar relacionados con la ineficiencia para la integración del fragmento de reparación por micro homología, el cual posee una diferencia significativa entre la longitud del fragmento retirado del gen *GP43* (~1200 pb) (91) y el fragmento de reparación con el casete de resistencia al antibiótico Higromicina B (~2900pb) (108), lo cual pudo impedir el reconocimiento de las regiones cortas homologas para su inserción en el genoma del hongo (143); adicionalmente se debe considerar la probabilidad de que todos los elementos del sistema CRISPR/Cas9 usados en esta estrategia pueden no ingresar de manera sincrónica a la célula como es lo esperado, esto debido a la naturaleza multigemante y multinucleada de las blastoconidias de *Paracoccidioides* spp. (84).

La edición realizada empleando la tecnología CRISPR/Cas9 mediante complejos de RNPs ha mostrado mayor eficiencia cuando se ejecuta en conjunto con la inserción de un fragmento de reparación en el sitio específico del corte (135); metodología en la cual resulta de gran utilidad la integración de casetes de resistencia a antibióticos, que permitan seleccionar las células transformadas como se realizó en *A. fumigatus* (53) y *Cryptococcus* spp. (54). En la segunda parte de este trabajo no fue útil el uso del casete *hph* para el aislamiento de las blastoconidias con la mutación esperada y debido a la limitada disponibilidad de marcadores de selección para uso en las herramientas de edición genética de *Paracoccidioides* spp., dimos continuidad a nuestro trabajo evaluando el casete KanMX insertado en el vector pCas (**Figura 15**) como nuevo marcador de selección dominante para su uso en los ensayos moleculares en *P. restrepiensis*. Se determino que en la cepa ATCC 60855 la concentración mínima inhibitoria de Geneticina es 30µg/ml (**Figura 17**), la cual es significativamente menor a la usada en otros hongos dimórficos como *H. capsulatum* [100µg/ml] (151) e incluso menor a la concentración de Higromicina B empleada en *Paracoccidioides* spp. [50-200µg/ml] (89,99,103). La confirmación molecular de la presencia del plásmido pCas en los aislamientos transformados y la estabilidad mitótica de estos en cultivo con el antibiótico G418 nos indica la capacidad del hongo para reconocer la secuencia heteróloga de este casete (118) y por tanto su utilidad en la selección de modificaciones genéticas realizadas en este microorganismo.

Los procesos desarrollados en el estudio de cada organismo requieren la adaptación de los procedimientos, a las características biológicas específicas de cada modelo. La forma saprofítica del hongo *Paracoccidioides* spp. produce un reducido número de conidias y representa un alto riesgo de infección para el investigador (64,83), por lo cual los estudios se han realizado principalmente en células en fase de levadura. No obstante, en el cultivo de las blastoconidias puede observarse la presencia de diferentes subpoblaciones de células, de acuerdo al tamaño, complejidad y contenido de ADN (84). En el desarrollo del tercer objetivo de este trabajo, se evaluó el uso del casete de resistencia KanMX del plásmido pCas en *P. restrepiensis*, para lo cual se estandarizó un nuevo protocolo para basados en el tamaño de las células, obtener la subpoblación de gemas pequeñas con uno o dos núcleos correspondientes a las células R1 y R2, según la clasificación de Almeida et al. (84) (sección 3.2.4), permitiendo así mejorar la eficiencia de la transformación por electroporación de *P. restrepiensis* respecto a la obtenida sin realizar dicha separación de células (datos no mostrados).

El conocimiento sobre el ciclo celular de *Paracoccidioides* spp. es limitado, sin embargo sabemos que las múltiples gemas en las blastoconidias se producen de manera asincrónica y que debido a la acumulación de varios núcleos en ellas, pueden encontrarse en diferentes fases del ciclo celular en los periodos de crecimiento (84) y por tanto responder de manera impredecible a cualquier tipo de manipulación genética que se realice. Basados en las consideraciones anteriores y en los resultados obtenidos en la electroporación del plásmido pCas, sugerimos que esta subpoblación de células es la indicada para la realización de los ensayos genéticos y moleculares en esta especie.

En general este trabajo de investigación contribuye al desarrollo de herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp. implementando la tecnología CRISPR/Cas9 para la obtención de mutaciones *knockout*. Las estrategias evaluadas en este estudio no mostraron los resultados esperados; sin embargo, labraron el camino para continuar en la búsqueda de estrategias efectivas para la obtención de aislamientos mutantes en este modelo. Dadas las ventajas del uso de los complejos de ribonucleoproteínas, el trabajo en curso estará dirigido a la estandarización de esta metodología para introducir los componentes del sistema CRISPR/Cas9, en las

blastoconidias de las subpoblaciones presentadas como R1 y R2 *Paracoccidioides* spp. (**Figura 16**).

Teniendo en cuenta las dificultades presentadas para la selección de las UFC de *P. restrepiensis* transformadas, los ensayos estarán dirigidos a la mutación de genes, cuya alteración genere cambios en el fenotipo del hongo, los cuales sean posibles de detectar a nivel macroscópico o microscópico. Así como al uso del casete KanMX presentado en el **Capítulo 3 (Figura 18)**, para realizar la reparación del corte en la doble cadena de ADN, mediado la inserción de un fragmento que contiene la secuencia de dicho marcador de selección como se mostró en el **Capítulo 2** (sección 2.2.3) y (**Figura 14 y Figura 18**) empleando el gen *hph*.

En virtud de los resultados obtenidos en la transformación de *P. restrepiensis* con el vector pCas (**Figura 15 y Figura 18**), se planteó utilizar la metodología presentada en el **Capítulo 3** (sección 3.2.4) para evaluar la utilidad del sistema de expresión para el sistema CRISPR/Cas9 en este vector (153), como estrategia adicional para la generación de mutaciones *knockout* en *Paracoccidioides* spp.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el congreso *International Meeting on Endemic Mycoses of the Americas* (IMEMA). Realizado en Santiago del Estero, Argentina en mayo del 2020. Presentación virtual titulada "CRISPR/Cas9 in *Paracoccidioides* spp." y los resultados del **Capítulo 3**, fueron presentados el IV Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2) en el marco del 34° Congreso latinoamericano de química CLAQ 2020, realizado en Cartagena, Bolívar, Colombia en octubre del 2021. Trabajo titulado: "*Geneticin resistance acquired in the human pathogen Paracoccidioides spp. by means plasmid pCas*", Modalidad poster.



## Referencias Bibliográficas

1. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature* [Internet]. 1953 Apr;171(4356). Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109703008003>
2. Crick FH. Central Dogma of Molecular Biology. *Nat Publ Gr* [Internet]. 1970;227(8):561–3. Available from: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
3. Gaj T, Sirk SJ, Shui S, Liu J. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 Dec;8(12):a023754. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a023754>
4. Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat J-C, Chames P, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006 Dec;34(22):e149–e149. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl720>
5. Carroll D. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics* [Internet]. 2011 Aug 1;188(4):773–82. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/188/4/773/6063261>
6. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):756–61.
7. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Jun 9;9(6):467–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
8. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* [Internet]. 2013 Jan 29;2(2):1–9. Available from: <https://elifesciences.org/articles/00471>
9. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A

- Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80- ) [Internet]. 2012 Aug 17;337(6096):816–21. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1138140>
10. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ) [Internet]. 2014 Nov 28;346(6213). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096>
  11. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* [Internet]. 1987 Dec;169(12):5429–33. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
  12. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* [Internet]. 2000 Apr;36(1):244–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
  13. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 Mar;43(6):1565–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
  14. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. Eisen JA, editor. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2005 Nov 11;1(6):e60. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
  15. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* [Internet]. 2005 Aug 1;151(8):2551–61. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28048-0>
  16. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* [Internet]. 2010 Nov 4;468(7320):67–71. Available from:

- <http://www.nature.com/articles/nature09523>
17. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* [Internet]. 2005 Feb;60(2):174–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-004-0046-3>
  18. Lillestøl R, Redder P, Garrett RA, Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* [Internet]. 2006;2(1):59–72. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/archaea/2006/542818/>
  19. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015 Nov 28;13(11):722–36. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro3569>
  20. Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, Datsenko KA, Djordjevic M, Wanner BL, et al. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2010;77(6):1367–79.
  21. Godde JS, Bickerton A. The Repetitive DNA Elements Called CRISPRs and Their Associated Genes: Evidence of Horizontal Transfer Among Prokaryotes. *J Mol Evol* [Internet]. 2006 Jun 11 [cited 2021 Aug 15];62(6):718–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-005-0223-z>
  22. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin E V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jun 2;42(10):6091–105. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/42/10/6091/2434503/Classification-and-evolution-of-type-II-CRISPRCas>
  23. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Mol Cell* [Internet]. 2014 Apr [cited 2021 Aug 14];54(2):234–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
  24. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* [Internet]. 2012 Feb 15;482(7385):331–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10886>
  25. Hooton SPT, Connerton IF. *Campylobacter jejuni* acquire new host-derived

- CRISPR spacers when in association with bacteriophages harboring a CRISPR-like Cas4 protein. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Jan 5;5. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
26. Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright A V, Davies CW, Doudna JA. Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2021 Oct 1];21(6):528–34. Available from: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)
  27. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733–40.
  28. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*. 2009;139(5):945–56.
  29. Tang Y, Fu Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell Biosci* [Internet]. 2018 Dec 12;8(1):59. Available from: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-018-0255-x>
  30. Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. *Nature* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2021 Oct 1];519(7542):199–202. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.257550.114>.
  31. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* [Internet]. 2011 Mar 30;471(7340):602–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature09886>
  32. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science* (80- ) [Internet]. 2014 Mar 14;343(6176):1247997–1247997. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1247997>
  33. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* [Internet]. 2014 Sep 27;513(7519):569–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13579>

34. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80- ) [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2021 Oct 2];339(6121):819–23. Available from: [www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1231143/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1231143/DC1)
35. Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* [Internet]. 2014 Dec;281(23):5186–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13110>
36. Jiang F, Doudna JA. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505–29.
37. Li Q, Chen J, Minton NP, Zhang Y, Wen Z, Liu J, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol J* [Internet]. 2016 Jul;11(7):961–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201600053>
38. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Aug 18;112(33):10437–42. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1512503112>
39. Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, et al. Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis. *Cell* [Internet]. 2015 Mar;160(6):1246–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415002044>
40. Zhang Z, Hua L, Gupta A, Tricoli D, Edwards KJ, Yang B, et al. Development of an *Agrobacterium* -delivered CRISPR /Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol J* [Internet]. 2019 Aug 12;17(8):1623–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.13088>
41. Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, Mortensen UH. A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. Yu J-H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 15;10(7):e0133085. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133085>
42. Verwaal R, Buiting-wiessenhaan N, Dalhuijsen S, Roubos JA. CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*.

- 2018;35:200–11.
43. Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Antifungal immunity in selected fungal infections. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* [Internet]. 2015 Apr 9;69:469–74. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=25897108&lang=es&site=ehost-live>
  44. Perez-Nadales E, Almeida Nogueira MF, Baldin C, Castanheira S, El Ghalid M, Grund E, et al. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2014 Sep;70:42–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>
  45. Li L, Kaplan J. The Yeast Gene MSC2, a Member of the Cation Diffusion Facilitator Family, Affects the Cellular Distribution of Zinc. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Feb;276(7):5036–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818463090>
  46. Mizutani O, Arazoe T, Toshida K, Hayashi R, Ohsato S, Sakuma T, et al. Detailed analysis of targeted gene mutations caused by the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae* RIB40 strain and a ligD disruptant. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2017 Mar;123(3):287–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.014>
  47. Wang S, Chen H, Tang X, Zhang H, Chen W, Chen YQ. Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Nov 30 [cited 2021 Aug 22];101(22):8063–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
  48. Woods JP, Retallack DM, Heinecke EL, Goldman WE. Rare Homologous Gene Targeting in *Histoplasma capsulatum*: Disruption of the URA5 Hc Gene by Allelic Replacement. *J Bacteriol* [Internet]. 1998 Oct;180(19):5135–43. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.180.19.5135-5143.1998>
  49. Piers KL, Heath JD, Liang X, Stephens KM, Nester EW. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1996 Feb 20;93(4):1613–8. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.93.4.1613>

50. Liu Z, Liang Y, Ang EL, Zhao H. A New Era of Genome Integration—Simply Cut and Paste! *ACS Synth Biol* [Internet]. 2017 Apr 21;6(4):601–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.6b00331>
51. Román E, Coman I, Prieto D, Alonso-Monge R, Pla J. Implementation of a CRISPR-Based System for Gene Regulation in *Candida albicans*. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2019 Feb 27;4(1):1–13. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00001-19>
52. Shapiro RS, Chavez A, Porter CBM, Hamblin M, Kaas CS, DiCarlo JE, et al. A CRISPR–Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nat Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 23;3(1):73–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-017-0043-0>
53. Al Abdallah Q, Ge W, Fortwendel JR. A Simple and Universal System for Gene Manipulation in *Aspergillus fumigatus*: In Vitro -Assembled Cas9-Guide RNA Ribonucleoproteins Coupled with Microhomology Repair Templates. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2017 Dec 27;2(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00446-17>
54. Wang P. Two Distinct Approaches for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in *Cryptococcus neoformans* and Related Species. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2018 Jun 27;3(3):1–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphereDirect.00208-18>
55. Rodriguez L, Voorhies M, Gilmore S, Beyhan S, Myint A, Sil A. Opposing signaling pathways regulate morphology in response to temperature in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mitchell AP, editor. *PLOS Biol* [Internet]. 2019 Sep 30;17(9):e3000168. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3000168>
56. Gregory C. Kujoth. CRISPR/Cas9-Mediated Gene Disruption Reveals the Importance of Zinc Metabolism for Fitness of the Dimorphic Fungal Pathogen *Blastomyces dermatitidis*. *MBio*. 2018;9(2):1–17.
57. Kujoth GC, Sullivan TD, Klein BS. Gene Editing in Dimorphic Fungi Using CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Microbiol* [Internet]. 2020 Dec 14;59(1):1–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpmc.132>
58. Ianiri G, Dagotto G, Sun S, Heitman J. Advancing functional genetics through

- Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis and CRISPR/Cas9 in the commensal and pathogenic yeast *Malassezia*. *Genetics*. 2019;212(4):1163–79.
59. Poyntner C, Mirastschijski U, Sterflinger K, Tafer H. Transcriptome Study of an *Exophiala dermatitidis* PKS1 Mutant on an ex Vivo Skin Model: Is Melanin Important for Infection? *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jul 3;9(JUL):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01457/full>
  60. Pathan EK, Ghormade V, Panmei R, Deshpande M V. Biochemical and Molecular Aspects of Dimorphism in Fungi. In: *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 69–94. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9349-5\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9349-5_3)
  61. Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. *Science* (80- ) [Internet]. 2006 Apr 28;312(5773):583–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1124105>
  62. Rappleye CA, Goldman WE. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2006 Oct 1;60(1):281–303. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.59.030804.121055>
  63. Gauthier GM. Fungal Dimorphism and Virulence: Molecular Mechanisms for Temperature Adaptation, Immune Evasion, and In Vivo Survival. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017;2017:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/8491383>
  64. Restrepo A, Tobón AM, Gonzalez A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Ninth. Philadelphia: Elsevier; 2020. p. 321.
  65. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1993 Apr;6(2):89–117. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.6.2.89>
  66. Nakamura R, Valgas N, Bichara RM, Brazuna D, Leverone A. Paracoccidioidomycosis: chronic adult unifocal form. *Int J Dermatol* [Internet]. 2012 Feb;51(2):195–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2011.05127.x>
  67. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of



- endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* [Internet]. 2011 May 4;49(8):1–14. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693786.2011.577821>
68. Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2012 Dec 13;6(4):303–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12281-012-0114-x>
  69. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi* [Internet]. 2017 Jan 3;3(1):1. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/1/1>
  70. Chaves AFA, Navarro MV, de Barros YN, Silva RS, Xander P, Batista WL. Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. *J Fungi* [Internet]. 2021 Feb 4;7(2):116. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/2/116>
  71. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira MDM, Bosco S de MG, Bagagli E. Environmental Mapping of Paracoccidioides spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. Reynolds T, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Apr 5;10(4):e0004606. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004606>
  72. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CDS. A critical analysis of isolation of Paracoccidioides brasiliensis from soil. *Med Mycol* [Internet]. 2000 Jan;38(3):185–91. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.38.3.185.191>
  73. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001 Jun 1;39(3):233–41.
  74. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JP, Bosco SDMG, Macoris SADG, Junior LOP, et al. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in soil. *Med Mycol* [Internet]. 2005 Jan;43(8):725–9. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780500129418>
  75. Restrepo M A. The ecology of paracoccidioides brasiliensis: A puzzle still unsolved. Vol. 23, *Medical Mycology*. 1985. p. 323–34.
  76. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. *Paediatr Respir Rev* [Internet]. 2009 Dec;10(4):161–5. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054209000670>

77. Untereiner W a, Scott J a, Naveau F a, Sigler L, Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a New Family of Vertebrate-Associated Onygenales. *Mycologia* [Internet]. 2004 Jul;96(4):812. Available from: <https://www.jstor.org/stable/3762114?origin=crossref>
78. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(1):65–73.
79. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2017 Sep;106(May):9–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184517300932>
80. Puccia R, Vallejo MC, Matsuo AL, Longo LVG. The *Paracoccidioides* Cell Wall: Past and Present Layers Toward Understanding Interaction with the Host. *Front Microbiol* [Internet]. 2011;2(DEC):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00257/abstract>
81. Sturme MHJ, Puccia R, Goldman GH, Rodrigues F. Molecular biology of the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. *Fungal Biol Rev* [Internet]. 2011 Jul;25(2):89–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2011.04.002>
82. Restrepo A, Jiménez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1980 Aug;12(2):279–81. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.12.2.279-281.1980>
83. Greer DL RA. La epidemiologia de la paracoccidioidomicosis. *Boletín la Of Sanit Panam*. 1977;82:428–45.
84. Almeida AJ, Martins M, Carmona JA, Cano LE, Restrepo A, Leão C, et al. New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2006;43(6):401–9.
85. Reis VCB, Torres FAG, Poças-Fonseca MJ, De-Souza MT, Souza DP de, Almeida JRM, et al. Cell cycle, DNA replication, repair, and recombination in the dimorphic human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res*. 2005;4(2):232–50.

86. De B.A. Soares R, Velho TAF, De Moraes LMP, Azevedo MO, Célia CM, Felipe MSS. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Med Mycol.* 2005;43(8):719–23.
87. Leal C V., Montes BA, Mesa AC, Rua AL, Corredor M, Restrepo A, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2004;42(4):391–5.
88. Almeida AJ, Cunha C, Carmona JA, Sampaio-Marques B, Carvalho A, Malavazi I, et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 May 2];46(12):919–26. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184509001480>
89. Hernández O, Almeida AJ, Gonzalez A, Garcia AM, Tamayo D, Cano LE, et al. A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in *Paracoccidioides brasiliensis* Adherence to Host Cells and Influences Pathogenicity. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Dec;78(12):5280–6. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00692-10>
90. Hernández Ruiz O, Gonzalez A, Almeida AJ, Tamayo D, Garcia AM, Restrepo A, et al. Alternative Oxidase Mediates Pathogen Resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Small PLC*, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011 Oct 25;5(10):e1353. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001353>
91. Torres I, Hernandez O, Tamayo D, Muñoz JF, Leitão NP, García AM, et al. Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sturtevant J*, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 11;8(7):e68434. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068434>
92. Goes T, Bailão EFLC, Correa CR, Bozzi A, Santos LI, Gomes DA, et al. New Developments of RNAi in *Paracoccidioides brasiliensis*: Prospects for High-Throughput, Genome-Wide, Functional Genomics. *Vinetz JM*, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Oct 2;8(10):e3173. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003173>
93. Tamayo D, Muñoz JF, Torres I, Almeida AJ, Restrepo A, McEwen JG, et al. Involvement of the 90kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides*

- brasiliensis to different environmental conditions. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2013 Feb;51(1):34–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.005>
94. Torres I, Hernandez O, Tamayo D, Muñoz JF, García AM, Gómez BL, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2014 Mar;14(2):270–80. Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12099>
  95. Bailão Cardoso EFL, Parente Alves J, Pigosso Lacerda L, Pacheco de Castro K, FonsecaLopes F, Silva-Bailão Garcia M, et al. Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. Vinetz JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 May 15;8(5):e2856. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002856>
  96. Parente-Rocha Alves J, Parente Alves AF, Baeza LC, Rondon Caixeta Bonfim SM, Hernandez O, McEwen JG, et al. Macrophage interaction with *paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. *PLoS One*. 2015;10(9):1–18.
  97. Marcos CM, da Silva J de F, de Oliveira HC, Assato PA, Singulani J de L, Lopez AM, et al. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. *Virulence* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 7];7(2):72–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1122166>
  98. Tamayo D, Muñoz JF, Lopez Á, Urán M, Herrera J, Borges CL, et al. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. Reynolds T, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Mar 10;10(3):e0004481. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004481>
  99. Tamayo D, Muñoz JF, Almeida AJ, Puerta JD, Restrepo Á, Cuomo CA, et al. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2017 Mar;100:22–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184517300117>
  100. Fernandes FF, Oliveira AF, Landgraf TN, Cunha C, Carvalho A, Vendruscolo PE, et al. Impact of Paracoccin Gene Silencing on *Paracoccidioides brasiliensis*

- Virulence. Cuomo CA, Cassone A, editors. MBio [Internet]. 2017 Sep 6;8(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00537-17>
101. Marcos CM, Tamer G, de Oliveira HC, Assato PA, Scorzoni L, Santos CT, et al. Down-regulation of TUFM impairs host cell interaction and virulence by *Paracoccidioides brasiliensis*. Sci Rep [Internet]. 2019 Dec 20;9(1):17206. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51540-y>
  102. Nojosa Oliveira L, Aguiar Gonçalves R, Garcia Silva M, Melo Lima R, Vieira Tomazett M, Santana de Curcio J, et al. Characterization of a heme-protein responsive to hypoxia in *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet Biol [Internet]. 2020 Nov;144(August):103446. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103446>
  103. Silva MG, de Curcio JS, Silva-Bailão MG, Lima RM, Tomazett MV, de Souza AF, et al. Molecular characterization of siderophore biosynthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. IMA Fungus [Internet]. 2020 Dec 29 [cited 2021 Aug 24];11(1):11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00035-x>
  104. Gelvin SB. Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2003 Mar [cited 2021 Aug 7];67(1):16–37. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
  105. Lee L-Y, Gelvin SB. T-DNA Binary Vectors and Systems. Plant Physiol [Internet]. 2008 Feb 4;146(2):325–32. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/146/2/325/6107068>
  106. Beijersbergen A, Dulk-ras A Den, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. Science (80- ). 1992;256(May):1324–7.
  107. Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. Plant Cell Rep [Internet]. 2003 Mar 16;21(7):659–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-002-0564-7>
  108. de Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJ., Beijersbergen AGM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat Biotechnol

- [Internet]. 1998 Sep 1;16(9):839–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt0998-839>
109. Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* [Internet]. 2005 Jul 12;48(1):1–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-005-0578-0>
  110. Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98:1871–6. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.041327598](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.041327598)
  111. Smith J, Gauthier G. New Developments in Blastomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2015 Sep 23;36(05):715–28. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1562898>
  112. Concordet J-P, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jul 2;46(W1):W242–5. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W242/4995687>
  113. Sambrook J, Russell D, EF F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook J, Russell DW, editors. Vol. 1, *Methods in enzymology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 85–98 p.
  114. Dulk-Ras A den, Hooykaas PJJ. Electroporation of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Plant Cell Electroporation And Electrofusion Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2003. p. 63–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-328-7:63>
  115. Menino J, Almeida A, Rodrigues Fernando. Gene Knockdown in *Paracoccidioides brasiliensis* Using Antisense RNA. In: Brand AC, MacCallum DM, editors. *Host-Fungus Interactions: : Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 187–92. (*Methods in Molecular Biology*; vol. 845). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-539-8>
  116. Sullivan TD, Rooney PJ, Klein BS. *Agrobacterium tumefaciens* Integrates Transfer DNA into Single Chromosomal Sites of Dimorphic Fungi and Yields Homokaryotic

- Progeny from Multinucleate Yeast. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2002 Dec;1(6):895–905. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.1.6.895-905.2002>
117. Dukik K, Muñoz JF, Jiang Y, Feng P, Sigler L, Stielow JB, et al. Novel taxa of thermally dimorphic systemic pathogens in the Ajellomycetaceae ( Onygenales ). *Mycoses* [Internet]. 2017 May 20;60(5):296–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792328>
  118. Yang S, Liu Q, Zhang Y, Du G, Chen J, Kang Z. Construction and Characterization of Broad-Spectrum Promoters for Synthetic Biology. *ACS Synth Biol* [Internet]. 2018 Jan 19;7(1):287–91. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.7b00258>
  119. Kitamoto N, Matsui J, Kawai Y, Kato A, Yoshino S, Ohmiya K, et al. Utilization of the TEF1-a gene ( TEF1 ) promoter for expression of polygalacturonase genes, pgaA and pgaB , in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1998 Jul 28 [cited 2021 Aug 11];50(1):85–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051260>
  120. Tamano K, Bruno KS, Karagiosis SA, Culley DE, Deng S, Collett JR, et al. Increased production of fatty acids and triglycerides in *Aspergillus oryzae* by enhancing expressions of fatty acid synthesis-related genes. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2013 Jan 26 [cited 2021 Aug 11];97(1):269–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4193-y>
  121. Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, Alper H, Stahl U, Stephanopoulos G. Engineering of Promoter Replacement Cassettes for Fine-Tuning of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Aug;72(8):5266–73. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00530-06>
  122. Blazeck J, Garg R, Reed B, Alper HS. Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2012 Nov;109(11):2884–95. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.24552>
  123. Kemski MM, Stevens B, Rappleye CA. Spectrum of T-DNA integrations for insertional mutagenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Biol* [Internet]. 2013

- Jan;117(1):41–51. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614612001948>
124. Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T, et al. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2015 Dec;112(12):2543–9. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25662>
  125. Almeida AJ, Carmona JA, Cunha C, Carvalho A, Rappleye CA, Goldman WE, et al. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2016 Apr 20];44(12):1387–98. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184507000722>
  126. Globyte V, Lee SH, Bae T, Kim J, Joo C. <sc>CRISPR</sc> /Cas9 searches for a protospacer adjacent motif by lateral diffusion. *EMBO J* [Internet]. 2019 Feb 15;38(4):1–12. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.201899466>
  127. Rantasalo A, Landowski CP, Kuivanen J, Korppoo A, Reuter L, Koivistoinen O, et al. A universal gene expression system for fungi. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Oct 12;46(18):e111–e111. Available from:  
<https://academic.oup.com/nar/article/46/18/e111/5040049>
  128. Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P. Engineering nucleases for gene targeting: Safety and regulatory considerations [Internet]. Vol. 31, *New Biotechnology*. 2014 [cited 2021 Aug 27]. p. 18–27. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2013.07.001>
  129. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J* [Internet]. 2016 Apr;283(7):1218–31. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13586>
  130. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* [Internet]. 2014 Jun;24(6):1012–9. Available from:  
<http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.171322.113>
  131. Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9



- ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 12];11(2):614–48. Available from: <http://www.thno.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
132. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Sep 15;23(1):R40–6. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddu125>
  133. Yao X, Wang X, Hu X, Liu Z, Liu J, Zhou H, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res* [Internet]. 2017 Jun 19;27(6):801–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/cr201776>
  134. Liang X, Potter J, Kumar S, Ravinder N, Chesnut JD. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol* [Internet]. 2017 Jan;241:136–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.011>
  135. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2016 Mar 20;34(3):339–44. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.3481>
  136. Seki A, Rutz S. Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *J Exp Med* [Internet]. 2018 Mar 5;215(3):985–97. Available from: <https://rupress.org/jem/article/215/3/985/42565/Optimized-RNP-transfection-for-highly-efficient>
  137. Woo JW, Kim J, Kwon S II, Corvalán C, Cho SW, Kim H, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2021 Aug 22];33(11):1162–4. Available from: <http://www.nature.com/>
  138. Wang Q, Cobine PA, Coleman JJ. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2018 Aug;117(1):21–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184518300811>
  139. Vyas VK, Bushkin GG, Bernstein DA, Getz MA, Sewastianik M, Barrasa MI, et al.

- New CRISPR Mutagenesis Strategies Reveal Variation in Repair Mechanisms among Fungi. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2018 Apr 25;3(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00154-18>
140. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MIN, da Silveira JF, Travassos LR. Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Feb [cited 2021 Aug 16];271(8):4553–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817365377>
  141. Wensing L, Sharma J, Uthayakumar D, Proteau Y, Chavez A, Shapiro RS. A CRISPR Interference Platform for Efficient Genetic Repression in *Candida albicans*. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2019 Feb 27;4(1):1–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00002-19>
  142. Auer TO, Duroure K, De Cian A, Concordet J-P, Del Bene F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res* [Internet]. 2014 Jan;24(1):142–53. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.161638.113>
  143. Seol J-H, Shim EY, Lee SE. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2018 May;809(12):81–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510717300416>
  144. Primrosa. Principles of Gene Manipulation [Internet]. Vol. 19, *Journal of Medical Genetics*. 1982. 397–398 p. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.19.5.397-a>
  145. Siewers V. An Overview on Selection Marker Genes for Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2014. p. 3–15. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0563-8\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0563-8_1)
  146. Hernández O, Araque P, Tamayo D, Restrepo A, Herrera S, McEwen JG, et al. Alternative oxidase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* cellular homeostasis and morphological transition. *Med Mycol*. 2015;53(3):205–14.
  147. Grahl N, Demers EG, Crocker AW, Hogan DA. Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non- *albicans* *Candida* Species. Mitchell AP, editor. *mSphere* [Internet]. 2017 Jun 28;2(3):1–9. Available from:

- <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00218-17>
148. Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge J-P. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2010 Feb;75(4):910–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x>
  149. Hua J, Meyer JD, Lodge JK. Development of Positive Selectable Markers for the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagnostic Lab Immunol* [Internet]. 2000 Jan;7(1):125–8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CDLI.7.1.125-128.2000>
  150. Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [Internet]. 1994 Dec;10(13):1793–808. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.320101310>
  151. Holbrook ED, Smolnycki KA, Youseff BH, Rappleye CA. Redundant Catalases Detoxify Phagocyte Reactive Oxygen and Facilitate *Histoplasma capsulatum* Pathogenesis. Deede GS, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2013 Jul;81(7):2334–46. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00173-13>
  152. Ryan OW, Skerker JM, Maurer MJ, Li X, Tsai JC, Poddar S, et al. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *Elife* [Internet]. 2014 Aug 19;3(August2014):1–15. Available from: <https://elifesciences.org/articles/03703>
  153. Ryan OW, Poddar S, Cate JHD. CRISPR–Cas9 Genome Engineering in *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2016 Jun 1;2016(6):pdb.prot086827. Available from: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot086827>
  154. Gómez IT, Ruiz OH, Muñoz JF, Garcia AM, Restrepo A, McEwen JG. RNAi technology targeting PbGP43 and PbP27 in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Open J Genet* [Internet]. 2013;03(02):1–8. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojgen.2013.32A2001>
  155. Ryan OW, Cate JHD. Multiplex Engineering of Industrial Yeast Genomes Using CRISPRm. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. p.

- 473–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00023-4>
156. Foster AJ, Martin-Urdiroz M, Yan X, Wright HS, Soanes DM, Talbot NJ. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 25;8(1):14355. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-32702-w>
157. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* [Internet]. 2015 Aug;208:44–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>

# Estrategias para el desarrollo de nuevas herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp.: Un acercamiento a la tecnología CRISPR/Cas9

## Suplemento 1. Identificación de la secuencia Pb60855\_SOD3 y elección de la secuencia Protoespaciador

Secuencia del gen superóxido dismutasa 3 (SOD3) en *P. restrepiensis* ATCC 60855

>SOD3\_Pb60855

```
TTACCATATCATCGCAGCGACACCGGCCAGCATCACACCAAGACAGAAGGCACCAA
CACGGTTTGCAGGGCCTTGGGAGGGCCGTTGCGATGCAGTTGGTGTGGGGGTAG
CAGAACCATTTATGCTGACTAGCGTGAAGTTGCCGCAGTTGATACGGGTCGTATTCT
TGAAATGGACGACGATAGATCGATTGCCGACATATGAACCAAGGCCGTCTTTGACG
GAGGTGAAATTATCCATAAAAGTCACTTCATAGACGCTTCCGTTGGACGCGTTCCTAA
TATCGCCGTACTIONGCCACTCAGATCGCCCTCCTGGCACATCTGGGGCGTGCTCGCG
TTGCAGGGTGGCATCTCGCCACGCATCATTAGATCGAGATGGGCAAGGGTGGAGTT
GCAGTTACCGAGGAATTGACAGGTTCAACATGGACGTGCCACGCTAATCTCCGGT
TAGAATATTGTAGACAAAGAAATGATATTTGAGGGAATGGGATTGTGCTCACGGAA
GGTTCCTCCAACCTTCTGTCTCGTTTGGGAAACCCCAAACTTGGCATGGTACATCAC
TCCAACACCGCCTGGGCCACCAGTAACATTGACAACCTCCGCGAACAGTGGTATCAT
TTCTGTCCATCAGACGCATGGTGTACGTATCATTCCGGTGTGCGGTAGTTAAGGCGA
CTTCCGGAAATTGCGCAGTCGCACGGAGGGCAAAGCCCAGCGAACATGCGAGGAC
AGAAAATATAGGCTTCAT
```

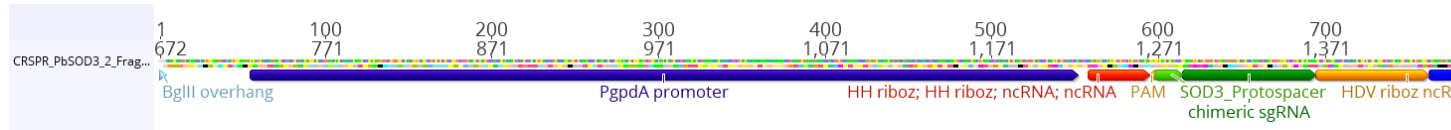
**PAM: AGG**

Secuencia *Protospacer* based on

<http://crispor.tefor.net/crispor.py?batchId=1AzEVEAwasQ3XilGtfPi>

Secuencia del ARN guía con base al diseño de Kujoth G. et al (57), para su inserción en el vector binario pPTS608-Cas9-hyg<sup>1,2</sup>. Gene Art Gene basado con la secuencia

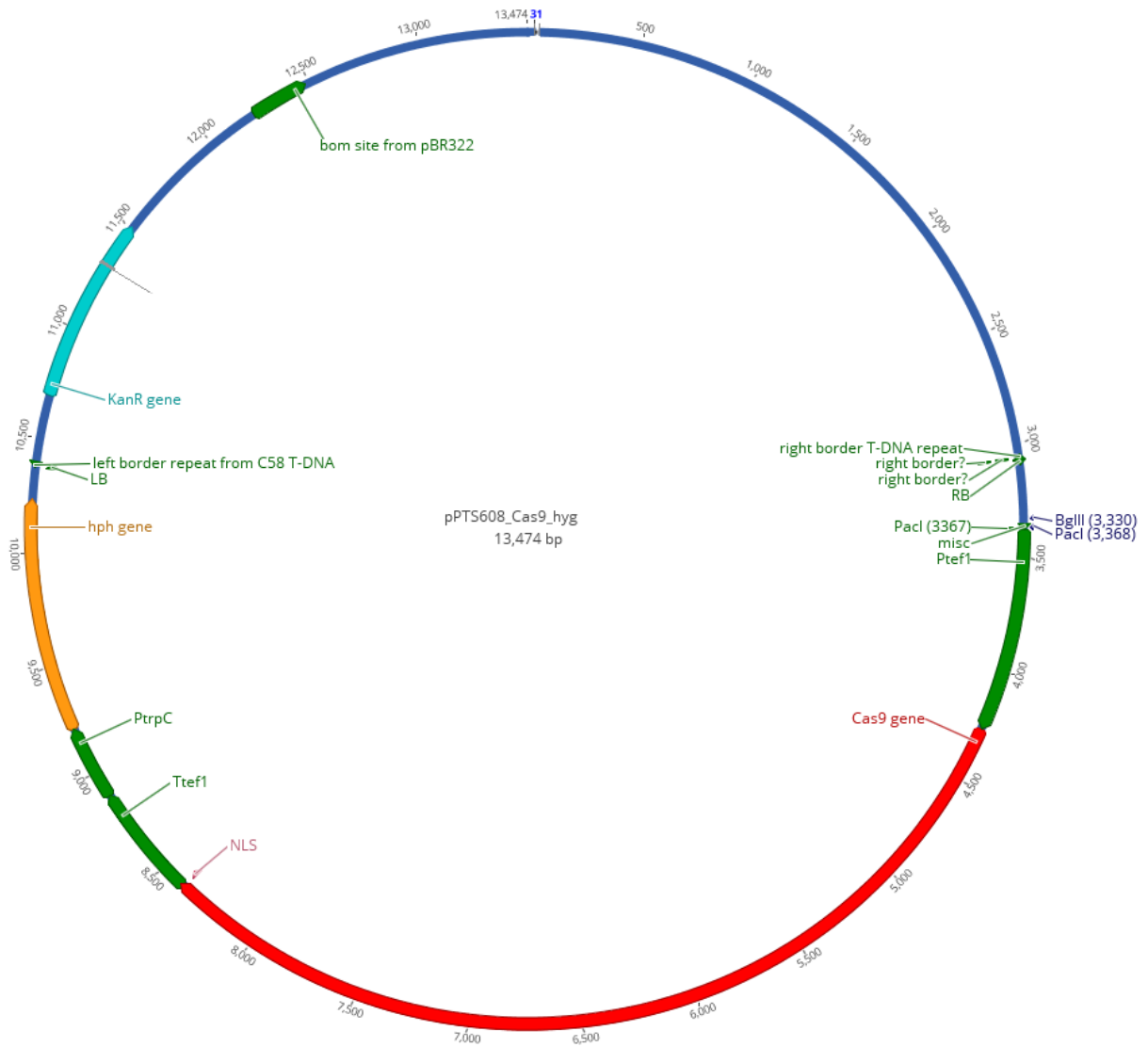
Protoespaciador (20 nucleótidos) de Pb60855\_SOD3, incluye cambio de la secuencia IR (*inverted repeat-forming region*) por una específica de homología a nuestra secuencia.



La secuencia fue adquirida sintetizada en un vector genérico.

# Estrategias para el desarrollo de nuevas herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp.: Un acercamiento a la tecnología CRISPR/Cas9

## Suplemento 2. Vector pPST608 vacío, con sistema de expresión para genes Cas9 y hph



Diseño de Kujoth G. et al (57)

**Estrategias para el desarrollo de nuevas herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp.: Un acercamiento a la tecnología CRISPR/Cas9**

**Suplemento 3. Identificación de la secuencia Pb60855\_ GP43 y elección de la secuencia Protoespaciador**

Secuencia codificante para la proteína de 43 KD en *P. restrepiensis*  
ATCC60855

CAGCA...1700pb...CTAGCAAGTTTGCCCAGAATTCCCAGTTGAAAAATGCGCATG  
CCCCACTCAATAAGGGCCTGGTGTGATTCTCATGTTACAGCAAGCCCTGGCATCTG  
CTGTTGATCTTTTCCTTATTTTGTGGATTTTGGCCTTTTCAAGGTTGCTTTTACTG  
AGAGCTATCACCTGTGGACTCATCTTAAAGCTCACTTGGACCATTCCATGTTTCATT  
GTTGCAGATTTATCAACAATTATGCACCTGCACAGAGGGATTATGGTGTATAAATAT  
CTGCTGTCTCCTCCCTATTTCCCTCCTCCTTCTTTTTACAGATCTTCAAGGTTTTGGT  
GGTCATAGGCATCAT**GAATTTAGTTCTCTTAACCTGG**CTCTTGCCAGCTGTGTTC  
TCGCATGGGTATGCCTGGCATCCGCATCATCTCACGTGCATCTCACATTGTACC  
TCGTCAAGCAGGATCAGCAATATATGGTGTGAATATCGGCGGGTGGCTATTGCTG  
GAGCCATGGATCTCGCCCTCCGTCTTCGAAGCAGGCGGGAGCAGCTCCGTCGAT  
GAATACACCCTGAGCAAGAATCTCGGCAGAGATGCTAAAAGGCACCTTTCGAAA  
CATTGGGACACCTTTATCACTGAAGATGATTTCAAGAACATTGCTGCGGCGGGGT  
TAAACCATGTCAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGTAAATCCTATAGAGGGAG  
AGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCTTGTCTGGGCCAA  
AAACTCAAATCTGAGGGTCGTCATCGATCTCCATGGTGgtaagttacatagtcacctgtaaagtg  
agcatatactatcgaccctcatccattattaactagaatatctcactcccag**TCCCGGGTCCCAAACGGCT**  
TCGACAACAGCGGTCACCGTGGCGCCATCAACTGGCAAAGGGTGACACGATCA  
AACAAACCCTGATCGCCATCCATACTCTCGCAATCCGTTACGCCAATCGTACCGA  
CGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCTCCATACCAGGAGGCGTGCA  
GGTGTCCCTACTGAAGGAATATTATGAGGATGGATATCACATCGTTCGTGATATA  
GACAGCACCGTTGGCGTCGCAATTTCCGATGCTTCTCTGCCCCGCGCACCTGG  
AATGGCTTTTTGGCGCCCAAGACATACAAGAACGTCTACCTCGACACATACCACA



**Estrategias para el desarrollo de nuevas herramientas para la edición genética en *Paracoccidioides* spp.: Un acercamiento a la tecnología CRISPR/Cas9**

ACCAAGTCTTCGATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAGCT  
TGCATGCTCGCTTCCTCATGACAGACTTAGAGGAGCCGATAAGCCGTTGATTGTG  
AAAGAGTGGAGCGGTGCCATGACTGACTGCGCCATGTATCTAAATGGGCGTGGC  
ATAGGTTGCGGATTTGATGGTTCGTTCCCTAGCGGCAAACCATCTGGCGCTTGTG  
GTGCGAGGTCTAAGGGCTCCTCTTCCGAATTGTCCGCTCAGCAGAAAAAAGATAC  
TCTCCGGTATATTGAGGCACAGCTTGATGCTTTTCGAGGTCGCGGCTGGATGGTAC  
TTCTGGACATGGAAGACGGAGGGGGCGCCGGGATGGGATATGCAGGACCTTTTG  
**AACCAGAAGCTGTTTCCGCAGCCGATTTGGGCTAGGAAGTATGGTGGATGCAGG**  
**TGAT**GGGACTTTTTACGGCTTGGAGCGTAGGAGAACAGCTGATTATTTACGTTTAC  
ATGTTTAACTTTTTATTAAGAAATGGAAAGGCTTAATTGAACACTTACTAATTAATTGA  
CATTGTTTTTCACTACTATCTCATTGTATTGTGCGAGGGATGGAGGGATGGTATCTA  
TGCGGTCCGTATACATCTGTGAGAAAAAGGGGTTAACAAGTGACCTGGGCTCAAAA  
TTCCAATCTAGGACATCGACCTACTACAGGGAACCTTAGATTTTCCCTTAGAATATC  
TCTTTAATAATTCAGAGGGCGTTATTTTATTTGATTTTCTTTCTT

**Secuencia Protospacer en región 5' UTR en verde y Protospacer en región 3' UTR en morado**

**PAM Pbgp43\_ARNg\_5': TGG**

**PAM Pbgp43\_ARNg\_3': TGG**

**Secuencia Protoespaciador** based on

<http://crispor.tefor.net/crispor.py?batchId=4h2ac30ayGdZTbF79f7V>

Los ARN guías fueron adquiridos como *TrueGuide Synthetic* CRISPR gRNA en Invitogen™.