



Optimización del uso del sistema CRISPR en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Trabajo de Fin de Grado

Juan Ernesto Pérez Fernández

Departamento de Bioquímica Vegetal
y Biología Molecular

Grado en Bioquímica

Junio 2023



ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
2.1. Las cianobacterias.....	2
2.2. Aplicaciones biotecnológicas de las bacterias	2
2.3. El sistema CRISPR-Cas	4
2.4. El sistema CRISPR-Cas como herramienta de ingeniería genética	5
3. Objetivos.....	8
4. Materiales y métodos.....	9
4.1. Organismos y condiciones de cultivo	9
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	9
4.1.2. <i>Synechocystis</i>	9
4.2. Métodos de biología molecular	10
4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	10
4.2.2. Manipulación enzimática de DNA	10
4.2.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	11
4.2.4. Transformación en <i>Escherichia coli</i>	11
4.2.5. Transformación en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	12
4.2.6. Extracción, purificación y cuantificación de DNA	12
4.3. Oligonucleótidos y plásmidos utilizados.....	13
4.3.1. Construcción de plásmidos.....	14
4.4. Análisis informático de las secuencias de DNA.....	16
4.5. Medidas espectrofotométricas	16
5. Resultados y discusión	16
5.1. Construcción del plásmido pGlnN_cpf1_Nat	16
5.2. Obtención de la estirpe CPF1 de <i>Synechocystis</i>	17
5.3. Construcción del plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat.....	18
5.4. Obtención de la estirpe AsCas12f1 de <i>Synechocystis</i>	19
5.5. Estudio del crecimiento de las estirpes CPF1 y AsCas12f1	21
5.6. Construcción de plásmidos que contienen gRNA para AsCas12f1	22
6. Conclusiones.....	25
7. Bibliografía.....	26

1. RESUMEN

Las cianobacterias son organismos procariotas fotoautótrofos de gran interés en la biotecnología y la biología sintética, debido a su capacidad de utilizar el CO₂ atmosférico y la luz solar como únicas fuentes de carbono y de energía, respectivamente. Uno de los mecanismos más utilizados hoy en día para la modificación genética de cianobacterias es el sistema CRISPR-Cas, que permite realizar roturas de doble cadena dirigidas en el genoma de la bacteria. Estas roturas posteriormente se reparan mediante recombinación homóloga con un DNA molde, lo que permite insertar mutaciones puntuales o genes exógenos en el genoma del organismo. Sin embargo, estos sistemas presentan un problema: para su utilización, es necesario transformar las cianobacterias con plásmidos de muy gran tamaño, lo que dificulta la entrada del plásmido en la célula.

En este trabajo, se han desarrollado dos estirpes de *Synechocystis* sp. PCC 6803, llamadas CPF1 y *AsCas12f1*, que presentan en su genoma genes que codifican para las proteínas Cas Cpf1 y *AsCas12f1*, respectivamente. Gracias a la presencia de estos genes en el genoma, no es necesario incluirlos en los plásmidos utilizados, lo que reduce en gran medida su tamaño. Además, se ha comprobado que la presencia de estos genes en el genoma de *Synechocystis* no provoca una alteración de la tasa de crecimiento. Finalmente, se han construido dos plásmidos que contienen RNAs guía para la proteína *AsCas12f1*, para comprobar la eficiencia de su sistema CRISPR-Cas. Estos RNA guía tienen insertados los genes *lacZα* y *ccdB*, con la intención de facilitar la selección de aquellos plásmidos que sustituyan estos insertos por secuencias diana. Sin embargo, aunque se ha demostrado que el sistema con *lacZα* funciona, el sistema con *ccdB* no ha dado los resultados esperados, ya que no se ha producido la muerte celular al inducir su expresión.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo de procariotas Gram-negativas muy diverso capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. Esa capacidad se debe a su sistema de pigmentos fotosintéticos, que tiene la capacidad de romper moléculas de agua, lo que distingue a este grupo de bacterias de los otros dos grandes grupos de bacterias fotosintéticas: las bacterias verdes y las bacterias púrpuras¹. Las cianobacterias existen desde hace más de 2000 millones de años², y fueron uno de los principales responsables de la transformación de la composición atmosférica³. Además, según la teoría endosimbiótica del origen de los orgánulos, son las precursoras de los cloroplastos de las plantas y algas⁴.

La gran diversidad que presentan las cianobacterias les ha permitido ocupar un gran rango de nichos ecológicos, desde suelos desérticos hasta océanos tropicales⁵. Existen varias clasificaciones para las cianobacterias, pero una de las más aceptadas las divide en cinco secciones según su morfología y el tipo de división celular que llevan a cabo⁶.

La cianobacteria utilizada en este trabajo es *Synechocystis* sp. PCC 6803 (de aquí en adelante, *Synechocystis*). *Synechocystis* es una cianobacteria unicelular de morfología esférica que se divide por fisión binaria, lo que la sitúa en la sección I de la clasificación anteriormente mencionada⁶. Fue el tercer organismo procariota y el primer organismo fotosintético del que se secuenció el genoma completo⁷. Esta cianobacteria ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar la fotosíntesis, debido a sus ventajas comparada con otros organismos fotosintéticos. *Synechocystis* es naturalmente competente, es decir, es capaz de incorporar espontáneamente fragmentos de DNA del medio, y es capaz de integrar este DNA en su genoma mediante recombinación homóloga. Además, es capaz de crecer en un amplio rango de condiciones, siendo capaz de llevar a cabo un metabolismo fotoautótrofo, heterótrofo o mixótrofo⁸.

2.2. Aplicaciones biotecnológicas de las bacterias

En tiempos recientes, ha surgido un gran interés por el uso de cianobacterias en la biotecnología y la biología sintética. Estos organismos son capaces de generar biomasa utilizando únicamente CO₂ atmosférico como fuente de carbono y luz solar como fuente de energía mediante la fotosíntesis y el ciclo de Calvin-Benson. Por tanto, la manipulación

de su metabolismo ofrece la oportunidad de convertir directamente el CO₂ a productos químicos de interés. Además, presentan una serie de ventajas sobre otros organismos fotoautótrofos como las plantas: son más eficientes a la hora de convertir la energía solar a biomasa, y adquieren su carbono a través de un intermediario, el bicarbonato, lo que permite enriquecer su medio para aumentar la productividad. Por último, presentan una velocidad de crecimiento mayor que la de las plantas superiores, y dirigen una mayor cantidad de carbono fijado a los productos de interés al no producir estructuras como raíces y tallos⁹.

La investigación hacia la aplicación de cianobacterias en la bioproducción se ha centrado principalmente en los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus*, con algunos estudios adicionales sobre otros géneros como *Anabaena*¹⁰. Hoy en día, hay disponibles una gran variedad de técnicas de modificación genética en estas cianobacterias, incluyendo la integración de genes en el genoma mediante recombinación homóloga, la introducción y mantenimiento de genes mediante plásmidos replicativos y la modificación genética mediante el sistema CRISPR-Cas. Algunas estirpes, como *Synechocystis* sp. PCC 6803, son naturalmente competentes y pueden incorporar DNA exógeno por sí solas, pero también se pueden utilizar otras técnicas como la conjugación o la electroporación¹¹.

También es posible modificar los niveles de expresión de los genes, tanto los genes propios de la cianobacteria como los insertados. Para ello, se pueden utilizar técnicas como RNAs reguladores, que incluyen los RNAs reguladores pequeños (sRNAs) y los riboswitches, o la interferencia CRISPR, que bloquea la transcripción de un gen de forma reversible^{11,12}. Para los genes exógenos, además, se puede controlar la expresión mediante el uso de unos promotores u otros, incluyendo promotores heterólogos como el promotor P_{lac} de *E. coli*. También se pueden utilizar terminadores de la transcripción personalizados para evitar la transcripción de loci adyacentes, o sitios de unión a ribosoma (RBS) combinados artificialmente con promotores diferentes para aumentar la eficiencia de traducción¹¹.

Utilizando estos métodos, se han introducido en *Synechocystis* y *Synechococcus* varias rutas metabólicas de interés, permitiendo la síntesis de productos como etanol, ácido láctico, sacarosa, etileno, isopreno y distintos biocombustibles como biodiésel y biogás. Para algunos de estos productos puede ser necesaria la expresión de un transportador para liberar el producto al medio extracelular, mientras que en otros casos

no es necesario. Inicialmente los niveles de producto alcanzados en el medio extracelular fueron del orden de microgramos por litro, pero hace unos años se consiguieron alcanzar niveles del orden de gramos por litro. Si el producto es tóxico, esto implica la necesidad de retirarlo. Aún así, la productividad de las mejores cepas sigue estando entre uno y dos órdenes de magnitud por debajo de la tasa máxima de fijación de CO₂ que pueden alcanzar estas células^{10,13,14}.

2.3. El sistema CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas es un sistema de inmunidad adquirida contra elementos genéticos exógenos presente en muchas bacterias y la mayoría de las arqueas. Este sistema está compuesto por repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) y las proteínas asociadas a estas repeticiones (Cas, CRISPR-associated proteins). Los loci CRISPR contienen de forma alterna elementos repetitivos (repeticiones) y secuencias variables (espaciadores)^{15,16}.

El mecanismo CRISPR-Cas se divide en tres pasos principales: adaptación, expresión y procesado, e interferencia (Figura 1). Durante el paso de adaptación, las proteínas Cas reconocen DNA invasor, bien de bacteriófagos o de plásmidos, e integran fragmentos cortos de este DNA exógeno en la región CRISPR como nuevos espaciadores. La región del DNA exógeno que se incorpora depende de la presencia de unas secuencias de DNA llamadas motivos adyacentes al protoespaciador (PAM)^{17,18}.

A continuación, ocurre el paso de expresión y procesado. Durante este paso, el loci CRISPR se transcribe a un transcrito primario largo (pre-crRNA), que luego se procesa para dar lugar a un conjunto de pequeños RNA CRISPR (crRNA), cada uno de ellos conteniendo un fragmento repetitivo y una secuencia espaciadora variable complementaria al DNA invasor. Estos crRNA se combinan con proteínas Cas formando un complejo efector, que reconoce la secuencia diana en el ácido nucleico invasor por hibridación entre este y la secuencia espaciadora del crRNA. Tras el reconocimiento, se produce una rotura en el ácido nucleico exógeno, impidiendo su proliferación y propagación¹⁸.

Los sistemas CRISPR-Cas se dividen en dos clases, dependiendo de si el complejo efector está formado por una o varias proteínas junto con el crRNA. A su vez, estas dos

clases se subdividen en seis tipos y 33 subtipos, dependiendo de las proteínas Cas que presentan^{19,20}.

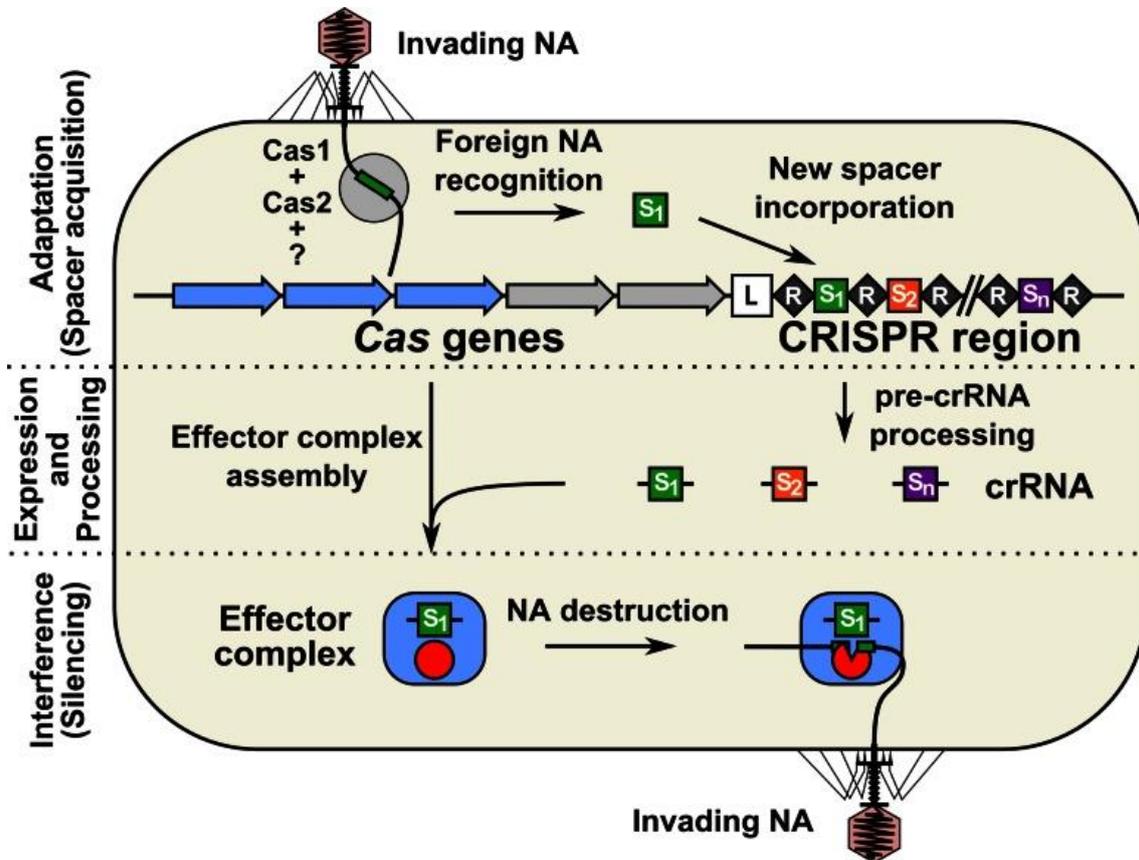


Figura 1. Representación esquemática de los tres pasos en los que se divide el sistema CRISPR-Cas. Reproducido de Gasiunas et al., 2014¹⁸.

2.4. El sistema CRISPR-Cas como herramienta de ingeniería genética

A lo largo de las últimas décadas, se han desarrollado varios sistemas de nucleasas artificiales para la edición genética. Dos de los más utilizados son las nucleasas de dedos de zinc, compuestas por un dominio de unión al DNA y un dominio de restricción del DNA derivado de la endonucleasa *FokI*, y las nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN), que derivan de una proteína natural de las bacterias del género *Xanthomonas*. Ambos tipos de nucleasas reconocen una secuencia específica de nucleótidos utilizando como guía una secuencia de aminoácidos²¹.

Sin embargo, en los últimos años, se ha empezado a utilizar el sistema CRISPR-Cas como herramienta para la modificación genética. Comparado con los dos sistemas anteriormente mencionados, el sistema CRISPR-Cas cuenta con la ventaja de que su especificidad depende de una secuencia corta de RNA, lo que facilita su aplicación²¹.

El sistema CRISPR-Cas más utilizado es el sistema de tipo II, que pertenece a la clase 2. Este tipo de sistema CRISPR-Cas es uno de los más sencillos, ya que requiere una sola proteína multifunción Cas9 para llevar a cabo la rotura del DNA, por lo que este sistema se suele denominar CRISPR-Cas9²⁰. El sistema CRISPR-Cas9 requiere tres componentes para llevar a cabo la restricción: la proteína Cas9, un crRNA y un segundo RNA llamado RNA CRISPR transactivante (tracrRNA), que contribuye a la maduración del crRNA y a la formación del complejo Cas9. El crRNA guía a la proteína Cas9 hasta el DNA complementario a su secuencia, y la proteína Cas9 produce roturas de doble cadena 3 pares de bases aguas arriba del PAM. En lugar de dos RNA, se puede utilizar un solo RNA guía (gRNA), que consiste en una fusión del crRNA y tracrRNA²².

En la mayoría de los organismos eucariotas, tras la rotura de doble cadena, el DNA se puede reparar por dos mecanismos: recombinación homóloga y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Figura 2). La reparación por NHEJ crea inserciones y deleciones que provocan un desplazamiento del marco de lectura, eliminando completamente la expresión del gen afectado. Por otra parte, si se proporciona una secuencia de DNA homóloga a la diana de Cas9, se puede producir la reparación por recombinación homóloga. En este caso, se pueden introducir mutaciones puntuales en la secuencia homóloga, que se incorporarán al genoma tras la recombinación. En algunos procariontes como *Escherichia coli*, sin embargo, la reparación solo se puede producir mediante recombinación homóloga, por lo que es necesaria la cotransformación de la proteína Cas9 y un RNA que la guíe junto con un molde de recombinación con las mutaciones que se quieran introducir^{23,24}.

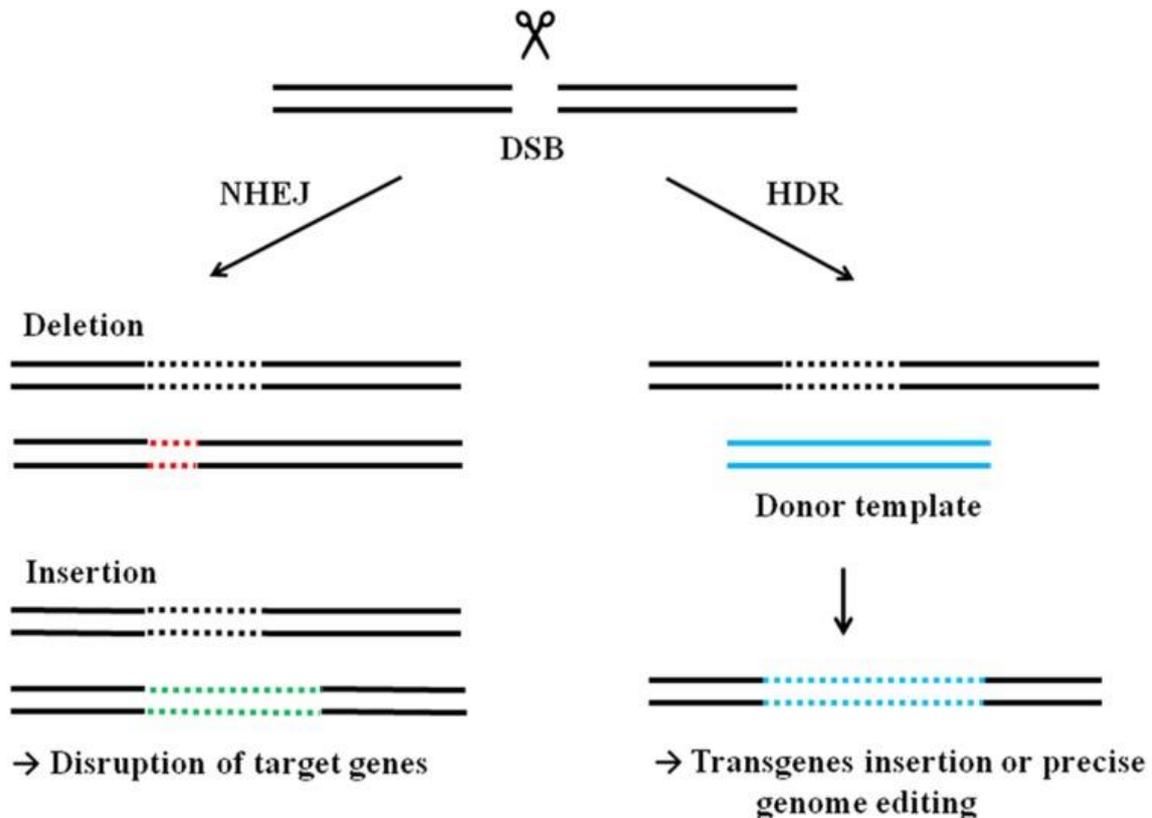


Figura 2. Mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSB). Reproducido de Hryhorowicz et al., 2017²².

Otro sistema CRISPR-Cas que se ha empezado a utilizar más recientemente es el sistema de tipo V y subtipo V-A, también perteneciente a la clase 2. Este sistema, conocido como CRISPR-Cas12a o CRISPR-Cpf1, utiliza una sola proteína Cas para realizar la rotura del DNA, al igual que el sistema CRISPR-Cas9. Sin embargo, presenta una serie de diferencias. En primer lugar, la proteína Cpf1 solo requiere una molécula de crRNA. Al contrario que Cas9, Cpf1 es capaz de procesar el pre-crRNA sin necesidad de utilizar un tracrRNA, lo que simplifica el diseño del RNA guía. Además, la proteína Cas9 presenta dos dominios nucleasa, cortando cada uno de ellos una hebra del DNA diana. Cpf1, sin embargo, presenta un único dominio nucleasa que corta ambas hebras. Las dos hebras siguen rutas distintas para alcanzar el sitio catalítico, lo que hace que se produzcan roturas escalonadas²⁵.

El sistema CRISPR-Cpf1 presenta una serie de ventajas sobre el sistema CRISPR-Cas9, más comúnmente utilizado. En primer lugar, en algunos microorganismos como *Streptomyces* y cianobacterias, el uso de Cas9 es tóxico²⁶, impidiendo completamente su uso. Por otra parte, se ha comprobado que, aunque *in vitro* ambas nucleasas presentan una

especificidad similar, *in vivo* la proteína Cpf1 produce una menor tasa de efectos off-target^{27,28}. Además, la capacidad de procesar pre-crRNA de Cpf1 permite modificar varios elementos genéticos a la vez utilizando pre-crRNAs con varios espaciadores en un solo plásmido, mientras que en el caso de Cas9, al ser necesarios varios tracrRNA, hace falta transformar con varios plásmidos^{29,30}.

Sin embargo, tanto CRISPR-Cas9 como CRISPR-Cpf1 presentan un problema: el gran tamaño de los plásmidos utilizados, lo que dificulta la transformación. Para solventar este problema, hay varios posibles métodos. En primer lugar, se pueden utilizar sistemas con proteínas Cas más pequeñas, reduciendo así el tamaño de los plásmidos. La proteína Cas12f1 de *Acidibacillus sulfuroxidans* (*AsCas12f1*) es una proteína Cas perteneciente a los sistemas CRISPR de subtipo V-F. Al igual que Cas9, requiere un tracrRNA para procesar el pre-crRNA, y ambos RNA pueden fusionarse en un solo gRNA. Esta proteína está formada por tan solo 422 aminoácidos, frente a los tamaños de Cas9 y Cpf1, que suelen superar los 1000 aminoácidos³¹. Además, presenta una mayor especificidad que Cas9, y produce una menor cantidad de inserciones y de deleciones grandes, aunque presenta menor eficiencia³².

Otra posible solución es la integración de los genes que codifican las proteínas Cas en el genoma del organismo. Con esto, los plásmidos utilizados ya no necesitan incluir la proteína Cas, reduciendo así su tamaño.

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Construir plásmidos integrativos para *Synechocystis* que contengan genes que codifiquen proteínas Cas.
2. Desarrollar estirpes mutantes de *Synechocystis* que presenten genes que codifiquen proteínas Cas en su genoma.
3. Comprobar el efecto de la presencia de estos genes sobre el crecimiento de las estirpes generadas.
4. Construir plásmidos que contengan gRNAs para comprobar la eficiencia del sistema CRISPR/Cas en las estirpes generadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Organismos y condiciones de cultivo

4.1.1. *Escherichia coli*

La estirpe de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo es la estirpe competente DH5 α , cuyo genotipo es el siguiente: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 λ ⁻thi-1 gyrA96 relA1*³³.

Como medio de cultivo, se utilizó el caldo de lisogenia o medio LB (Lysogeny Broth), cuya composición es de 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura y 10 g L⁻¹ de NaCl³⁴. Para el medio sólido, se añadieron además 15 g L⁻¹ de agar. Los antibióticos utilizados como marcadores de selección fueron ampicilina, a una concentración de 100 μ g mL⁻¹, espectinomicina-estreptomycinina, ambas a una concentración de 50 μ g mL⁻¹, y kanamicina, a una concentración de 25 μ g mL⁻¹.

Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en placas de Petri y se incubaron a 37 °C durante al menos 18 horas. Los cultivos en medio líquido, por su parte, se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm durante al menos 18 horas.

4.1.2. *Synechocystis*

Las estirpes de *Synechocystis* utilizadas en este trabajo aparecen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de *Synechocystis* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Resistencia	Referencia
WT	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	-	Laboratorio de Luis López Maury
CPF1	<i>glnN::cpf1:Nat</i>	Nat	Este trabajo
AsCas12f1	<i>glnN::AsCas12f1:Nat</i>	Nat	Este trabajo

El medio de cultivo utilizado fue el medio BG11c, compuesto por medio BG11⁶ suplementado con NaHCO₃ a una concentración de 1 g L⁻¹. Para los cultivos en medio sólido, se añadió a este medio agar a una concentración de 10 g L⁻¹. El antibiótico utilizado para llevar a cabo la selección de los transformantes fue nourseotricina, a una concentración de 50 μ g mL⁻¹.

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL, con un volumen de cultivo de 20 mL, y se incubaron en agitación orbital, a 30 °C y

bajo iluminación continua de 40-50 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los cultivos en medio sólido se realizaron sobre placas de Petri de 50 mL y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y con una iluminación de 35 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.2. Métodos de biología molecular

4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)³⁴ se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad).

La PCR para amplificar el gen sintético AsCas12f1 se realizó en un volumen total de 50 μL . La mezcla de reacción contenía 1 μL de DNA molde, 0,5 μL de cada oligonucleótido 50 μM , 1 μL de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 0,3 μL de polimerasa Q5 (New England BioLabs), 10 μL de tampón de la polimerasa 5x, y H₂O miliQ hasta completar el volumen final.

El programa utilizado fue el siguiente: 30 segundos a 98 °C, 30 ciclos de reacción y por último 5 minutos a 72 °C. Cada ciclo de reacción consistió en una etapa de desnaturalización de 15 segundos a 98 °C, una etapa de hibridación de 15 segundos a 62 °C y una etapa de extensión a 72 °C cuya duración dependió de la longitud del fragmento a amplificar (30 segundos por cada kb).

Las PCR de colonias tanto de *E. coli* como de *Synechocystis* se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL . La mezcla de reacción contenía 1 μL de dNTPs 10 mM, 0,5 μL de cada oligonucleótido 50 μM , 0,2 μL de polimerasa DreamTaq (Thermo Fisher Scientific), 2,5 μL de tampón de la polimerasa 10x, y H₂O miliQ hasta completar el volumen final. A las PCR de *Synechocystis* se les añadió además 0,5 μL de MgCl₂ 25 mM. El DNA molde utilizado fue biomasa de las colonias correspondientes.

El programa utilizado para las PCR de colonias fue el siguiente: 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos de reacción y por último 5 minutos a 72 °C. Cada ciclo de reacción consistió en una etapa de desnaturalización de 30 segundos a 95 °C, una etapa de hibridación de 30 segundos a 55 °C y una etapa de extensión a 72 °C cuya duración dependió de la longitud del fragmento de DNA a amplificar (1 minuto por cada kb).

4.2.2. Manipulación enzimática de DNA

Las restricciones enzimáticas del DNA se llevaron a cabo utilizando enzimas suministradas por New England BioLabs. Las mezclas de reacción contenían 0,5-2 μL de

cada enzima de restricción, el tampón correspondiente a las enzimas utilizadas y 4-40 µg de DNA. Las preparaciones se incubaron a 37 °C durante un mínimo de 3-4 horas.

Los extremos de los plásmidos cortados fueron desfosforilados para evitar la religación. Para ello, se utilizó la fosfatasa alcalina suministrada por Roche y su tampón correspondiente, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando la DNA ligasa T4 proporcionada por New England BioLabs. Las mezclas de reacción contenían 5 µL de plásmido desfosforilado, 12 µL de inserto, 2 µL de tampón de la ligasa 10x y 1 µL de ligasa T4, y se incubaron a 16 °C durante al menos 18 horas.

4.2.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante restricción, así como los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR, fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa³⁴. Se utilizaron geles con una concentración de agarosa de 0,8-1,5% (p/v), preparados en tampón TBE 0,5x (tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), a los que se añadió la solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe 20.000x (iNtRON). A cada muestra se le añadió tampón de carga púrpura 6x (New England BioLabs).

Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) a 90 voltios, o en cubetas Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) a 120 voltios.

4.2.4. Transformación en *Escherichia coli*

Las células DH5α competentes utilizadas fueron suministradas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Las células fueron transformadas mediante choque térmico.

En primer lugar, se mezcló una alícuota de 100 µL de células competentes con el DNA producto de la ligación, y se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico durante 70 segundos a 42 °C, y se enfriaron rápidamente en hielo durante 2 minutos. Tras esto, se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1-2 horas. Por último, las células se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección, y se incubó a 37 °C hasta el día siguiente.

Para la transformación con el plásmido pSPARK, que permite la identificación de las colonias que incluyen el inserto gracias a la inactivación del gen lacZ, se añadió sobre

la placa de Petri 4 μL de IPTG 0,1 M y 40 μL de X-gal antes de sembrar. Las colonias que presentan el inserto aparecen de color blanco debido a la inactivación del gen *lacZ*, mientras que las colonias que no lo presentan aparecen de color azul por la actividad de la β -galactosidasa sobre el X-gal.

4.2.5. Transformación en *Synechocystis* sp. PCC 6803

La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 es capaz de internalizar moléculas de DNA del medio de forma natural. Si estas moléculas presentan homología con alguna región del genoma, además, *Synechocystis* es capaz de integrarlas en su genoma mediante recombinación homóloga.

En primer lugar, se cultivaron las células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 silvestre en 50 mL de medio BG11c en condiciones normales de iluminación y temperatura. Estos cultivos fueron refrescados al menos tres veces. Tras alcanzar la fase exponencial, con una densidad óptica a 750 nm de aproximadamente 0,5, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante, se lavó el cultivo con 50 mL de medio BG11c y se centrifugó de nuevo. Este lavado y centrifugado se repitió una vez más, y las células se resuspendieron en 1 mL de medio BG11c.

Se repartieron alícuotas de 200 μL en tubos de 10 mL de poliestireno transparente, y se añadieron 10-20 μg de DNA a cada tubo excepto a uno, que se utilizó como control. Estos cultivos se incubaron a 30 °C bajo iluminación continua durante 2-3 horas. Tras la incubación, las células se sembraron en placas de Petri con medio BG11c sólido sobre un filtro de nitrocelulosa MF-Millipore (Merck), y se incubaron a 30 °C en condiciones de baja luz (10 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante al menos 20 horas.

Posteriormente, se transfirieron los filtros a placas de medio BG11c sólido con el antibiótico utilizado como marcador de selección, en este caso nourseotricina. Estos cultivos se incubaron a 30 °C bajo iluminación continua de 35 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta que se observó la aparición de colonias sobre los filtros. Las células transformantes fueron transferidas a placas de medio BG11c suplementado con nourseotricina, el antibiótico de selección, y fueron analizadas mediante PCR de colonias.

4.2.6. Extracción, purificación y cuantificación de DNA

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina³⁵ a partir de cultivos de *E. coli* DH5 α transformada con los plásmidos de interés.

La purificación del DNA plasmídico, así como de fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa, se llevó a cabo utilizando el kit FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit (FavorGen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

La cuantificación del DNA purificado se llevó a cabo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 230 nm, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

4.3. Oligonucleótidos y plásmidos utilizados

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y sus descripciones se encuentran en la Tabla 2. La lista de plásmidos utilizados que no fueron construidos en este trabajo se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia 5' → 3'
50	Cebador forward para comprobación del gen <i>glnN</i> .	ATGCAGGCCAGTCTTCCT AA
51	Cebador reverse para comprobación del gen <i>glnN</i> .	AAATGGCAGTGTCCAAG TCC
423	Cebador forward para comprobación de plásmidos pSEVA.	AGCGGATAACAATTCAC ACAGGA
460	Cebador reverse para comprobación de plásmidos pSEVA.	CGCCAGGGTTTTCCCAG TCACGAC
509	Cebador que hibrida con la secuencia del gen <i>cpfl</i> .	GCTAAGCTAACTAGTGTC C
510	Cebador forward para amplificación del gen <i>cas12f1</i> de <i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> .	GAATTCCACCCCAGGCTT TACAC
511	Cebador reverse para amplificación del gen <i>cas12f1</i> de <i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> .	GGATCCCCTAGGCTCGA G
512	Cebador forward para amplificación de los gRNAs.	GAATTCTTGACGGCTAGC TCAG
513	Cebador reverse para amplificación de los gRNAs.	GCGGCCGCAAGCTTGCA TGC

Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pSpark II	Vector de clonación de alta eficiencia para productos de PCR con extremos romos.	Amp	Canvax Reagents
pSEVA251	Vector de clonación estandarizado que contiene un MCS y un gen de resistencia a kanamicina.	Km	Standard European Vector Architecture
pSEVA451	Vector de clonación estandarizado que contiene un MCS y un gen de resistencia a estreptomycinina y espectinomycinina.	Sp/St	Standard European Vector Architecture
pSEVA451_cpfl	Plásmido pSEVA451 que contiene el gen <i>cpfl</i> insertado entre las dianas de corte de las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Sp/St	Baldanta et al., 2022 ²⁸
pGlnN_PpetE_gst_Nat	Plásmido que contiene dos regiones de homología con los extremos del gen <i>glnN</i> , y entre ellas el promotor P _{petE} , el gen <i>gst</i> y un gen de resistencia a nourseotricina.	Amp/Nat	Laboratorio de Luis López Maury
pSEVA451_Ascas12fl	Plásmido pSEVA451 que tiene clonado el gen <i>cas12fl</i> de <i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> bajo el promotor P _{lac} .	Sp/St	Laboratorio de Luis López Maury

4.3.1. Construcción de plásmidos

Para la construcción de los plásmidos basados en pSpark II, en primer lugar, se realizó una PCR a partir de un fragmento de DNA sintético (gBlock) suministrado por Integrated DNA Technologies, para amplificar dicho fragmento para su clonación. Una vez amplificado, se ligó con el plásmido pSpark II siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de esta ligación se utilizó para transformar la estirpe DH5 α de *E. coli*, y posteriormente se realizó la comprobación mediante PCR de colonias, extracción, purificación y cuantificación del plásmido. Una vez purificado, se realizó una restricción del plásmido obtenido para extraer el fragmento clonado. Además, los plásmidos generados tras clonación mediante PCR fueron secuenciados para su comprobación mediante el servicio de secuenciación de STAB VIDA.

Para la construcción de plásmidos a partir de los plásmidos pGlnN, pSEVA251 y pSEVA451, en primer lugar, se llevó a cabo la restricción del plásmido vector y de otro plásmido con el fragmento a clonar utilizando las mismas enzimas de restricción. Una vez cortados ambos plásmidos, se desfosforiló el plásmido vector, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa y se purificaron a partir del gel el plásmido receptor y el fragmento de DNA a clonar. Tras la purificación, se realizó una ligación del plásmido y del fragmento, se utilizó el producto de ligación para transformar *E. coli* DH5a y se llevó a cabo la comprobación mediante PCR de colonias, extracción, purificación y cuantificación del plásmido obtenido.

Los plásmidos construidos en este trabajo están recogidos a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia
pSpark_AsCas12f1	Plásmido pSpark II con el gen <i>cas12f1</i> de <i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> bajo el promotor P _{lac} clonado.	Amp
pSpark_gRNA_lacZ	Plásmido pSpark II con un gRNA clonado que tiene insertado el gen <i>lacZ</i> .	Amp
pSpark_gRNA_ccdB	Plásmido pSpark II con un gRNA clonado que tiene insertado el gen <i>ccdB</i> .	Amp
pSpark_gRNA_petE	Plásmido pSpark II con un gRNA que hibrida con el gen <i>petE</i> clonado.	Amp
pGlnN_cpfl_Nat	Plásmido pGlnN que tiene clonado el gen <i>cpfl</i> bajo el promotor P _{lac} y un gen de resistencia a nourseotricina.	Amp/Nat
pGlnN_AsCas12f1_Nat	Plásmido pGlnN que tiene clonado el gen <i>cas12f1</i> de <i>Acidibacillus sulfuroxidans</i> con el promotor P _{lac} y un gen de resistencia a nourseotricina.	Amp/Nat
pSEVA251_gRNA_lacZ	Plásmido pSEVA251 que tiene clonado un gRNA que tiene insertado el gen <i>lacZ</i> .	Km
pSEVA451_gRNA_ccdB	Plásmido pSEVA451 que tiene clonado un gRNA que tiene insertado el gen <i>ccdB</i> .	Sp/St

4.4. Análisis informático de las secuencias de DNA

El diseño de los oligonucleótidos, el análisis de los plásmidos y la localización de los sitios de restricción se realizaron utilizando el programa gratuito Serial Cloner (SerialBasics).

4.5. Medidas espectrofotométricas

Las medidas de densidad óptica de los cultivos de *Synechocystis* se realizaron utilizando un espectrofotómetro V-650 (Jasco) a una longitud de onda de 750 nm, en la que 1 DO corresponde aproximadamente a 2×10^7 células mL⁻¹. Las medidas de densidad óptica de los cultivos de *E. coli* se realizaron en el mismo espectrofotómetro a una densidad óptica de 600 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Construcción del plásmido pGlnN_cpfl_Nat

En primer lugar, el gen *cpfl*, junto con el promotor P_{lac} que controla su expresión, se obtuvieron mediante restricción a partir del plásmido pSEVA451_cpfl utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Una vez purificado, este fragmento se ligó con el plásmido pGlnN_PpetE_gst_Nat, que fue previamente cortado con las mismas enzimas y desfosforilado. Como resultado de esta ligación, se obtuvo el plásmido pGlnN_cpfl_Nat (Figura 3B).

Tras transformar con esta ligación la estirpe DH5α de *E. coli*, se cultivó en una placa de medio LB sólido suplementado con el antibiótico ampicilina, se seleccionaron seis clones positivos para el plásmido y se realizó su extracción y purificación siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.6 de este trabajo. Finalmente, el plásmido se analizó mediante restricciones con las enzimas *PvuII*, *EcoRV* y *XbaI* (Figura 3C).

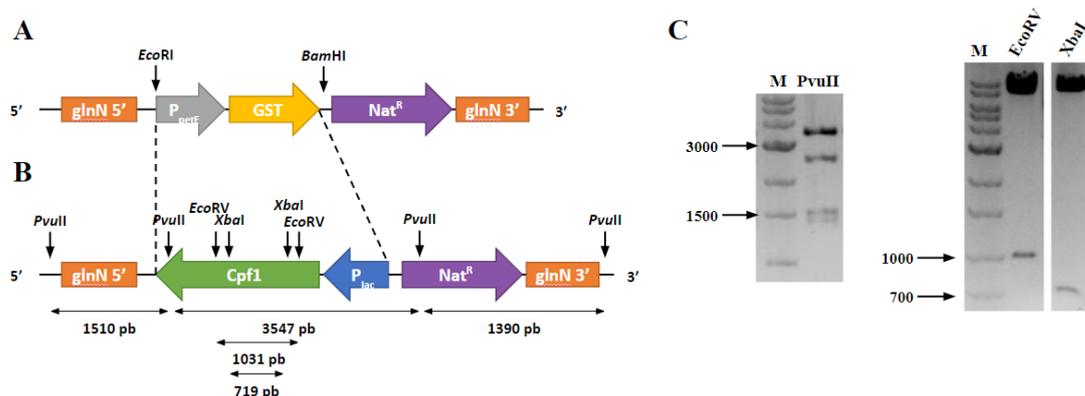


Figura 3. Construcción y análisis del plásmido pGlnN_cpf1_Nat. (A) Esquema de la región de clonación del plásmido pGlnN_PpetE_gst_Nat. Se muestran las dianas de las enzimas utilizadas para la construcción. (B) Esquema de la región de clonación del plásmido pGlnN_cpf1_Nat. Se muestran las dianas de las enzimas de restricción utilizadas para el análisis del plásmido, así como los tamaños de los fragmentos esperados. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de las restricciones realizadas para el análisis. Los carriles rotulados con M corresponden al marcador SiZer-1000 plus (iNtRON, número de referencia 24075). Los carriles correspondientes a las restricciones están rotulados con la enzima de restricción utilizada en cada caso. Los tamaños de las bandas se muestran en pb.

5.2. Obtención de la estirpe CPF1 de *Synechocystis*

Se transformó la estirpe WT de *Synechocystis* utilizando el plásmido pGlnN_cpf1_Nat siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.5 de este trabajo, obteniéndose de este modo la estirpe mutante CPF1. Las células transformadas se cultivaron en placas de medio BG11c sólido suplementado con el antibiótico de selección nourseotricina.

El plásmido utilizado contiene el gen *cpf1* bajo el promotor P_{lac} , junto con un gen de resistencia a nourseotricina. Todo esto se encuentra entre dos secuencias que presentan homología con las regiones 5' y 3' del gen *glnN* de *Synechocystis*, que codifica para una glutamina sintetasa no esencial³⁶. Esto permite que el inserto se integre dentro del genoma bacteriano mediante recombinación homóloga, interrumpiendo el gen *glnN*.

Para comprobar la integración del inserto en el genoma, así como la segregación de los cromosomas bacterianos mutantes, se realizó una PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos 50, 51 y 509 (Figura 4). Los oligonucleótidos 50 y 51 hibridan con el gen *glnN*, mientras que el oligonucleótido 509 hibrida dentro del gen *cpf1*. En la estirpe

WT, se amplificó la región situada entre los oligonucleótidos 50 y 51, dando lugar a un fragmento de 1441 pb. Mientras tanto, en los mutantes, se amplificó la región situada entre los oligonucleótidos 50 y 509, debido a la presencia del gen *cpf1*, dando lugar a un fragmento de 936 pb (Figura 4C).

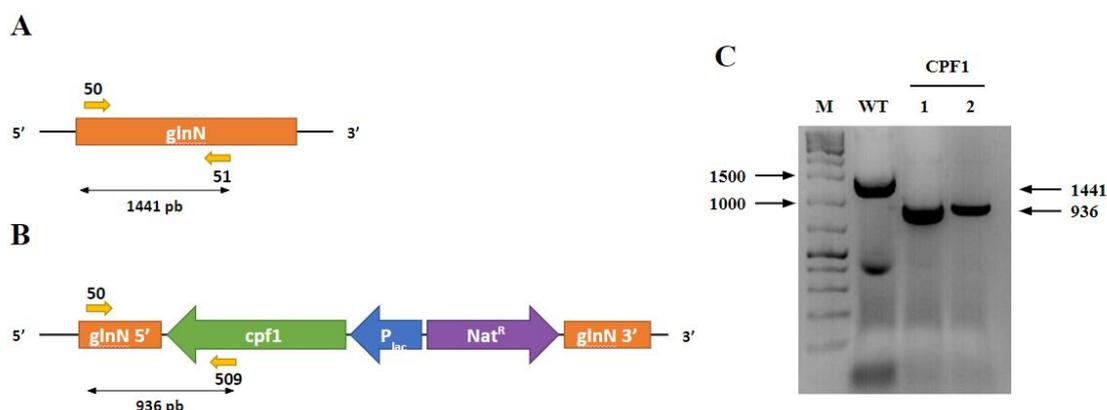


Figura 4. Análisis mediante PCR de la estirpe CPF1. (A) Esquema de la región *glnN* del genoma de *Synechocystis* WT. Se muestra el lugar donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para el análisis, y el tamaño del fragmento esperado. (B) Esquema de la región *glnN* en la estirpe CPF1 de *Synechocystis*. Se muestra el lugar donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para el análisis, y el tamaño del fragmento esperado. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en el análisis con los oligonucleótidos 50, 51 y 509. El carril marcado con M corresponde al marcador SiZer-1000 plus (iNtRON, número de referencia 24075). Los carriles correspondientes a los productos de PCR están marcados con la estirpe analizada. Los tamaños de las bandas se muestran en pb.

5.3. Construcción del plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat

En primer lugar, se compró un fragmento de DNA sintético (suministrado por Integrated DNA Technologies) que consistió en el promotor P_{lac} y el gen *cas12f1* de *Acidibacillus sulfuroxidans*, cuyo uso de codones fue optimizado para *Synechocystis*, con una diana de restricción de *EcoRI* en el extremo 5' y otra diana de restricción de *BamHI* en el extremo 3'. Este fragmento de DNA fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 510 y 511, y posteriormente fue ligado con el plásmido pSpark II. Tras esta ligación, se llevó a cabo una restricción con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* para obtener el gen *cas12f1* junto con su promotor P_{lac} . Tras la restricción, el fragmento de DNA se purificó y se ligó con el plásmido pGlnN_PpetE_gst_Nat,

previamente cortado con las mismas enzimas de restricción, dando lugar al plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat (Figura 5B).

Con este plásmido, se transformó la estirpe DH5 α de *E. coli*, se cultivó en una placa de medio LB sólido suplementado con el antibiótico ampicilina, se seleccionaron siete clones positivos para el plásmido y se realizó su extracción y purificación siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.6 de este trabajo. Finalmente, el plásmido se analizó mediante una restricción con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Figura 5C).

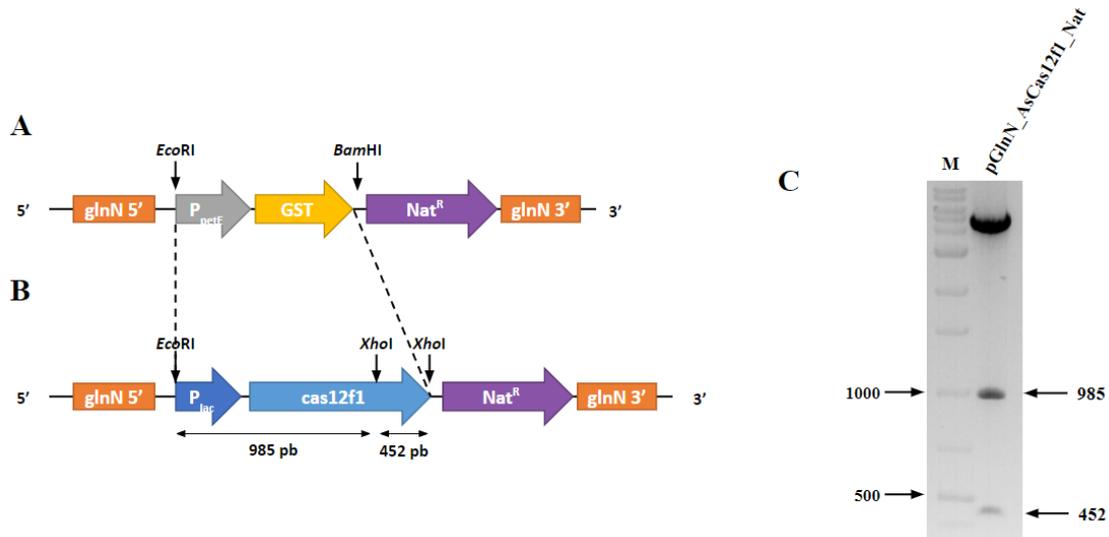


Figura 5. Construcción y análisis del plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat. (A) Esquema de la región de clonación del plásmido pGlnN_PpetE_gst_Nat. Se muestran las dianas de las enzimas de restricción utilizadas en la construcción del plásmido. (B) Esquema de la región de clonación del plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat. Se muestran las dianas de restricción utilizadas para el análisis del plásmido, y los tamaños de los fragmentos esperados. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la restricción realizada para el análisis. El carril marcado con M corresponde al marcador SiZer-1000 plus (iNtRON, número de referencia 24075). Los tamaños se muestran en pb.

5.4. Obtención de la estirpe AsCas12f1 de *Synechocystis*

Se transformó la estirpe WT de *Synechocystis* utilizando el plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.5 de este trabajo, obteniéndose de este modo la estirpe mutante *AsCas12f1*. Las células transformadas se cultivaron en placas de medio BG11c sólido suplementado con el antibiótico de selección nourseotricina.

Al igual que el plásmido utilizado en el apartado 5.2 de este trabajo, el plásmido pGlnN_AsCas12f1_Nat presenta secuencias homólogas con el gen *glnN* de *Synechocystis* a ambos lados del inserto, que consiste en el promotor P_{lac}, el gen *cas12f1* y un gen de resistencia a nourseotricina. Esto permite la integración del inserto en el genoma bacteriano mediante recombinación homóloga.

Para comprobar la integración del inserto en el genoma y la segregación de los cromosomas bacterianos mutantes, se realizó una PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos 50, 51 y 511 (Figura 6). Los oligonucleótidos 50 y 51 hibridan con el gen *glnN*, mientras que el oligonucleótido 511 hibrida dentro del gen *cas12f1*. En la estirpe WT, se amplificó la región situada entre los oligonucleótidos 50 y 51, dando lugar a un fragmento de 1441 pb. Mientras tanto, en los mutantes, se amplificó la región situada entre los oligonucleótidos 50 y 511, debido a la presencia del gen *cas12f1*, dando lugar a un fragmento de 2094 pb (Figura 6C).

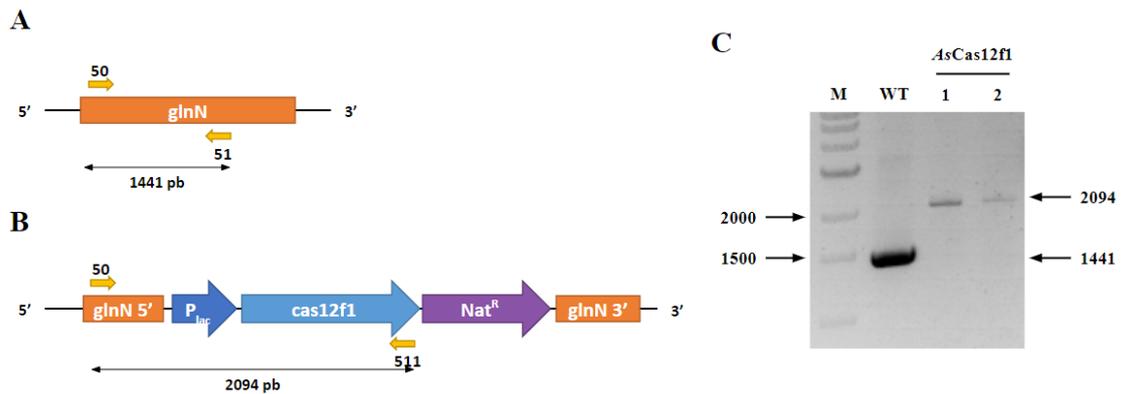


Figura 6. Análisis mediante PCR de la estirpe AsCas12f1. (A) Esquema de la región *glnN* del genoma de *Synechocystis* WT. Se muestra el lugar donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para el análisis, y el tamaño del fragmento esperado. (B) Esquema de la región *glnN* en la estirpe AsCas12f1 de *Synechocystis*. Se muestra el lugar donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para el análisis, y el tamaño del fragmento esperado. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de PCR obtenidos en el análisis con los oligonucleótidos 50, 51 y 511. El carril marcado con M corresponde al marcador SiZer-1000 plus (iNtRON, número de referencia 24075). Los carriles correspondientes a los productos de PCR están marcados con la estirpe analizada. Los tamaños de las bandas se muestran en pb.

5.5. Estudio del crecimiento de las estirpes CPF1 y *AsCas12f1*

Se realizó un estudio para comparar el crecimiento de las estirpes CPF1 y *AsCas12f1* con el crecimiento de la estirpe WT de *Synechocystis*. Para ello, se realizaron cultivos de las distintas especies en medio BG11c líquido, suplementado con el antibiótico nourseotricina en el caso de las estirpes mutantes. Estos cultivos se dejaron crecer durante 3-4 días, y a partir de ellos se prepararon cultivos nuevos con una densidad óptica a 750 nm de 0,2 en 15 mL de medio BG11c en matraces de 50 mL.

A lo largo de los cuatro días siguientes a la preparación de los cultivos, se tomaron medidas de densidad óptica a 750 nm cada día para comparar la tasa de crecimiento de las diferentes estirpes.

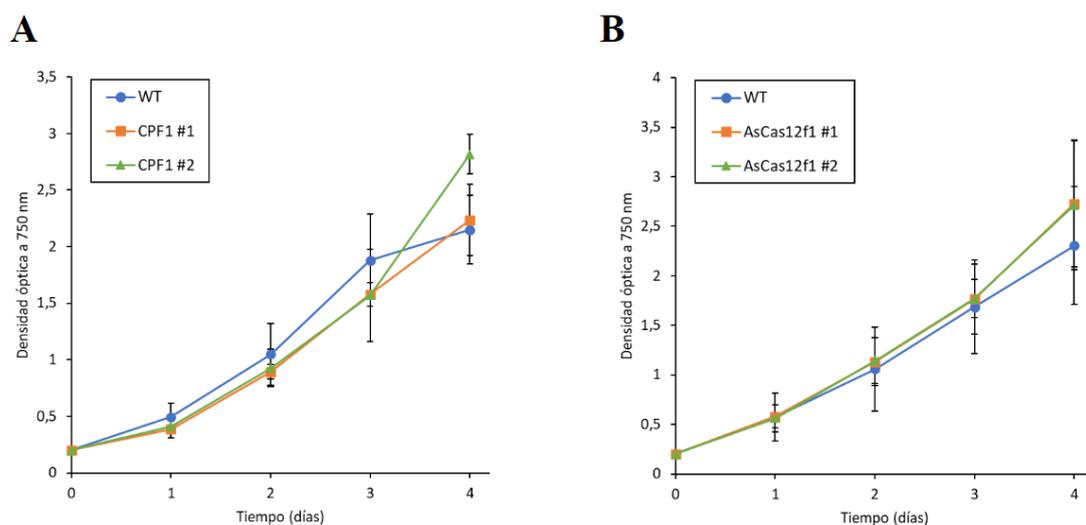


Figura 7. Estudio del crecimiento de las estirpes mutantes de *Synechocystis*. (A) Curva de crecimiento de la estirpe CPF1 comparada con la estirpe WT. Se utilizaron dos clones de la cepa CPF1. Se realizaron 3 réplicas. Las barras de error representan la desviación típica. (B) Curva de crecimiento de la estirpe *AsCas12f1* comparada con la estirpe WT. Se utilizaron dos clones de la cepa *AsCas12f1*. Se realizaron 2 réplicas. Las barras de error representan la desviación típica.

Ambas estirpes mostraron una tasa de crecimiento similar a la estirpe silvestre (Figura 7), lo que sugiere que la presencia de los genes *cpf1* y *cas12f1* no provoca ningún efecto negativo sobre el crecimiento de *Synechocystis*. Sin embargo, para la estirpe *AsCas12f1* solo se llevaron a cabo dos réplicas biológicas, por lo que sería conveniente repetir el experimento a fin de confirmar los datos obtenidos.

Para la estirpe CPF1, uno de los dos clones utilizados presentó un crecimiento significativamente mayor que la estirpe silvestre y que el otro clon de la estirpe CPF1 a los cuatro días de crecimiento (Figura 7A). Sin embargo, esto puede deberse a la presencia de un outlier en los datos obtenidos. Al realizar solo tres réplicas biológicas del experimento, el efecto de este outlier sobre la media de los datos es bastante importante. Por tanto, sería conveniente realizar más réplicas para obtener datos más fiables.

5.6. Construcción de plásmidos que contienen gRNA para *AsCas12f1*

Para comprobar la eficiencia del sistema CRISPR/Cas en la estirpe *AsCas12f1*, se construyeron los plásmidos pSEVA251_gRNA_lacZ y pSEVA451_gRNA_ccdB. Estos plásmidos contienen gRNA para la proteína *AsCas12f1* bajo el promotor constitutivo P_{J23100}, y dichos gRNA tienen insertado en el lugar de la secuencia diana el fragmento *lacZα* y el gen *ccdB*, respectivamente. Estos insertos están flanqueados por dianas de restricción para la enzima *BsaI*. Esta enzima deja tras la restricción extremos adhesivos, lo que permite la clonación de oligonucleótidos con una secuencia diana. Esta secuencia entonces será reconocida en el genoma de *Synechocystis*, se producirá hibridación entre el gRNA y el DNA genómico y la proteína *AsCas12f1* cortará el DNA.

Los insertos utilizados, *lacZα* y *ccdB*, permiten realizar una selección de los clones que hayan sustituido dichos insertos por la secuencia diana deseada. El fragmento *lacZα* permite la selección de colonias blancas y azules³⁴, donde las colonias blancas corresponderán a las que hayan sustituido el inserto. Mientras tanto, el gen *ccdB* codifica una toxina que inhibe el funcionamiento de la DNA girasa³⁷, y se encuentra regulado por el promotor P_{lac}. Por tanto, utilizando IPTG como inductor, los clones que no hayan eliminado este gen sintetizarán la toxina y morirán, permitiendo una selección negativa.

Para llevar a cabo la construcción de los plásmidos, en primer lugar, se adquirieron los gRNA en forma de fragmentos de DNA sintéticos (gBlocks, suministrados por Integrated DNA Technologies) con dianas de corte para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* en sus extremos. Estos fragmentos de DNA fueron amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 512 y 513, y posteriormente fueron ligados con el plásmido pSpark II. Tras las ligaciones, se llevaron a cabo restricciones con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para extraer los insertos. El gRNA con *lacZα* insertado fue ligado con el plásmido pSEVA251, mientras que el gRNA con *ccdB* insertado fue ligado con el plásmido

pSEVA451. Ambos plásmidos receptores fueron previamente cortados con las mismas enzimas y desfosforilados.

Tras las ligaciones se transformó la estirpe DH5 α de *E. coli* con ambos plásmidos, se cultivaron en placas de medio LB sólido suplementado con los antibióticos kanamicina (para el plásmido pSEVA251_gRNA_lacZ) y estreptomycin-a-espectinomycin-a (para el plásmido pSEVA451_gRNA_ccdB), se seleccionaron tres clones positivos para cada plásmido y se realizó su extracción y purificación siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.6 de este trabajo. Los plásmidos purificados se analizaron mediante PCR de colonias, utilizando los oligonucleótidos 423 y 460 (Figura 8).

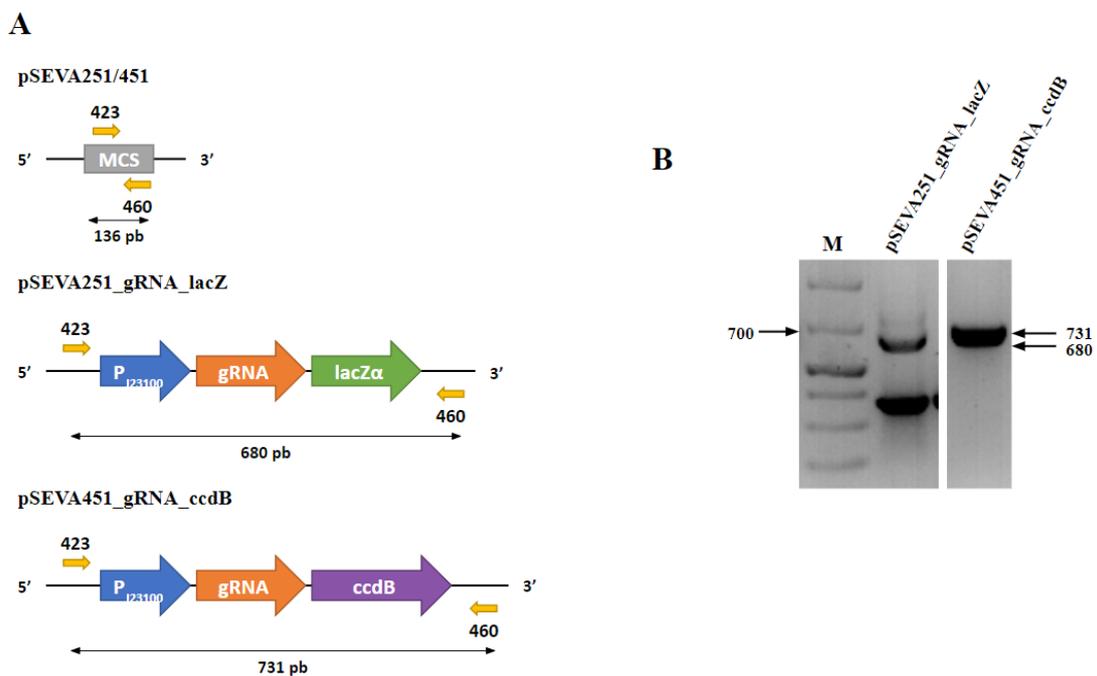


Figura 8. Análisis mediante PCR de los plásmidos pSEVA251_gRNA_lacZ y pSEVA451_gRNA_ccdB. (A) Esquema de los plásmidos utilizados. Se muestra el lugar donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para el análisis, y el tamaño del fragmento esperado en cada caso. Los plásmidos pSEVA251 y pSEVA451 son idénticos en la región analizada. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR obtenidos. El carril marcado con M corresponde al marcador SiZer-1000 plus (iNtRON, número de referencia 24075), y los demás carriles están marcados con el plásmido analizado. La región 3' del cebador 460 hibrida también con una región del gen *lacZ α* , produciendo la segunda banda observada en el carril correspondiente al plásmido pSEVA251_gRNA_lacZ. Los tamaños de las bandas se muestran en pb.

Se comprobó también la eficacia de los sistemas de selección utilizados para seleccionar los clones que han sustituido los insertos por una secuencia diana. Para ello, se transformó la estirpe DH5 α de *E. coli* con los plásmidos pSPARK_gRNA_lacZ, pSPARK_gRNA_ccdB, pSEVA251_gRNA_lacZ y pSEVA451_gRNA_ccdB, y se cultivó en placas suplementadas con los antibióticos de selección correspondientes, 4 μ L de IPTG 0,1 M y 40 μ L de X-gal (Figura 9).

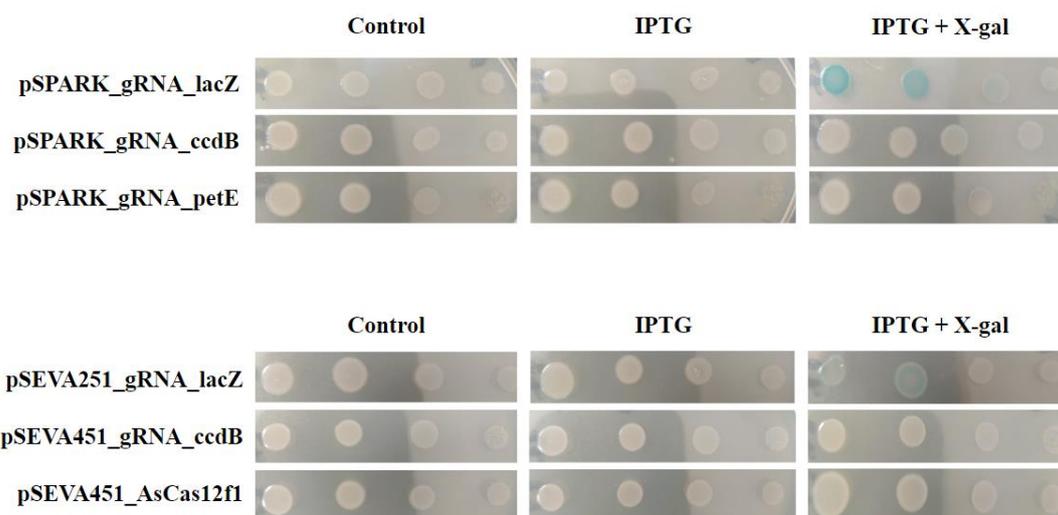


Figura 9. Comprobación de los sistemas de selección de gRNA. Los transformantes se cultivaron en medio líquido durante 24 horas, y se diluyeron igualando a una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Se realizaron tres diluciones seriadas con un factor de dilución de 10. Las distintas diluciones se sembraron en placas de medio LB suplementadas con los antibióticos de selección correspondientes en cada caso, y adicionalmente con los compuestos indicados en cada columna. Las placas se fotografiaron tras cultivarse durante 18 horas aproximadamente.

Como puede observarse, las células transformadas con los plásmidos que contienen el fragmento *lacZ α* presentan un color azul cuando se cultivan en presencia de IPTG y X-gal, lo que confirma la funcionalidad del sistema de selección de colonias blancas y azules. Sin embargo, al contrario de lo que se esperaba, en las células transformadas con plásmidos que contienen el gen *ccdB* no se observa una muerte celular significativa al añadir IPTG. Esto sugiere que el sistema de selección negativa con la toxina CcdB no podría utilizarse para seleccionar colonias que hayan incorporado la secuencia diana de interés.

También se intentó construir un plásmido que contuviera un gRNA con una secuencia diana contra el gen *petE* de *Synechocystis*, que codifica para la plastocianina³⁸, a partir de un gBlock, siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo para los genes *lacZa* y *ccdB*. Sin embargo, tras varios intentos, no se consiguió llevar a cabo exitosamente la ligación entre el plásmido pSEVA451 y el gRNA mencionado.

Finalmente, los plásmidos construidos en este apartado no pudieron ser utilizados en *Synechocystis* por falta de tiempo. En futuros experimentos, se debería insertar en estos plásmidos una secuencia homóloga a la del DNA a cortar, de forma que se produzca recombinación homóloga y se introduzcan las mutaciones deseadas. Tras esto, estos plásmidos deberían ser utilizados para transformar la estirpe *AsCas12f1* de *Synechocystis*, para comprobar la eficiencia de su sistema CRISPR-Cas12f.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en este trabajo son las siguientes:

- Se han construido y comprobado dos plásmidos (pGlnN_cpfl_Nat y pGlnN_AsCas12f1_Nat) que permiten la integración de los genes *cpfl* y *cas12f1* en el genoma de *Synechocystis*.
- Se han generado dos estirpes de *Synechocystis* (CPF1 y *AsCas12f1*) que presentan en su genoma genes que codifican para proteínas Cas, reduciendo así el tamaño de los plásmidos necesarios para llevar a cabo ingeniería genética mediante el sistema CRISPR/Cas.
- Se ha comprobado que la presencia de los genes *cpfl* y *cas12f1* no afecta de forma significativa a la tasa de crecimiento de *Synechocystis*.
- Se han construido dos plásmidos (pSEVA251_gRNA_lacZ y pSEVA451_gRNA_ccdB) que contienen gRNAs para la proteína *AsCas12f1* a los que se les puede insertar una secuencia diana.
- Se ha comprobado que el sistema de selección de colonias blancas y azules se puede utilizar con el plásmido pSEVA251_gRNA_lacZ para seleccionar aquellos clones que hayan sustituido el fragmento *lacZa* por la secuencia diana de interés.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. PHOTOTROPHIC PROKARYOTES: THE CYANOBACTERIA. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 225–274 (1977).
2. Demoulin, C. F. *et al.* Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radic Biol Med* **140**, 206–223 (2019).
3. Sánchez-Baracaldo, P. & Cardona, T. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist* **225**, 1440–1446 (2020).
4. Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F. & Gould, S. B. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology* **22**, 38–48 (2014).
5. Selão, T. T. Exploring cyanobacterial diversity for sustainable biotechnology. *Journal of Experimental Botany* **73**, 3057–3071 (2022).
6. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology* **111**, 1–61 (1979).
7. Kaneko, T. *et al.* Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Research* **3**, 109–136 (1996).
8. Vermaas, W. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications. *J Appl Phycol* **8**, 263–273 (1996).
9. Knoot, C. J., Ungerer, J., Wangikar, P. P. & Pakrasi, H. B. Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J Biol Chem* **293**, 5044–5052 (2018).
10. Wijffels, R. H., Kruse, O. & Hellingwerf, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* **24**, 405–413 (2013).
11. Opel, F., Axmann, I. M. & Klähn, S. The Molecular Toolset and Techniques Required to Build Cyanobacterial Cell Factories. in 1–39 (Springer). doi:10.1007/10_2022_210.
12. Vijay, D., Akhtar, M. K. & Hess, W. R. Genetic and metabolic advances in the engineering of cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol* **59**, 150–156 (2019).
13. Lin, P.-C. & Pakrasi, H. B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta* **249**, 145–154 (2019).

14. Farrokh, P., Sheikhpour, M., Kasaeian, A., Asadi, H. & Bavandi, R. Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. *Biotechnology Progress* **35**, e2835 (2019).
15. Barrangou, R. & Marraffini, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* **54**, 234–244 (2014).
16. Barrangou, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
17. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733–740 (2009).
18. Gasiunas, G., Sinkunas, T. & Siksnys, V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell Mol Life Sci* **71**, 449–465 (2014).
19. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **13**, 722–736 (2015).
20. Makarova, K. S. *et al.* Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol* **18**, 67–83 (2020).
21. Zhang, F., Wen, Y. & Guo, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics* **23**, R40–R46 (2014).
22. Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J. & Słomski, R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **65**, 233–240 (2017).
23. Charpentier, E. & Marraffini, L. A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr Opin Microbiol* **0**, 114–119 (2014).
24. Gupta, D. *et al.* CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences* **232**, 116636 (2019).
25. Paul, B. & Montoya, G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed J* **43**, 8–17 (2020).
26. Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H. & Pakrasi, H. B. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microbial Cell Factories* **15**, (2016).
27. Kim, D. *et al.* Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **34**, 863–868 (2016).

28. Baldanta, S., Guevara, G. & Navarro-Llorens, J. M. SEVA-Cpf1, a CRISPR-Cas12a vector for genome editing in cyanobacteria. *Microbial Cell Factories* **21**, 103 (2022).
29. Campa, C. C., Weisbach, N. R., Santinha, A. J., Incarnato, D. & Platt, R. J. Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts. *Nat Methods* **16**, 887–893 (2019).
30. Zetsche, B. *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 through autonomous processing of a single crRNA array. *Nat Biotechnol* **35**, 31–34 (2017).
31. Wu, Z. *et al.* Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease. *Nat Chem Biol* **17**, 1132–1138 (2021).
32. Xin, C. *et al.* Comprehensive assessment of miniature CRISPR-Cas12f nucleases for gene disruption. *Nat Commun* **13**, 5623 (2022).
33. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580 (1983).
34. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
35. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523 (1979).
36. Reyes, J. C. & Florencio, F. J. A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **176**, 1260–1267 (1994).
37. Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**, 735–745 (1992).
38. Briggs, L. M., Pecoraro, V. L. & McIntosh, L. Copper-induced expression, cloning, and regulatory studies of the plastocyanin gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **15**, 633–642 (1990).