

Título: Modelado y análisis bioinformático de la edición de integrasas de integrones presentes en el género *Shewanella* mediante CRISPR/Cas9.

1) Breve introducción.

Los integrones son plataformas genéticas que se encuentran comúnmente en bacterias. Su función principal es la captura y la expresión de genes, los cuales están especialmente asociados con la resistencia a antibióticos. Esta función está mediada por el gen llamado “integrasa”, la cual es la responsable de la recombinación del ADN. La tecnología CRISPR ha demostrado ser una herramienta poderosa para la edición genética precisa. Este proyecto propone el uso de CRISPR para modificar el gen de la integrasa de los integrones encontrados en un *dataset* del género *Shewanella*.

2) Hipótesis de Trabajo y Resultados Esperados.

Hipótesis: Dado que la tecnología CRISPR ha demostrado ser eficaz para la edición genética precisa, se plantea que el uso de CRISPR/Cas9 específicamente dirigido al gen de la integrasa en integrones de bacterias del género *Shewanella* puede resultar en la interrupción o desactivación de la función de recombinación de ADN de la integrasa. Se hipotetiza que al modificar el gen de la integrasa, se reducirá la capacidad de los integrones para capturar y expresar genes asociados con la resistencia a antibióticos en las bacterias de este género.

Resultados esperados: Se espera demostrar la capacidad de la tecnología CRISPR/Cas9 para dirigirse con precisión al gen de la integrasa de los integrones encontrados en *Shewanella*, evidenciando la capacidad de editar este gen de manera específica. Asimismo, se espera observar una disminución en la capacidad de los integrones modificados para realizar la recombinación del ADN, demostrando así la influencia de la edición genética en la función de la integrasa, y se espera una reducción en la expresión de genes asociados con la resistencia a antibióticos en las bacterias de *Shewanella* portadoras de integrones editados.

3) Desarrollo y Diseño del Software: Metodología Experimental:

1. Se crear un módulo “BD*Shewanella*” en python que tendrá como objetivo la descarga automática de un *dataset* de secuencias nucleotídicas de integrasas de integrón encontradas en *Shewanella* del NCBI.

2. Se creará un módulo “AM*Shewanella*” que tendrá como objetivo realizar un alineamiento múltiple, usando clustal Omega y/o MAFFT para conocer las regiones conservadas.
 - 2.1 Se desarrollarán funciones para graficar las regiones conservadas.
 - 2.2 Se desarrollarán funciones para la construcción de Árboles Filogenéticos para visualizar las relaciones evolutivas entre las secuencias de integrasas.
 - 2.2.1 Se incluyen funciones para ingresar y alinear una nueva secuencia e incluirla en el árbol filogenético de secuencias conocidas.
 - 2.3 Se desarrollarán funciones para crear Modelos Ocultos de Markov (HMMer): Se aplicará HMMer para caracterizar patrones en las secuencias de integrasas, facilitando la identificación de sitios de edición CRISPR/Cas9.
3. Se creará un módulo “Vision*Shewanella*” tendrá como objetivo el análisis estructural con NGLVIEW y/o PyMOL u otro visualizador de pdb y analizar las estructuras tridimensionales de integrasas y predecir cambios post-edición CRISPR.
4. Se creará un módulo “Guias*Shewanella*” tendrá como objetivo el diseño de las guías CRISPR, utilizando métricas y librerías de diseño para mejorar las más posibles. En base a las regiones conservadas se evaluarán los posibles objetivos blanco.
5. Se creará un módulo “Primers*Shewanella*” que tendrá como objetivo el diseño de secuencias primer para identificar los blancos antes y después de editar.
6. Se creará un módulo “IA*Shewanella*” tendrá como objetivo desarrollar modelos de machine learning. En primera instancia se utilizarán Árboles de Decisión: Utilizar árboles de decisión para predecir los efectos de las ediciones CRISPR en la función de las integrasas y en la resistencia a antibióticos, basándose en los datos de las secuencias y las características filogenéticas.
7. Se creará un módulo “Gui*Shewanella*” el cual tendrá como objetivo interactuar con el usuario y llamar a los demás módulos.
8. Se crearán diagramas de sistema, y manuales de usuario, se utilizará repositorio versionados, y se registraran los derechos de autor de la obra de software.

4) Diseño Experimental y Metodología:

- Se cultivarán las bacterias de *Shewanella* que albergan integrones y se realizará la transformación con las células que albergan el sistema CRISPR/Cas9 diseñado para apuntar al gen de la integrasa.
- Verificación de la edición mediante secuenciación, por lo cual es necesario el diseño de primers.
- Se realizarán ensayos específicos para evaluar la capacidad de la integrasa para llevar a cabo la recombinación del ADN.
- Se evaluará por qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) la expresión de gen de la integrasa y del gen de resistencia adyacente al gen (*intl*).
- Se realizarán pruebas de sensibilidad a antibióticos a las células editadas y wild-type.

5) Citas Bibliográficas:

- Hall, R.M. Integrons and gene cassettes: Hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012, 1267, 71–78.
- Messier, N.; Roy, P.H. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 6699–6706.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2023. Antibiotic resistance threats in the United States, 2023. CDC, Atlanta, Georgia.
- Deng W, Shi X, Tjian R, Lionnet T, Singer RH. 2015. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11870 –11875.
- Li, Q., Zhao, P., Li, L., Zhao, H., Shi, L., & Tian, P. (2020). Engineering a CRISPR Interference System To Repress a Class 1 Integron in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(3), e01789-19.

Título: Modelado y análisis bioinformático de la edición de integrasas de integrones presentes en el género *Shewanella* mediante CRISPR/Cas9.

1) Breve introducción.

Los integrones son plataformas genéticas que se encuentran comúnmente en bacterias. Su función principal es la captura y la expresión de genes, los cuales están especialmente asociados con la resistencia a antibióticos. Esta función está mediada por el gen llamado “integrasa”, la cual es la responsable de la recombinación del ADN. La tecnología CRISPR ha demostrado ser una herramienta poderosa para la edición

genética precisa. Este proyecto propone el uso de CRISPR para modificar el gen de la integrasa de los integrones encontrados en un *dataset* del género *Shewanella*.

2) Hipótesis de Trabajo y Resultados Esperados.

Hipótesis: Dado que la tecnología CRISPR ha demostrado ser eficaz para la edición genética precisa, se plantea que el uso de CRISPR/Cas9 específicamente dirigido al gen de la integrasa en integrones de bacterias del género *Shewanella* puede resultar en la interrupción o desactivación de la función de recombinación de ADN de la integrasa. Se hipotetiza que al modificar el gen de la integrasa, se reducirá la capacidad de los integrones para capturar y expresar genes asociados con la resistencia a antibióticos en las bacterias de este género.

Resultados esperados: Se espera demostrar la capacidad de la tecnología CRISPR/Cas9 para dirigirse con precisión al gen de la integrasa de los integrones encontrados en *Shewanella*, evidenciando la capacidad de editar este gen de manera específica. Asimismo, se espera observar una disminución en la capacidad de los integrones modificados para realizar la recombinación del ADN, demostrando así la influencia de la edición genética en la función de la integrasa, y se espera una reducción en la expresión de genes asociados con la resistencia a antibióticos en las bacterias de *Shewanella* portadoras de integrones editados.

3) Desarrollo y Diseño del Software: Metodología Experimental:

1. Se crear un módulo “BD*Shewanella*” en python que tendrá como objetivo la descarga automática de un *dataset* de secuencias nucleotídicas de integrasas de integrón encontradas en *Shewanella* del NCBI.
2. Se creará un módulo “AM*Shewanella*” que tendrá como objetivo realizar un alineamiento múltiple, usando clustal Omega y/o MAFFT para conocer las regiones conservadas.
 - 2.1 Se desarrollarán funciones para graficar las regiones conservadas.
 - 2.2 Se desarrollarán funciones para la construcción de Árboles Filogenéticos para visualizar las relaciones evolutivas entre las secuencias de integrasas.
 - 2.2.1 Se incluyen funciones para ingresar y alinear una nueva secuencia e incluirla en el árbol filogenético de secuencias conocidas.
 - 2.3 Se desarrollarán funciones para crear Modelos Ocultos de Markov (HMMer): Se aplicará HMMer para caracterizar patrones en las secuencias de integrasas, facilitando la identificación de sitios de edición CRISPR/Cas9.

3. Se creará un módulo “*VisionShewanella*” tendrá como objetivo el análisis estructural con NGLVIEW y/o PyMOL u otro visualizador de pdb y analizar las estructuras tridimensionales de integrasas y predecir cambios post-edición CRISPR.
4. Se creará un módulo “*GuiasShewanella*” tendrá como objetivo el diseño de las guías CRISPR, utilizando métricas y librerías de diseño para mejorar las más posibles. En base a las regiones conservadas se evaluarán los posibles objetivos blanco.
5. Se creará un módulo “*PrimersShewanella*” que tendrá como objetivo el diseño de secuencias primer para identificar los blancos antes y después de editar.
6. Se creará un módulo “*IAShewanella*” tendrá como objetivo desarrollar modelos de machine learning. En primera instancia se utilizarán Árboles de Decisión: Utilizar árboles de decisión para predecir los efectos de las ediciones CRISPR en la función de las integrasas y en la resistencia a antibióticos, basándose en los datos de las secuencias y las características filogenéticas.
7. Se creará un módulo “*GuiShewanella*” el cual tendrá como objetivo interactuar con el usuario y llamar a los demás módulos.
8. Se crearán diagramas de sistema, y manuales de usuario, se utilizará repositorio versionados, y se registraran los derechos de autor de la obra de software.

4) Diseño Experimental y Metodología:

- Se cultivarán las bacterias de *Shewanella* que albergan integrones y se realizará la transformación con las células que albergan el sistema CRISPR/Cas9 diseñado para apuntar al gen de la integrasa.
- Verificación de la edición mediante secuenciación, por lo cual es necesario el diseño de primers.
- Se realizarán ensayos específicos para evaluar la capacidad de la integrasa para llevar a cabo la recombinación del ADN.
- Se evaluará por qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) la expresión de gen de la integrasa y del gen de resistencia adyacente al gen (*intl*).
- Se realizarán pruebas de sensibilidad a antibióticos a las células editadas y wild-type.

5) Citas Bibliográficas:

- Hall, R.M. Integrons and gene cassettes: Hotspots of diversity in bacterial genomes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2012, 1267, 71–78.

- Messier, N.; Roy, P.H. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 6699–6706.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2023. Antibiotic resistance threats in the United States, 2023. CDC, Atlanta, Georgia.
- Deng W, Shi X, Tjian R, Lionnet T, Singer RH. 2015. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11870 –11875.
- Li, Q., Zhao, P., Li, L., Zhao, H., Shi, L., & Tian, P. (2020). Engineering a CRISPR Interference System To Repress a Class 1 Integron in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(3), e01789-19.