

## SIGUIENDO LA PISTA

### Aplicación de la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 para la generación de grandes deleciones en el genoma de *Streptomyces rimosus*

Carmen Díez Acedo<sup>1</sup> ; Alen Pšeničnik<sup>2</sup> ; Hrvoje Petković<sup>3</sup>

Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Graduada de Biotecnología (promoción 2018-2022). Departamento de “Food biotechnology”, Universidad de Ljubljana (Eslovenia).

1. [cdiezo3@estudiantes.unileon.es](mailto:cdiezo3@estudiantes.unileon.es) ; 2. [alen.psenicnik@bf.uni-lj.si](mailto:alen.psenicnik@bf.uni-lj.si);

3. [hrvoje.petkovic@bf.uni-lj.si](mailto:hrvoje.petkovic@bf.uni-lj.si)

#### Resumen

Mediante la aplicación de la técnica de CRISPR-Cas9 se ha conseguido la deleción de fragmentos de ADN de 245 kpb a 450 kpb del cromosoma de la cepa productora de oxitetraciclina, *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. Estas deleciones afectaron a la misma región de un extremo del cromosoma que, según el análisis bioinformático, contiene varios agrupamientos genéticos que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios. La generación de grandes deleciones en esta parte del cromosoma de *S. rimosus* probablemente hará que las cepas modificadas sean más robustas, reduciendo de esta forma la inestabilidad morfológica y genética. Para ello, mediante diferentes procedimientos de clonación se ensamblaron 3 construcciones en *Escherichia coli* de plásmidos que contenían la maquinaria CRISPR-Cas9, para posteriormente ser introducidas independientemente en *S. rimosus* usando técnicas de conjugación, para conseguir las deleciones correspondientes. A pesar de las grandes deleciones generadas, los clones modificados de *S. rimosus* seguían manteniendo la morfología de la cepa original de referencia, pudiendo representar atractivas factorías de células microbianas para la producción de diferentes metabolitos.

#### Palabras clave

Antibióticos, CRISPR-Cas9, grandes deleciones, *Streptomyces*.

#### Introducción

##### Género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece a la familia *Streptomycetaceae*. Esta familia pertenece al filo *Actinobacteria* y en el orden recientemente renombrado *Streptomycetales* (Kämpfer, 2015). El género *Streptomyces* es el único miembro de la familia *Streptomycetaceae* (Hasani *et al.*, 2014), con bacterias Gram-positivas con un alto valor de G+C en genoma (aproximadamente 70 %) y capaces de crecer en ambientes aeróbicos. Las especies de *Streptomyces* son bacterias quimioorganotróficas y filamentosas que se encuentran en los mismos hábitats que un amplio rango de hongos, y presentan una similitud morfológica macroscópica con estos últimos (Hasani *et al.*, 2014).

Los representantes de *Streptomyces* son los principales productores de metabolitos secundarios, actuando estos en muchos casos como agentes antibac-

terianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, antitumorales o inmunosupresores (Bekiesch *et al.*, 2016); sus miembros se caracterizan por poseer un gran cromosoma lineal de un tamaño aproximado entre 8-10 mega-pares de bases (Mpb), y parte de su información genética está codificada en plásmidos lineales o circulares (Gravius *et al.*, 1994).

### Streptomyces rimosus

*Streptomyces rimosus* ATCC 10970 es una actinobacteria filamentosa utilizada para la producción del antibiótico oxitetraciclina. *S. rimosus* tiene un gran cromosoma lineal con numerosos agrupamientos genéticos largos repetidos, y un único plásmido lineal gigante. El cromosoma de *S. rimosus* tiene una organización genética compleja con una región central de genes conservados flanqueada por brazos cromosómicos variables. El cromosoma de *S. rimosus* ATCC 10970 tiene un tamaño aproximado de 8,6 Mpb, y un 72 % de G+C en su DNA (Petković *et al.*, 2006).

### Grandes deleciones del genoma

Las deleciones del genoma de ciertas bacterias pueden incidir en la reducción de la carga metabólica bacteriana, incrementándose de esta forma la producción de metabolitos secundarios, como se ha descrito en el caso de *S. rimosus* y el antibiótico oxitetraciclina (Bu *et al.*, 2020). El cromosoma de *S. rimosus* presenta una región central (*core*), donde se encuentran los genes esenciales para las funciones básicas para la viabilidad bacteriana y los brazos izquierdo y derecho donde se encuentran, entre otros, los agrupamientos genéticos prescindibles (Bu *et al.*, 2019). En los extremos de los brazos se pueden encontrar los agrupamientos (*clusters*) genéticos de biosíntesis (BGCs), encargados de la síntesis de antibióticos u otros metabolitos secundarios.

### CRISPR-Cas9

Las bacterias presentan en muchos casos sistemas de inmunidad innata (enzimas de restricción) descrito hace medio siglo, y adaptativo basado en el recientemente descrito sistema CRISPR-Cas9. Este último protege a las bacterias/arqueas del acceso de ácidos nucleicos extraños, que pudiera recombinar con el propio (Zhang, 2019). El proceso de actuación de este sistema se divide en 3 pasos:

- Adaptación: se produce la infección del virus, que introduce su material genético. Este material es detectado y algunas proteínas del sistema CRISPR lo integran en el genoma del procarionte.
- Expresión: cuando se produce una nueva infección, la secuencia CRISPR se expresa.
- Interferencia: si se detecta material genético extraño, es eliminado y cortado por las nucleasas Cas9.

### CRISPR-Cas9 como técnica de edición genética

Lo que realmente nos interesa del sistema CRISPR-Cas9 es su capacidad

de edición; para ello es necesaria la nucleasa Cas9, que escinde las dos cadenas de DNA, y el RNA guía, que dirige a la enzima al punto de corte deseado. Modificando la secuencia del RNA guía, y haciéndola complementaria al del genoma del procarionta, se pueden realizar diferentes procesos de edición (Thurtle-Schmidt y Lo, 2018).

Una vez realizado el corte en la doble hebra, se lleva a cabo el proceso de reparación, que puede ser mediante (i) una recombinación homóloga, en la cual se incluyen las regiones de homología UP y DOWN en el plásmido, para que el DNA se repare de forma correcta, o (ii) por recombinación no homóloga, que no usa molde y, por tanto, se repara al azar produciendo inserciones y deleciones.

Este trabajo fue desarrollado durante mi estancia en la Universidad de Ljubljana (Eslovenia), bajo la supervisión y dirección del Profesor Hrvoje Petković, director del Departamento de biotecnología alimentaria (*food Biotechnology*) en colaboración con el Dr. Alen Pšeničnik.

### Hipótesis y objetivo

La hipótesis de este trabajo afirma que es posible la delección de grandes fragmentos (de más de 100 kpb) en *S. rimosus* mediante la aplicación del sistema CRISPR-Cas9. Para ello, se elimina una parte importante del brazo cromosómico izquierdo que contiene los BGCs.

En este caso, se propone realizar 3 deleciones de tamaños diferentes, donde la delección avanza hacia el extremo 5' del brazo izquierdo. De esta forma, la región de aguas abajo (3'-DOWN) de homología es siempre la misma, y las regiones aguas arriba (5'-UP) cambian en función del tamaño. El tamaño de las deleciones propuestas sería de 245, 350 y 450 kpb.

### Material y métodos

Para llevar a cabo las deleciones del genoma se construyeron 3 plásmidos recombinantes diferentes, con idéntica región de homología 3'-DOWN, siendo variables las regiones 5'-UP y la secuencia de RNA guía en cada plásmido.

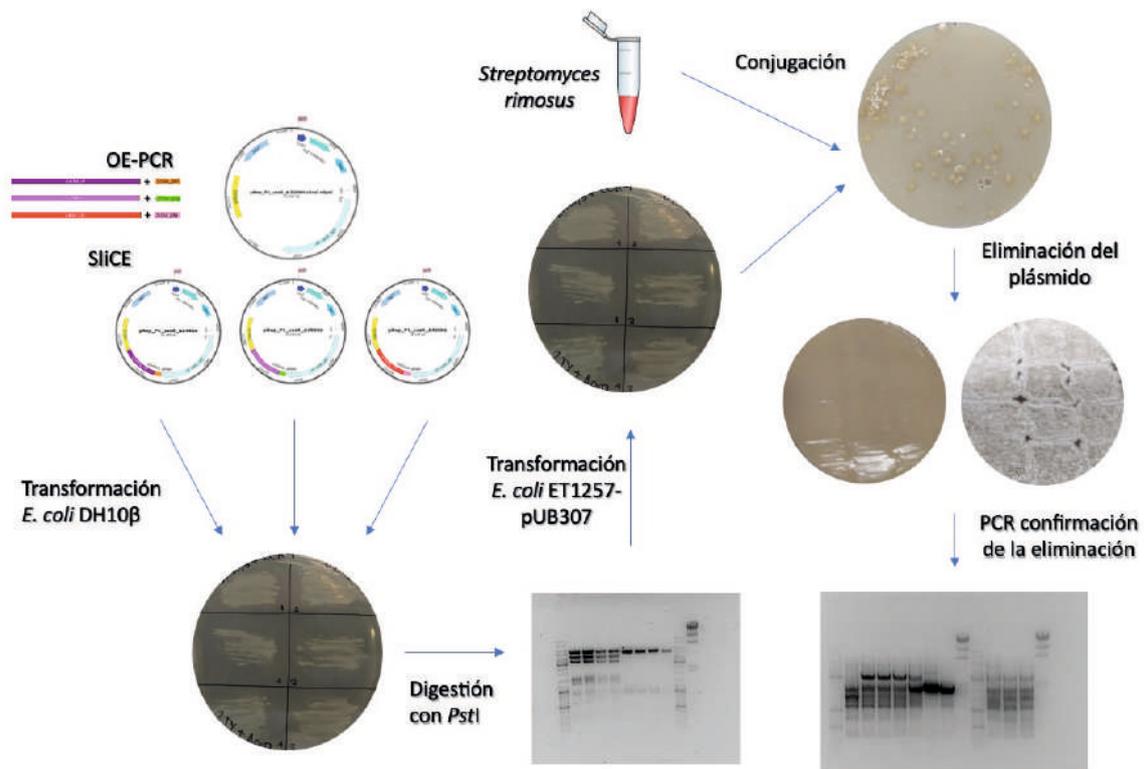
Las 3 construcciones plasmídicas fueron usadas para transformar las cepas de *Escherichia coli*, seleccionando los clones recombinantes y transfiriendo los plásmidos de forma individual a la cepa de *S. rimosus* mediante sistemas conjugativos. Como último paso, se confirma la delección en las cepas de *S. rimosus* mediante reacciones de PCR (**Fig. 1**).

### Resultados

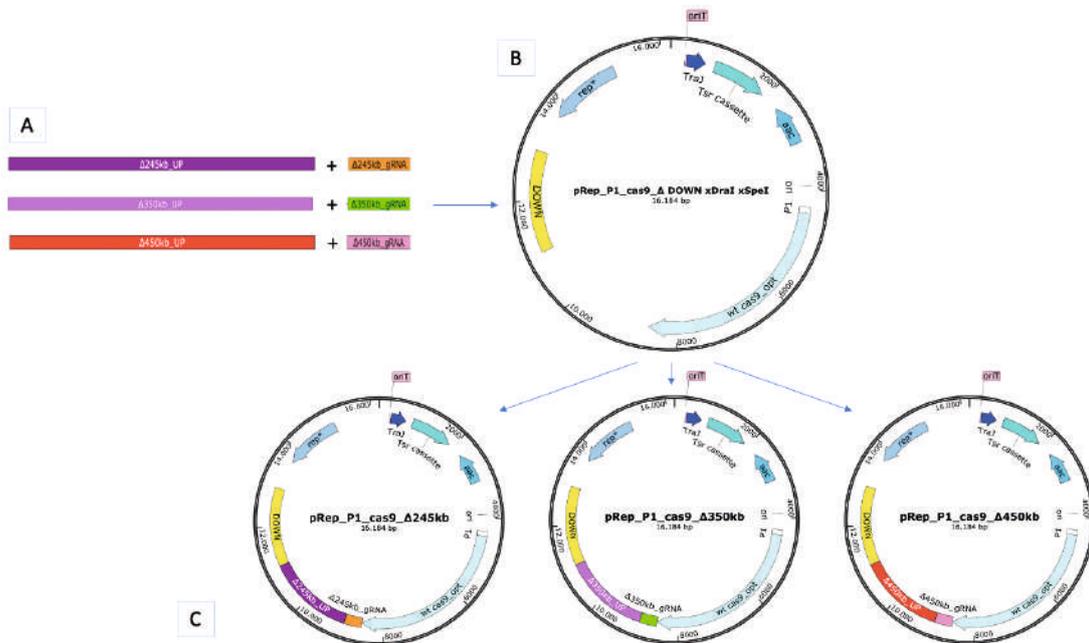
#### Clonación y construcción de los plásmidos

El primer paso fue la construcción y ensamblaje de los plásmidos recombinantes (**Fig. 2**).

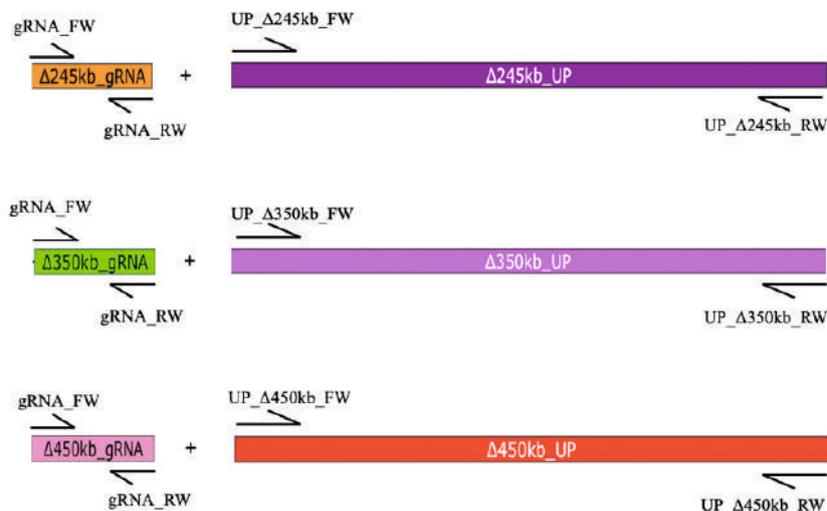
Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de las diferentes regiones de homología UP, así como las secuencias de RNA guía específicas (**Fig. 3**).



**Figura 1.** Esquema general del experimento.



**Figura 2.** **A.** Ensamblaje de la región de homología UP, y las correspondientes guías RNAs (de arriba a abajo:  $\Delta$ 245kbp,  $\Delta$ 350kbp y  $\Delta$ 450kbp). **B.** Plásmido pRep\_P1\_cas9\_ΔDOWN digerido con las enzimas *Dra*I y *Spe*I. **C.** Los plásmidos ensamblados para las diferentes deleciones (de izquierda a derecha: 245, 350 y 450 kpb).



**Figura 3.** Esquema de la amplificación de las regiones UP (parte derecha) y regiones de RNA guía (parte izquierda), para cada uno de los plásmidos (de arriba hacia abajo: 245 kpb, 350 kpb y 450 kpb).

El siguiente paso consistió en la unión de los fragmentos amplificados para UP y para el RNA guía, para cada uno de los 3 plásmidos. Para esto, se llevó a cabo una PCR de fusión, donde los *primers* de los extremos (FW de la guía y RW de secuencia UP) se añadieron una vez iniciada la reacción (**Fig. 4**).



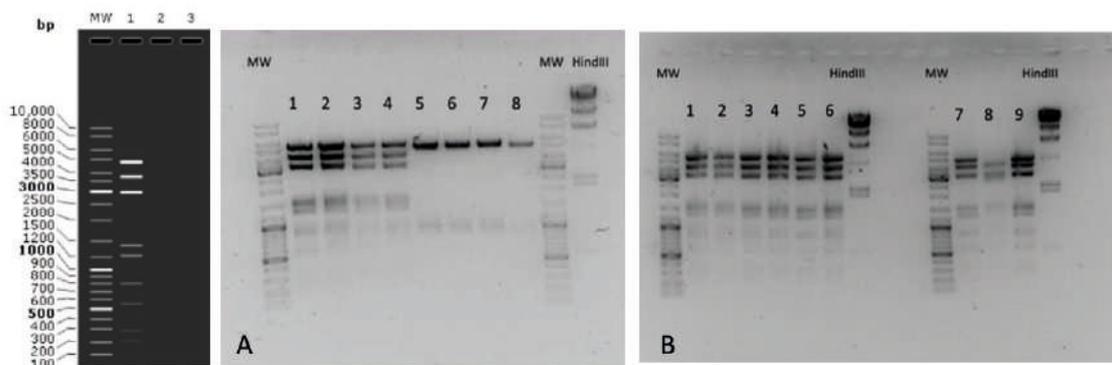
**Figura 4.** Esquema de los fragmentos obtenidos de la PCR de fusión (de arriba hacia abajo: 245 kpb, 350 kpb y 450 kpb).

Una vez obtenidos los fragmentos obtenidos en la PCR de fusión, se llevó a cabo una reacción “SliCE” para provocar la recombinación con el plásmido base, idéntico en los tres casos, que posee la región de homología DOWN. Este plásmido base procede de un plásmido recombinante que fue previamente digerido con las enzimas de restricción *DraI* y *SpeI*.

La mezcla de la reacción se usó individualmente (3 ensayos) para transformar las cepas de *E. coli* DH10B, para posteriormente seleccionar y verificar el correcto ensamblaje de los plásmidos recombinantes.

#### Verificación y ensamblaje de los plásmidos.

La verificación/ensamblaje de los plásmidos se llevó a cabo mediante la digestión con la enzima de restricción *Pst*I. 8 plásmidos procedentes de otros tantos clones en el ensayo de 245-kpb fueron aislados y digeridos con la enzima *Pst*I, (**Fig. 5A**), de forma que únicamente los 4 primeros fueron ensamblados de manera correcta. Por otro lado, los 6 plásmidos para la delección de 350-kpb fueron satisfactoriamente ensamblados (**Fig. 5B**), mientras que en el caso de los plásmidos para la delección 450-kpb únicamente 2 de ellos fueron correctos.

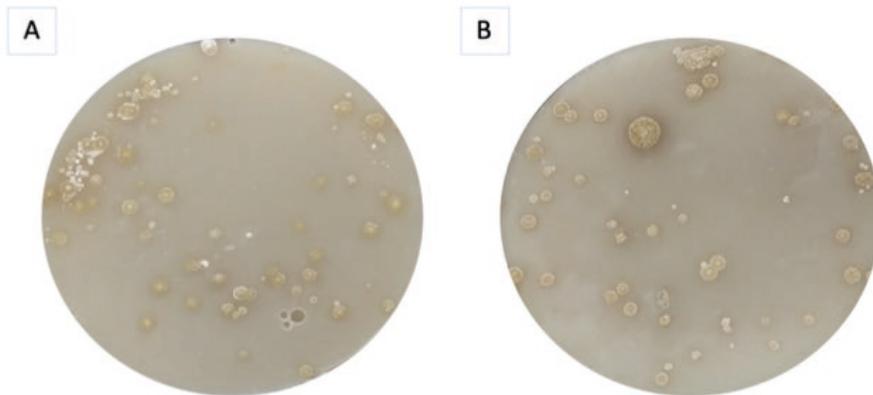


**Figura 5.** Patrón de restricción previsto de los plásmidos tras la reacción de restricción *Pst*I (carril 1); MW (marcador de tamaño de peso molecular). **A.** Electroforesis en gel de agarosa para plásmidos de delección 245-kpb, aislados de transformantes individuales (de 1 a 8), digeridos con *Pst*I. **B.** Ensayo con plásmidos para delecciones de 350-kpb (del 1 al 6), y 450-kpb (del 7 al 9), digeridos con *Pst*I.

#### Transferencia del plásmido por conjugación

Los plásmidos que fueron correctamente ensamblados aislados de *E. coli* DH10B, se usaron para transformar la cepa *E. coli* ET12567-pUB307 por electroporación; esta última es capaz de transferir los plásmidos indicados con anterioridad a cepas de *S. rimosus* por electroporación.

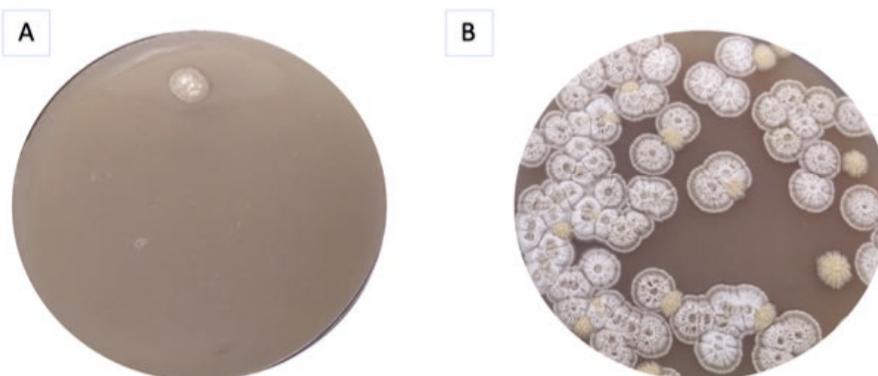
En la conjugación, *S. rimosus* (actuando como receptora) acepta el plásmido y lo integra en su genoma para proceder a la delección de los diferentes fragmentos. La selección de los transconjugantes correctos se realiza por selección con tioestreptona y ácido nalidíxico para eliminar las colonias donadoras de *E. coli* (**Fig. 6**).



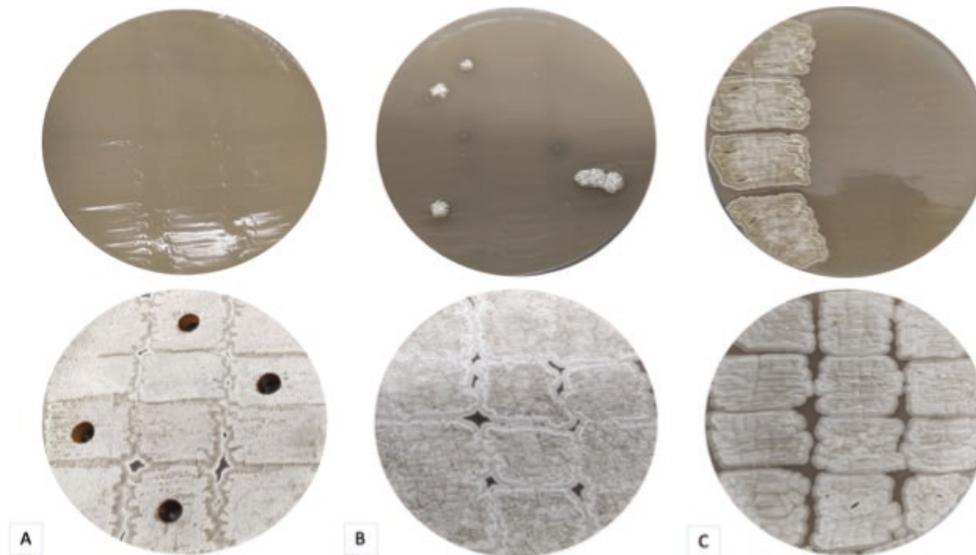
**Figura 6.** Selección en medio SM + MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> de transconjugantes con el plásmido para la delección 450-kpb. **A.** Extensión de 100  $\mu$ L de la mezcla de conjugación; **B.** Con 200  $\mu$ L de la mezcla de conjugación.

#### Proceso de subcultivo

La eliminación del plásmido se llevó a cabo mediante sistemas de subcultivo. Para ello, se realizaron dos pases (subcultivos) en medio TSB líquido sin antibiótico. Tras esos pases, el último cultivo se sembró en medios SM y SM+Tio (Fig. 7). El último paso del proceso de subcultivo se basa en la técnica de *replica plating*, donde se siembra la misma colonia en un medio sin- y con- antibiótico (Fig. 8). En el ensayo las colonias que crecieron en el medio con antibiótico fueron descartadas (el plásmido usado en delección seguía integrado: gen para Tio<sup>r</sup>, sin ser eliminado).



**Figura 7.** Cultivos diluidos de los transconjugantes de *S. rimosus* + el plásmido de la delección 350-kpb, después del proceso de subcultivo. Dilución 10<sup>-6</sup> de los subcultivos crecidos en: **A.** Medio SM+Tio. **B.** Medio SM.

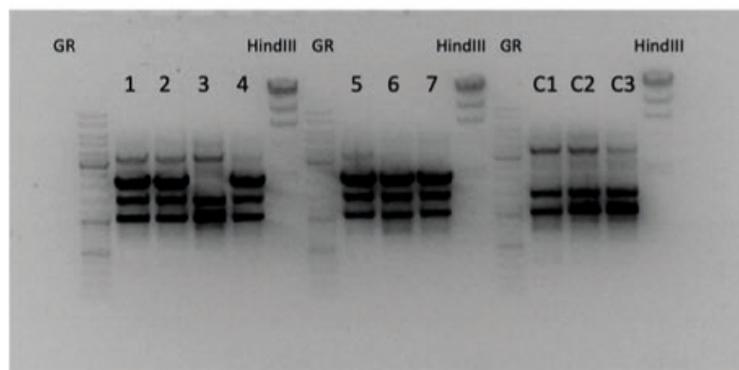


**Figura 8.** Técnica de *replica plating* de transconjugantes de *S. rimosus*. Fila superior: medio SM+Tio; Fila inferior: medio SM. **A.** Clones con plásmido para la deleción 245-kpb. **B.** Clones con plásmido para 350-kpb. **C.** Clones con plásmido para 450-kpb.

#### Confirmación de la deleción

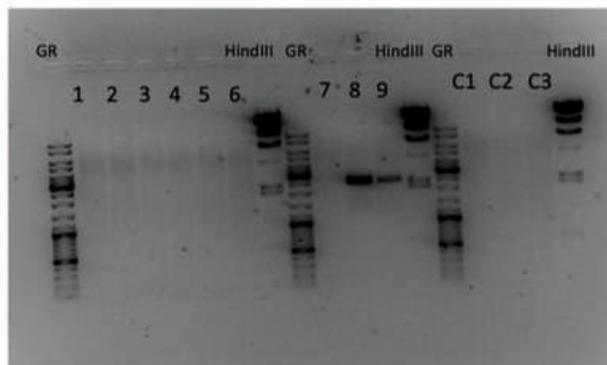
Para confirmar las deleciones existentes en los diferentes clones, se llevó a cabo el aislamiento de las colonias que habían eliminado correctamente los plásmidos, y posteriormente se llevó a cabo una reacción de amplificación por PCR.

Respecto a la deleción de 245-kpb, todos los amplicones, menos el tercero, habían delecionado correctamente la región deseada, debido a que presentan una banda de 2334-pb esperada después de la deleción. Sin embargo, la muestra 3 presenta una apariencia similar a los controles (**Fig. 9**).



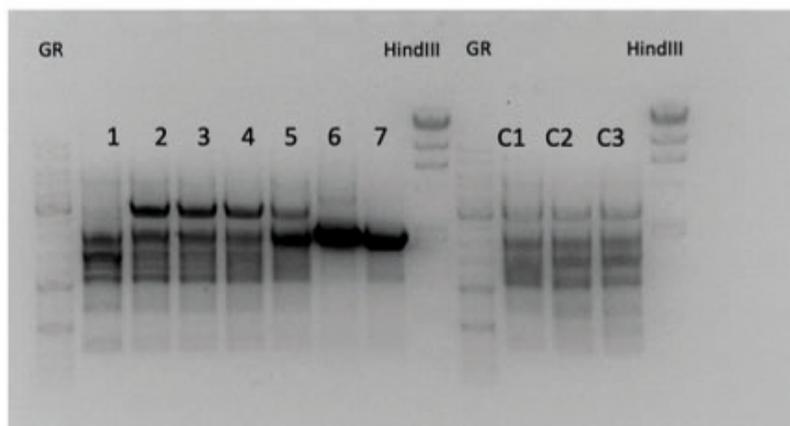
**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa de la confirmación por PCR de la deleción de 245-kbp. Del 1 al 7 se cargaron las diferentes muestras de genoma de las cepas *S. rimosus* ATCC 10970. C1, C2 y C3 son los controles correspondientes al genoma no editado de la bacteria (silvestre: *Wild Type*).

Por otra parte, en el caso de la delección de 350-kpb, únicamente dos de las muestras consiguieron eliminar correctamente la región, al presentar una banda de 2356-pb esperada para esa delección (**Fig. 10**).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de la confirmación por PCR de la delección de 350-kpb. Del 1 al 9, se cargaron las diferentes reacciones de PCR de las cepas *S. rimosus* ATCC 10970. C1, C2 y C3 son los controles correspondientes al genoma no editado de la bacteria (WT).

Con respecto a la delección de 450-kpb en los clones transconjugantes obtenidos, únicamente los dos últimos amplicones han sido exitosos al eliminar la región esperada del genoma, al presentar una banda de 2042-pb (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de la confirmación por PCR de la delección de 450 kbp. Del 1 al 7, se cargaron las diferentes reacciones de PCR de las cepas *S. rimosus* ATCC 10970. C1, C2 y C3 son los controles para clones con genoma no editado.

## Discusión y conclusiones

El sistema CRISPR-Cas9 fue descubierto en un elevado número de procariontas (bacterias y arqueas) frente a los desafíos virales (fagos), usando un sistema equivalente a la inmunidad adquirida en los sistemas animales. La aplicación de

esta herramienta en el campo de la biología molecular está siendo determinante en diferentes ámbitos como la sanidad (terapia génica, ensayos preclínicos, etc.), en diagnóstico, con técnicas para la identificación de agentes patógenos (e.g. de coronavirus), o en otras aplicaciones biotecnológicas como la generación de fármacos nuevos o en el incremento en la producción de antibióticos ya presentes en cepas bacterianas. El enfoque de esta última aplicación ha llevado a la utilización de CRISPR-Cas9 en los procesos de biología sintética, integrando la biología molecular con la biología de sistemas. Un abordaje sencillo de esto último consiste en la modificación de la dotación genética de representantes de *Streptomyces*, el principal productor de antibióticos bacteriano; uno de los abordajes basado en la delección de fragmentos cromosómicos de gran tamaño de agrupamientos genéticos (no esenciales) implicados en el metabolismo secundario y no directamente vinculado a la producción del antibiótico diana, está resultando prometedor en *S. rimosus*. Su aplicación en este trabajo nos permite generar las siguientes conclusiones:

CRISPR-Cas9 es un método eficaz para crear delecciones a gran escala y con ello reducir el genoma en *Streptomyces rimosus*.

La eficacia del método depende del tamaño de la región del genoma eliminada, siendo más difícil la eliminación de segmentos más grandes.

La nucleasa Cas9 parece tener cierta toxicidad en *S. rimosus*, lo cual se relaciona con el bajo número de transconjugantes obtenidos y la rápida pérdida del plásmido de las cepas, cuando carecían de presión selectiva.

### Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al profesor Luis Mariano Mateos Delgado (Universidad de León) que revisó la última versión de mi Trabajo Fin de Grado. A Marata, Miki, Sara, Belén, Elena, Pechu y Roberto (<3), y a todas las personas que he conocido durante mi estancia Erasmus que han hecho que esta experiencia sea inolvidable, y han hecho que todo sea mucho más fácil. Y, por último, a mi familia que siempre me apoya.

### Bibliografía

- Bekiesch, P., Basitta, P. y Apel, A. K. 2016. Challenges in the heterologous production of antibiotics in *Streptomyces*. *Archiv der Pharmazie*, 349(8):594–601.
- Bu, Q. T., Li, Y. P., Xie, H., Wang, J., Li, Z. Y., Chen, X. A., Mao, X. M. y Li, Y. Q. 2020. Comprehensive dissection of dispensable genomic regions in *Streptomyces* based on comparative analysis approach. *Microbial Cell Factories*, 19(1):99.
- Bu, Q. T., Yu, P., Wang, J., Li, Z. Y., Chen, X. A., Mao, X. M. y Li, Y. Q. 2019. Rational construction of genome-reduced and high-efficient industrial *Streptomyces* chassis based on multiple comparative genomic approaches. *Microbial Cell Factories*, 18(1):16.
- Gravius, B., Glocker, D., Pigac, J., Pandza, K., Hranueli, D. y Cullum, J. 1994. The 387 kb linear plasmid *pPZG101* of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. *Microbiology*, 140(9):2271–2277.

- Hasani, A., Kariminik, A. y Issazadeh, K. 2014. Archive of SID *Streptomyces*: characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1):63–75.
- Kampfer, P. 2015. Streptomycetales ord. nov. En *Bergey's Manual of Archaea and Bacteria*, 1-1.
- Petković, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Perić-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D. y Long, P. F. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3):704–728.
- Thurtle-Schmidt, D. M. y Lo, T. W. 2018. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2):195–205.
- Zhang, F. 2019. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 52:e6.