



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Generación de mutantes de *Streptomyces
mobarraensis* en el gen del pre péptido de la
ciclotiazomicina, por medio del sistema
CRISPR-Cas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

RAQUEL NERI BARRANCO



DIRECTOR DE TESIS:

DR. LORENZO P. SEGOVIA FORCELLA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos de sinodales

Datos del tutor

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología, UNAM

Sinodal 1

Presidente

Dr. Luis Servín González

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Sinodal 2

Vocal

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Facultad de Ciencias, UNAM

Sinodal 3

Q. Viviana Escobar Sánchez

Facultad de Ciencias, UNAM

Sinodal 4

Dr. Ismael Hernández Lucas

Instituto de Biotecnología, UNAM

La vida sin controles no tiene sentido

没有控制的生活没有意义

Proverbio chino

Agradecimientos

Gracias Rose, Ani, Nachi y Rastrillo. Mamá, siempre has sido mi ejemplo a seguir, ejemplo de lucha constante, de determinación, de sacrificios y de amor. Gracias por tu apoyo constante, por escucharme en mis buenos y malos momentos y gracias por la vida que me has dado, todo lo que soy es gracias a ti. Ani y Nachi, la vida sería otra sin ustedes, siempre me inspiran a dar lo mejor de mí, su hambre de éxito, cada obstáculo que vencen y cada reto que cumplen es mi motivación para seguir empujando en la vida adulta, los amo. Papá, gracias por la vida que me has dado, por haberme transmitido el espíritu viajero y por tu apoyo perpetuo.

Gracias Lorenzo, por haberme dado un lugar en tu laboratorio y por haberme recibido con ese carisma que te caracteriza. También por haberme asignado un proyecto interesante con el cual trabajar, por tu asesoría siempre sabia en este proyecto y en la vida en general, y por hacer del laboratorio un lugar menos cuadrado y rígido que el resto del Instituto. Gracias Iris por haberme introducido al mundo de *S. mob* y del laboratorio, por todo tu apoyo a lo largo del proyecto y por las aportaciones y correcciones a mi tesis. Gracias Mabel, por tu siempre cálida recepción cada vez que te preguntaba algo y por haberme salvado dos que tres veces en cosas en las que llevaba atorada mucho tiempo. Gracias M. en C. Blanca Ramos y Dra. Claudia Martínez por su apoyo en la realización de este proyecto. En general, gracias al laboratorio 12 por su agradable compañía y porque desde el principio me hicieron sentir bienvenida.

Gracias a los miembros del jurado por haberse tomado el tiempo de leer mi tesis y hacer aportaciones y correcciones acertadas y de mucho valor. Gracias en particular a Ismael y a Viviana, porque sus correcciones en particular me hicieron reflexionar sobre mi tesis.

Gracias UNAM, por haberme brindado educación de alto nivel gratuita, por haberme proporcionado tantas oportunidades y por dejarme pertenecer a esta gran comunidad. Gracias a la Facultad de Ciencias por la formación científica y humanitaria que me dieron. Gracias a mis profesores de la facultad por tan excelentes lecciones académicas y de vida, en particular gracias Alejandro Frías por haberme dado el valor de tomar Cálculo y por tu apoyo aún después de haber tomado bioestadística. Gracias Dr. José Luis Puente por dirigir el taller y permitirnos hacer investigación en un lugar de gran alcance como lo es el IBt.

Gracias a mis amigos tallerines por haber hecho de Cuernavaca un lugar soportable y más bien divertido: Alfredo, Juan José, Raúl, Pao, Abraham y Mishel (aunque no seas tallerina). Gracias a mis amigos de la facultad Samuel, Jonás, Stella, Karla, Johnny, Coffeen, Diego, Zoar, Oscar, por haber hecho de la facultad un lugar más divertido. Gracias Miguel por llegar a mi vida, estar conmigo y alegrar mis días con tu sonrisa y elocuencia.

CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1 <i>Streptomyces</i>	9
3.1.1 <i>Streptomyces mobaraensis</i> y la ciclotiazomicina	10
3.2 Edición de genomas	12
3.2.1 CRISPR-Cas	12
3.3 pCRISPomyces-2	18
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	21
7. MÉTODO	22
7.1 Cepas y plásmido	22
7.2 Diseño de sgRNAs	22
7.3 Inserción de sgRNAs en pCRISPomyces-2	23
7.4 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con pCRISPomyces-2-sgRNA-1 y pCRISPomyces-2-sgRNA-2 por choque térmico	24
7.4 Transformación de <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 por electroporación	24
7.5 Amplificación y ligación de secuencia de recombinación	25
7.6 Conjugación	27
7.7 Tamizaje de exconjugantes	28
8. RESULTADOS	29
8.1 Obtención de sgRNAs	29
8.2 Conjugación	30
8.3 Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	31

8.4 Recombinación homóloga (HDR)	32
8.5 Tamizaje de exconjugantes	35
9. DISCUSIÓN	37
9.1 pCRISPomyces-2	37
9.2 Variantes de CRISPR-Cas en <i>Streptomyces</i>	39
9.3 sgRNAs	41
9.4 Toxicidad Cas9	44
10. CONCLUSIONES	45
Perspectivas	46
Referencias	47
ANEXO	52

1. RESUMEN

El género *Streptomyces* es un grupo de bacterias Gram-positivas, quimioheterótrofas que viven normalmente en suelos, con genomas grandes (>8 Mb), alto contenido de GC y ciclo de vida complejo, que involucra formación de hifas y formación de esporas. Este género de bacterias produce una gran cantidad de metabolitos secundarios que son usados en la industria biotecnológica. En particular, la especie *Streptomyces mobaraensis* produce una molécula de tipo RiPPs (péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post-traduccionalmente, por sus siglas en inglés) llamada ciclotiazomicina a la cual se le ha encontrado actividad antibiótica. Dicha propiedad resulta de gran interés debido a la crisis de resistencia a antibióticos que vivimos actualmente, que consiste en el aumento en la incidencia mundial de enfermedades infecciosas que afectan a la población humana y que son incurables con cualquier antimicrobiano conocido. La ciclotiazomicina podría formar parte de la ola de antibióticos nuevos, sin embargo, para que esto suceda, primero tiene que ser caracterizada de forma que se puedan crear variantes con actividad mejorada. Una de las aproximaciones para llevar a cabo lo anterior es por medio de mutaciones y hoy en día el sistema CRISPR-Cas, ha funcionado en varios organismos como la técnica más novedosa y fácil de aplicar para realizar mutagénesis. Por medio de la proteína Cas9 y el sgRNA, se lleva a cabo un corte de doble cadena localizado en la región del genoma que se desea mutar. Después el DNA es reparado por medio de unión de extremos no homólogos o recombinación homóloga, a través de los cuales se introducen mutaciones a la secuencia original. En este trabajo se utilizó el plásmido pCRISPOmyces-2 como vector del sistema CRISPR-Cas específico para *Streptomyces*. Se evaluaron los dos métodos de reparación del corte de doble cadena y con ninguno de los dos se obtuvieron mutantes, lo que indica que a pesar de que el sistema de edición CRISPR-Cas conceptualmente representa una forma fácil y rápida de realizar mutaciones, aún se necesitan más pruebas de estandarización para poder implementarlo de forma efectiva en *S. mobaraensis*.

2. ABSTRACT

The *Streptomyces* genus, is a group of Gram-positive, soil chemoheterotrophic bacteria, with genomes (> 8 Mb) with a high GC content and a complex lifecycle comprising hyphae formation and the release of spores. This genus, produces several secondary metabolites, that are used in the biotechnology industry. In particular, *Streptomyces mobaraensis* produces a RiPPs (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides) molecule, called ciclothiazomycin that presents antibiotic activity. Such property, is interesting due to the antibiotic resistance crisis we are currently facing. Ciclothiazomycin could be part of the new generation of antibiotics, nonetheless, it has to be characterized first such that new variants with improved activity can be generated. One of the approaches to obtain variants is by means of the CRISPR-Cas system, since it has worked perfectly in several organisms as the most novel and easiest technology to obtain mutants. Together the Cas9 protein and the sgRNA, cleave the nucleic acid target in a sequence-specific manner. Then the DNA is repaired through non-homologous end joining or homologous recombination, introducing mutations in the original sequence. In the present work, pCRISPOmyces-2 plasmid was used as the CRISPR-Cas vector specific for *Streptomyces*. The results show that by using the CRISPR-Cas system in *Streptomyces* we were unable to obtain mutants in the ciclothiazomycin prepeptide gene. Such that even if the CRISPR-Cas system represents an easy and fast method to obtain mutants, more standardization essays are needed in order to efficiently implement this technique in *S. mobaraensis*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Streptomyces*

El género *Streptomyces* perteneciente al orden *Actinomycetales*, es un grupo de bacterias Gram-positivas, quimioheterótrofas que normalmente habitan diferentes suelos. Poseen genomas mayores a ocho megabases con un contenido alto de guanina y citosina. El ciclo de vida de esta bacteria (Fig. 1) consiste en: germinación de las esporas (A), crecimiento vegetativo (B), erección de hifas aéreas (C), segmentación de esporas y segregación de cromosomas (D), maduración (E) y dispersión de esporas (F) (Bush *et al.*, 2015).

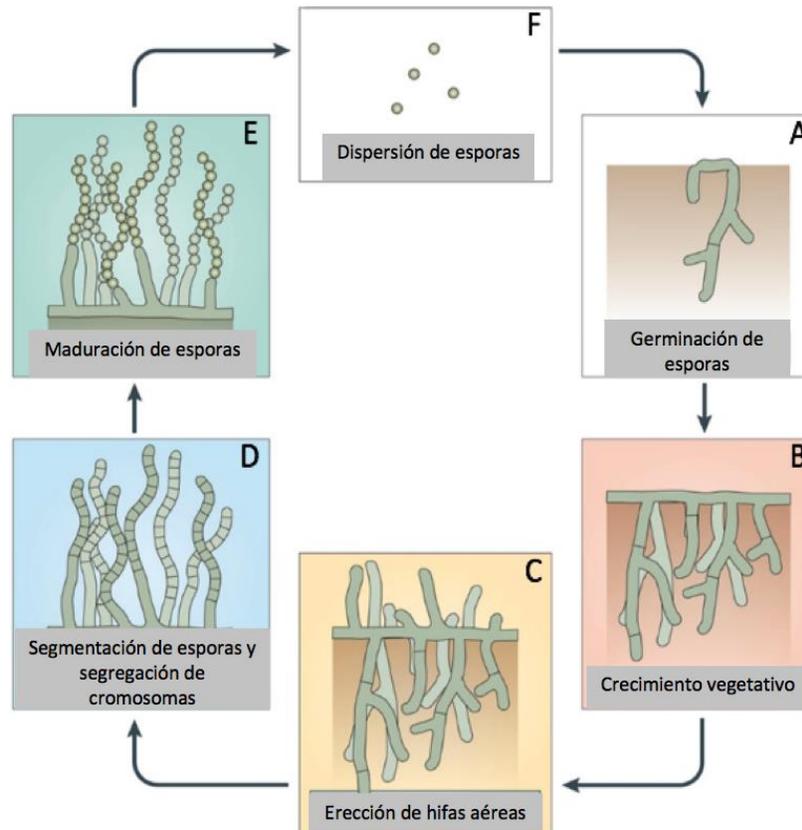


Fig. 1. Ciclo de vida de los *Streptomyces* (modificado de Bush *et al.*, 2015). El ciclo de vida consiste en germinación de esporas (A), crecimiento vegetativo (B), erección de hifas aéreas (C), segmentación de esporas y segregación de cromosomas (D), maduración (E) y dispersión de esporas (F).

Asimismo, este género de bacterias y en general el orden *Actinomycetales*, produce una gran cantidad de metabolitos secundarios que son usados como compuestos bioactivos en la industria biotecnológica. Son la fuente principal de los antibióticos usados clínicamente, así como de otros compuestos utilizados para tratar enfermedades como el cáncer (Medema *et al.*, 2011). Dentro de estas moléculas se encuentran los RiPPs (Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post-traduccionalmente, por sus siglas en inglés). Los RiPPs forman una clase diversa de productos naturales de gran interés debido a la diversidad de estructuras químicas que presentan, así como por sus actividades biológicas potenciales (Skinnider *et al.*, 2016).

3.1.1 *Streptomyces mobaraensis* y la ciclotiazomicina

En particular, la especie *Streptomyces mobaraensis* produce una molécula de tipo RiPPs, llamada ciclotiazomicina. La ciclotiazomicina (Fig. 2) es un tiopéptido que presenta un rango amplio de bioactividad. Los tiopéptidos son péptidos de origen ribosomal, altamente modificados, ricos en azufre y poseen un anillo central de seis lados con nitrógenos en su estructura. La ciclotiazomicina es generada mediante un cluster de genes que contiene el gen del prepéptido de la ciclotiazomicina (*ctm*) con 183 pares de bases (pb), el cual es modificado post-traduccionamente por enzimas contenidas en el cluster dando lugar a la molécula final de la ciclotiazomicina (Just-Baringo *et al.*, 2014). A la ciclotiazomicina se le ha reportado actividad antifúngica, inhibición de la renina (usado como tratamiento para la hipertensión), así como propiedades antibióticas contra bacterias Gram-positivas al inhibir la traducción de proteínas (Cox *et al.*, 2014).

Esta última propiedad antibiótica resulta de gran interés debido a la crisis de resistencia a antibióticos que vivimos actualmente. Varias organizaciones importantes, como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), el Foro Económico Mundial y la Organización Mundial de la Salud, entre otras, han declarado a la resistencia a antibióticos como un “asunto

global de salud pública” (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; World Health Organization, 2014; World Economic Forum, 2018).

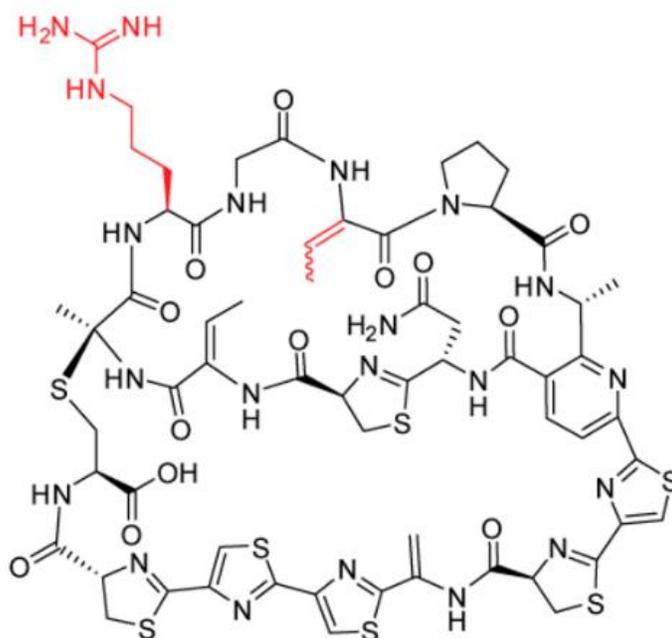


Fig. 2. Estructura de la ciclótiazomicina (Cox *et al.*, 2014). Estructura de la ciclótiazomicina B, sintetizada por *S. mobaraensis*. Las regiones en color rojo representan las diferencias que esta estructura tiene en comparación con la ciclótiazomicina A y C, provenientes de especies diferentes de actinomicetes.

Dicha crisis consiste en el aumento de enfermedades infecciosas que afectan a la población humana y son incurables con cualquier antimicrobiano conocido. La resistencia a antibióticos ha surgido como una respuesta evolutiva de los microorganismos ante el uso indiscriminado de antimicrobianos; asimismo, la globalización ha provocado el esparcimiento de estos patógenos en toda la humanidad (Michael *et al.*, 2014).

La ciclótiazomicina podría formar parte de la ola de antibióticos nuevos, sin embargo, para que esto suceda tiene que ser estudiada, ya que entender la relación estructura-función de la ciclótiazomicina permitirá crear variantes con actividad antibiótica mejorada. Una manera de aproximarse a esto es mediante la edición de

genomas, para crear mutantes de *S. mobaraensis* en el gen *ctm* y en los genes que codifican las enzimas que modifican a la ciclotiazomicina, permitiendo estudiar nuevas variantes.

3.2 Edición de genomas

La edición de genomas es una herramienta ampliamente usada en biología molecular, ya que por medio de esta se puede estudiar el funcionamiento de los genes o insertar nuevas funciones en un organismo. Así, las tecnologías para manipular DNA han permitido grandes avances en la biología desde el descubrimiento de la doble hélice del DNA (Doudna & Gersbach, 2015).

Sin embargo, las modificaciones sitio específicas en los genomas de células y organismos resultan difíciles de llevar a cabo por medio de los métodos tradicionales de recombinación homóloga y vectores lentivirales (Nemudryi *et al.*, 2014). Por tal razón, en la década de los 90s, se generaron varias herramientas que permiten resolver problemas de edición exacta de genomas. Bajo este contexto, usando los principios de reconocimiento proteína-DNA se desarrollaron métodos como las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y las proteínas efectoras de tipo de activador transcripcional fusionadas a nucleasas (TALENs) (Bibikova *et al.*, 2014; Christian *et al.*, 2010). No obstante, estas dos técnicas presentan varias desventajas, ya que se necesita llevar a cabo ingeniería de proteínas cada vez para cada locus en particular, lo cual implica complejidad y costos altos para poder implementarlas (Nemudryi *et al.*, 2014).

3.2.1 CRISPR-Cas

Actualmente, el campo de la biología está experimentando una nueva era en la edición de genomas con el uso del sistema CRISPR-Cas (CRISPR: Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Cas: CRISPR associated), debido a la simplicidad con que opera y a la alta eficiencia funcional obtenida (Doudna & Charpentier, 2014; Nemudryi *et al.*, 2014).

En 1987, un grupo de investigadores japoneses describió en el genoma de *Escherichia coli* una serie de repeticiones palindrómicas interrumpidas por secuencias cortas no repetitivas, a las que denominaron *secuencia espaciadoras* (Ishino *et al.*, 1987). Sin embargo, sólo fue hasta mediados del año 2000 que se comenzaron a estudiar este tipo de secuencias, y se encontraron en los genomas de varias bacterias y arqueas (Mojica *et al.*, 2000). En el 2002, a dichas secuencias se les dio el nombre de CRISPR y también se encontraron cuatro genes asociados que fueron denominados *cas1-cas4*. Una de las proteínas, Cas3, mostró dominios de helicasa de la superfamilia 2, indicando que pertenecía a este grupo de proteínas modificadoras de DNA (Jansen *et al.*, 2002). Se hicieron muchas especulaciones sobre la función de estas proteínas, entre ellas se les atribuyeron roles en reparación de DNA (Chong *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2002).

Un par de años después se descubrió que muchas de estas secuencias no repetitivas coincidían con genes de bacteriófagos, de plásmidos y de DNA cromosomal (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). Dicha evidencia, sumado a que el *locus* CRISPR se transcribía y que los genes *cas* codificaban para proteínas con dominios de helicasa y nucleasa (Bolotin *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002) llevó a proponer que el sistema CRISPR-Cas podría funcionar como un mecanismo de defensa ante invasiones por fagos o plásmidos, de forma que las secuencias CRISPR funcionarían como un tipo de memoria de “invasiones genéticas” pasadas por medio de un mecanismo basado en RNAs de interferencia (Makarova *et al.*, 2006; Pourcel *et al.*, 2005).

En el 2007, Barrangou y colaboradores, demostraron experimentalmente dichas hipótesis. Para esto seleccionaron un modelo fago-hospedero, el cual consistía de una cepa de *Streptococcus thermophilus* silvestre (*wild-type*, WT) sensible a los fagos 858 y 2972. Al exponer la cepa WT de *S. thermophilus* a la infección con el fago 858, con el 2972, o los dos simultáneamente, obtuvieron nueve mutantes resistentes a los fagos, cuyos *loci* CRISPR1 fueron analizados. En los genomas de

las mutantes se habían integrado de una a cuatro secuencias espaciadoras nuevas, junto a los 32 espaciadores ya existentes en la cepa WT. Las secuencias de estas mutantes mostraron similitud con secuencias encontradas dentro de los genomas de los fagos utilizados. Lo anterior reveló que a las cepas de *Streptococcus* que ahora eran resistentes, se les habían insertado fragmentos de secuencias provenientes de los fagos dentro de sus loci CRISPR. De esta forma, se comprobó que las secuencias CRISPR funcionaban como un sistema de inmunidad adquirida.

Los arreglos CRISPR, así como los genes *cas*, pueden variar entre especies microbianas. Sin embargo, la mayoría de los sistemas CRISPR-Cas tienen algunas características conservadas, las cuales se describen a continuación (Sorek *et al.*, 2008). Un locus CRISPR (Fig. 3), consta de un conjunto de genes llamados *cas*, que codifican para proteínas denominadas Cas, las cuales cuentan con dominios de nucleasas, helicasas e integrasas (Jansen *et al.*, 2002; Makarova *et al.*, 2006). A continuación de los genes *cas*, se encuentra una secuencia denominada líder, rica en adeninas y timinas, que puede tener hasta 550 pb. La secuencia líder se localiza en el extremo 5' del arreglo CRISPR, carece de un marco de lectura abierta y actúa como el promotor de la transcripción del arreglo CRISPR. El arreglo CRISPR está compuesto por secuencias repetitivas (24-47 pb) separadas por secuencias cortas denominadas espaciadores (26-72 pb) (Sorek *et al.*, 2008).

El sistema CRISPR-Cas como mecanismo de inmunidad consta de dos pasos principalmente: inmunización e inmunidad (Fig. 4). En la inmunización, por medio de los genes *cas*, el DNA invasor es cortado y una secuencia pequeña resultado de esta fragmentación se inserta como una secuencia espaciadora dentro del arreglo CRISPR. En la inmunidad, los espaciadores se transcriben y llevan a cabo un proceso de maduración para generar crRNAs (CRISPR RNA) individuales, cada uno compuesto por una porción repetida y una porción espaciadora que tiene como blanco el material genético invasor. Después, las proteínas Cas dirigidas por el crRNA, cortan los ácidos nucleicos foráneos en sitios complementarios a la secuencia del espaciador del crRNA (Doudna & Charpentier, 2014).

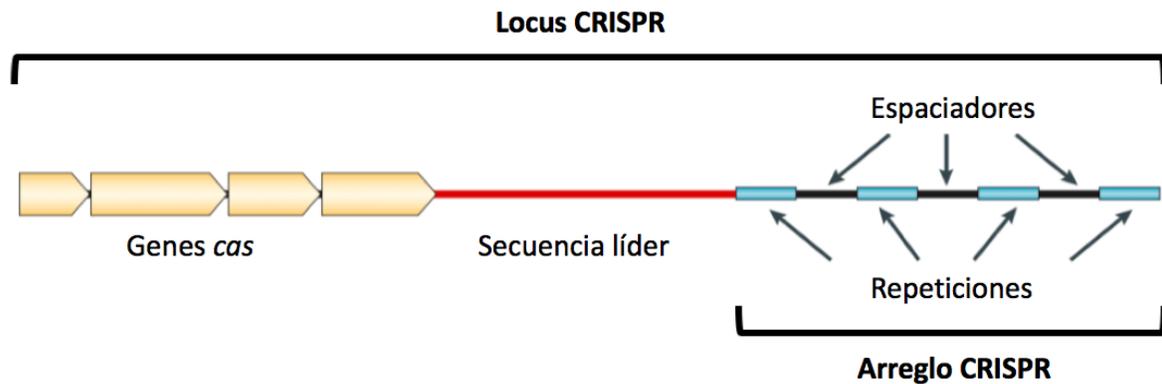


Figura 3. Locus CRISPR (modificado de Sorek *et al*, 2008). Un locus CRISPR está compuesto por los genes *cas*, una secuencia líder en donde se ubica el promotor de la transcripción del arreglo CRISPR y el arreglo CRISPR, con las secuencias espaciadoras intercaladas por secuencias repetidas.

El sistema CRISPR-Cas utilizado hoy en día para editar genomas es el CRISPR-Cas9, proveniente de *Streptococcus pyogenes*. La razón por la cual se ha utilizado preferencialmente este sistema sobre los demás tipos de CRISPR-Cas, es porque es un sistema tipo II, es decir sólo necesita a la proteína Cas9 para llevar a cabo el reconocimiento dirigido por el RNA y posterior corte del DNA. Mientras que los tipos I y III, necesitan más de una proteína Cas para llevar a cabo el reconocimiento y corte del DNA (Doudna y Charpentier, 2014).

La proteína Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9), es una endonucleasa de DNA guiada por un dúplex de RNA, conformado por tracrRNA (trans-activating RNA) y crRNA (CRISPR RNA) para dirigir el corte del DNA. Posteriormente, dicho dúplex se logró unir en una sola molécula denominada sgRNA (small guide RNA), también conocido como RNA guía o gRNA (Doudna y Charpentier, 2014).

Después de reconocer la secuencia blanco del DNA denominada protoespaciador, la proteína Cas9 realiza un corte de doble cadena mediante dos dominios de nucleasa denominados RuvC y HNH, entre 3 a 4 pares de bases río arriba del sitio PAM (Protospacer adjacent motif). El sitio PAM es una secuencia corta que se

encuentra en el DNA que será cortado y es un requisito para el reconocimiento de la secuencia. Cada PAM es diferente según la especie de la cual provenga la Cas9, e.g., SpCas9 reconoce PAMs de tipo NGG (Kleinstiver *et al.*, 2015).

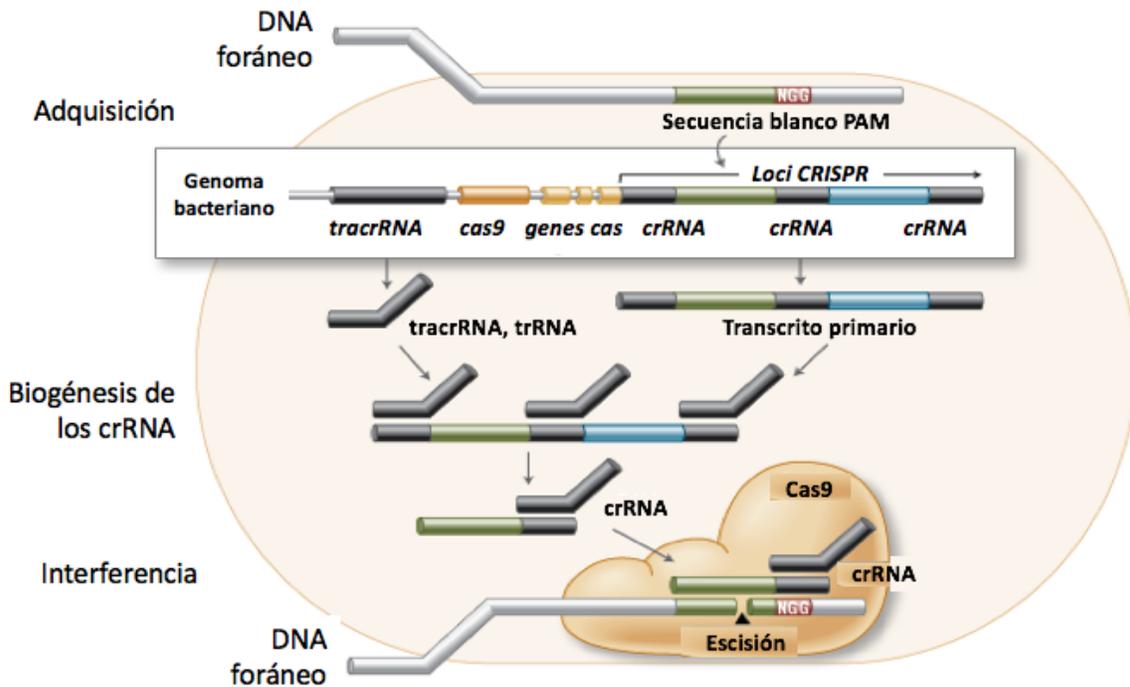


Fig. 4. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 (modificado de Reis *et al.*, 2014). En la etapa de adquisición, una secuencia de DNA foráneo invade a la célula hospedera, parte de esta secuencia se integra dentro de los arreglos CRISPR entre secuencias repetidas. En la interferencia, se transcribe el *crRNA* el cual se une a la proteína Cas9, juntos reconocen al DNA foráneo y lo degradan.

Para utilizar CRISPR-Cas en la edición de genomas solo se requiere de una secuencia de RNA denominada espaciador que tenga complementariedad de bases con la secuencia de DNA que se quiera mutar (protoespaciador) y de la proteína Cas9. Una vez que Cas9 realiza el corte sitio-específico de doble cadena de DNA, se activa la maquinaria de reparación de rompimiento de doble cadena. Esta puede llevarse a cabo por medio de dos vías (Fig. 5), unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés).

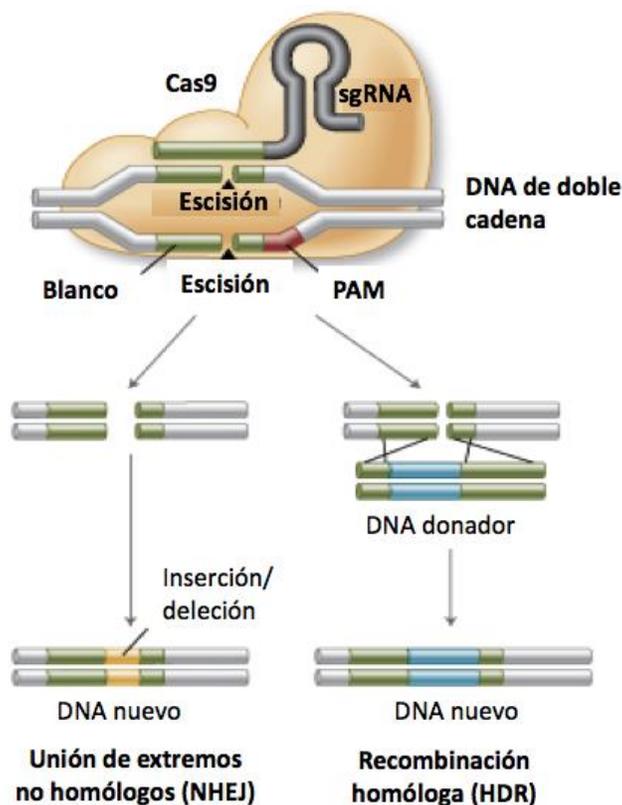


Fig. 5. Dos vías, NHEJ y HDR, por medio de las cuales se lleva a cabo la reparación de corte de doble cadena de DNA (modificado de Reis *et al.*, 2014). En la vía de NHEJ, no se aporta una secuencia de recombinación y el DNA se repara por medio de proteínas específicas, introduciendo inserciones o deleciones. En la vía de HDR, el DNA se repara por medio de recombinación homóloga con una secuencia donadora.

La vía NHEJ sucede en ausencia de un templado para recombinación homóloga, por lo que las hebras de DNA se vuelven a unir por medio de la proteína Ku y de ligasas de DNA específicas como LigD, lo que puede resultar en inserciones o deleciones (indels) de pares de bases, interrumpiendo la secuencia blanco. El uso de las proteínas Ku y LigD para la vía NHEJ, se ha encontrado en bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Archaeoglobus*, *Rhizobium*, entre otros. Cabe destacar que en *S. mobaraensis* en particular, cuenta con las proteínas Ku y LigD. Mientras que la vía HDR ocurre cuando existe un templado de recombinación homóloga, por medio del

cual se pueden introducir mutaciones específicas o activar genes (Shuman y Glickman, 2007; Reis *et al.*, 2014).

3.3 pCRISPomyces-2

Recientemente Cobb y colaboradores, diseñaron dos plásmidos llamados pCRISPomyces-1 y pCRISPomyces-2 (Fig. 6), los cuales codifican para el sistema CRISPR-Cas para edición de genomas en bacterias del género *Streptomyces* (Cobb *et al.*, 2014).

El plásmido pCRISPomyces-1 codifica para el CRISPR RNA (crRNA) y el transactivating crRNA (tracrRNA), mientras que pCRISPomyces-2 codifica el sgRNA, una versión fusionada del crRNA y del tracrRNA. Los autores observaron que la eficiencia de mutación de pCRISPomyces-2 era un 80% mayor que la de pCRISPomyces-1 (Cobb *et al.*, 2016), por lo cual seleccionaron pCRISPomyces-2 para ese trabajo. Dicho plásmido incluye el casete de expresión del sgRNA y el gen que codifica para la proteína Cas9. El gen *cas9*, está optimizado en el uso de codones para *Streptomyces*. Asimismo, este plásmido contiene promotores fuertes *gapdph(EL)* y *rpsLp*, para la expresión de los elementos CRISPR/Cas y terminadores de fagos *fd*, *T7* y λ . Las secuencias que codifican los sgRNAs se integran a través de la técnica de clonación molecular Golden Gate, dentro de un casete de *lacZ* flanqueado por sitios únicos de restricción *BbsI*. Por medio de un sitio único de restricción *XbaI*, el plásmido puede ser linearizado para insertar elementos adicionales, como la secuencia de recombinación, por medio de ligación tradicional o ensamblaje de Gibson (Cobb *et al.*, 2014).

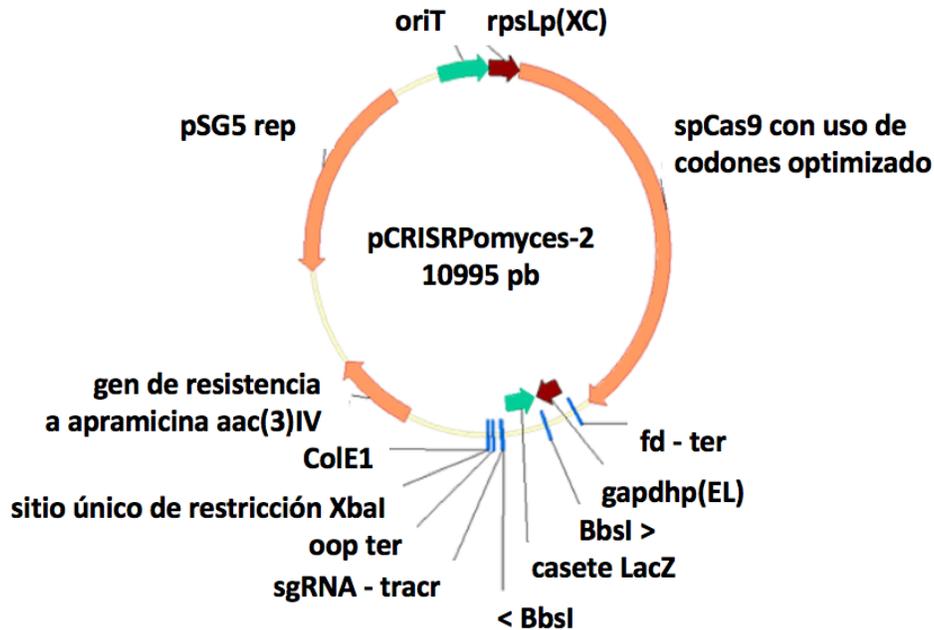


Fig. 6. Mapa del plásmido pCRISRPomyces-2 (Cobb *et al.*, 2014). Dentro de las características de dicho plásmido están: el gen que codifica para la proteína Cas9 optimizada para el uso de codones en *Streptomyces*, sitios *BbsI* para la integración del sgRNA, casete de resistencia a apramicina y un sitio *XbaI* para la integración de la secuencia de recombinación, entre otras.

Como sistema de selección, el plásmido incluye el gen *aac(3)-IV*, el cual confiere resistencia a apramicina, que permite seleccionar transformantes tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*. El origen de replicación *ColE1* permite la replicación en *E. coli*, mientras que el origen de transferencia *oriT* hace posible la conjugación del plásmido pCRISRPomyces de *E. coli* a *Streptomyces*. Por último, el origen de replicación *pSG5 rep* permite la replicación en *Streptomyces* y además es sensible a temperatura lo que permite la eliminación rápida del plásmido de los hospederos después de haberse llevado a cabo la mutación (Cobb *et al.*, 2014).

Para probar la eficiencia de edición del plásmido construido (Cobb *et al.*, 2014) llevaron a cabo experimentos en *Streptomyces lividans* 66. Se seleccionaron dos secuencias genómicas (protoespaciadores) a mutar: una en *redN*, del cluster de genes para la síntesis de undecilprodigiosina y una en *actVA-ORF5*, del cluster de

genes para la síntesis de actinorrodina. En ambos casos, se seleccionó una secuencia de 20 pb con el triplete NGG en la región PAM, dando preferencia a los sitios en la cadena no codificante y a los que tuvieran múltiples purinas en el extremo 3'. Esto último ya que anteriormente se había visto que la Cas9 unía preferencialmente sgRNAs que contienen purinas en las últimas cuatro pares de bases de la secuencia del espaciador, mientras que las pirimidinas eran desfavorecidas (Wang *et al.*, 2014).

Con el objetivo de minimizar los efectos de apareamientos inespecíficos, eligieron sitios en los cuales la secuencia semilla con las últimas 12 pb del protoespaciador más la secuencia PAM fueran únicas en el genoma. Para permitir la edición por medio de recombinación homóloga, se introdujo al plásmido un templado de 2 kilobases (kb), el cual consistía de dos brazos homólogos de 1 kb correspondientes a las secuencias río arriba y río abajo del protoespaciador, diseñado para introducir una delección pequeña que provocaría mutaciones en el gen de interés. Los plásmidos se transfirieron a *S. lividans* por medio de conjugación y las mutantes se confirmaron por medio de extracción de DNA genómico y la posterior amplificación y secuenciación del gen de interés. Así, se reportaron eficiencias del 100% de mutación en *S. lividans*, ya que seis de seis exconjugantes elegidas al azar, contenían el fenotipo editado. Después, probaron la eficiencia de su sistema en otras dos especies del mismo género: *Streptomyces albus* J1074 y *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736.

Utilizando también pCRISPomyces-2 por medio de recombinación homóloga, la eficiencia de mutación resultó ser del 100% para tres de los genes probados (dos en *S. albus* y uno en *S. viridochromogenes*) y 67% para uno de los genes probados en *S. viridochromogenes* (Cobb *et al.*, 2014). Debido a la eficiencia alta de mutación obtenida con pCRISPomyces-2, utilizamos dicho plásmido en este trabajo como herramienta intentar para llevar a cabo las mutaciones deseadas en *S. mobaraensis*.

4. JUSTIFICACIÓN

La crisis de antibióticos que vivimos actualmente demanda el descubrimiento de antibióticos nuevos y la ciclotiazomicina podría representar uno de ellos. Sin embargo, para que pueda ser utilizada clínicamente, primero se tienen que estudiar sus propiedades y mejorarlas en caso de ser necesario. En otros modelos biológicos, el sistema CRISPR-Cas ha permitido generar mutantes de forma práctica y sencilla. Por lo anterior, es conveniente montar y estandarizar este sistema en *S. mobaraensis* para obtener mutantes de la ciclotiazomicina que permitan llevar a cabo su caracterización y la de sus variantes.

5. HIPÓTESIS

El sistema CRISPR-Cas por medio del plásmido pCRISPomyces-2, puede ser montado y estandarizado en *S. mobaraensis* para obtener mutantes de la ciclotiazomicina.

6. OBJETIVOS

- **General**

Montar el sistema CRISPR-Cas en *S. mobaraensis*, utilizando como blanco el gen del pre péptido de la ciclotiazomicina.

- **Particulares**

- Probar CRISPR-Cas en pCRISPomyces-2 por medio de las vías de reparación por recombinación homóloga (HDR) y por unión de extremos no homólogos (NHEJ)
- Diseñar un protocolo de tamizaje de exconjugantes de la vía de reparación por recombinación homóloga
- Hacer un *knock-out* de la ciclotiazomicina, así como variantes con mutaciones específicas y predeterminadas

7. MÉTODO

La metodología descrita a continuación se hizo basándose en el trabajo de (Wang *et al.*, 2016).

7.1 Cepas y plásmido

El plásmido pCRISPomyces-2 fue donado por el Dr. Christian Sohlenkamp del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. La cepa de *E. coli* DH5 α , se usó para la manipulación del plásmido. La bacteria *S. mobaraensis* se obtuvo de la ATCC (ATCC® 29032™, <https://www.atcc.org/>), mientras que la cepa de conjugación *E. coli* ET12567/pUZ8002 fue proporcionada por el Dr. Luis Servín (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Las cepas *E. coli* DH5 α , *E. coli* ET12567/pUZ8002 fueron crecidas en medio LB a 37 °C. La cepa *S. mobaraensis* fue crecida a 30 °C en medio MS (20 g/L de manitol y 20 g/L de harina de soya) sólido (20 g de agar) y líquido, para crecimiento de micelio y esporulación.

7.2 Diseño de sgRNAs

Las secuencias de los sgRNAs fueron diseñadas con el programa sgRNACas9 (Xie *et al.*, 2014). En dicho programa se ingresó la secuencia completa del genoma de *S. mobaraensis* y la secuencia del gen del prepeptido de la ciclotiazomicina. El software eligió los protoespaciadores bajo la condición de que contaran con la secuencia NGG en el extremo 3'. También, se definieron los siguientes parámetros: la búsqueda se hizo en la cadena sentido, la longitud de los sgRNAs de 20 pares de bases y el contenido de GC de 20 a 80%.

A las secuencias codificantes para los sgRNAs se les agregaron cuatro pares de bases (5'-ACGC-3' y 5'-AAAC-3', para el espaciador sentido y el antisentido respectivamente) correspondientes a los sitios de restricción *Bsbl*, por medio de los

cuales se llevó a cabo el empalme con el plásmido pCRISPomyces-2. Tanto la secuencia sentido como la antisentido del sgRNA-1 y sgRNA-2 se mandaron a sintetizar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USSDNA, <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>).

Una vez sintetizados, cada par sentido-antisentido se alineó según lo indicado por (Wang *et al.*, 2016). Primero, cada oligo se suspendió a una concentración final de 100 μM en agua libre de nucleasas. Posteriormente, se mezclaron 5 μL del oligo sentido y 5 μL de oligo antisentido con 90 μL de HEPES 30 Mm, pH 7.8. Finalmente, usando un termociclador esta mezcla se mantuvo por cinco minutos a 95°C, para después bajar la temperatura 0.1°C cada segundo hasta llegar a los 4°C. La muestra se mantuvo a 4°C hasta que los sgRNAs se ligaran al plásmido.

7.3 Inserción de sgRNAs en pCRISPomyces-2

La secuencia codificante para el sgRNA se ensambló en pCRISPomyces-2 a través del método de Golden Gate, de forma que en un tubo de 0.2 mL, por cada 20 μL de reacción se añadieron 100ng de pCRISPomyces-2; 0.3 μL de los oligonucleótidos alineados (diluidos diez veces); 2 μL de buffer 10x T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific EL0014); 1 μL de T4 DNA ligasa (400 U/ μL , Thermo Fisher Scientific EL0014); y 1 μL de *BbsI* (10 U/ μL , NEB #R3539), más el volumen necesario de agua libre de nucleasas.

Después dicha mezcla se colocó en un termociclador con el programa de ensamblaje Golden Gate: 10 minutos a 37 °C (digestión); 10 minutos a 16 °C (ligación), estos dos primeros pasos se repitieron nueve veces más; 5 minutos a 50 °C (digestion final que lineariza cualquier plasmido que quede sin el fragmento a ligar); 20 minutos a 65 °C (inactivación previene que se vuelva a ligar). Los cuales corresponden a la temperatura de digestión, ligación y las últimas temperaturas se usan para favorecer la digestión de los plásmidos que no hayan sido cortados eficientemente y por lo tanto aún conservan el sitio *Bsbl*. La reacción final se mantuvo a 4 °C hasta que fue usada para la transformación.

7.4 Transformación de *E. coli* DH5 α con pCRISPomyces-2-sgRNA-1 y pCRISPomyces-2-sgRNA-2 por choque térmico

Se utilizaron 5 μ L de la reacción resultante de Golden Gate para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las células se dejaron recuperando en 500 μ L de medio SOC líquido (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) a 37 °C por una hora con agitación (250 rpm).

El cultivo se sembró en cajas de medio LB con 50 μ g/mL de apramicina. El plásmido pCRISPomyces-2 original contiene el gen reportero *lacZ*, sin embargo, el sitio de inserción del sgRNA está dentro de dicho casete por lo cual queda interrumpido y permite identificar clonas positivas. Es por lo anterior que una vez solidificado el medio en las cajas, se les añadió a cada una 5 μ L de IPTG 1 M en agua estéril y 40 μ L de X-gal 40 mg/mL en DMSO, de forma que después de incubar las placas a 37°C toda la noche (ON), se seleccionaron aquellas colonias de color blanco y se dejaron crecer en medio LB líquido (50 μ g/mL de apramicina) para extraer plásmido y verificar que la secuencia de 20 nucleótidos del sgRNA se ubicara en el lugar deseado.

El plásmido se extrajo con kit de extracción de plásmido (Monarch Plasmid Miniprep Kit, NEB) y la región donde se insertó el sgRNA se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USSDNA, <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>) con los oligonucleótidos sgRNA-seq-for y sgRNA-seq-rev (Tabla A3, Anexo).

7.4 Transformación de *E. coli* ET12567/pUZ8002 por electroporación

Una vez que se confirmó que el plásmido contenía la secuencia del sgRNA, se utilizaron 120 ng del plásmido para transformar células competentes de la cepa de conjugación *E. coli* ET12567/pUZ8002. Se dejaron recuperar en 1 mL de medio

SOC, una hora, a 37°C con agitación (250 rpm). Las células se sembraron en medio LB más apramicina (50 µg/mL).

7.5 Amplificación y ligación de secuencia de recombinación

Para llevar a cabo la reparación por la vía de HDR se amplificó una secuencia de 2.6 kb por medio de *Overlapping* PCR (OVL PCR), a partir del genoma de *S. mobaraensis*. Para lo cual se diseñaron dos pares de oligonucleótidos. Uno de estos pares (1-F y 2-R) amplificaba una región de 1.4 kb río arriba del gen del prepeptido de la ciclotiazomicina, el otro par (3-F y 4-R) amplifica una región de 1.2 kb río abajo del gen (Tabla A3, Anexo).

Los oligonucleótidos 1-F y 4-R, contienen la secuencia del sitio de restricción de *XbaI* en el extremo 5', mientras que 2-R y 3-F tienen añadida una secuencia de solapamiento de 40 pb correspondientes a sitios de restricción múltiples (*EcoRI*, *BglII*, *BtsI*, *HindIII*, *EcoRV*, *XhoI* y *FokI*). Cabe destacar que la localización de amplificación de los oligonucleótidos 2-R y 3-F interrumpe la secuencia original de *ctm*, generando un *knock-out* de la ciclotiazomicina cuando sucede la recombinación (Fig. 7).

Las amplificaciones se hicieron con la enzima DNA polimerasa Q5 (NEB). Primero, en reacciones de PCR diferentes, se amplificaron las regiones río arriba y río abajo al gen del prepeptido. Las condiciones de PCR fueron: 98°C por 30 segundos; 30 ciclos de 98°C por 10 s, 60°C por 30 s y 72 °C por 90 s; y finalmente 72°C por 10 min. Los productos de dichas reacciones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron y cuantificaron. Después, para unir los dos fragmentos por medio de OVL PCR se siguió lo establecido por (Shevchuk *et al.*, 2004), usando 100 ng de cada uno de los amplicones río arriba y río abajo en un volumen final de 25 µL. Primero se llevó a cabo una reacción de PCR con todos los reactivos necesarios (enzima DNA polimerasa Q5, buffer, DNA templado, dNTP's y agua) menos los oligonucleótidos, con las siguientes condiciones: 98°C por 30 segundos; 10 ciclos

de 98°C por 10 s, 55°C por 30 s y 72 °C por 90 s; y finalmente 72°C por 10 min. Después se hizo una segunda reacción de PCR, con tres microlitros de la reacción anterior como templado y con los oligonucleótidos de sobrelape (2-R y 3-F), con las siguientes condiciones: 98°C por 30 segundos; 30 ciclos de 98°C por 10 s, 60°C por 30 s y 72 °C por 90 s; y finalmente 72°C por 10 min. El fragmento resultante de 2.6 kb se verificó por electroforesis en gel de agarosa, se purificó, cuantificó y digirió con *XbaI*.

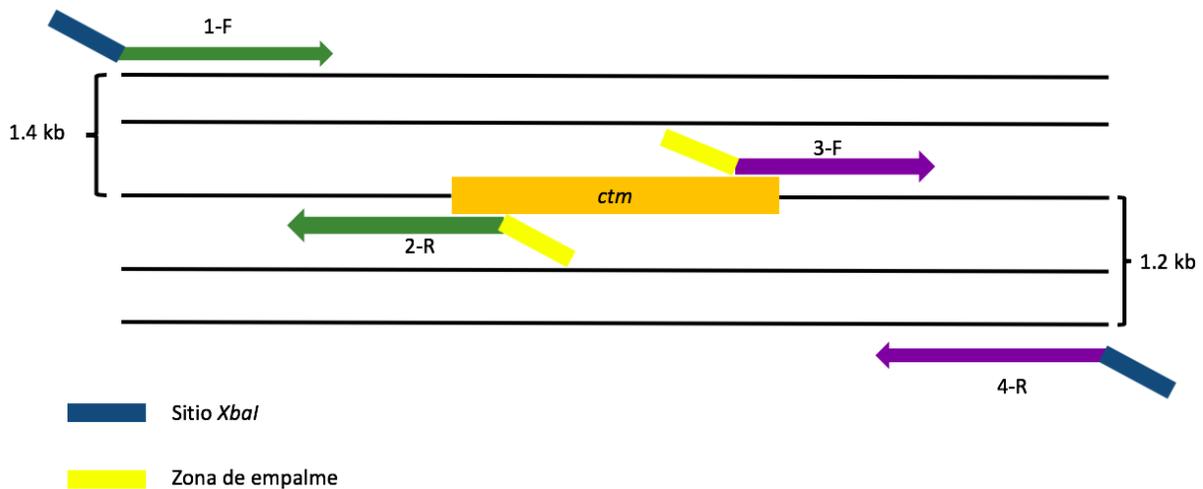


Fig. 7. Diagrama de la estrategia utilizada para realizar la OVL PCR. Los oligonucleótidos 1-F y 2-R amplifican una región de 1.2 kb situada en la dirección río arriba del gen *ctm*. Los oligonucleótidos 3-F y 4-R amplifican una región de 1 kb situada en la dirección río abajo del gen *ctm*. Los oligonucleótidos 2-R y 3-F tienen un sitio de empalme, por medio del cual las regiones río arriba y río abajo del gen se unen y eliminan una región de 40 pb del gen.

Por otro lado, el plásmido pCRISPomyces-2-sgRNA-1 también se digirió con *XbaI* para linealizarlo. La ligación se llevó a cabo con 300 ng del fragmento de recombinación, 100 ng del plásmido linealizado, 200 U de T4 DNA ligasa, 10x buffer de T4 DNA ligasa en un volumen de 20 µL y se dejó incubando ON a 4 °C.

Al siguiente día se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α con 5 μ L de la reacción de ligación. Se seleccionaron dos colonias al azar, a las cuales se les extrajo plásmido para digerirlo con *Xba*I y comprobar que el fragmento de 2.6 kb efectivamente se había ligado al plásmido.

7.6 Conjugación

Se electroporaron células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con 100 ng de plásmido y se seleccionaron aquellas que crecieran en medio LB con kanamicina (50 μ g/mL), cloranfenicol (50 μ g/mL) y apramicina (50 μ g/mL). Después se inocularon en medio LB líquido con las mismas concentraciones de antibiótico y se dejaron crecer a 37 °C, 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm fuera de 0.7. Se tomaron 100 μ L del cultivo anterior y se lavaron y resuspendieron en 1 mL de medio LB sin antibiótico.

Por otro lado, se tomó un vial de esporas de *S. mobaraensis* con 10⁸ esporas, almacenado en el ultracongelador, se descongeló y centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad. Se resuspendieron en 50 μ L de medio 2xYT (16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de cloruro de sodio) y se incubaron a 50 °C por diez minutos, con el objetivo de dar un estímulo de germinación a las esporas.

En tubos independientes se mezclaron 10 μ L de esporas con 2 μ L del cultivo de *E. coli*. Esta mezcla se plaqueó por gotas de 1.5 μ L en cajas con medio R2 (en 600 mL de agua, 0.15 g de K₂SO₄, 6.07 g de MgCl₂·6H₂O, 6 g glucosa, 0.06 g casaminoácidos, 3.44 g de buffer TES, 12 g de agar. Después del autoclave, se agregan 1.6 μ L de KH₂PO₄ 50 mg/mL y 3 mL de 2.94 g de CaCl₂·2H₂O, 3 g de L-prolina en 5 mL de NaOH 1 M, ambas soluciones deben ser filtradas). Las cajas se incubaron por 20 horas a 30 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se aplicó 1 mL de agua estéril con ácido nalidíxico [2.5 mg/mL] y apramicina [2.5 mg/mL] por cada caja. Dicha mezcla se aplicó por gotas de aproximadamente el mismo tamaño encima de cada gota de cultivo. Las cajas se dejaron secar y se volvieron a incubar

por 5 días más. Transcurrido este tiempo, ya era posible observar colonias exconjugantes.

7.7 Tamizaje de exconjugantes

Las colonias exconjugantes se reestriaron en medio MYG sólido con antibiótico (10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de extracto de levadura, 4 g/L de glucosa, 20 g/L agar y 50 µg/mL de apramicina) para confirmar la recepción del plásmido. Las colonias resultantes se crecieron en 1 mL de medio MYG líquido a 30°C, 250 rpm, por seis días para extraer DNA genómico. La extracción se hizo por medio del método de CTAB/NaCl como lo reportado por (Kieser *et al.*, 2000) ajustando los volúmenes a 1 mL de cultivo.

El tratamiento posterior del DNA extraído se dio según el tipo de reparación que se realizara después del corte de doble cadena (NHEJ o HDR). Por el lado de las colonias con NHEJ, a partir del DNA extraído se amplificó por PCR la secuencia de *ctm*. Las muestras se purificaron y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Ahora bien, a partir del material genómico de las exconjugantes con HDR, se amplificó con la DNA polimerasa Q5 (NEB) una región de 2.6 kb que comprendía la región de recombinación. Para lo anterior, se diseñaron los oligonucleótidos screening-1-F y screening-4-R (Tabla A3, Anexo) que alinearan en el genoma de *S. mobaraensis* ~30 pb río arriba y río abajo respectivamente de la secuencia de recombinación incluida en el plásmido, para evitar falsos positivos. La región amplificada se digirió con la enzima *XhoI*, para comprobar la inserción de la secuencia del gen *ctm* interrumpido por los múltiples sitios de restricción. Posteriormente se verificó por electroforesis en gel de agarosa el resultado de la digestión.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de sgRNAs

El primer paso para llevar a cabo la mutagénesis por medio de CRISPR-Cas, consistía en la obtención de los sgRNAs a usar, para lo anterior se usó el programa sgRNACas9, al cual se le dio el genoma de *S. mobaraensis* y la secuencia del gen a mutar, *ctm*. El programa nos proporcionó una lista de ocho posibles protoespaciadores (Tabla A2, Anexo) de los cuales se eligieron dos: el dos y el siete. La elección de dichas secuencias se hizo basándose en las recomendaciones dadas por (Wang *et al.*, 2016): secuencias con purinas ocupando las cuatro últimas bases (3') del protoespaciador, secuencias en la cadena no codificante y secuencias en las cuales los últimos 12 nucleótidos del protoespaciador más los tres nucleótidos del PAM (15 nucleótidos denominados secuencia semilla) fueran únicos en el contexto del genoma.

A partir de las secuencias de los protoespaciadores seleccionados, se diseñaron los sgRNAs, en los cuales la secuencia PAM se eliminó (ya que solo se requiere que esté presente en la secuencia blanco a mutar) y se agregaron los sitios de restricción *Bsbl* mencionados previamente (Fig. 8).

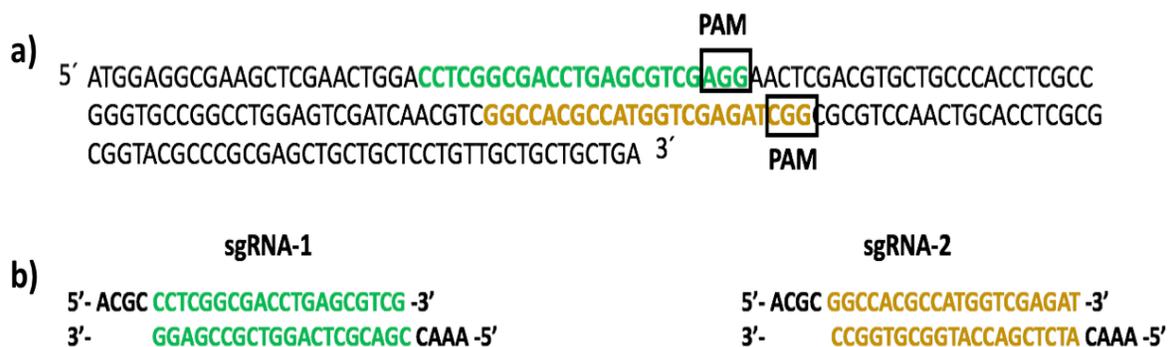


Fig. 8. (a) Secuencia del gen del prepeptido de la ciclotiazomicina y (b) secuencias codificantes para los sgRNAs seleccionados (resaltado en color verde y amarillo).

La inserción de las secuencias codificantes para los sgRNAs al plásmido pCRISPomyces-2 se confirmó por medio de secuenciación de la región del plásmido donde debía de insertarse el sgRNAs. Una vez corroborada la secuencia de los sgRNAs, se transformó *E. coli* ET12567/pUZ8002 con los plásmidos pCRISPomyces-2-sgRNA-1 y pCRISPomyces-2-sgRNA-2 y se llevaron a cabo las conjugaciones intergenéricas con *S. mobaraensis*.

8.2 Conjugación

Inicialmente se probó la concentración de antibiótico propuesta por (Wang *et al.*, 2016) para seleccionar exconjugantes, de 1 mL de agua estéril con ácido nalidíxico [2 mg/mL] y apramicina [20 mg/mL], por caja. Sin embargo, debido a que con esta concentración no había crecimiento de exconjugantes, se probó la concentración indicada por (Nybo *et al.*, 2010), con 1 mL de agua estéril con ácido nalidíxico [2.5 mg/mL] y apramicina [2.5 mg/mL]. Esta se seleccionó como la concentración a utilizar ya que funcionó de manera adecuada, permitiendo el crecimiento de los controles positivos y las exconjugantes, mientras que inhibía el crecimiento de los controles negativos.

Asimismo, las esporas de *S. mobaraensis* se dejaron 10 minutos a 50 °C como un estímulo para la germinación, antes de ponerlas en contacto con las células de *E. coli*. En general, se recomienda que el número de esporas sea igual que el número de células de *E. coli*, por lo cual se corroboró que el número de esporas fuera de 10^8 mediante conteo en cámara de Neubauer, lo cual correspondía con la OD a la que estaba el cultivo de *E. coli* (0.7 a 600 nm) en el momento de la conjugación.

Por otro lado, el medio de crecimiento R2 indicado por (Wang *et al.*, 2016), fue el que mejor funcionó para la conjugación. Sin embargo, el número de exconjugantes obtenidas se incrementó al agregar al medio 10 mM de MgCl₂. Por último, 20 horas fue el tiempo más adecuado de incubación antes de la aplicación de antibiótico, contrastado con las cajas incubadas durante 18 horas en el mismo experimento, tiempo indicado por (Wang *et al.*, 2016).

Para confirmar que el plásmido había sido transferido a *S. mobaraensis* se realizó PCR utilizando oligonucleótidos específicos de pCRISPomyces-2, los cuales amplifican la región del gen de resistencia a apramicina (Fig. 9).

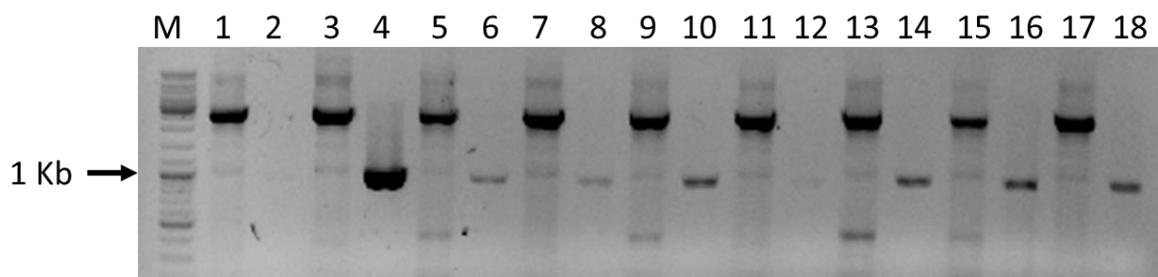


Fig. 9. M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder), 1: DNA WT con oligonucleótidos 1-F y 4-R (control positivo para el DNA genómico WT), 2: DNA WT con oligonucleótidos de gen de resistencia a apramicina (control negativo para el DNA genómico WT), 3: pCRISPomyces-2 con oligonucleótidos 1-F y 4-R (control positivo para pCRISPomyces-2), 4: pCRISPomyces-2 con oligonucleótidos de resistencia a apramicina (control positivo para pCRISPomyces-2). Los carriles: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, corresponden a DNA extraído de siete exconjugantes diferentes y amplificado con oligonucleótidos 1-F y 4-R. Los carriles 6,8,10,12,14,16,18; corresponden a DNA extraído de las mismas siete exconjugantes anteriores, amplificado con oligonucleótidos del gen de resistencia a apramicina.

Como se observa se logró amplificar el gen de resistencia a apramicina en al menos seis de las siete exconjugantes probadas (Fig. 9), presente exclusivamente en el plásmido pCRISPomyces-2. Lo anterior, confirma que el plásmido fue transferido exitosamente de *E. coli* a *S. mobaraensis*.

8.3 Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Inicialmente se evaluaron los plásmidos pCRISPomyces-2-sgRNA-1 y pCRISPomyces-2-sgRNA-2, sin haber agregado secuencia de recombinación, es decir con vía de reparación por medio de NHEJ. Con esta estrategia se obtuvieron

16 colonias exconjugantes de *S. mobaraensis*, a cada una se les extrajo DNA, se amplificó el gen de *ctm* (Fig. 10) y se envió a secuenciar.

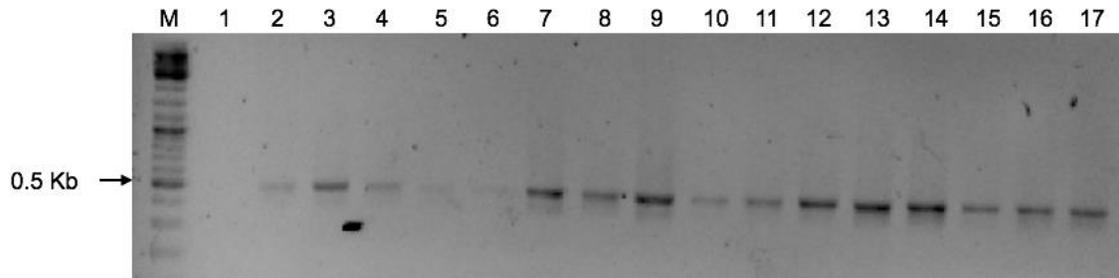


Fig. 10. Amplificación del gen *ctm* de colonias exconjugantes con vía de reparación NHEJ. M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder); 1: control negativo, 2-17: amplicón de *ctm* (0.5 kb) de las 16 colonias obtenidas.

Los resultados de secuenciación de los amplicones de *ctm* de las 16 exconjugantes no presentaron diferencias con la secuencia original del gen, es decir, no se generó ninguna mutante *knock-out* de la ciclotiazomicina.

8.4 Recombinación homóloga (HDR)

Debido a que no se obtuvieron mutantes por medio de NHEJ, se procedió a probar la mutagénesis por medio de CRISPR-Cas con la vía de reparación HDR. Con este fin, se amplificó la secuencia de recombinación por medio de OVL PCR (Fig. 11). Primero se amplificaron las secuencias de recombinación (~1 kb cada una) río arriba y río abajo del gen *ctm*, para lo anterior se probaron tres temperaturas diferentes de alineación 60 °C, 70 °C y 72 °C, de las cuales 60 °C se seleccionó como la temperatura estándar (Fig. 11, a). Después, las dos secuencias (río arriba y río abajo) se sobrelapan por medio de OVL PCR (Fig. 11, b), ya que cuentan con secuencias que sobrelapan entre sí.

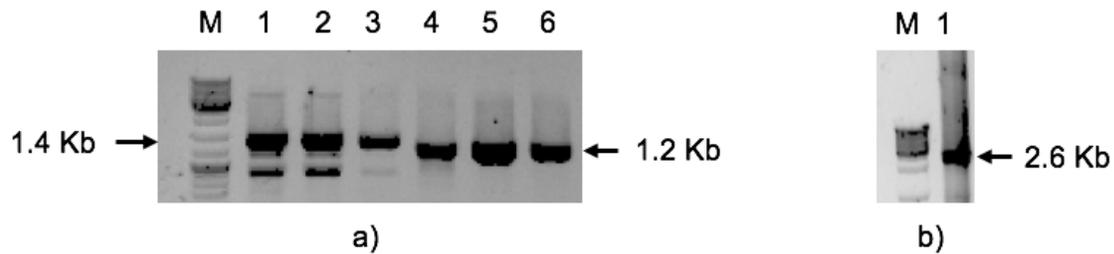


Fig. 11. Amplificación de secuencia de recombinación homóloga para llevar a cabo la vía de reparación HDR. M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder). a) 1-3: secuencia río arriba a *ctm* con oligonucleótidos 1-F y 2-R amplificado a diferentes temperaturas de alineación (60 °C, 70 °C y 72 °C); 4-6: secuencia río abajo a *ctm* con oligonucleótidos 3-F y 4-R amplificado a diferentes temperaturas de alineación (60 °C, 70 °C y 72 °C). b) 1: OVL PCR de secuencias río arriba y río abajo.

Una vez amplificado la secuencia de recombinación, esta se ligó al plásmido pCRISPomyces-2-sgRNA-1 (Fig.12). Como se ve en la figura 12, sólo la secuencia de recombinación se logró ligar al plásmido pCRISPomyces-2-sgRNA-1, del plásmido pCRISPomyces-2-sgRNA-2 no se obtuvieron colonias con el fragmento de recombinación (Fig 12, carriles 8 y 9). El plásmido con la secuencia de recombinación se denominó pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR.

Una vez verificada la ligación de la secuencia de recombinación al plásmido, se transformó en *E. coli* ET12567/pUZ8002 y se llevó a cabo la conjugación con *S. mobaraensis*. Se obtuvieron 32 colonias exconjugantes a las cuales se les extrajo DNA, a partir del cual se amplificó una secuencia de 2.8 Kb (Fig. 13), correspondiente a la zona de recombinación.

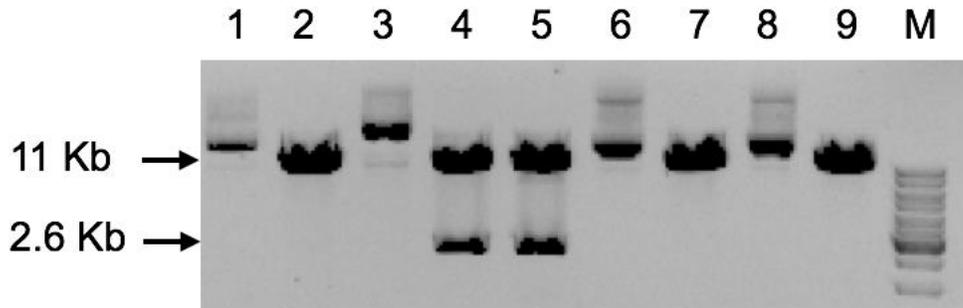


Fig. 12. Verificación de la ligación de la secuencia de recombinación a pCRISPomyces-2-sgRNA-2 por medio de digestión. 1: pCRISPomyces-2; 2: pCRISPomyces-2 digerido con *XbaI*; 3: pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR (colonia 1); 4,5: pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR digerido con *XbaI* por duplicado, 6: pCRISPomyces-2-sgRNA-1 (colonia 2), 7: pCRISPomyces-2-sgRNA-1 (colonia 2) digerido con *XbaI*, 8: pCRISPomyces-2-sgRNA-2 (colonia 1), 9: pCRISPomyces-2-sgRNA-2 (colonia 1) digerido con *XbaI*, M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder).

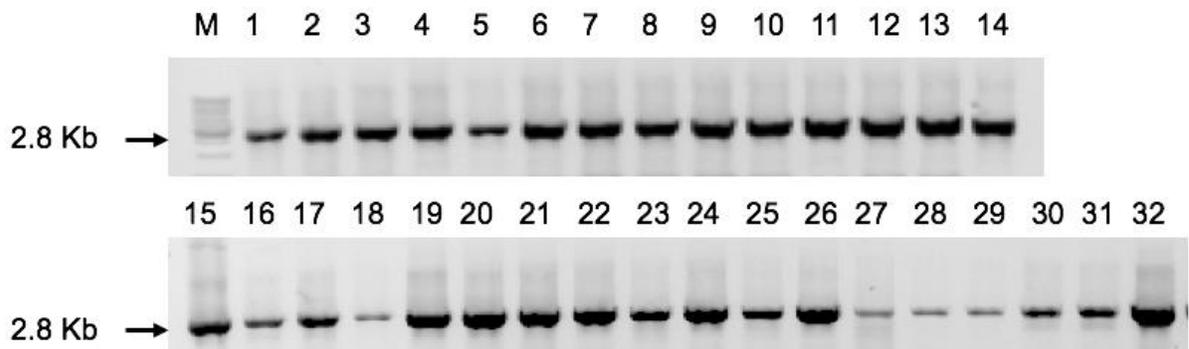


Fig. 13. Amplificación de secuencia de recombinación a partir de DNA extraído de 32 exconjugantes. M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder), 1-32: amplicón de secuencia de recombinación de las 32 exconjugantes obtenidas.

8.5 Tamizaje de exconjugantes

La secuencia de recombinación se amplificó con oligonucleótidos (screening-1-F y screening-4-R, Tabla 3A, Anexo) que alineaban ~30 pb río arriba del inicio y ~30 pb río abajo del final de la secuencia de recombinación, con el objetivo de evitar falsos positivos que provinieran de amplificación a partir del plásmido. En caso de haber ocurrido el evento de recombinación homóloga entre la secuencia insertada en el plásmido y el cromosoma de *S. mobaraensis*, se esperaba que la secuencia de recombinación incluyera un sitio múltiple de clonación (con los sitios de restricción: *EcoRI*, *BglII*, *BtsI*, *HindIII*, *EcoRV*, *XhoI* y *FokI*) el cual interrumpía al gen *ctm*, eliminando 40 pb del mismo (Fig. 14).

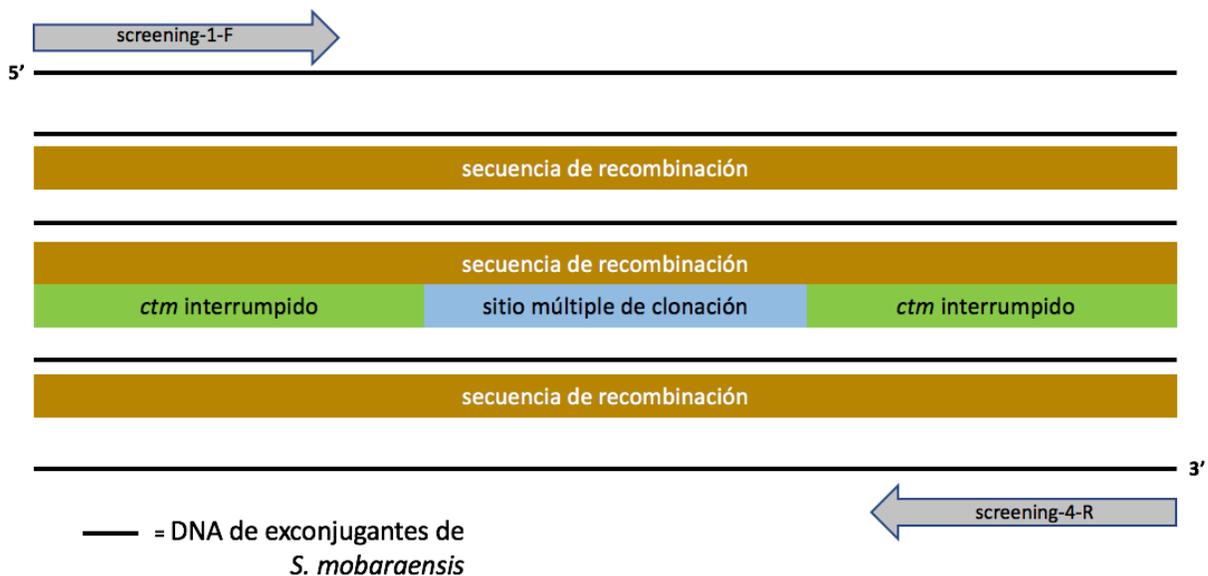


Fig. 14. Esquema de secuencia esperada en exconjugantes de *S. mobaraensis* donde sucedió recombinación homóloga con el templado de recombinación incluido en pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR.

Por lo tanto, como forma de evaluar si el evento de edición había sucedido, los productos de la amplificación se digirieron con la enzima *XhoI*. Lo anterior, debido a que dentro de la secuencia de recombinación se insertaron múltiples sitios de restricción para interrumpir la secuencia original de *ctm*. A diferencia de los controles positivos ninguna de las colonias exconjugantes presentó el patrón de restricción esperado en caso de haber ocurrido el evento de edición (Fig. 15). Asimismo, se

realizó el ensayo de restricción con *EcoRV*, *HindIII*, *EcoRI*, *BglIII*, pero los resultados fueron los mismos.

Se mandaron a secuenciar tres de las secuencias amplificadas de las exconjugantes, no obstante los resultados confirmaron lo visto en las digestiones en los geles, las secuencias eran iguales que la secuencia original (WT).

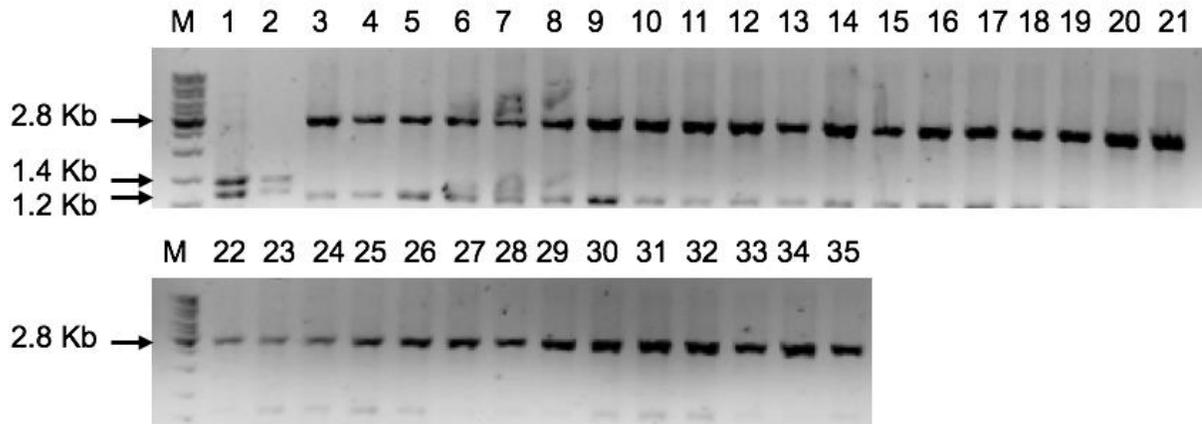


Fig. 15. Ensayo de restricción con *XhoI* de las amplificaciones hechas a partir de la región de recombinación del DNA de 32 exconjugantes. M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder); 1: control positivo, digestión con *XhoI* del templado de recombinación generado por OVL PCR; 2: control positivo, digestión con *XhoI* de templado de recombinación amplificado a partir de pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR; 3: control negativo, digestión con *XhoI* de amplificación de la región de recombinación a partir de DNA WT; 4-35: digestión con *XhoI*, de amplificaciones hechas a partir de 32 exconjugantes.

En resumen, por medio del programa sgRNAs9 se obtuvieron ocho secuencias de sgRNAs potenciales de las cuales se eligieron dos para llevar a cabo mutagénesis por CRISPR-Cas. Una vez que se construyeron los plásmidos, se hizo la conjugación de *E. coli* a *S. mobaraensis*, para la cual se tuvo que ajustar la concentración de antibiótico a utilizar. El plásmido fue introducido de forma exitosa, sin embargo, con ninguna de las dos vías de reparación, NHEJ y HDR, se obtuvieron mutantes en el gen del prepeptido de la ciclotiazomicina.

9. DISCUSIÓN

9.1 pCRISPomyces-2

En otros trabajos publicados se ha logrado utilizar el plásmido pCRISPomyces-2 de forma exitosa para construir mutaciones en diferentes especies de *Streptomyces* por medio del sistema CRISPR-Cas. Por ejemplo en el trabajo de (Qin *et al.*, 2017), usaron el vector original junto con un templado de recombinación homóloga con el objetivo de eliminar un cluster biosintético completo, productor de un antibiótico de interés en *Streptomyces formicae*. La mutación fue confirmada por amplificación por PCR y su posterior secuenciación, obteniendo como resultado 100% de eficiencia de mutación para esta especie. Sin embargo, con otras especies de *Streptomyces*, usadas en este mismo grupo de investigación, la eficiencia de mutación se reducía al 50%.

También se ha utilizado pCRISPomyces-2 para activar la expresión de genes (Lim *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017). En uno de estos trabajos (Zhang *et al.*, 2017), utilizaron como secuencia de recombinación homóloga al promotor constitutivo *kasO* para activar genes en *S. albus*, *S. lividans* y *S. roseosporus*. En este trabajo reportaron que la eficiencia de recombinación se incrementaba en un 40% cuando el templado era de 2 kb en lugar de 1 kb (Lim *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017).

Por otro lado (Jia *et al.*, 2017) utilizaron el sistema pCRISPomyces-2 en *Streptomyces rimosus*. Se diseñaron tres tipos de arreglos CRISPR: uno con un solo sgRNA, otro que contenía dos sgRNAs y un tercer arreglo que contenía un sgRNA con brazos de homología. Sin embargo, la inserción de los brazos de homología en el plásmido fue realizada de forma diferente a lo establecido por (Wang *et al.*, 2016). Se sintetizó un fragmento de DNA que contenía 100 pb como secuencia donadora para recombinación homóloga seguido de la secuencia del sgRNA, todo flanqueado por sitios *BbsI*. Dicho fragmento de aproximadamente 120 pb se insertó dentro de los sitios *BbsI* de pCRISPomyces-2. Los 100 pb de secuencia donadora se encuentran flanqueando el protoespaciador y contienen una

delección de 8 pb de la secuencia original. La delección incluye la secuencia PAM y las tres últimas pares de bases de la secuencia del sgRNA (Fig. 15).

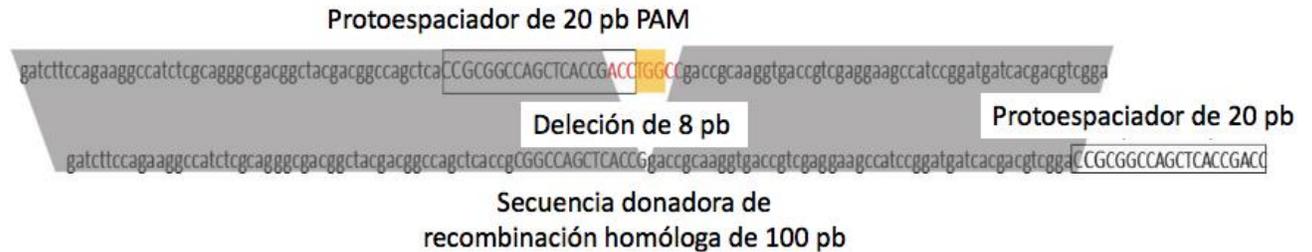


Fig. 16. Diseño del templado de recombinación homóloga de 100 pb, seguido de la secuencia del sgRNA. La secuencia fue sintetizada artificialmente (tomada de Jia *et al.*, 2017).

Esta forma de llevar a cabo la recombinación homóloga difiere de la realizada en nuestro trabajo. En este trabajo, la secuencia templado que usamos para la recombinación homóloga es de 2 kb, a diferencia de las 100 pb de (Jia *et al.*, 2017). Además, el sgRNA y el templado de recombinación se encuentran en regiones diferentes del plásmido; el sgRNA está entre los sitios *BbsI* y el templado se encuentra en la región delimitada por sitios de restricción *XbaI*. Mientras que en el trabajo de (Jia *et al.*, 2016) la secuencia templado y el sgRNA están contiguos dentro de los sitios *BbsI*.

Es posible que el cambio realizado por (Jia *et al.*, 2016) en la longitud de la secuencia templado y la ubicación en el plásmido de la misma, haya hecho al plásmido pCRISPomyces más eficiente para *S. rimosus*. Debido a que el objetivo de este trabajo era probar el funcionamiento del plásmido original, no intentamos cambiarlo. Sin embargo, los cambios hecho por (Jia *et al.*, 2016) podrían aplicarse para *S. mobaraensis*.

Otro aspecto que vale la pena recalcar del trabajo mencionado previamente, es que introdujeron el plásmido en *S. rimosus* por electroporación en lugar de conjugación. En el trabajo publicado por (Wang *et al.*, 2016), establecieron que la transferencia

de pCRISPomyces-2 a *Streptomyces*, debía llevarse a cabo por medio de conjugación usando la cepa de *E. coli* WM6026, cepa utilizada específicamente para conjugaciones en *S. lividans*. Sin embargo (Jia *et al.*, 2017), lo hicieron por medio de electroporación del micelio siguiendo el protocolo establecido por (Kieser *et al.*, 2000) y usando *E. coli* ET12567/pUZ8002.

En *S. mobaraensis*, no probamos la introducción del plásmido por medio de electroporación, sólo se hizo a través de conjugación y aunque al final la introducción del plásmido fue exitosa se tuvieron que sobrepasar varios obstáculos. En general existen tres métodos de transformación de *Streptomyces*: por medio de protoplastos, PEG y electroporación. Sin embargo, debido a la diversidad del género, las especies de *Streptomyces* requieren una cantidad considerable de experimentación para determinar cuál método de introducción es el más adecuado. Por lo cual se tienen que crear protocolos que estén optimizados para cada especie en donde se tomen en cuenta las limitaciones de una cepa en particular y del vector que se está usando. Por lo tanto, mientras que la electroporación podría funcionar para un especie de *Streptomyces* en específico, para otra podría ser la técnica menos eficiente (Pigac & Schrempf, 1995; Nybo *et al.*, 2010).

9.2 Variantes de CRISPR-Cas en *Streptomyces*

Además de pCRISPomyces, se han generado otras estrategias para aplicar CRISPR-Cas en *Streptomyces*, las cuales podrían ser utilizadas como alternativa en *S. mobaraensis*. Hasta mediados de 2018, el sistema CRISPR-Cas (incluyendo pCRISPomyces) había sido utilizado satisfactoriamente en 12 especies diferentes de *Streptomyces*, entre ellas las cuatro especies modelo de *Streptomyces*: *Streptomyces coelicolor*, *S. lividans*, *Streptomyces venezuelae* y *S. albus* (Tao *et al.*, 2018).

El plásmido pCRISPR-Cas9 ha sido utilizado para mutar el cluster biosintético de la actinorrodina en *S. coelicolor* y para identificar un cluster biosintético en una especie

de *Streptomyces* aislada de sedimento de manglar (Low *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2015). También se han usado versiones mutadas de Cas9, llamadas dCas9 (optimizadas para *Streptomyces*), las cuales han perdido la actividad de nucleasa y se han usado para reprimir la expresión de uno o varios genes en *S. coelicolor* (Tong *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

De la misma forma se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas en *S. coelicolor*, pero en lugar de utilizar Cas9, se usó Cpf1, endonucleasa proveniente del sistema CRISPR tipo V. Esta nucleasa, reconoce secuencias PAM ricas en T, en contraste con Cas9, que en general reconoce PAM ricas en G. Asimismo, se observó que mientras un sistema con Cas9 no funcionaba en *Streptomyces higroscopicus*, con Cpf1 se lograban generar mutantes (Li *et al.*, 2018).

En *S. lividans*, *S. albus* y *Streptomyces avermitilis*, se han creado sistemas CRISPR-Cas *in vitro* (Liu *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2016). En *S. coelicolor*, se usó CRISPR-Cas9 en conjunto con el sistema reportero CodA, el cual confiere sensibilidad a la 5-fluorocitosina en las bacterias que hayan adquirido el plásmido (Zeng *et al.*, 2015).

Otro ejemplo, es el plásmido pKCCas9dO y sus derivados, desarrollados por (Huang *et al.*, 2015). Este plásmido fue usado para mutar los genes *redD* y *actII-ORF4* de *S. coelicolor*. El vector pKCCas9dO proviene del plásmido sensible a temperatura pKC1139 al cual se le ensambló un sgRNA, una Cas9 con uso de codones optimizado y dos templados de recombinación homóloga y fue introducido en *S. coelicolor* por conjugación intergénica con *E. coli*.

Asimismo, en el trabajo realizado por (Huang *et al.*, 2015), obtuvieron un 100% de eficiencia de mutación para el gen *actII-orf4* y para el gen *redD*, la eficiencia fluctuaba entre 25% y 100%. La estrategia que llevaron a cabo para aumentar la eficiencia de mutación en *redD* fue diseñar otros dos sgRNAs (no se menciona en el artículo cuáles fueron las características de los nuevos sgRNAs), con los que obtuvieron resultados diferentes de conjugación y eficiencia de mutación según el

sgRNA usado. Con estos nuevos sgRNAs construyeron plásmidos para probar la eficiencia de corte de la doble cadena, es decir sin proporcionar una secuencia templado de recombinación. La eficiencia de corte de uno de los sgRNAs, tuvo la mayor tasa de delección, siendo dos veces mayor que los otros dos plásmidos. Por lo anterior, atribuyeron el cambio en la eficiencia de mutación al mejoramiento de la eficiencia de corte dada por el complejo sgRNA/Cas9 (Huang *et al.*, 2015).

9.3 sgRNAs

Se ha investigado mucho sobre los efectos de mutaciones fuera del sitio blanco, no obstante pocos estudios se han concentrado en analizar la eficiencia de corte en el sitio blanco del complejo sgRNA/Cas9. Sin embargo, se han observado resultados similares a lo reportado por (Huang *et al.*, 2015), en los que la eficiencia de mutación en el mismo locus genómico cambia según el sgRNA usado (Liu *et al.*, 2016).

En un trabajo realizado en una línea celular de ratón, se estudiaron 1,841 sgRNAs diferentes que inducían pérdida completa de la función de una proteína, con el objetivo de probar la eficiencia de mutación diferencial según el sgRNA utilizado. Primero realizaron una prueba denominada *Surveyor nuclease assay*, en la que después de haber exponer el DNA a edición por medio de CRISPR-Cas, se hace hibridar con la secuencia del DNA original. De forma que si el DNA fue mutado se generarán *mismatches* entre pares de bases, los cuales son reconocidos por la enzima *Surveyor nuclease* que corta en el extremo 3' de donde haya inserciones/delecciones o sustituciones. Al final, el resultado se ve en un gel de electroforesis, en el cual, de haber funcionado el sgRNA aparecerá un patrón de bandeado comparado con una sola banda del DNA original. Así, después de haber llevado a cabo dicha prueba, detectaron que el 41% de los 1841 sgRNAs probados no llevaron a cabo el corte de doble cadena. Con este resultado, se investigó qué características tenían en común los sgRNAs que habían funcionado. Se concluyó que había preferencia por la posición de ciertos nucleótidos y que el contexto genómico del DNA blanco así como el porcentaje de GC y la estructura secundaria

de los sgRNAs también contribuían en el desempeño del sgRNA (Liu *et al.*, 2016). Los nucleótidos en las posiciones 3 y 20 estaban asociados con la eficiencia de corte (Liu *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2004).

Lo anterior, concuerda con estudios de la estructura cristalina de CRISPR/Cas9, en donde se muestra que el nucleótido en la posición 20 (base adyacente al PAM) induce la separación de doble cadena del DNA y es responsable de la formación del loop R, híbrido de DNA:RNA (Anders *et al.*, 2014). Asimismo, se vio que la presencia de adenina en la posición 20 tenía un impacto negativo en la eficiencia. También se observó que la región más próxima al PAM, la secuencia semilla, también tenía un papel importante en el funcionamiento apropiado del complejo sgRNA/Cas9. En regiones lejanas al PAM, en las posiciones 2 y 3, T y G, tenían un efecto negativo en la eficiencia de corte. Se ha probado que las posiciones 2 y 4-6 interactúan con el dominio REC1 del sgRNA, el cual es crítico para el reconocimiento sgRNA:DNA, por lo cual estos nucleótidos también podrían influir en el proceso de reconocimiento y por lo tanto afectar el desempeño en el corte (Nishimasu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

En cuanto al contexto genómico del DNA blanco, se reportó que cuando estaba en la región del promotor-TSS (*Transcription starting site*), la secuencia tenía mayor probabilidad de ser cortada exitosamente comparado con secuencias localizadas en la región intergénica. Mientras que los sgRNAs con un porcentaje de GC en un rango de 40%-60% era más favorecido en cuanto a la eficiencia de corte de la doble cadena (Liu *et al.*, 2016).

Asimismo, se vio que la formación de estructura secundaria del sgRNA también tenía un papel importante que debía ser considerado en el diseño de los sgRNAs. En particular, si la secuencia semilla era más propensa a formar estructura secundaria, el sgRNA tenía mayor probabilidad de romper la secuencia blanco, de forma que la estructura secundaria de la secuencia semilla podría tener un papel en facilitar el proceso de unión y podría mejorar potencialmente la actividad catalítica

de la Cas9 (Liu *et al.*, 2016). Esto podría explicar resultados en donde se ha demostrado que la unión del sgRNA con la Cas9 es un paso crucial para convertir a la Cas9 en su conformación activa capaz de llevar a cabo su función de nucleasa (Jinek *et al.*, 2014).

Sin embargo, el trabajo anterior de (Liu *et al.*, 2016), fue hecho en línea celular de ratón y según sea el caso del organismo que se estudie, las características que hacen eficientes a los sgRNAs varían, por ejemplo, en *Myxococcus xanthus*, se encontró que la eficiencia diferencial de los sgRNAs dependía de la localización de nucleótidos en posiciones determinadas (Yang *et al.*, 2017). Por lo cual, aunque algunas propiedades de los sgRNAs funcionen para el sistema CRISPR-Cas en general, las particularidades deben ser definidas para cada organismo.

En el caso de *S. mobaraensis*, probamos dos sgRNAs diferentes tomados de los resultados obtenidos con el programa sgRNACas9. Comparando con los resultados obtenidos por (Liu *et al.*, 2016), ninguno de los dos sgRNAs contenía una A en la posición 20, sin embargo en las posiciones 2 y 3 de uno de los dos sgRNAs respectivamente había G o T. Las secuencias blanco se encontraban aproximadamente 22 pb del sitio de inicio de la transcripción y la otra a 75 pb y la proporción de GC era de 78% para los dos.

Con ninguno de los dos sgRNAs se obtuvieron colonias mutantes, probablemente debían de haberse probado los ocho posibles sgRNAs obtenidos con el programa. También se pudo haber llevado a cabo la prueba de *Surveyor nuclease assay* (mencionada previamente) o utilizar el kit *Guide-it Complete sgRNA Screening System* (Takara Bio USA, www.takarabio.com), para ver si en realidad el complejo sgRNA/Cas9 estaba llevando a cabo el corte de doble cadena. Lo anterior es importante porque es posible que el sistema en *S. mobaraensis* no funcionó desde el paso que consistía en el funcionamiento adecuado del complejo sgRNA/Cas9.

9.4 Toxicidad Cas9

La eficiencia de conjugación se reduce de 5 a 10 veces al usar cualquier plásmido con el gen de la Cas9, lo cual sugiere una toxicidad inherente asociada a la sobreexpresión heteróloga de la endonucleasa (Wang *et al.*, 2016). En un estudio realizado en *E. coli*, se reportó que la expresión de dCas9 (versión catalíticamente muerta de la Cas9) causaba una disminución de aproximadamente un 50% de las tasas de crecimiento en comparación con las células *wild-type*. La morfología de la célula cambiaba a una forma anormal filamentosa, indicando que la dCas9 afectaba la división celular y además se encontró que se alteraba la expresión de 574 genes en la presencia de niveles altos de dCas9 (Cho *et al.*, 2018).

En pCRISPomyces-2, la expresión del gen *cas9* está dirigida por el promotor *rspLp(XC)* del gen de la proteína S12 de la subunidad ribosomal 30S de *Xylanimonas cellulositytica*, lo cual indica que la Cas9 está siendo expresada fuertemente. Considerando además la toxicidad inherente de la Cas9 mencionada previamente, esto podría explicar porqué pCRISPomyces-2 no funcionó en nuestro estudio. De forma que las exconjugantes obtenidas podrían ser colonias que lograron sobrellevar la expresión de Cas9 pero que al mismo tiempo la expresión no fue suficiente para llevar a cabo la mutagénesis o también podrían ser variantes en las que no se expresó la Cas9.

En un trabajo realizado en *Myxococcus xanthus*, se colocó un promotor inducible por cobre, río arriba del gen de la Cas9 con el fin de controlar su expresión debido a su citotoxicidad inherente. A concentraciones bajas de cobre, lo que implicaba niveles bajos de expresión de Cas9, no se afectaba el crecimiento de células de *M. xanthus* (Yang *et al.*, 2017). En el trabajo realizado por (Tong *et al.*, 2015), también se utilizó un promotor inducible con tioestreptón para regular la expresión de Cas9 en *S. coelicolor*.

Algunas de esas estrategias en las que la expresión de Cas9 es controlada e inducida sólo cuando el plásmido se encuentra en *Streptomyces* para regular la

toxicidad de la proteína, puede ser utilizada en *S. mobaraensis*. Lo anterior, debido que al igual que lo reportado por (Wang *et al.*, 2016), la eficiencia de conjugación se veía reducida en comparación con otros plásmidos utilizados en el laboratorio, por lo cual se adecuaron las condiciones adecuadas de conjugación. En particular cuando introducíamos pCRISPomyces-2 vacío, la eficiencia se reducía en un 86% en comparación con pCRISPomyces-2 con los sgRNAs.

10. CONCLUSIONES

El plásmido pCRISPomyces-2 no funcionó para llevar a cabo la mutación del gen del prepeptido de la ciclotiazomicina en *S. mobaraensis*. Se evaluaron dos sgRNAs, el sistema de reparación por unión de extremos no homólogos y por recombinación homóloga y también se diseñó un protocolo de tamizaje de exconjugantes para la selección de mutantes obtenidas por recombinación homóloga.

Aún se debe realizar más trabajo para poder estandarizar la técnica en esta especie en particular. Se pueden evaluar más sgRNAs, otros plásmidos que aplican CRISPR-Cas utilizados en *Streptomyces* o tratar de modificar pCRISPomyces-2 para hacerlo más eficiente. Por lo cual, aún no se puede descartar que el sistema CRISPR-Cas en general no funcione para *S. mobaraensis*.

CRISPR-Cas ya ha sido utilizado de forma exitosa en otras especies de *Streptomyces*. La mayor parte de la investigación se ha llevado a cabo en *S. albus*, *S. lividans* y *S. coelicolor*, especies modelo del género que han sido altamente estudiadas y caracterizadas. Aún existen muchos aspectos genéticos que no se han estudiado en *S. mobaraensis*, los cuales podrían dar pie a un mejor entendimiento de cómo se podría implementar la edición por medio de CRISPR-Cas en esta bacteria.

El sistema de edición CRISPR-Cas suele ser conocido por la facilidad con que se aplica en comparación con los sistemas de edición predecesores. En efecto, el sistema es simple, sin embargo su aplicación en los diferentes organismos no es

trivial. Este trabajo representa un ejemplo de lo anterior y además muestra que en algunos casos el sistema debe ser adaptado para que funcione en esa especie en particular.

Perspectivas

Se debe intentar hacer pCRISPomyces-2 más eficiente, ya que cada especie de *Streptomyces* podría tener requerimientos diferentes. También se deberían de probar los seis sgRNAs restantes propuestos por el programa, ya que se ha visto que diferentes sgRNAs tienen eficiencia diferencial. Asimismo, se puede probar utilizar otro de los plásmidos desarrollados para llevar a cabo CRISPR-Cas en *Streptomyces* y tomando en cuenta la citotoxicidad que la Cas9 presenta, buscar formas de controlar su expresión. Además de CRISPR-Cas también existen los métodos convencionales utilizados para llevar a cabo mutaciones en *Streptomyces*. Así, actualmente M. en C. Iris Bravo, quien estudia la relación estructura-función de la ciclotiazomicina, está mutando a *S. mobaraensis* por medio de PCR-targeting.

Referencias

- Anders C., Niewoehner O., Duerst A. & Jinek M.** (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, **513**: 569-73.
- Barrangou R., Christopher F., Devenau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A. & Horvath P.** (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, **316**: 1709-12.
- Bibikova M., Golic M., Golic K.G., Carroll D.** (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, **161**: 1169-75.
- Bush M.J., Tschowri N., Schlimpert S., Flärth K. & Buttner M.J.** (2015). C-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. *Nature Reviews*, **13**: 749-60.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., & Ehrlich S.D.** (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**: 2551-61.
- Doudna J.A. & Charpentier E.** (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**: 6213.
- Doudna J.A. & Gersbach C.A.** (2015). Genome editing: the end of the beginning. *Genome Biology*, **16**: 292.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2013). Antibiotic resistance threat in the United States. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- Christian M., Cernak T., Doyle E., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J. & Voytas D. F.** (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, **186**: 757-61.
- Cho S., Choe D., Lee E., Kim S.C., Palsson B. & Cho B.** (2018). High-Level dCas9 expression induces abnormal cell morphology in *Escherichia coli*. *American Chemical Society Synthetic Biology*, **7**: 1085-94.
- Cobb R. E., Wang Y. & Zhao H.** (2014). High-Efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *American Chemical Society Synthetic Biology*, **4**: 723-28.
- Cox C.L., Tietz J.I., Sokolowski K., Melby J.O., Doroghazi J.R. & Mitchell D.A.** (2014). Nucleophilic 1,4-additions for natural product discovery. *Chemical Biology*, **9**: 2014-22.
- Guy C.P., Majernik A.I., Chong J.P.J. & Bolt E.L.** (2004). A novel nuclease-ATPase (Nar71) from archaea is part of a proposed thermophilic DNA repair system. *Nucleic Acids Research*, **32**: 6176-86

- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. & Nakata A.** (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, **169**: 5429-33.
- Huang H., Zheng G., Jiang W., Hu H. & Lu Y.** (2015). One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, **47**: 231-43.
- Jansen R., van Embden J.D.A., Gaastra W. & Schouls M.L.** (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, **43**: 1565-75.
- Jia H., Zhang L., Wang T., Han J., Tang H. & Zhang L.** (2017). Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus*. *Microbiology*, **163**: 1148-55.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A. & Charpentier E.** (2012). A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**: 816-22.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E. Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E. & Doudna J.A.** (2014). Structure of Cas9 endonuclease reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, **343**: 12479971-11
- Just-Baringo X., Albericio F. & Álvarez M.** (2014). Thiopeptide antibiotics: retrospective and recent advances. *Marine drugs*, **12**: 317-51.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. & Hopwood D.A.** (2000) Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, 585 pp.
- Li L., Wei K., Zheng G., Liu X., Chen S., Jiang W. & Lu Y.** (2018). CRISPR-Cpf1-Assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**: e00827-18
- Lim Y.H., Wong F.T., Yeo W.L., Ching K.C., Lim Y.W., Heng E., Chen S., Tsai D., Lauderdale T., Shia K., Ho Y.S., Hoon S., Ang E.L., Zhang M. & Zhao H.** (2018). Auroramycin: a potent antibiotic from *Streptomyces roseosporus* by CRISPR-Cas9 activation. *Chembiochem*, **19**: 1716-19.
- Liu X., Homma A., Sayadi J., Yang S., Ohashi J. & Takumi T.** (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, **6**: 19675-84.
- Liu Y., Tao W., Wen S., Li Z., Yang A., Deng Z. & Sun Y.** (2015). *In vitro* CRISPR/Cas9 system for efficient targeted DNA editing. *American Society for Microbiology*, **6**: e01714-15
- Low Z.J., Pang L.M., Ding Y., Cheang Q.W., Hoang K.L.M., Tran H.T., Li J., Liu X., Kanagasundaram Y., Yang L. & Liang Z.** (2015). Identification of a biosynthetic gene cluster for the polyene macrolactam sceliphrolactam in a

- Streptomyces* strain isolated from mangrove sediment. *Scientific reports*, **8**: 1594-07.
- Makarova K.S., Araindl., Grishin N.V., Rogozin I.B. & Koonin E.V.** (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, **30**: 482-96.
- Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y. I. & Koonin E.V.** (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, **1**: 26.
- Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M.** (2014). The microbial resistance crisis: causes, consequences and management. *Frontiers in public health*, **2**: 145.
- Medema M. H., Breitling R. & Takano E.** (2011). Synthetic Biology in *Streptomyces* Bacteria. *Methods in enzymology*, **47**: 485-02.
- Mojica F.J., Diez-Villaseñor C., Soria E. & Juez G.** (2000). Biological significance of a family of regularly paced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular biology*, **36**: 244-46.
- Mojica F.J., Diez-Villaseñor C., García-Martínez J. & Soria E.** (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, **60**:175-82.
- Nemydryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P. & Zakian S.M.** (2014). TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae*, **6**: 19-40.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehate S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F. & Nureki O.** (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, **156**: 935-49.
- Nybo S.E., Shepherd M.D., Bosserman M.A. & Rohr J.** (2010). Genetic Manipulation of *Streptomyces* Species. *Current Protocols in Microbiology*, **19**: 10E.3.1-26.
- Paradkar A., Trefzer A., Chakraborty R. & Stassi D.** (2003). *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, **23** :1-27.
- Pigac J. & Schrepf H.** (1995). A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 352-56.
- Pourcel C., Salvignol G. & Vergnaud G.** (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**: 653-63.

- Qin Z., Munnoch J.T., Devine R., Holmes N.A., Seipke R.F, Wilkinson K.A., Wilkinson B. & Hutchings M.I.** (2017). Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African *Tetraponera* plant-ants. *Chemical Science*, **8**: 3218-27.
- Qiu P., Shandilya H., D'alessio J.M., O'Connor K., Durocher J., Gerard G.F.** (2004). Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques*, **34**: 702-7.
- Reis A., Hornblower B. & Tzertzinis G.** (2014). CRISPR/Cas9 and targeted genome editing: a new era in molecular biology. NEB Expressions, issue I. Encontrado en línea en: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-Cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>
- Shevchuk N. A., Bryksin A. V., Nusinovich Y. A., Cabello F. C., Sutherland M. & Ladisch S.** (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*, **32**: e19.
- Shuman S. & Glickman M.S.** (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews Microbiology*, **5**: 852-61.
- Skinnider M.A., Johnston C.W., Edgar R.E., Dejong C.A., Merwin N.J., Rees P.N. & Magarvey N. A.** (2016). Genomic charting of ribosomally synthesized natural product chemical space facilitates targeted mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**: E6343-351.
- Sorek R., Kunin V. & Hugenholtz P.** (2008). CRISPR- a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews*, **6**: 181- 86.
- Tao W., Yang A., Deng Z. & Sun Y.** (2018). CRISPR/Cas9-Based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 1660-8.
- Tao, W., Yurkovich M.E., Wen S., Lebe K.E., Samborsky M., Liu Y., Yang A., Liu Y., Ju Y., Deng Z., Tosin M., Sun Y. & Leadlay P.F.** (2016). A genomics-led approach to deciphering the mechanism of thiotetronate antibiotic biosynthesis. *Chemical Science*, **7**: 376-85.
- Tong Y., Charusanti P., Zhang L., Weber T. & Lee S.Y.** (2015). CRISPR-Cas9 based engineering of Actinomycetal genomes. *ACS Synthetic Biology*, **4**: 1020-29.
- Wang Y., Cobb R.E. & Zhao H.** (2016). High-efficiency genome editing of *Streptomyces* species by an engineered CRISPR/Cas System. *Methods in Enzymology*, **575**: 271-84.
- Wang T., Wei J. J., Sabatini D. M. & Lander E. S.** (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas system. *Science*, **343**: 80-84.

- World Economic Forum** (2018). The Global Risks Report 2018. Disponible en: http://www3.weforum.org/docs/WEF_GRR18_Report.pdf
- World Health Organization (WHO)** (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- Xie S., Shen B., Zhang C., Huang X. & Zhang Y.** (2014). sgRNACas9: A software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. *PLOS one*, **9**: e100448.
- Yang Y., Wang Y., Li Z., Gong Y., Zhang P., Hu W., Sheng D. & Li Y.** (2017). Increasing on-target cleavage efficiency for CRISPR/Cas9-induced large fragment deletion in *Myxococcus xanthus*. *Microbial cell factories*, **16**: 142-57.
- Zhang M.M, Wong F.T., Wang Y., Luo S., Lim Y.H., Heng E., Yeo W.L., Cobb R.E., Enghiad B., Ang E.L. & Zhao H.** (2017). CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nature chemical biology*, **13**: 607-9
- Zhao Y., Li L., Zheng G., Jiang W., Deng Z., Wang Z. & Lu Y.** (2018). CRISPR/dCas9-Mediated multiplex gene repression in *Streptomyces*. *Biotechnology Journal*, **13**: 1800121-31.

ANEXO

Tabla A1. Lista de plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Fuente o referencia
pCRISpomyces-2	Plásmido utilizado para llevar a cabo CRISPR-Cas en <i>Streptomyces</i>	Wang <i>et al.</i> , 2016
pCRISPomyces-2-sgRNA-1-NHEJ	pCRISPomyces-2 más secuencia de sgRNA-1, reparación por medio de NHEJ	Este estudio
pCRISPomyces-2-sgRNA-2-NHEJ	pCRISPomyces-2 más secuencia de sgRNA-2, reparación por medio de NHEJ	Este estudio
pCRISPomyces-2-sgRNA-1-HDR	pCRISPomyces-2 más secuencia de sgRNA-1 y secuencia de recombinación homóloga, reparación por medio de HDR	Este estudio

Tabla A2. Lista de secuencias de protoespaciadores obtenidos con el programa sgRNACas9, a partir de las secuencias del genoma de *S. mobaraensis* y del gen *ctm*. En negritas se encuentra resaltada la región PAM.

Protoespaciadores	Secuencia (5'-3')
1	GCGAAGCTCGAACTGGACCT CGG
2	CCTCGGCGACCTGAGCGTCG AGG
3	CGACGTGCTGCCCACCTCGC CGG
4	GACGTGCTGCCCACCTCGCC GGG
5	GGCCTGGAGTCGATCAACGT CGG
6	GATCAACGTGCGCCACGCCAT TGG
7	GGCCACGCCATGGTCGAGAT CGG
8	GCGTCCAACCTGCACCTCGCG CGG

Tabla A3. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

Categoría	Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
Construcción del plásmido	sgRNA-1-Fw	acgcCCTCGGCGACC TGAGCGTCG	opción uno de espaciador de ctm
	sgRNA-1-Rv	aaacCGACGCTCAGG TCGCCGAGG	opción uno de espaciador de ctm
	sgRNA-2-Fw	acgcGGCCACGCCAT GGTCGAGAT	opción dos de espaciador de ctm
	sgRNA-2-Rv	aaacATCTCGACCAT GGCGTGGCC	opción dos de espaciador de ctm
	1-F	gtgtgtctagaGCTGCTA CCTTTCGATCCC	amplificación de 1 kb del cluster ctm brazo de homología - izquierdo, minúsculas sitio XbaI
	2-R	catccctcgaggatatcaagc ttcactgcagatctgaattcGT CGCCGAGGTTTCAGT TC	amplificación de 1 kb del cluster ctm brazo de homología - izquierdo, minúsculas sitio múltiple de restricción, negrita mutación introducida para generar un codón de paro
	3-F	gaattcagatctgcagtgaag cttgatattcctcgaggatgC GGCCTGGAGTCGAT CAA	amplificación de 1 kb del cluster ctm brazo de homología - derecho, minúsculas sitio múltiple de restricción
	4-R	gtgtgtctagaCCCCATA CCCAGGAGAGTTC	amplificación de 1 kb del cluster ctm brazo de homología - derecho, minúsculas sitio XbaI

Tamizaje por PCR	ctmB-Fw-1	CACCGAACGAGAGG AGGAC	amplificación del gen del prepérido de la ciclotiazomicina a partir del DNA de <i>S. mobaraensis</i>
	ctmB-Fw-2	CCGCTGACCTGGTG AGAC	amplificación del gen del prepérido de la ciclotiazomicina a partir del DNA de <i>S. mobaraensis</i> , 135 pb río arriba del oligo ctmB-Fw-1
	ctmB-Rv-1	CTCGCTGGTGGTCG TTCC	amplificación del gen del prepérido de la ciclotiazomicina a partir del DNA de <i>S. mobaraensis</i>
	screening-1-F	AGCTGTACCTGTGG CTCG	amplificación de 2 kb del cluster ctm correspondiente a los brazos de homología en caso de haber sucedido recombinación en las exconjugantes
	screening-4-R	GTGCGGTAGTAGGC GTAGTC	amplificación de 2 kb del cluster ctm correspondiente a los brazos de homología en caso de haber sucedido recombinación en las exconjugantes
Secuenciación	sgRNA-seq-for	GCGGTGTGAACTT CTGTGA	secuenciación del sgRNA en pCRISPomyces-2

sgRNA-seq-rev	TTTTACGGTTCCTGG CCTCT	secuenciación del sgRNA en pCRISPomyces-2
Fw-Apr	TATCACCACCGACTA TTTGCAAC	secuenciación del gen de resistencia a apramicina a partir de pCRISPomyces-2
Rv-Apr	CTGAAGAAAGACAA TCCCCGATC	secuenciación del gen de resistencia a apramicina a partir de pCRISPomyces-2
