

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

CRISPR, EMPLEO PARA LA EDICIÓN GENÉTICA EN ACTINOMICETOS



CARLA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ

**Departamento de Biología Funcional/
Universidad de Oviedo**

Julio / 2021



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	5
2.1 Hipótesis.....	6
3. Materiales y métodos	6
4. Desarrollo del trabajo.....	7
4.1 Antecedentes	7
4.2 CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica en <i>Actinomyces</i>	8
Construcción e inserción de CRISPR para la edición génica	10
Limitaciones en el uso de CRISPR-Cas9	12
4.3 Alternativas al sistema CRISPR-Cas9 convencional en <i>Actinomyces</i>	14
Nickasa Cas9.....	14
CRISPRi y CRISPRa.....	15
CRISPR BEST.....	17
Otras proteínas Cas	19
CRISPR endógenos.....	21
Sistema ICE <i>in vitro</i>	21
5. Conclusiones.....	22
6. Bibliografía	23

Abreviaturas

ABE: "adenosine base editor" o edición basada en adenosina

ACT: actinorhodina

BGC: clúster de genes biosintéticos

CBE: "cytosine base editor" o edición basada en citosina

CRISPR: "clustered regularly interspaced palindromic repeats"

DSB: "double strand break" o corte de doble hebra

HDR: reparación directa homóloga

NHEJ: unión de extremos no homólogos

NP: productos naturales

PAM: motivo adyacente del protoespaciador

PTM: "polycyclic tetramate macrolactam"

PKS: policétido sintasa

RED: undecilprodigiosina

TALENS: nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción

ZFN: nucleasas con dedos de zinc

Declaración de originalidad

Declaro que todos los textos, datos e ilustraciones contenidos en esta memoria son obra original mía, salvo aquellos procedentes de otros autores que han sido debidamente citados siguiendo los procedimientos usuales en este campo de la Ciencia.

Firmado a 5 de Julio de 2021,



Resumen

Durante los últimos años el campo de la edición genómica ha dado un giro gracias al descubrimiento del sistema CRISPR. Aunque las principales aplicaciones de este sistema están relacionadas con la edición de células humanas, son múltiples las disciplinas en las que se puede emplear esta técnica. Dado que uno de los principales problemas es la aparición de bacterias multirresistentes y la falta de nuevos antibióticos, el sistema CRISPR es fundamental para el descubrimiento de nuevos productos de esta índole, trabajando principalmente con el grupo bacteriano *Actinobacteria*. Los Actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas cuya importancia se debe a la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios como por ejemplo inmunosupresores, antibióticos o antitumorales. La mayor parte de estos productos naturales (NP) son producidos por el género *Streptomyces* que contienen en su genoma un elevado número de clústeres de genes biosintéticos (BGC) que en su mayoría están silenciados. El sistema CRISPR permite avanzar en el estudio del genoma de estos organismos, activando o bloqueando determinadas rutas biosintéticas que en definitiva permitan acelerar la producción de estos NP. Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo mostrar la eficacia del sistema CRISPR-Cas9 convencional en la edición de Actinomicetos, así como sus limitaciones y alternativas desarrolladas para continuar con este estudio y con el descubrimiento de nuevos productos de gran importancia farmacológica.

Abstract

In recent years the field of genome editing has taken a turn thanks to the discovery of CRISPR. Although the main applications of this system are related to the editing of human cells, there are many disciplines in which this technique can be used. Given that one of the main problems is the appearance of multi-resistant bacteria and the lack of new antibiotics, the CRISPR system is essential for the discovery of new products of this nature, working mainly with *Actinobacteria*. Actinomycetes are a group of Gram-positive bacteria whose importance is due to the production of many secondary metabolites such as immunosuppressants, antibiotics or antitumoral. Most of these natural products (NP) are produced by *Streptomyces*, which contain in their genome a high number of biosynthetic gene clusters (BGC) that are mostly silenced. The CRISPR system allows to advance in the study of the genome of these organisms, activating or blocking biosynthetic pathways that will accelerate the production of these NP. The aim of this review is to show the effectiveness of the conventional CRISPR-Cas9 system in the editing of *Actinomycetes*, as well as its limitations and alternatives developed to continue studying and discovering new products with pharmacological importance.

1. Introducción

Con el descubrimiento de la doble hélice de DNA en 1953 por Watson y Crick, el campo de la biología empezó a adentrarse en la búsqueda de técnicas que permitiesen manipular y editar nuestro genoma de manera específica y dirigida (Doudna & Charpentier, 2014).

Una de las primeras cuestiones que observaron los científicos fue la capacidad de las células eucariotas de activar mecanismos de reparación propios tras sufrir cortes en la doble hebra del DNA (DSB) (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017). Estos mecanismos de reparación endógenos podían ser o bien mediante una recombinación homóloga (HDR o *reparación directa por homología*) o mediante recombinación no homóloga (NHEJ o *unión de extremos no homólogos*). Este último, a pesar de ser un mecanismo de reparación muy eficaz, es susceptible a introducir mutaciones de tipo “*indels*” (inserciones o deleciones) (Hsu et al., 2014).

Para llevar a cabo una edición génica más precisa y efectiva introduciendo DSBs en el DNA de manera específica, los científicos desarrollaron nuevas herramientas basadas en el uso de distintos tipos de nucleasas. Entre ellas cabe destacar las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs) y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs). Aunque su descubrimiento supuso un gran avance, tanto ZFNs como TALENs presentaban una serie de limitaciones como el elevado coste o la complejidad en el diseño de las proteínas, que dificultaba su uso como técnicas efectivas de edición del DNA (Hsu et al., 2014).

Todo ello cambió con el descubrimiento de CRISPR (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*), una técnica revolucionaria en el campo de la edición génica que resolvía los inconvenientes de las herramientas utilizadas hasta el momento.

CRISPR fue descrita por primera vez en 1987 por unos investigadores japoneses que observaron una serie de pequeñas repeticiones interespaciadas en el genoma de *Escherichia coli*. A partir de este momento el interés fue en aumento y numerosos estudios, entre los que cabe destacar los de Francis Mojica, permitieron entender la utilidad de tales repeticiones en el DNA. El Dr. Mojica, científico español de la Universidad de Alicante, comenzó a investigar en 1989 con *Haloferax mediterranei* donde sorprendentemente observó una serie de segmentos de 30pb que se repetían. Años más tarde, estas repeticiones fueron detectadas en numerosas especies, aproximadamente en un 40% de bacterias y un 90% de arqueas. Ya en 2002 decidieron nombrar a estas secuencias con el acrónimo CRISPR y en 2005, gracias a una serie de análisis bioinformáticos, vieron que esas secuencias palindrómicas derivaban de los fagos que infectaban a bacterias y arqueas. De esta manera, CRISPR no sólo es la herramienta de edición génica que conocemos hoy en día, sino que originalmente se trata de un sistema de inmunidad

adaptativa procariota que permite a bacterias y arqueas defenderse ante la invasión de bacteriófagos (Doudna & Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014; Mojica & Rodriguez-Valera, 2016).

El locus CRISPR presenta una serie de componentes que participan en las distintas etapas de la inmunidad adaptativa. Un esquema general de dicho locus puede observarse en la **Figura 1** donde se distinguen principalmente dos componentes: la región CRISPR con secuencias repetitivas intercaladas por espaciadores de DNA exógeno bien de virus o plásmidos (también conocidos como *protoespaciadores*); y el operón Cas que codifica los componentes de las proteínas Cas. También presenta un locus tracrRNA que desempeña una función clave en las etapas de expresión e interferencia del funcionamiento de CRISPR (Doudna & Charpentier, 2014).

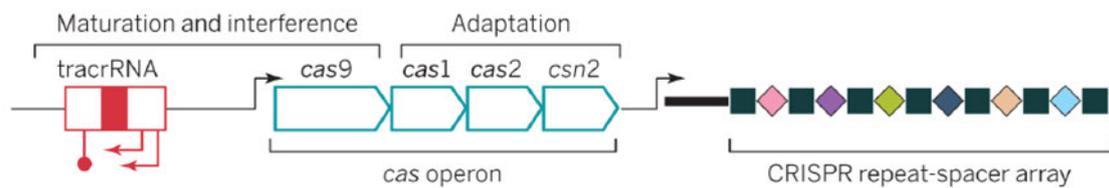


Figura 1. Esquema de la estructura del locus CRISPR-Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014).

El funcionamiento general de CRISPR tiene lugar en tres etapas: adquisición, expresión e interferencia. En la etapa de adquisición tiene lugar la incorporación de pequeños fragmentos de DNA foráneo en el locus CRISPR como *protoespaciadores*. A continuación, se transcribe el locus CRISPR obteniéndose un pre-crRNA que tras ser procesado se convierte en crRNA, formado por una región repetitiva y una pequeña porción espaciadora de DNA exógeno. En la última etapa, crRNA junto con una serie de proteínas de tipo Cas, realizan un corte en el DNA invasor gracias al reconocimiento de una región complementaria a crRNA en el DNA foráneo. En este DNA de interés se encuentra PAM (*protospacer adjacent motif*), un protoespaciador adyacente a la secuencia complementaria a crRNA que facilita ese reconocimiento y posterior escisión del genoma invasor (**Figura 2**) (Doudna & Charpentier, 2014; de la Fuente-Núñez & Lu, 2017).

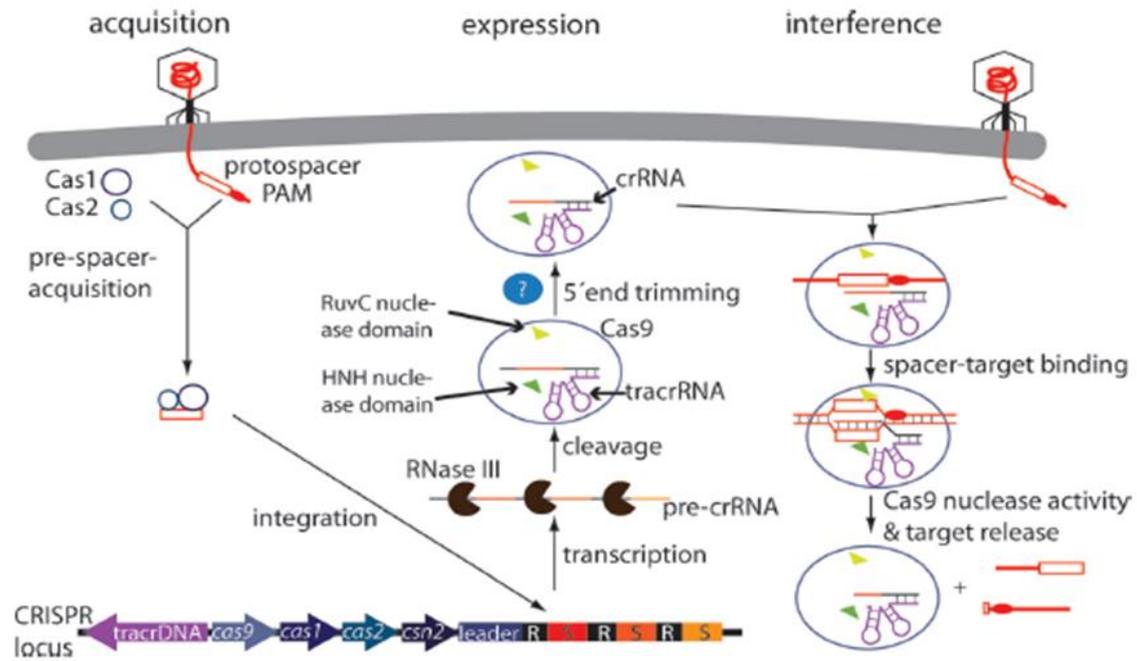


Figura 2. Esquema de las tres etapas correspondientes al funcionamiento del sistema CRISPR-Cas de tipo II. En la fase de adquisición, el DNA invasor (color rojo) atraviesa la pared bacteriana e inmediatamente es procesado por las proteínas Cas (Cas1 y Cas2 representadas con dos círculos azules). A continuación, los fragmentos del DNA invasor se integran en el locus CRISPR como protoespaciadores (S=protoespaciador; R= repeticiones). Comienza la segunda fase de expresión en la que se transcribe el locus CRISPR obteniéndose un pre-crRNA que será procesado por una RNasa de tipo III. Tras la posterior escisión, el complejo crRNA:tracrRNA obtenido se une gracias a la endonucleasa Cas9. De esta manera, el complejo crRNA:tracrRNA:Cas9 ya está listo para efectuar un corte en el DNA invasor en la tercera etapa de interferencia. Este corte se consigue gracias a la presencia de PAM en el genoma de interés (Kirchner & Schneider, 2015)

Por el momento se han identificado seis tipos de sistemas CRISPR-Cas clasificados en dos clases: clase 1 con los tipos I, III y IV; y clase 2 con los tipos II, V y VI. Estos se diferencian en el mecanismo molecular que utilizan. Mientras los tipos I, III y IV necesitan múltiples proteínas Cas para el reconocimiento y escisión del DNA de interés, los tipos II, V y VI utilizan una única proteína Cas. Aunque cada uno de ellos presenta una serie de ventajas y aplicaciones muy útiles, el más conocido y estudiado es el sistema CRISPR-Cas de tipo II que utiliza una endonucleasa concreta, Cas9, que facilita el correcto funcionamiento del sistema. Además, tanto los tipos I como II necesitan de la presencia de PAM en el DNA diana para el reconocimiento de la secuencia complementaria al crRNA (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017; Nishimasu & Nureki, 2017).

Así, gracias a su eficacia y precisión, el sistema CRISPR-Cas es considerado como una de las técnicas más prometedoras en el campo de la investigación, entre otros. Cada vez son más sus aplicaciones, entre la que cabe destacar la búsqueda de nuevos fármacos como antitumorales o inmunosupresores.

Con el paso de los años, el aumento de bacterias multirresistentes o los efectos secundarios derivados de tratamientos como la quimioterapia, hace cada vez más necesario la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Ante este desafío, CRISPR-Cas y el grupo de bacterias *Actinomycetes* juegan un papel clave en esta búsqueda (Olano et al., 2009).

Los Actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas imprescindibles en la producción de metabolitos secundarios conocidos como productos naturales (NP), que son moléculas bioactivas con una gran importancia farmacológica. Aproximadamente producen dos tercios del total de NP y entre ellos, el género *Streptomyces* es el productor de más del 70%. Se estima que cada cepa del género *Streptomyces* produce alrededor de 20 metabolitos secundarios, todos ellos con función antimicrobiana, antitumoral o antiinflamatoria. Un ejemplo de ello es el antibiótico daptomicina, uno de los más conocidos producidos por *Streptomyces*. Este producto natural se utiliza en clínica para el tratamiento de infecciones cutáneas o patologías más severas como la bacteremia o la endocarditis causada por *Staphylococcus aureus* (Alberti & Corre, 2019; Salwan & Sharma, 2020).

A pesar de esto, gracias a una serie de análisis bioinformáticos de distintas cepas de *Streptomyces*, se vio que parte de los grupos de genes biosintéticos de NP (*biosynthetic gene clusters* o BGCs) estaban silenciados o poco expresados. Ya se habían desarrollado distintas estrategias para manipular el genoma de estas bacterias, pero resultaban poco eficientes y muy costosas. Esto cambió con el descubrimiento de CRISPR que, de manera rápida y eficiente, permite hoy en día llevar a cabo modificaciones en los BGCs, activando determinadas rutas biosintéticas y acelerando así el descubrimiento y la producción de nuevos NP. El sistema más utilizado para llevar a cabo todos estos cambios en el genoma de actinobacterias es el CRISPR-Cas9 por su fácil manejo y rapidez. Aun así, una serie de limitaciones hace necesario el uso de otros tipos de proteínas Cas que iremos desarrollando a lo largo de este trabajo (Zhao et al., 2020; Heng et al., 2021).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar y comprender el sistema CRISPR como herramienta de edición génica. Para ello, además de las cuestiones planteadas en la parte introductoria, abordaré otros puntos:

- Comprensión del sistema CRISPR-Cas9 convencional como herramienta de edición génica en Actinomicetos y concretamente en *Streptomyces*.
- Plantear las principales limitaciones derivadas del uso de CRISPR-Cas9.

- Valorar y desarrollar otras alternativas a CRISPR-Cas9. Ventajas del uso de otras endonucleasas frente a los inconvenientes derivados del uso de Cas9.
- Análisis y activación de las rutas biosintéticas y BGCs del genoma de Actinomicetos que están silenciadas o poco expresados. Papel clave en la obtención de nuevos metabolitos secundarios de interés farmacológico.
- Ventajas del uso de CRISPR-Cas frente a otras técnicas de edición génica.

2.1 Hipótesis

La técnica CRISPR es una herramienta de modificación genética muy conocida en el ámbito clínico y ampliamente difundida por los medios de divulgación científica centrándose especialmente en el uso de CRISPR en la modificación genética de células humanas. El empleo de este sistema no queda solamente relegado a ese campo por lo que, con esta revisión bibliográfica, se pretende arrojar luz sobre el sistema CRISPR y su uso como técnica de edición génica, en este caso, en el mundo bacteriano concretamente en Actinomicetos.

3. Materiales y métodos

Al tratarse de un trabajo bibliográfico, los materiales empleados han sido, en su mayoría, artículos científicos disponibles en distintas bases de datos o en revistas científicas.

En una primera toma de contacto con el tema comencé buscando las palabras clave en Google siendo estas “CRISPR-Cas” y “Actinomycetes”. Así, conseguí profundizar y comprender más sobre CRISPR-Cas, ya que es una herramienta de edición génica poco conocida en este campo.

Con las ideas generales claras, comencé a llevar a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva. Para ello busqué en bases de datos como *ScienceDirect*, *Pubmed* o *ResearchGate* y en revistas científicas entre las que cabe destacar *Science* y *Nature*. El número de artículos en *Pubmed* no era excesivamente elevado y se veía claramente como iban aumentando con los años (**Figura 3**), lo que reflejaba un mayor interés por el uso de esta técnica de edición genómica en Actinomicetos.

Ante la dificultad de acceder a determinados artículos, la ayuda de mi tutor Carlos Olano Álvarez fue clave a la hora de completar la búsqueda de información. Además, para que el manejo de la bibliografía fuese más sencillo, utilicé un gestor bibliográfico llamado *Zotero*.

Con todo ello, conseguí recopilar información suficiente para desarrollar el tema de manera clara y completa.

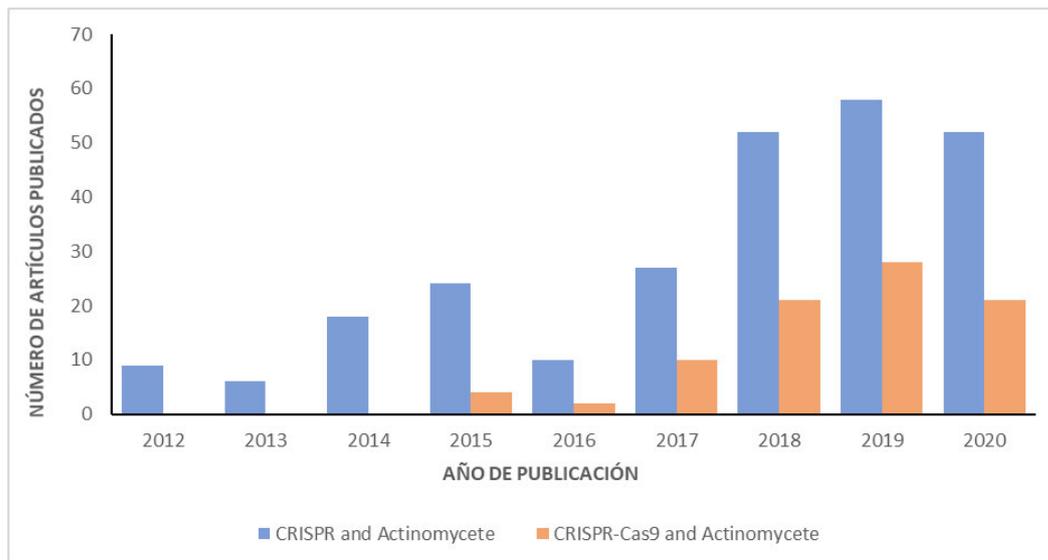


Figura 3. Número de artículos publicados en NCBI Pubmed según el año y la palabra clave buscada

4. Desarrollo del trabajo

4.1 Antecedentes

Uno de los principales retos durante los últimos años ha sido la activación de BGCs silenciados presentes en los genomas de Actinomicetos, especialmente en aquellos del género *Streptomyces*. Por ello y previo al descubrimiento del sistema CRISPR-Cas, se han ido desarrollando diferentes estrategias y técnicas para conseguir la activación de estos genes y aumentar así la producción de productos naturales de distinta índole.

Las técnicas más tradicionales, entre las que se incluyen la delección, disrupción o el intercambio de DNA, presentaban numerosas limitaciones que las hacían muy laboriosas y costosas para llevar a cabo una ingeniería genómica eficiente. Así, desde el 2003 se han ido desarrollando métodos más novedosos para llevar a cabo una edición efectiva en *Streptomyces*. Una de las primeras en utilizarse ha sido el sistema PCR-targeting, muy eficiente en la delección de determinados genes de numerosas cepas de bacterias. Otras aproximaciones como el sistema de recombinación Cre-loxP o las anteriormente mencionadas ZFN y TALEN han sido también muy útiles durante muchos años (Zhao et al., 2020).

Pero a las numerosas limitaciones que presentaban estas técnicas se suma la complejidad a la hora de trabajar con Actinomicetos en parte debido a su crecimiento micelar, inestabilidad genómica y su elevada composición en GC superior al 70% (Tong et al., 2019).

El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas resolvió los inconvenientes de las técnicas más tradicionales y permitió editar múltiples genomas de manera simplificada y exitosa. Desde ese momento, múltiples variantes al sistema convencional CRISPR-Cas9 se han ido desarrollando para resolver las limitaciones que dificultaban su uso (Tong et al., 2019).

4.2 CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica en *Actinomycetes*

El sistema CRISPR-Cas9 se ha convertido en una de las tecnologías punteras en la edición del genoma de numerosas especies, entre los que cabe destacar los Actinomicetos. El funcionamiento de este sistema es común al de todos los sistemas CRISPR-Cas pero con la particularidad de que utiliza una endonucleasa concreta, en este caso Cas9. Junto con la ayuda del resto de componentes del sistema, son capaces de manipular y editar determinados genes y genomas de manera simple y dirigida.

Su sencillez se debe a la necesidad de sólo tres componentes para su correcto funcionamiento. Por un lado una nucleasa, en este caso Cas9 derivada de la obtenida a partir de *S.pyogenes*; y dos RNA no codificantes conocidos como crRNA y tracrRNA que guían al complejo tracrRNA:crRNA:Cas9 a su sitio de interés en el DNA. Con los años este sistema fue evolucionando y haciéndose cada vez más sencillo sustituyendo el complejo tracrRNA:crRNA por sgRNA, un único RNA guía que mantiene dos cuestiones clave. En primer lugar, una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' que permite el emparejamiento con el DNA de interés según las reglas de Watson-Crick. En segundo lugar, una estructura de doble hebra en el extremo 3' que se engancha a Cas9 ubicándola en el sitio exacto para realizar el corte. De esta manera el nuevo complejo sgRNA:Cas9 será el encargado de la búsqueda del protoespaciador PAM en el extremo 3' de la secuencia genómica de interés (**Figura 4**) (Doudna & Charpentier, 2014; Tong et al., 2019).

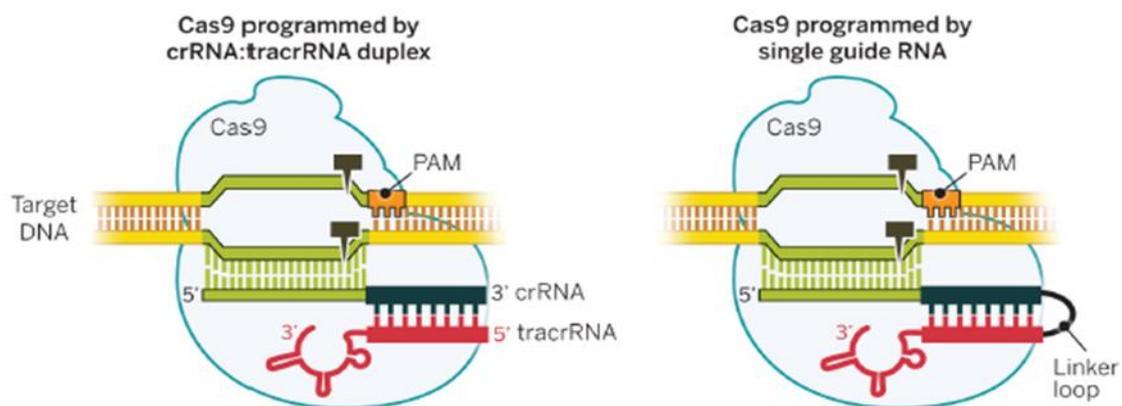


Figura 4. Evolución y estructura de Cas9 hasta llegar al complejo sgRNA (Doudna & Charpentier, 2014)

Una de las particularidades de Cas9 es su multifuncionalidad y la presencia de dos dominios en su estructura llamados HNH y RuvC, que son los responsables de introducir los cortes de doble hebra en el DNA de interés. Por un lado, utilizan el dominio HNH para cortar la cadena de DNA complementaria a la secuencia nucleotídica de crRNA. En cambio, el dominio RuvC se encarga de cortar la cadena de DNA que es opuesta a la complementaria. Si introducimos mutaciones en estos dos dominios obtenemos la variante de tipo nickasa que sólo realiza el corte en una de las dos hebras solventando problemas causados por la Cas9 original (Doudna & Charpentier, 2014).

El proceso de edición comienza con la generación del complejo sgRNA:Cas9 que analizará el genoma del Actinomiceto a manipular para la búsqueda de las secuencias PAM asociadas al punto de remodelación. En el caso de Cas9 la secuencia PAM es NGG siendo N cualquiera de las 4 bases nucleotídicas (A, G, C o T). Cuando lo encuentran, se unen a él y abren la doble hélice, activándose los dominios HNH y RuvC de Cas9 que estarán listos para efectuar el corte en las hebras. Este corte no lo hacen en una posición al azar sino que únicamente lo efectúan 3 nucleótidos corriente arriba del motivo PAM en dirección a la secuencia complementaria a sgRNA (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017; Tong et al., 2019).

Estos cortes en la doble hebra (DSB) son considerados uno de los eventos más peligrosos para el genoma del organismo en cuestión pudiendo llegar a causar hasta su muerte. Para reparar el daño causado en el DNA, se activarán inmediatamente los sistemas de reparación propios como son NHEJ y HDR. El sistema NHEJ se encarga de reparar la lesión del genoma pero es propenso a errores ya que introduce mutaciones de tipo *indels* que puede acabar en la inactivación o *knock-out* del gen afectado. Sin embargo, este sistema está ausente en la mayor parte de bacterias, entre ellas el género de *Streptomyces*, que utilizarán el mecanismo de recombinación homóloga HDR. Este sistema de reparación es menos eficiente y sólo tiene lugar si, además de sgRNA y Cas9, introducimos una secuencia de DNA exógena. Esta secuencia será elegida por el propio investigador y además de contener los cambios a realizar en el genoma del Actinomiceto, tendrá que ser homóloga a las regiones que flanquean la región escindida. Esto nos permite reparar la lesión y modificar o insertar secuencias (*knock-in*) de manera precisa y simultáneamente (**Figura 5**) (Xiong et al., 2016; de la Fuente-Núñez & Lu, 2017; Tong et al., 2019; Nishida & Kondo, 2021).

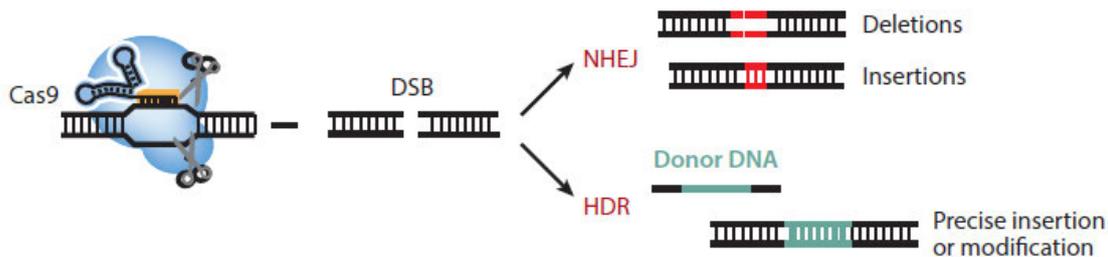


Figura 5. Sistemas de reparación y edición activados tras el corte de doble hebra (DSB) producido por Cas9 (Xiong et al., 2016).

Construcción e inserción de CRISPR para la edición génica

Una de las técnicas más empleadas para la edición génica con CRISPR-Cas9 es el uso de plásmidos que contengan sgRNA, Cas9, promotores que guíen la expresión de los componentes del locus CRISPR-Cas9 y otros elementos que en su conjunto permiten llevar a cabo la función determinada en el Actinomiceto con el que estemos trabajando.

En la mayoría de los casos se utiliza como intermediaria a *Escherichia coli* para la construcción del plásmido en cuestión, que será transferido posteriormente al Actinomiceto por conjugación. En otras ocasiones, se emplean también técnicas bioinformáticas como Genscript para el diseño experimental o kits ya preparados a tal efecto (Huang et al., 2015).

Son varios los plásmidos a destacar cuando se manipulan genomas de Actinomicetos, en concreto en el género *Streptomyces*. En primer lugar pCRISPRomyces-2 (Cobb et al., 2015); el plásmido pCRISPR-Cas9 (Tong et al., 2015); pKCas9dO (Huang et al., 2015) y finalmente pWHU2059, también conocido como CRISPR/Cas9-CodA(sm) (Zeng et al., 2015). Todos estos están basados en el replicón pSG5 sensible a la temperatura que facilitará posteriores tandas de edición. Esto se consigue llevando a cabo dos o tres rondas a alta temperatura que nos permiten obtener mutantes libres de plásmidos, aunque resulta muy costoso sobre todo para aquellos *Streptomyces* de crecimiento lento. Además, comparten la estrategia de incorporar en el mismo plásmido SpCas9, sgRNA y en algunos casos, el *editing template*. Casi todos se basan en la vía de reparación HDR gracias a la maquinaria de recombinación homóloga HR, que permite tanto activar como inactivar los genes de interés seleccionados (Tong et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Cada uno de estos plásmidos han demostrado una eficiencia muy alta desde 70-100% del plásmido pCRISPRomyces-2 hasta casi un 100% en el caso del plásmido pCRISPR-Cas9. Son varios los genes que se han logrado activar e inactivar, muchos de ellos con importancia farmacológica. Un ejemplo es el plásmido pCRISPRomyces-2 que ha logrado llevar a cabo una deleción precisa de varios genes en *S. lividans*, *S. albus* y *S. viridochromogenes*. Dos de estos genes han sido *actI-*

ORF2, productor del antibiótico actinorhodina (ACT) con importancia como bioindicador de pH; y el gen *redN*, productor de undecilprodigiosina (RED), un alcaloide importante por su actividad antipalúdica. Además, también han conseguido identificar una serie de metabolitos únicos como por ejemplo un policétido novel de tipo II en *S. viridochromogenes* y la activación de distintos BGC silenciados en varias especies de *Streptomyces*, como el clúster del pigmento indigoidina en *S. albus* o un clúster PTM (*polycyclic tetramate macrolactam*) en *S. griseus*. La **Tabla 1** refleja estos y otros genes que en definitiva han sido editados de manera satisfactoria (Zeng et al., 2015; Zhang et al., 2017; Lee et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Tabla 1. Tabla comparativa de las aplicaciones de CRISPR-Cas9 en distintas bacterias del género *Streptomyces* (Tong, et al., 2019).

Species	Cas type ^f	sgRNA	DSB repair	Multiplex	Editing size (bp)	Editing efficiency ^g (%)	Backbone plasmid	Editing type	Related compound
<i>S. lividans</i>	SpCas9	Yes ^a	HR	Yes	20–31 415	100/21.4–25	pSG5	Knockout	Undecylprodigiosin, actinorhodin
<i>S. viridochromogenes</i>	SpCas9	Yes	HR	Yes	20–23	66.7–100	pSG5	Knockout	Phosphinothricin tripeptide
<i>S. albus</i>	SpCas9	Yes	HR	Yes	67–13 214	66.7–100	pSG5	Knockout	Polycyclic tetramic acid, macrolactam
<i>S. coelicolor</i>	SpCas9	Yes	HR	No	666	94	pWHU	Knockout	Actinorhodin
<i>S. coelicolor</i>	SpCas9	Yes	Defective NHEJ	No	1–37 173	3–54	pGM1190	Knockout	Actinorhodin
			NHEJ	No	Indel ^b	69–77	(pSG5 replicon)		
			HR	No	1795–1952	97–100			
<i>S. coelicolor</i>	Dead SpCas9	Yes	N.R. ^e	No	NR ^e	100	pGM1190	Knockdown	Actinorhodin
							(pSG5 replicon)		
<i>S. coelicolor</i>	SpCas9	Yes	HR	No	768–82 867	29–100	pKC1139	Knockout	Undecylprodigiosin, actinorhodin
							(pSG5 replicon)		
<i>S. formicae</i>	SpCas9	Yes	HR	No	~43 000 ^f	ND ^d	pSG5	Knockout	Formicamycins
<i>S. rimosus</i>	SpCas9	Yes	HR	Yes	1–8	100 33.3–40	pSG5	Knockout	Oxytetracycline
<i>S. sp. SD85</i>	SpCas9	Yes	HR	Yes	14–833	ND ^d	pGM1190	Knockout	Sceliphrolactam
							(pSG5 replicon)		
<i>S. albus</i>	SpCas9	Yes	HR	No	94–1097	60–100	pSG5	Knockin	Indigoidine
<i>S. lividans</i>	SpCas9	Yes	HR	No	97	66–100	pSG5	Knockin	Undecylprodigiosin, actinorhodin
<i>S. roseosporus</i>	SpCas9	Yes	HR	No	97–774	50–100	pSG5	Knockin	Macrolactam photocyclized alteramide A, FR-900098
<i>S. venezuelae</i>	SpCas9	Yes	HR	No	774	38–64	pSG5	Knockin	<i>m/z</i> 425 ^f
<i>S. viridochromogenes</i>	SpCas9	Yes	HR	No	97	100	pSG5	Knockin	<i>m/z</i> 405 ^f , <i>m/z</i> 780 ^f

Aunque estos plásmidos habían tenido mucho éxito en varias especies de *Streptomyces*, resultaba complejo utilizarlos en *S. rimosus*, en parte porque su genoma era diferente al resto al contener una serie de regiones conservadas o genes raros que en definitiva no estaban presentes en el resto de *Streptomyces*. La importancia de esta bacteria se debe a que es el productor del antibiótico oxitetraciclina que posee un amplio espectro y es muy utilizado en clínica para tratar infecciones bacterianas como la enfermedad de transmisión sexual causada por *Neisseria gonorrhoeae*, que afecta en gran medida al ser humano. Es por ello que, utilizando el plásmido pCRISPomyces-2, un grupo de científicos llevó a cabo una investigación para determinar la eficiencia de este sistema en *S. rimosus*. Para ello eligieron dos genes, *zwf2* y *devB*, ambos claves en la producción del antibiótico y en la codificación de dos enzimas muy importantes en la ruta de las pentosas fosfato. De manera eficiente lograron introducir

mutaciones simples y dobles, además de interrupciones en los genes de interés con una eficiencia que alcanzaba en la mayoría de los casos el 100%. Lo más llamativo era que la producción de oxitetracilina en los mutantes obtenidos aumentaba entre un 10 y un 37% (Jia et al., 2017).

Así, este estudio permite abrir la puerta al uso de CRISPR-Cas9 de manera eficiente en *S.rimosus* a pesar de las múltiples diferencias que le separan del resto de *Streptomyces*.

Limitaciones en el uso de CRISPR-Cas9

A pesar de ser una de las técnicas más prometedoras, numerosas limitaciones dificultan hoy en día su empleo en la edición de organismos bacterianos como los Actinomicetos.

Uno de los inconvenientes de CRISPR-Cas9 son los efectos *off-target* producidos por Cas9, que dan lugar a mutaciones y reordenamientos cromosómicos, que en definitiva producen una alteración fenotípica en la bacteria en cuestión. Una de las claves para tratar de solucionar este problema es trabajar a nivel de las nucleasas Cas9, controlando en particular su concentración intracelular ya que se ha demostrado que pequeñas cantidades de esta reduce notablemente los efectos producidos en lugares diferentes a la diana seleccionada. Algunos investigadores han optado por utilizar la variante de Cas9 de tipo nickasa que sólo corta una hebra del DNA. También se han desarrollado herramientas bioinformáticas, como CRISPRdirect, que permite diseñar nuevos y más específicos sgRNA que dirigen a Cas9 directamente a la región diana. Uno de los retos del futuro, sobre todo para genomas más grandes, es determinar de manera específica la razón de la ocurrencia de los efectos *off-target* para así poder prevenir su incidencia en el genoma en cuestión (Tian et al., 2017; Tong et al., 2019).

Otra limitación es la eficiencia en la adquisición del complejo Cas9/sgRNA por parte del genoma del Actinomiceto con el que estamos trabajando, que nos indicará si es posible o no llevar a cabo la edición en ese organismo. Por ello, son necesarias técnicas robustas como el uso de plásmidos transferidos por conjugación y que codifican sgRNA y Cas9 en el genoma bacteriano (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017; Tong et al., 2019).

Uno de los componentes de estos plásmidos es el replicón, siendo uno de los más comunes el pSG5 que es sensible a la temperatura. Aunque ha demostrado con creces una alta eficiencia, se ha visto que no es el más adecuado a la hora de editar genes de tipo policétido sintasa (PKS), que sintetizan precursores de productos naturales. Para evitar los efectos no deseados como por ejemplo las recombinaciones, se puede optar por utilizar el replicón pIJ101, muy eficiente

en la edición de genes PKS presentes en Actinomicetos como por ejemplo los productores de rapamicina o tilosina, ambos con gran importancia farmacológica (Mo et al., 2019).

El principal objetivo cuando se opta por trabajar con este sistema es conseguir una edición precisa. Cuando el sistema CRISPR-Cas9 produce los cortes en el DNA (DSB), inmediatamente se activan las vías de reparación anteriormente explicadas, bien NHEJ o HDR. La vía de tipo no homóloga o NHEJ introduce mutaciones potencialmente peligrosas para el organismo, que en muchos casos lleva su muerte. A pesar de esto, se ha utilizado esta vía en *S.coelicolor* y *S.rimosus* para interrumpir la síntesis de actinorhodina, entre otras, de manera satisfactoria. Sin embargo, en la mayoría de *Streptomyces* esta vía es ineficiente al carecer de uno de los componentes, en este caso LigD. Aunque en algunos casos han optado por introducir LigD en el sistema CRISPR-Cas9, la mejor opción para solucionar el problema es llevar a cabo estrategias que supriman la vía NHEJ y de manera paralela, activen la vía HDR de tipo homólogo. Algunos grupos de investigación han logrado, de manera satisfactoria, suprimir la actividad de NHEJ mediante la inhibición de la actividad de la DNA ligasa IV gracias a una pequeña molécula llamada Scr7. Potenciando simultáneamente la vía homóloga conseguiremos nuestro objetivo de estimular e incrementar la producción y activación de diversos metabolitos secundarios sin poner en riesgo la supervivencia del genoma del Actinomiceto (Lee et al., 2019; Tong et al., 2019).

Hay otros retos que son más específicos del sistema tradicional CRISPR-Cas9 como por ejemplo la toxicidad de Cas9. Se ha visto que concentraciones muy elevadas de esta proteína tiene un efecto nocivo para el organismo, afectando sobre todo a su crecimiento. La solución más sencilla es reducir los niveles intracelulares de Cas9 con las técnicas anteriormente mencionadas o incorporar componentes de tipo anti-Cas9 que sean capaces de modular su actividad y reducir los efectos no deseados de manera simultánea (Tong et al., 2019).

Trabajar con genomas de Actinomicetos y concretamente con el género *Streptomyces* también supone un gran desafío para la mayoría de los investigadores. En parte esto se debe a su inestabilidad genómica y a su alto contenido en GC que dificulta en gran medida su manipulación. Además, al utilizar la nucleasa SpCas9, que implica encontrar una secuencia PAM, aumenta considerablemente la probabilidad de generar efectos *off-target* y uniones inespecíficas en general. También se han encontrado sistemas endógenos de CRISPR en los genomas de algunas bacterias como es el caso del *Streptomyces avermitilis*, que contiene el sistema CRISPR/Cas tipo I-E. Se cree que estos sistemas pueden interferir con los sistemas CRISPR externos, afectando así a la eficiencia de la edición. Aún cabe seguir investigando y

profundizando en esta cuestión para determinar de manera clara cómo influyen en la edición genómica de este grupo bacteriano (Qiu et al., 2016; Tong et al., 2019).

4.3 Alternativas al sistema CRISPR-Cas9 convencional en *Actinomycetes*

El sistema CRISPR-Cas9 es clave a la hora de activar o inactivar determinados grupos de genes en los Actinomicetos, pero son varios los inconvenientes que dificultan su uso en muchos géneros. Es por ello que diversos científicos han desarrollado alternativas al sistema tradicional que permite solucionar las limitaciones anteriormente explicadas y avanzar más en la edición genómica de este grupo bacteriano.

Nickasa Cas9

Una de las alternativas al sistema CRISPR-Cas9 común es el uso de la endonucleasa Cas9 modificada, convirtiéndola en su variante de tipo nickasa o Cas9n, que sólo corta una de las dos hebras del DNA y por lo tanto reduce los efectos negativos derivados del uso de Cas9 y las modificaciones *off-target*.

Estas nucleasas se generan introduciendo mutaciones en los dominios de Cas9, bien una mutación D10A en el dominio RuvC o una mutación H8404 en el dominio HNH. Al escindir una única hebra de DNA y producir unos cortes conocidos como *nicks*, no produce DSB y por tanto, no induce la vía de reparación no homóloga NHEJ. Esto es muy útil para los Actinomicetos ya que prevenimos la letalidad causada por esos DSB, además de evitar las mutaciones de tipo *indels* que todo ello conllevaba. Así, se inducirá la vía de reparación homóloga HDR, asociada a una baja probabilidad de efectos *off-target* (Xu et al., 2015; de la Fuente-Núñez & Lu, 2017).

También puede utilizarse Cas9n para introducir dobles *nicks*, utilizando esta nickasa junto con dos sgRNA más pequeños que reconocen sitios *off-target* en el DNA. De esta manera, cada sgRNA recluta una nickasa y generan una rotura de tipo escalonada y de doble *nick*. Conseguimos así mantener una eficiencia *on-target* y reducimos entre 50 y 1500 veces los efectos *off-target* y las mutaciones producidas por esos DSB. Hay que tener en cuenta ciertas consideraciones como por ejemplo el diseño de esos sgRNAs que son esenciales para la formación de los dobles *nicks* o el tipo de nickasas a utilizar, optando por reducir el número de bases y garantizar así su eficiencia (Doudna & Charpentier, 2014; de la Fuente-Núñez & Lu, 2017).

Aunque este sistema ya ha sido adoptado en varias bacterias como *Clostridium cellulolyticum* donde ha demostrado alrededor de un 100% de eficiencia, en *Streptomyces* su aplicación es

ínfima, pero cabe esperar que será una técnica muy eficiente y rápida, sobre todo en aquellos Actinomicetos con baja eficiencia en la transformación del DNA (Zhao et al., 2020).

CRISPRi y CRISPRa

Además de las numerosas aplicaciones anteriormente explicadas del sistema convencional CRISPR, también se ha empezado a utilizar como herramienta para la regulación de la transcripción bacteriana. Esto se ha logrado gracias a la introducción de mutaciones, en este caso en los dos dominios de Cas9 (D10A y H840A), que la transforma en su variante catalítica “muerta” o inactiva conocida como dCas9. Estas dos mutaciones hacen que dCas9 pierda su actividad endonucleasa, pero mantiene su capacidad de unirse al DNA. Con la pérdida de la actividad nucleasa no puede generar cortes en la doble hebra del DNA (DSB), lo que reduce la probabilidad de generar mutaciones o efectos *off-target* al ser independiente de los mecanismos de reparación como NHEJ que dificultaba considerablemente los procesos de edición en muchos Actinomicetos (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017).

Esta variante inactiva dCas9 se utiliza para activar (CRISPRa) o inhibir (CRISPRi) la expresión génica, en ambos casos controlando las distintas fases de la transcripción en estos organismos. Esto supone una nueva ventaja frente al sistema convencional CRISPR ya que CRISPR-dCas9 no va a provocar ningún cambio cromosómico, simplemente regulará y controlará las distintas etapas transcripcionales (Tong et al., 2020).

El sistema CRISPRi se encarga de guiar al complejo dCas9-sgRNA a la región de interés del DNA. Este complejo podrá bloquear la transcripción y controlar la expresión génica retrasando la unión de la RNA polimerasa al promotor, bloqueando la fase de elongación o impidiendo la unión del factor de transcripción (Tian et al., 2017). Aunque CRISPRi se ha demostrado por primera vez en *Escherichia coli*, recientemente se han desarrollado tres sistemas eficientes en *Streptomyces*. El primero de estos sistemas es un CRISPRi de tipo inducible que utiliza un plásmido replicativo junto con el replicón pSG5 sensible a la temperatura y el promotor inducible por tioestreptona *tipAp*. Para determinar su eficacia se trabajó con *S. coelicolor* y con el agrupamiento génico implicado en la biosíntesis de actinorhodina que permitieron concluir que este sistema era eficiente y además reversible en cuanto a la represión génica, siendo más efectivo cuando el gen de interés está localizado en la cadena no molde (Tong et al., 2015; Zhao et al., 2020). Los otros dos sistemas utilizan un plásmido integrativo regulado por promotores constitutivos que han logrado una represión múltiple y simultánea de cuatro genes implicados en la producción de cuatro antibióticos: *act11* de actinorhodina (ACT); *redQ* de undecilprodigiosina (RED); *cdaPS1* del antibiótico dependiente de calcio (CDA); y *cpkA* de un

pigmento amarillo policetídeo (γ CPK). La eficiencia ha sido prácticamente del 100% pasadas 48h de incubación en el caso de la represión individual y ligeramente inferior cuando la represión de estos cuatro genes es de manera simultánea con 4-sgRNA debido en parte al tipo de promotor empleado (**Figura 6**). Además, estos dos sistemas más novedosos presentan varias ventajas frente al primero. En primer lugar, al trabajar con un plásmido integrativo sus efectos son más estables ya que están integrados en el genoma; en segundo lugar, la eficiencia de transformación de este tipo de plásmidos es mucho mayor, además de que el sitio *attB* que permite su integración está presente en todos los genomas del género *Streptomyces*. Todo esto permite concluir que el sistema CRISPRi permite efectuar una represión génica individual o múltiple de manera reversible y eficiente (en torno al 70-80%) y es muy útil tanto para generar *knock-down* como para la identificación de nuevos genes funcionales y controlar y mejorar la producción de metabolitos secundarios por parte de los *Streptomyces* (Zhao et al., 2018, 2020).

Por otro lado, el sistema CRISPRa se encarga de activar la expresión génica, que tiene lugar cuando dCas9 se une a la subunidad omega (ω) de la RNA polimerasa o a activadores transcripcionales en general. Es menos eficiente que CRISPRi y su aplicación en Actinomicetos aún es muy baja por lo que tendrá que ser optimizada en el futuro para seguir investigando y descubriendo lo que esconden los genomas de este grupo bacteriano (Tian et al., 2017; Lee et al., 2019).

Se ha visto que es posible combinar estos dos sistemas, CRISPRi y CRISPRa, para llevar a cabo una activación y represión génica de manera simultánea y sinérgica. Normalmente la expresión de estos sistemas está bajo el control de promotores inducibles por lo que su actividad es temporal y reversible, lo que permite a los científicos valorar el efecto de las distintas alteraciones en la funcionalidad de los genes modificados. Hay que tener en cuenta algunas cuestiones como por ejemplo la posibilidad de que los cambios en la expresión génica no sean los deseados, para lo que se diseñarán varios sgRNA para cada gen. Con todo ello, ambos sistemas han demostrado ser una buena alternativa al sistema CRISPR-Cas9 convencional, que permiten identificar y regular la expresión de genes de interés, así como controlar la producción de productos naturales de distinta índole (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017; Nishida & Kondo, 2021).

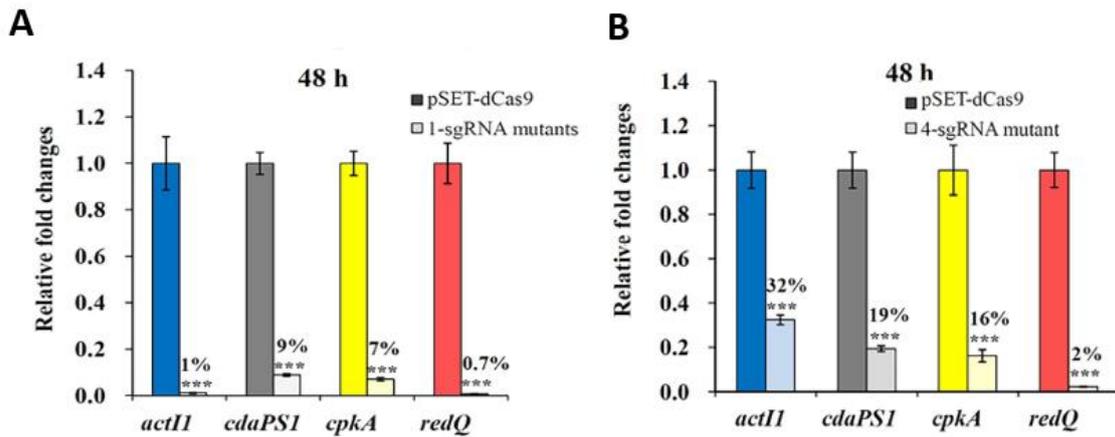


Figura 6. Represión génica de cuatro genes en *S. coelicolor* por CRISPRi. A) Análisis transcripcional mediante qRT-PCR de los cuatro genes en cepas mutantes de 1-sgRNA que contienen el plásmido CRISPRi. B) Análisis transcripcional mediante qRT-PCR de los cuatro genes en cepas mutantes de 4-sgRNA que contienen el plásmido CRISPRi (Zhao et al., 2018).

CRISPR BEST

El sistema CRISPR-BEST (*Base editing system*) es otra de las alternativas más novedosas al sistema CRISPR-Cas9 cuando trabajamos con Actinomicetos. Se caracteriza por utilizar una tecnología de edición genómica basada en la fusión de una variante de Cas9, bien Cas9n o dCas9, con una deaminasa de citosina (CRISPR-cBEST o CBE) o adenina (CRISPR-aBEST o ABE). De esta manera son capaces de introducir cambios en las bases nucleotídicas convirtiendo C:G en T:A gracias a CRISPR-cBEST; y A:T en G:C con CRISPR-aBEST. Esto traerá consigo sustituciones aminoacídicas y modificaciones en varios codones, que serán mutados en muchos casos a codones de STOP. Otra cuestión clave de este sistema es que no introduce cortes en la hebra del DNA (DSB) por lo que no va a depender de los dos mecanismos de reparación anteriormente explicados ni introducirá las mutaciones de tipo *indels*. Todo ello hace que sea un sistema bastante sencillo, rápido y en definitiva muy eficiente para trabajar con *Streptomyces* (Zhao et al., 2020; Nishida & Kondo, 2021).

En primer lugar, este sistema se validó en la especie no modelo *Streptomyces collinus* en el que gracias a CBE se consiguió generar un mutante *knock-out* inactivando el gen *kirN* perteneciente a la ruta de biosíntesis del antibiótico kirromycina, al introducir un codón de STOP que por el contrario no se había conseguido con el sistema CRISPR-Cas9. A partir de ese momento, el sistema se trasladó a otras especies de *Streptomyces* para determinar la eficiencia y la frecuencia de conversión de bases de los dos sistemas desarrollados. Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vivo* en *S. coelicolor* donde se seleccionó el BGC de actinorhodina y se vio que ambos sistemas tenían preferencias distintas: por un lado el sistema cBEST tenía preferencia por las

combinaciones TC > CC > AC > GC con una frecuencia de conversión del 100% mientras que el sistema aBEST se decantaba por TA > GA > AA > CA. También tenían distintas eficiencias donde el cBEST rondaba el 30-100% mientras que el sistema aBEST era mucho menos eficaz, en parte debido al bajo contenido en A-T de estas bacterias que demostraba que la eficiencia se veía influida por la posición genómica de las distintas bases nucleotídicas (Tong et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Otra de sus aplicaciones es la introducción de codones de STOP, a causa de los cambios de bases y aminoácidos, que producen una inactivación génica. También la validación de esta aproximación se trabajó con *S. coelicolor* donde se logró identificar entre 13 y 14 sitios de interés para la introducción de esos codones de STOP; y dos especies no modelo como *Streptomyces griseofuscus* donde se identificaron 34 nuevos BGCs. En este caso y gracias a la secuenciación Sanger de los genomas, se vio que el 100% de las citosinas se convertían en timinas con la introducción de dichos codones de STOP gracias al sistema cBEST (Tong et al., 2019).

En las aproximaciones anteriores, en ocasiones, resultaba complicado llevar a cabo una edición genómica múltiple, en parte por la inestabilidad de los genomas de los Actinomicetos. Esto se ha resuelto con el diseño de un sistema Golden Gate basado en Csy4 (también conocido como sistema I-E CRISPR asociado a Cas6) con el que se consiguió, con la expresión de múltiples sgRNAs y un solo promotor y terminador, editar y mutar tres sitios diferentes de manera simultánea y con una eficiencia del 100% (Zhao et al., 2020).

Son varias las ventajas de este novedoso sistema además de las mencionadas anteriormente, como la capacidad de generar tanto *knock-in* como *knock-out* y *knock-down* y la necesidad de un único plásmido para llevar a cabo una edición múltiple. Pero, tal como sucede con los sistemas descritos anteriormente, es necesario tener en cuenta ciertas limitaciones como los efectos *off-target* que, aunque algunos son visibles en el fenotipo y fácilmente resueltos, es recomendable secuenciar el genoma completo para identificar todos los errores. La mayoría de los detectados se han identificado como leves y solamente 20-30 resultan realmente problemáticos reafirmando así la eficacia de esta herramienta (Tong et al., 2020). Otra limitación es el diseño de sgRNA, sobre todo cuando se trabaja con organismos no modelos. Para ello, se extendió el uso de CRISPRy-web, un servicio web que permite diseñar e identificar los sgRNAs que menos *off-target* generen. Gracias a este programa se logró introducir un codón de STOP en el clúster del gen de actinorhodina en *S. coelicolor* de manera muy específica (Blin et al., 2020).

Todo ello permite concluir que es una buena alternativa al sistema CRISPR-Cas9, cuyas aplicaciones puede ser múltiples y todas ellas eficientes en Actinomicetos.

Otras proteínas Cas

Las numerosas limitaciones del sistema CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* como su alta toxicidad o la complejidad a la hora de llevar a cabo una edición genómica múltiple, también abrió la puerta al uso de otras proteínas Cas diferentes a SpCas9. Si bien es cierto que son varias las proteínas descritas hasta el momento, no todas han sido aún utilizadas en Actinomicetos.

La que más éxito ha tenido en el mundo bacteriano es la proteína Cas12a, también conocida como Cpf1, que deriva de *Francisella novicida* y pertenece a la clase 2, concretamente al tipo V. Presenta varias características especiales como por ejemplo la necesidad únicamente de un crRNA como guía con una actividad RNasa de procesamiento de pre-crRNA diferente a la utilizada por el complejo tracrRNA en Cas9. Además, este crRNA es bastante más corto y tiene la capacidad de expresar varios crRNAs a la vez con la necesidad de un solo promotor, lo que facilita en gran medida la edición múltiple. Otra cuestión a destacar es que mantiene la capacidad de cortar el DNA bacteriano de manera escalonada reconociendo secuencias PAM, aunque en este caso reconoce zonas ricas en T como la secuencia 5'-TTV-3' (V = A/G/C) lo que es bastante útil para el reconocimiento de genes de interés que se localizan en regiones ricas en A-T. Todo ello hace que esta proteína sea aún más atractiva para los investigadores y sus aplicaciones sean cada vez más amplias (Li et al., 2018).

Para determinar su eficacia en cepas de *Streptomyces* se desarrolló un plásmido, pKCCpf1, con promotores de tipo inducible como *tipAp* y fuertes como *kasOp** o *ermEp**, además del replicón pSG5 sensible a la temperatura que permite varias rondas de edición al ser fácilmente eliminado. Se trabajó con *S. coelicolor* y se volvieron a utilizar como genes de interés aquellos relacionados con los BGC de ACT y RED para comprobar cómo de eficiente era Cas12a gracias a que el producto de las regiones diana son dos pigmentos cuyos cambios fenotípicos son fácilmente visibles. Con todo ello se demostró que el sistema ensayado era altamente eficiente en la delección basada en HR de uno u varios genes alcanzando, en muchos casos, el 99% de eficiencia. En el caso de NHEJ, como muchos *Streptomyces* carecen de alguno de los componentes de esta vía, introdujeron LigD y otras proteínas y vieron que también se conseguía efectuar la delección de varios BGCs de gran tamaño aunque con menos eficiencia que la anterior. También fue clave trabajar con cepas no modelo y de interés industrial donde la edición con SpCas9 no había tenido éxito. Se consiguió así tanto la delección de 5-oxomilbemycin A3/A4 en *S. hygroscopicus* como *knock-in* y la activación de varios BGC que permanecían inactivos y que en consecuencia

condujeron a aumentar la producción de NP en Actinomicetos que no había sido logrado con CRISPR-Cas9 (Li et al., 2018; Yao et al., 2018; Zhao et al., 2020).

También se desarrolló una variante inactiva de Cpf1 conocida como ddCpf1 que se obtiene al introducir una mutación E1006A en el dominio RuvC manteniendo la capacidad de procesamiento del crRNA pero no la de cortar la doble hebra del DNA bacteriano. Por ello, y de manera similar a lo anteriormente explicado para dCas9, esta proteína ddCpf1 se utiliza en CRISPRi para la regulación de la transcripción y la edición de bases nucleotídicas (Li et al., 2018; Yao et al., 2018). Aunque ya había sido ensayada en *Escherichia coli* donde no había generado efectos *off-target*, se desarrolló un plásmido integrativo y se optó de nuevo por el BGC RED para ver cómo funcionaba en *Streptomyces*. Se pudo concluir que el sistema era muy eficaz en cuanto a la represión de la transcripción de manera mucho más efectiva cuando el gen de interés está en la hebra utilizada como molde para la transcripción, justo lo contrario a lo obtenido con el sistema CRISPRi/dCas9 en *S. coelicolor*. Sobre todo resultaba muy eficiente en la represión múltiple, resolviendo algunos de los problemas al emplear dCas9 como la necesidad de construir varios sgRNA o la inestabilidad de los plásmidos de tipo replicativo. De esta manera se abre la puerta a otra alternativa menos tóxica y más efectiva para continuar con el estudio de los genomas de Actinomicetos (Li et al., 2018; Zhao et al., 2021).

En 2019, un grupo de investigadores analizó por primera vez dos nuevas Cas como eran sth1Cas9 o CRISPR1 de *Streptococcus thermophilus* y saCas9 de *Staphylococcus aureus*, además de la anteriormente explicada fnCpf1. La finalidad de utilizar CRISPR1 y saCas9, que previamente no habían sido utilizadas en *Streptomyces*, era la búsqueda de otras alternativas que permitiesen efectuar tanto *knock-in* como la delección en aquellas cepas de mayor interés donde SpCas9 había fracasado. Para ello desarrollaron un plásmido *all-in one* con la ayuda de Golden Gate para insertar todos los elementos necesarios en un solo plásmido. Consiguieron así una eficiencia entre el 87 y 100% en *knock-in* del clúster de indigoidina en *S. albus* y prácticamente un 100% en la producción de un compuesto fosfonato en otra cepa de *Streptomyces* utilizando saCas9 y fnCpf1. No sólo eso sino que también lograban la delección de genes como el gen *aurS5* de un BGC productor de un antibiótico polieno con un 100% de efectividad utilizando dos saCas9 (Yeo et al., 2019).

Todo ello nos permite concluir que hay alternativas que han demostrado una gran eficacia y que permiten solucionar los numerosos inconvenientes de SpCas9 a la hora de trabajar con los genomas de Actinomicetos. Cabe esperar que con los años se irá avanzando más en este

aspecto, desarrollando nuevas técnicas que facilitarán aún más el trabajo con este grupo bacteriano que tiene tanto que ofrecer.

CRISPR endógenos

Los sistemas CRISPR-Cas están ampliamente distribuidos entre los organismos procariotas, pero sólo en algunos se encuentran activos, entre ellos el sistema CRISPR-Cas tipo I-E de *Streptomyces avermitilis*. Se vio que un total de 46 especies de *Streptomyces* poseen clústeres de genes *Cas* en su genoma; la mayoría de estas especies contienen el subtipo I-E, mientras que sólo unos pocos contienen los tipos I-C o I-U. Concretamente, el sistema I-E de *S. avermitilis* contenía una secuencia PAM conservada cuyo funcionamiento era bastante similar al de los sistemas CRISPR externos y al sistema I-E de *Escherichia coli*. Aun así, presentaba alguna característica propia como por ejemplo la capacidad de proporcionar protección frente a posibles infecciones por fagos (Qiu et al., 2016; Zhao et al., 2020).

Este tipo de sistemas endógenos ya se han utilizado como herramienta de edición génica en otros grupos bacterianos como es el caso del sistema nativo I-B en *Clostridium pasteurianum*. Es posible que en el futuro se pueda aplicar esto en *Streptomyces* simplemente introduciendo un locus CRISPR sintético o un pequeño RNA guía con una actividad controlada y limitada. Las herramientas bioinformáticas serán claves para caracterizar estas *Cas* endógenas y poder así llevar a cabo la edición genómica de manera eficiente (Zhao et al., 2020).

Una de las consideraciones a tener en cuenta es la posibilidad de que estos sistemas interfieran con los CRISPR externos, influyendo de manera considerable en la eficiencia de esta herramienta en la edición génica. Si bien es cierto que falta mucho por investigar en este aspecto, se espera que sean una alternativa factible para continuar trabajando con los genomas de Actinomicetos sin ningún tipo de problema.

Sistema ICE *in vitro*

Hasta el momento, todos los sistemas desarrollados para llevar a cabo la edición genómica en Actinomicetos se desarrollaban *in vivo*. Aunque todas habían demostrado una alta eficiencia, se necesitaba alguna técnica para realizar *in vitro*, sobre todo a la hora de trabajar con BGCs de gran tamaño.

Uno de los más conocidos y empleados a día de hoy es el sistema CRISPR-Cas9 *in vitro* también conocido como sistema ICE. Su principal aplicación es la refactorización de BGCs en *Streptomyces*, así como la introducción de deleciones, inserciones o intercambios de determinadas secuencias génicas. En este caso se utiliza una endonucleasa Cas9 y sgRNA, ambos

programados para trabajar *in vitro* y efectuar cortes en moléculas de DNA circulares, además de una serie de protoespaciadores. La actividad exonucleasa 3'-5' de esta proteína *Cas* da lugar a mutaciones que desplazan el marco de lectura pero que pueden ser solucionadas introduciendo una DNA polimerasa T4 que repara los DSB generados (Li et al., 2017; Alberti & Corre, 2019).

Se volvieron a diseñar ciertos plásmidos para comprobar la eficacia de este sistema, aunque en este caso el tamaño era superior a los anteriormente descritos. Un ejemplo es el plásmido pYH285 y el vector de clonación 10A3 que contenían el BGC de los antibióticos tetronato RK-682 y el de holomicina respectivamente. Se logró de este modo la delección de dos genes pertenecientes a los BGC anteriormente descritos, aunque la eficiencia aún no era muy alta rondando un 20 y 35%. De la misma manera se consiguió aumentar la producción de estos dos antibióticos en *S. albus* y *S. lividans* con alta eficiencia. A continuación también se analizó la potencialidad de ICE en la inserción de secuencias génicas, en este caso insertando el gen de resistencia a la ampicilina (*bla*) en el plásmido pYH285, que también demostró ser altamente eficiente (Liu et al., 2015).

Para la edición múltiple, otros investigadores han utilizado el sistema ICE junto con la ayuda del ensamblaje de tipo Gibson que facilitó la refactorización de un vector que contenía el BGC del antibiótico pristinamicina para lograr así una edición de múltiples genes en distintas especies de *Streptomyces* (Tao et al., 2018).

Todo ello nos permite concluir que el sistema ICE es una buena herramienta para llevar a cabo múltiples aplicaciones *in vitro* sobre todo a la hora de trabajar con BGCs de gran tamaño. Aunque los primeros estudios no han demostrado una gran eficiencia en la inserción, delección o intercambio de secuencias, se espera que en el futuro pueda ser optimizada, por ejemplo acoplándolo con el ensamblaje de tipo Gibson. De esta manera será muy factible utilizar esta técnica para potenciar la biosíntesis de productos naturales o intercambiar determinados promotores estimulando así la activación de BGC que permanecen silenciados (Liu et al., 2015; Tao et al., 2018).

5. Conclusiones

Tras haber recogido toda la información necesaria y haber realizado este trabajo, he llegado a la siguiente serie de conclusiones:

- El sistema CRISPR-Cas9 puede emplearse como herramienta de edición génica en Actinomicetos de manera muy efectiva rondando el 100% de eficacia en la mayoría de los casos.

- Se han identificado prácticamente todas las limitaciones de este sistema y por tanto, se han desarrollado alternativas eficaces para continuar manipulando estas bacterias
- Las herramientas utilizadas como alternativa al sistema convencional también han demostrado ser eficaces en la mayoría de *Streptomyces*, incluso en cepas no modelo.
- Son varios los genes modificados de manera efectiva, como aquellos pertenecientes a los BGC RED o ACT, que han permitido activar o bloquear determinadas rutas biosintéticas de productos naturales de gran relevancia para el ser humano.

Durante los últimos años, el sistema CRISPR-Cas ha demostrado por tanto ser una de las técnicas de edición genómica más prometedoras de nuestro futuro en el ámbito clínico. Pero es evidente que las aplicaciones de esta herramienta van mucho más allá de la edición de células humanas, por ejemplo. Gracias a esta revisión bibliográfica se puede concluir que, y en base a mi hipótesis, CRISPR es una buena herramienta a la hora de trabajar con bacterias, en este caso con Actinomicetos. Este grupo bacteriano esconde una riqueza que es y será clave para nuestro futuro, proporcionándonos múltiples productos como nuevos antibióticos que serán imprescindibles para combatir nuevos retos actuales y futuros como es la multirresistencia. Se espera que en los próximos años esta cuestión vaya ganando cada vez más importancia y se extienda el uso de CRISPR a otros grupos de bacterias.

6. Bibliografía

- Alberti, F., & Corre, C. (2019). Editing streptomycete genomes in the CRISPR/Cas9 age. *Natural Product Reports*, 36(9), 1237-1248. <https://doi.org/10.1039/C8NP00081F>
- Blin, K., Shaw, S., Tong, Y., & Weber, T. (2020). Designing sgRNAs for CRISPR-BEST base editing applications with CRISPy-web 2.0. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(2), 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.05.005>
- Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2015). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 723-728. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- de la Fuente-Núñez, C., & Lu, T. K. (2017). CRISPR-Cas9 technology: Applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integrative Biology*, 9(2), 109-122. <https://doi.org/10.1039/c6ib00140h>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

- Heng, E., Tan, L. L., Zhang, M. M., & Wong, F. T. (2021). CRISPR-Cas strategies for natural product discovery and engineering in actinomycetes. *Process Biochemistry*, *102*, 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.01.007>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, *157*(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Huang, H., Zheng, G., Jiang, W., Hu, H., & Lu, Y. (2015). One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *47*(4), 231-243. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv007>
- 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*(8), 1148-1155. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000501>
- Lee, N., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., & Cho, B. P. and B.-K. (2019). Synthetic Biology Tools for Novel Secondary Metabolite Discovery in *Streptomyces*. *29*(5), 667-686. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04015>
- Li, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2017). New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. *Biotechnology Advances*, *35*(8), 936-949. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.007>
- 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*(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.00827-18>
- 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. *MBio*, *6*(6), e01714-01715. <https://doi.org/10.1128/mBio.01714-15>
- Mo, J., Wang, S., Zhang, W., Li, C., Deng, Z., Zhang, L., & Qu, X. (2019). Efficient editing DNA regions with high sequence identity in actinomycetal genomes by a CRISPR-Cas9 system. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *4*(2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.02.004>

- Mojica, F., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*, 283. <https://doi.org/10.1111/febs.13766>
- Nishida, K., & Kondo, A. (2021). CRISPR-derived genome editing technologies for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 63, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.12.002>
- Nishimasu, H., & Nureki, O. (2017). Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current Opinion in Structural Biology*, 43, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.11.013>
- Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (2009). Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Marine Drugs*, 7(2), 210-248. <https://doi.org/10.3390/md7020210>
- Qiu, Y., Wang, S., Chen, Z., Guo, Y., & Song, Y. (2016). An Active Type I-E CRISPR-Cas System Identified in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149533>
- Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231, 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01660>
- Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J. F., Yuan, Q., & Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.006>
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., & Lee, S. Y. (2015). CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synthetic Biology*, 4(9), 1020-1029. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00038>
- Tong, Y., Weber, T., & Lee, S. Y. (2019). CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery. *Natural Product Reports*, 36(9), 1262-1280. <https://doi.org/10.1039/C8NP00089A>

- Tong, Y., Whitford, C. M., Blin, K., Jørgensen, T. S., Weber, T., & Lee, S. Y. (2020). CRISPR–Cas9, CRISPRi and CRISPR-BEST-mediated genetic manipulation in *Streptomyces*. *Nature Protocols*, *15*(8), 2470-2502. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0339-z>
- Tong, Y., Whitford, C. M., Robertsen, H. L., Blin, K., Jørgensen, T. S., Klitgaard, A. K., Gren, T., Jiang, X., Weber, T., & Lee, S. Y. (2019). Highly efficient DSB-free base editing for *Streptomyces* with CRISPR-BEST. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(41), 20366-20375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913493116>
- Xiong, X., Chen, M., Lim, W. A., Zhao, D., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *17*(1), 131-154. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022258>
- Xu, T., Li, Y., Shi, Z., Hemme, C. L., Li, Y., Zhu, Y., Van Nostrand, J. D., He, Z., & Zhou, J. (2015). Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(13), 4423-4431. <https://doi.org/10.1128/AEM.00873-15>
- Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *3*(3), 135-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.004>
- Yeo, W. L., Heng, E., Tan, L. L., Lim, Y. W., Lim, Y. H., Hoon, S., Zhao, H., Zhang, M. M., & Wong, F. T. (2019). Characterization of Cas proteins for CRISPR-Cas editing in streptomyces. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(9), 2330-2338. <https://doi.org/10.1002/bit.27021>
- Zeng, H., Wen, S., Xu, W., He, Z., Zhai, G., Liu, Y., Deng, Z., & Sun, Y. (2015). Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(24), 10575-10585. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6931-4>
- 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*(6), 607-609. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2341>

- Zhao, D., Zhu, X., Zhou, H., Sun, N., Wang, T., Bi, C., & Zhang, X. (2021). CRISPR-based metabolic pathway engineering. *Metabolic Engineering*, *63*, 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.10.004>
- Zhao, Y., Li, G., Chen, Y., & Lu, Y. (2020). Challenges and Advances in Genome Editing Technologies in *Streptomyces*. *Biomolecules*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050734>
- 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*(9), 1800121. <https://doi.org/10.1002/biot.201800121>