

# Optimización del sistema CRISPR-Cas9 en *Pseudomonas syringae*

Sanz Martí, Estela; López Sánchez, Aroa y Govantes Romero, Fernando.

Área de Microbiología y Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide Carretera de Utrera, Km. 141013 Sevilla, España

## INTRODUCCIÓN

Entre las principales causas de pérdidas económicas en los cultivos se hayan ciertas bacterias fitopatógenas, como *Pseudomonas syringae* pv. tomato y pv. phaseolicola. Sin embargo, la investigación de estas bacterias sigue siendo compleja debido a que los métodos de modificación genética existentes son laboriosos. Una de las técnicas más prometedoras para la modificación genética es el sistema CRISPR-Cas9, que se ha utilizado con éxito en otras *Pseudomonas* (Tan, Reisch y Prather, 2018). Por ello el objetivo de este trabajo es optimizar la aplicación de este sistema en *P. syringae*.

El sistema CRISPR-Cas9 emplea un ARN guía (sgRNA), que se une a la endonucleasa Cas9 y la dirige hacia una secuencia diana a la que se une mediante emparejamiento de bases (Fig. 1). En esta secuencia, Cas9 genera un corte de doble cadena o DSB (*double-strand breaks*), que es letal para las bacterias debido a la ausencia de sistemas de reparación (Sánchez-Rivera y Jacks, 2015; Gupta *et al.*, 2019).

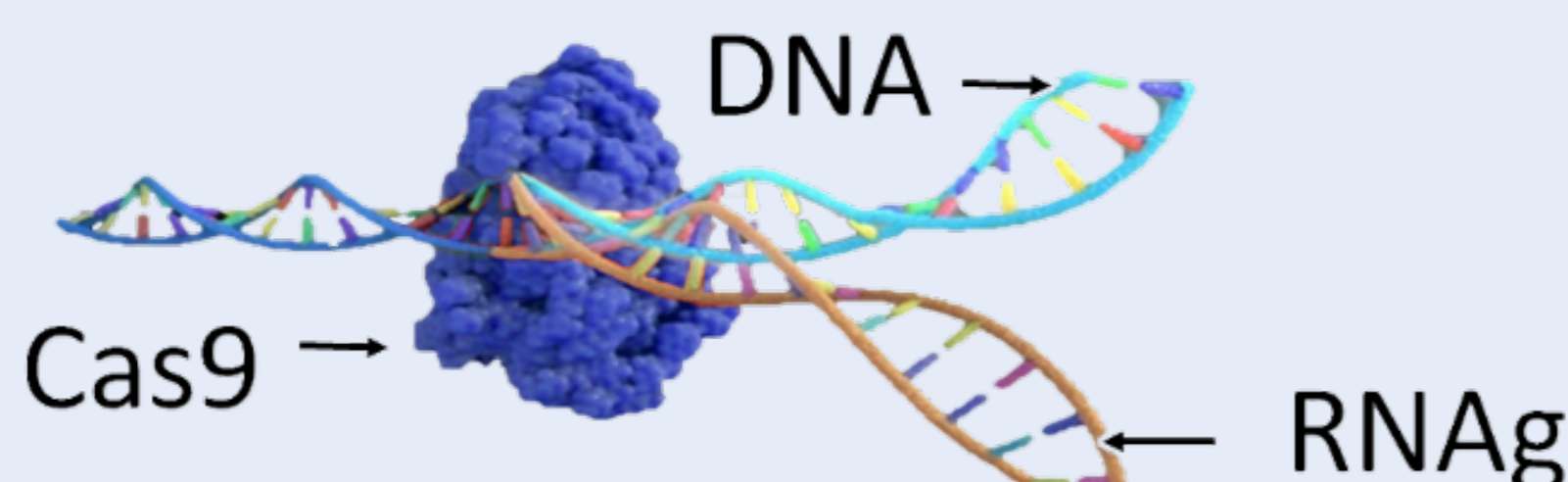


Figura 1. Elementos básicos del sistema CRISPR-Cas9.

No obstante, los DSB pueden ser reparados gracias a la introducción de un sistema de reparación no homóloga o NHEJ (*non-homologous end joining*) en *P. syringae*. Estos sistemas están formados por la proteína Ku que se protege los extremos del ADN cortado y la ligasa LigD que posibilita la unión de estos (Fig.2) (Choi y Lee, 2016).

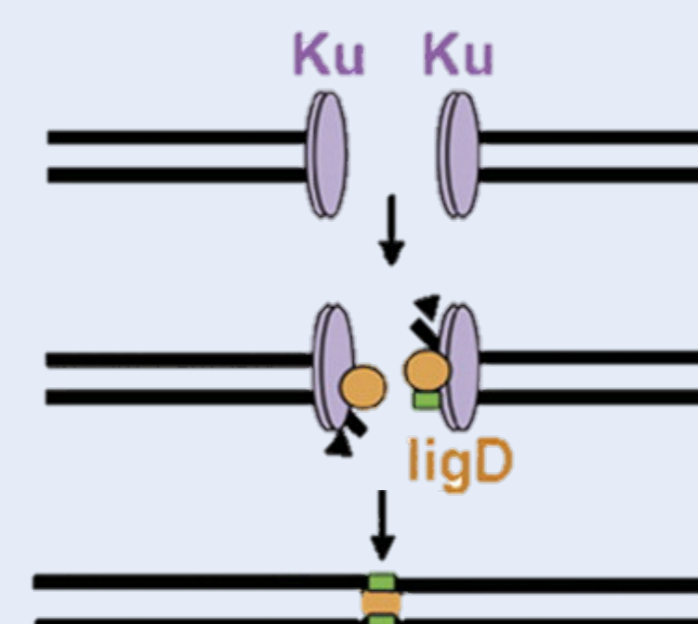


Figura 2. Sistema NHEJ.

## RESULTADOS

### → Efecto de la expresión Cas9 sobre el crecimiento de *P. syringae*

Como se observa en la Fig 3, *P. syringae* pv. phaseolicola presenta una menor fase de latencia y mayor velocidad de crecimiento cuando contiene el plásmido pSEVA421-Cas9tr (expresión de Cas9) respecto a la bacteria silvestre. Sin embargo, la pv. tomato no presenta diferencias en el crecimiento de la bacteria silvestre respecto a la que expresa la proteína Cas9.

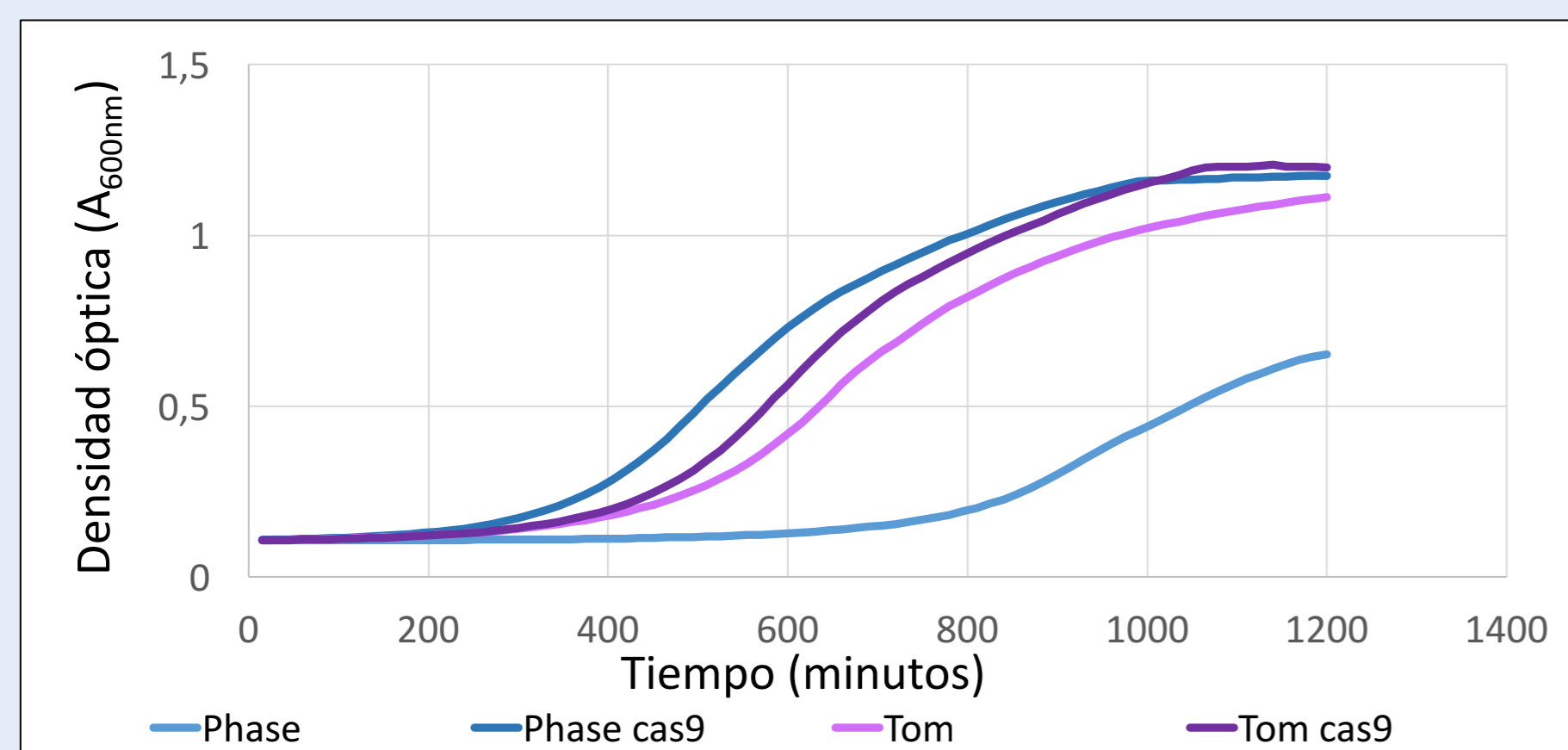


Figura 3. Crecimiento de *P. syringae* pv. phaseolicola y tomato silvestre y con pSEVA421-Cas9

### → Efecto de la expresión de Cas9 sobre la morfología de las colonias de *P. syringae*

Las colonias bacterianas que habían adquirido el plásmido pSEVA421-Cas9 presentaban dos tipos de morfología:

- 1) Colonias de aspecto muy similar a *Pseudomonas syringae* silvestre (Fig 4.1)
- 2) Morfología muy irregular, con papilas que indican la aparición de mutaciones debido a la toxicidad de Cas9. Esta era la morfología predominante (Fig 4.2).



Figura 4. Morfología de *P. syringae* pv. tomato con el plásmido pSEVA421-Cas9

### → Test de letalidad

Para medir la eficacia del corte de Cas9 en *P. syringae*, se midió la pérdida de viabilidad inducida por la expresión de Cas9 junto a un ARNg con diana en el gen *pyrF*. Para ello, se transformaron las bacterias objetivo con los plásmidos pSEVA231-CRISPR (expresión del sgRNA de *pyrF*) y pSEVA421-Cas9tr (expresión Cas9). Además se utilizó un control negativo que poseía la ORF de la RFP (sin diana en el genoma) sustituyendo al sgRNA (Fig. 5).

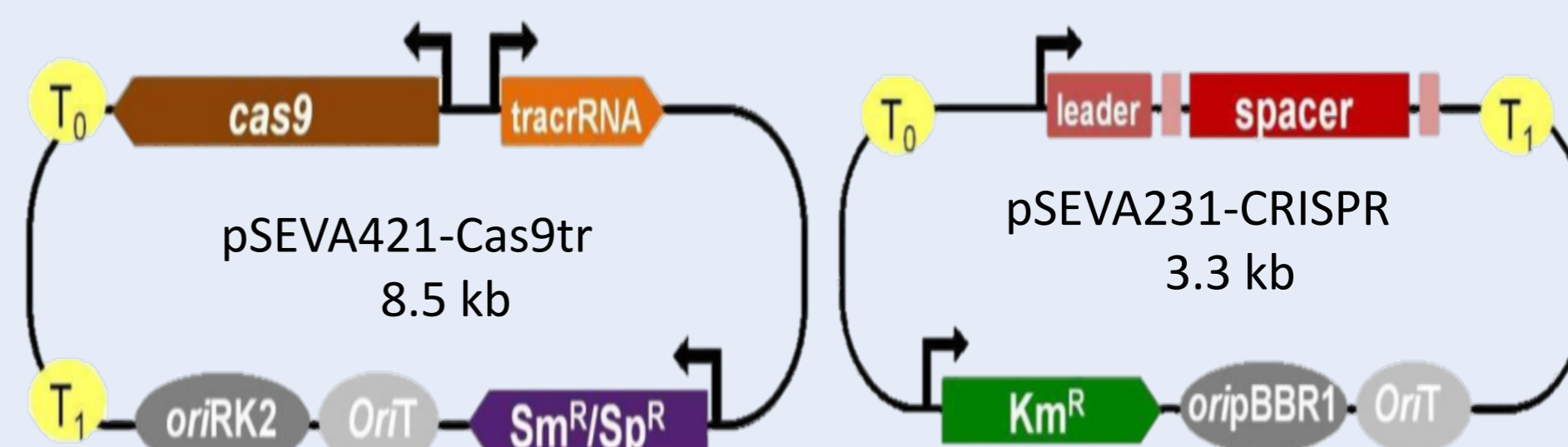


Figura 5. Plásmido pSEVA421-Cas9tr que expresa la proteína Cas9 y plásmido pSEVA231-CRISPR que expresa el sgRNA de *pyrF*.

No se observó una diferencia importante en la viabilidad de las bacterias que expresan Cas9 junto al sgRNA de *pyrF* y las que expresan la RFP (Fig.6). Este resultado sugiere que el sistema CRISPR-Cas9 no está funcionando eficazmente en las condiciones ensayadas.

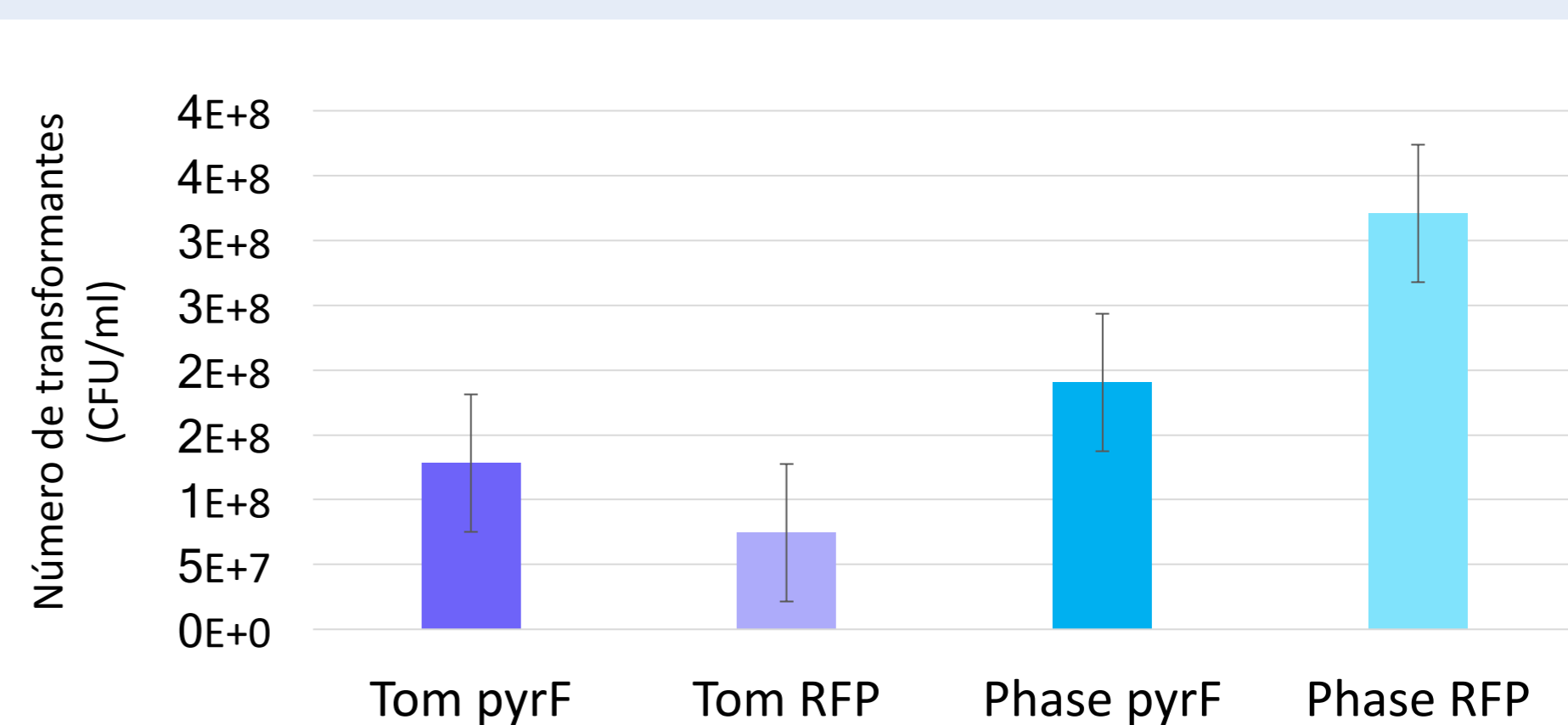


Figura 6. Viabilidad de *P. syringae* pv. tomato y phaseolicola al introducir el plásmido con el sgRNA de *pyrF* (presenta diana en el genoma) y el plásmido que expresa la RFP (no presenta diana en el genoma).

## CONCLUSIÓN

- ❖ No se observa que la expresión de la endonucleasa Cas9 repercute negativamente en el crecimiento bacteriano en medio líquido. Sin embargo, en medio sólido, las colonias de *P. syringae* pv tomato que expresan la proteína Cas9 son más pequeñas y presentan papilas.
- ❖ En el ensayo de letalidad no se da un incremento de la mortalidad bacteriana, lo que indica que el sistema CRISPR-Cas9 no está funcionando eficientemente en las condiciones de ensayo. En experimentos futuros se utilizarán otros sgRNA.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Choi, K. and Lee, S., 2016. CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnology Advances*, 34(7), pp.1180-1209.
2. Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S. and Ghosh, D. (2019).
3. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, 232, p.116636.
4. Sánchez-Rivera, F. and Jacks, T. (2015). Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), pp.387-393.
5. Tan, S., Reisch, C. and Prather, K. (2018). A Robust CRISPR Interference Gene Repression System in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 200(7), pp.e00575-17.