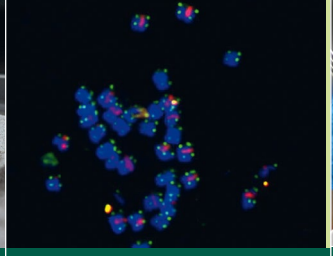
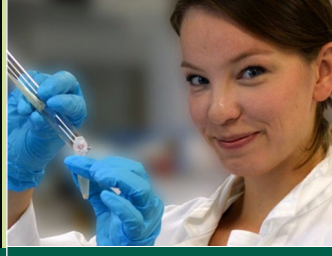
54. Jahrgang Sonderheft 2024 ISSN 0045-205X BLUZAR D 5627

SONDERHEFT
2024





VBiO
Verband | Biologie, Biowissenschaften & Biomedizin in Deutschland

MATERIAL-FORSCHUNG
Gesteinsbesiedelnde Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die Ausreißer

BIOLOGIE
IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas
... mehr als nur Verteidigung

www.biuz.de

DOI:10.11576/biuz-7570

Gut geschützt durch CRISPR-Cas-Systeme

CRISPR-Cas in Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten

Lena Mitousis | Wolfgang Wohlleben

Aktinomyceten produzieren eine große Vielfalt an Naturstoffen, die in der Medizin und Industrie für uns Menschen von großer Bedeutung sind. Besonders Antibiotika sind unentbehrlich für die Behandlung von Infektionskrankheiten. Man geht davon aus, dass sich Aktinomyceten in ihren natürlichen Habitaten durch die Naturstoffe vor anderen Konkurrenten schützen. Es gibt aber auch andere Bedrohungen wie zum Beispiel die Infektion durch Phagen. Abwehrsysteme wie CRISPR-Cas können davor schützen. Über die Funktion von CRISPR-Cas-Systemen in Aktinomyceten ist aber bisher nur sehr wenig bekannt.

Eine der größten taxonomischen Einheiten innerhalb der Bakterien ist die Klasse der *Actinomycetes* (Abbildung 1). Sie beinhaltet grampositive, GC-reiche Bakterien mit häufig filamentösem Wachstum. Viele Aktinomyceten haben einen komplexen Lebenszyklus (Abbildung 2), während dem sich das vegetativ wachsende, verzweigte Substratmycel zu unverzweigtem Luftmycel weiter differenziert. Aus dem Luftmycel werden dann Sporen gebildet. Diese wachsen nach dem Auskeimen wiederum als vegetatives Mycel und der Zyklus beginnt von vorne. Aktinomyceten kommen häufig im Boden vor; man findet sie aber auch in anderen Habitaten wie etwa in Gewässern. In ihrem jeweiligen Ökosystem spielen sie eine wichtige Rolle. Beispielsweise im Boden sind *Streptomyces*, *Nocardia* oder *Cellulomonas* an der Humusbildung beteiligt, da sie sowohl Pilze als auch pflanzliches und tierisches Material zersetzen können. Abgesehen davon tragen dort insbesondere *Streptomyceten* auch durch die Synthese von Geosmin zum typischen waldig-erdigen Geruch von Boden bei. Es gibt auch symbiontische Aktinomyceten: So leben Stickstoff-fixierende Aktinomyceten wie Vertreter der Gattung *Frankia* mit Wurzeln von Pflanzen assoziiert. Einige Antibiotika-produzierende Arten – wie z. B *Streptomyces*, *Pseudonocardia* oder *Amycolatopsis* – kommen dagegen gemeinsam mit Insekten (z. B. Termiten, Ameisen oder Wespen) vor. Fast alle Aktinomyceten sind harmlos; es gibt nur sehr wenige pathogene Arten. Dazu gehören unter anderem *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger von Tuberkulose, oder *Corynebacterium diphteriae*, der Auslöser der Diphterie.

Aktinomyceten als Quelle von wichtigen Naturstoffen

Die besondere Relevanz von Aktinomyceten liegt hauptsächlich in ihrem großen Potenzial, biologisch aktive Naturstoffe zu produzieren. Die Isolierung von Aktinomycin im Jahr 1941 [1] – dem ersten Antibiotikum aus Aktinomyceten – stellt nur den Anfang einer langen Erfolgsgeschichte dar. Seitdem wurden Aktinomycetenstämme aus verschiedensten Quellen mit zum Teil extremen

© 2024 Die Autoren. Biologie in unserer Zeit
veröffentlicht durch VBIO e.V. unter der CC-BY-SA 4.0-Lizenz

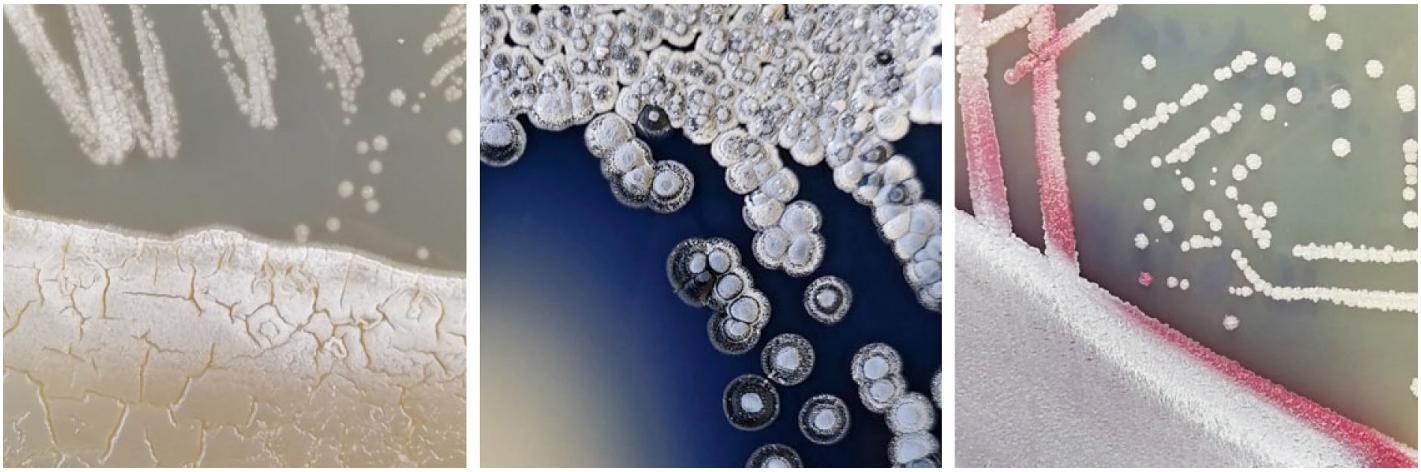


ABB. 1 Vielfältige Morphologie von Aktinomyceten. Aktinomyceten können als vegetatives Substratmycel wachsen, das meist beige ist. Unter bestimmten Bedingungen kann sich dieses Mycel zu weißlich-pudrigem Luftmycel ausdifferenzieren, woraus sich dann weißliche oder graue Sporen bilden. Manche Aktinomyceten bilden Naturstoffe, die die Zellen und den Agar bunt färben können. In dieser Abbildung zu sehen sind *Streptoalloteichus tenebrarius*, *Streptomyces albidoflavus* und *Streptomyces coelicolor*.

Bedingungen isoliert (Boden, Süß- und Salzwasser, Kalkstein, Luft, Schwämme, Wüste, Vulkanhöhlen). Diese wurden auf die Produktion von aktiven Substanzen gescreent. Zwischen 1950 und 1970 – der sogenannten „goldenen Ära der Antibiotika" – stammten rund 60 Prozent aller Antibiotika aus Aktinomyceten, größtenteils aus *Streptomyces*-Stämmen [2]. Bis heute wurde eine sehr große Variation an unterschiedlichsten Naturstoffen in Aktinomyceten entdeckt. Darunter befinden sich vielfältige chemische Strukturen wie Glykopeptide, β-Lactame, Makrolide, Tetracycline, Rifamycine oder Aminoglycoside. Die Naturstoffe besitzen eine Vielzahl an unterschiedlichen Wirkmechanismen – sie wirken antibiotisch, fungizid, insektizid, herbizid und antiviral, hemmen Enzyme, Tumorwachstum oder modulieren das Immunsystem. Heutzutage geht beinahe ein Drittel aller verwendeten Antibiotika ursprünglich auf Aktinomyceten zurück.

Genetisches Potenzial und Zugänglichkeit von Aktinomyceten

Die Gene, die für die Synthese der Naturstoffe kodieren, lassen sich in der Genomsequenz von Aktinomyceten meist in sogenannten Biosynthesegenclustern (BGC) wiederfinden. Das bedeutet, dass die Gene auf der DNA benachbart sind und in der Regel gemeinsam exprimiert und reguliert werden. Häufig besitzt ein BGC zusätzlich zu den Genen für die Synthese des Produktes auch die Gene für die dazugehörigen Regulatoren oder Resistenzgene. Durch bioinformatische Analysen von Aktinomyceten-Genomen weiß man, dass sie mehrere BGCs besitzen können. Im Durchschnitt findet man 16 BGCs pro Genom, wobei es auch Beispiele mit über 60 Clustern gibt [3]. Unter Standardlaborbedingungen wird oft aber nur ein Bruchteil aller BGCs exprimiert. Die inaktiven BGCs nennt man daher auch „schlafende" Biosynthesegencluster. Es gibt verschiedene Ansätze, um dieses „versteckte" Potenzial auszuschöpfen und die BGCs zu „wecken". Entweder man versucht, den ursprünglichen Stamm genetisch so zu verändern, dass die Expression des „schlafenden" BGCs aktiviert wird. Alternativ kann man die für die Synthese verantwortlichen Gene aus dem eigentlichen Stamm isolieren und in einem anderen, optimierten Stamm heterolog exprimieren. Das setzt voraus, dass man Methoden und Werkzeuge hat, um diese Stämme molekulargenetisch zu bearbeiten. Dazu gehören zum Beispiel die Isolierung von DNA, das Klonieren, der Transfer von rekombinanter DNA in die Zellen und die Selektion von Mutanten. Bei Aktinomyceten kommt es häufig vor, dass molekulargenetische Standardlabormethoden nicht oder nicht effizient funktionieren. Mögliche Ursachen dafür können unter anderem in der Aktivität von Abwehrmechanismen wie etwa dem Restriktionsmodifikationssystem oder aber auch dem CRISPR-Cas-System liegen.

IN KÜRZE

- *Aktinomyceten haben oft einen komplexen Lebenszyklus und sind eine wichtige Quelle für **medizinisch und industriell relevante Naturstoffe** wie z. B. Antibiotika.*
- *Man findet in **etwa der Hälfte aller Aktinomyceten-Genome** CRISPR-Cas. Trotzdem ist die Funktion von CRISPR-Cas in Aktinomyceten aktuell kaum erforscht.*
- *Beispiele aus* Streptomyces avermitilis, Mycobacterium tuberculosis *und* Streptoalloteichus tenebrarius *weisen **untypische Eigenschaften** auf, die zum Teil auch mit dem komplexen Lebenszyklus zusammenhängen.*

CRISPR-Cas in Aktinomyceten

CRISPR-Cas ist bekannt als prokaryotisches adaptives Immunsystem. Es besteht in der Regel aus den entsprechenden *cas*-Genen und *spacer-repeat*-Einheiten, die als

© 2024 Die Autoren. Biologie in unserer Zeit veröffentlicht durch VBIO e.V. unter der CC-BY-SA 4.0-Lizenz

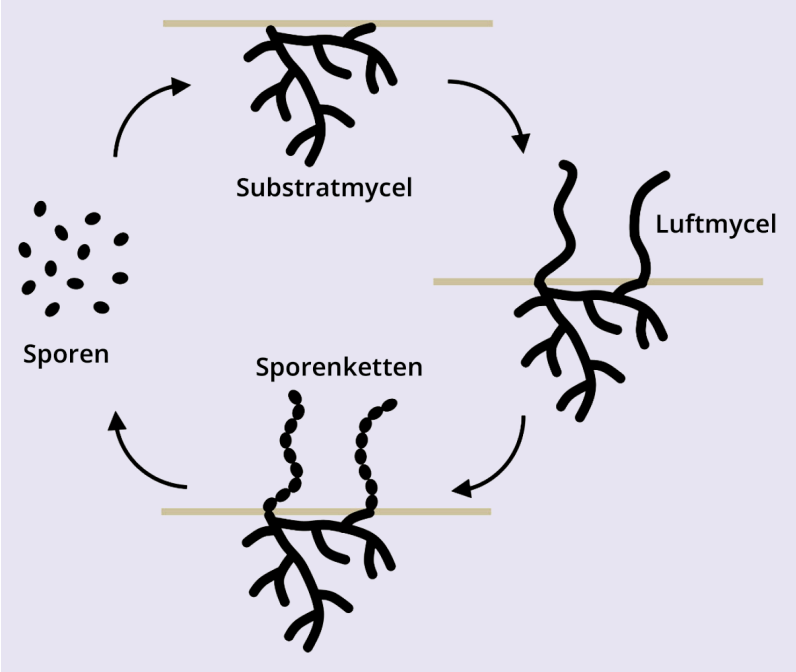
CRISPR-Array bezeichnet werden. Häufig findet man CRISPR-Arrays direkt neben den *cas*-Genen; beides gemeinsam wird als CRISPR-Locus bezeichnet. CRISPR-Arrays können auch an anderen Stellen im Genom auftauchen als in Nachbarschaft von *cas*-Genen. Es gibt auch Beispiele von CRISPR-Arrays in Stämmen, die keine *cas*-Gene besitzen. Sequenzanalysen aller vollständigen bakteriellen Genomsequenzen zeigen, dass in 41,9 Prozent der bakteriellen Genome *cas*-Gene und/oder CRISPR-Arrays kodiert sind [4]. Betrachtet man die Gruppe der Aktinobakterien, findet man CRISPR-Loci in nahezu 50 Prozent der Genome [5]. In *Streptomyces*-Genomen kommen bei 65,7 Prozent CRISPR-Arrays vor, aber nur 37,1 Prozent haben auch die entsprechenden *cas*-Gene dazu [6].

CRISPR-Cas-Systeme können in unterschiedliche Typen unterteilt werden (Typ I-VI). Analysen der Verteilung der sechs unterschiedlichen CRISPR-Cas-Typen ergeben, dass es sich in fast allen Fällen um Typ-I-Systeme, hauptsächlich Typ I-E, handelt. Obwohl die Sequenzanalysen demonstrieren, dass CRISPR-Cas-Systeme in Aktinomyceten etwa ähnlich häufig vorkommen wie in allen bakteriellen Genomen, sind CRISPR-Cas-Systeme aus Aktinomyceten nur sehr wenig experimentell erforscht. Nach unserem besten Wissen gibt es aktuell nur drei experimentell und funktionell charakterisierte Beispiele aus Aktinomyceten.

Das erste Beispiel – ein CRISPR-Cas auf dem linearen *Streptomyces* Plasmid pSHK1 – wurde im Jahr 2011 von Guo et al. publiziert [7]. Das System umfasst acht *cas*-Gene mit zwei flankierenden CRISPR-Arrays (Abbildung 3) und fünf zusätzlichen Arrays über die restliche Plasmidsequenz verteilt. Es entspricht damit einem typischen Typ I-E-System, wie es auch in *Escherichia coli* vorkommt. Interessanterweise liefert das System im Laborexperiment keinen Schutz vor Phageninfektion oder Plasmiden. Außerdem konnten bisher keine Homologien zwischen *spacer*-Sequenzen einerseits und Plasmid- oder Phagensequenzen andererseits gefunden werden. Woran das liegen könnte und welche potenzielle Funktion das System stattdessen haben könnte, ist bislang nicht geklärt.

Als zweites Beispiel folgte 2016 eine Veröffentlichung von Qui et al. [8] über das erste aktive System aus Aktinomyceten. Die Publikation beschreibt ein Typ I-E-System in *Streptomyces avermitilis* (Abbildung 3), das genetisch sehr große Ähnlichkeiten zum gut charakterisierten System aus *Escherichia coli* aufweist. Es bietet Schutz vor Phagen und Plasmiden, aber der Einbau von neuen *spacer*-Abschnitten findet generell eher selten statt. Im Vergleich mit dem bekannten System aus *E. coli* fallen Unterschiede auf, was die Bedingungen des *spacer*-Erwerbs (Adaptation) angeht. Normalerweise werden keine neuen *spacer* eingebaut, wenn es für eine fremde DNA bereits einen *spacer* mit exakter Übereinstimmung gibt. In diesem Fall kann die eingedrungene DNA sofort abgebaut werden. Für das System aus *S. avermitilis* wurde aber auch unter diesen Bedingungen der Einbau von zusätzlichen *spacer*-Abschnitten beobachtet. Am interessantesten ist aber, dass

ABB. 2 | KOMPLEXER LEBENSZYKLUS VON FILAMENTÖSEN AKTINOMYCETEN



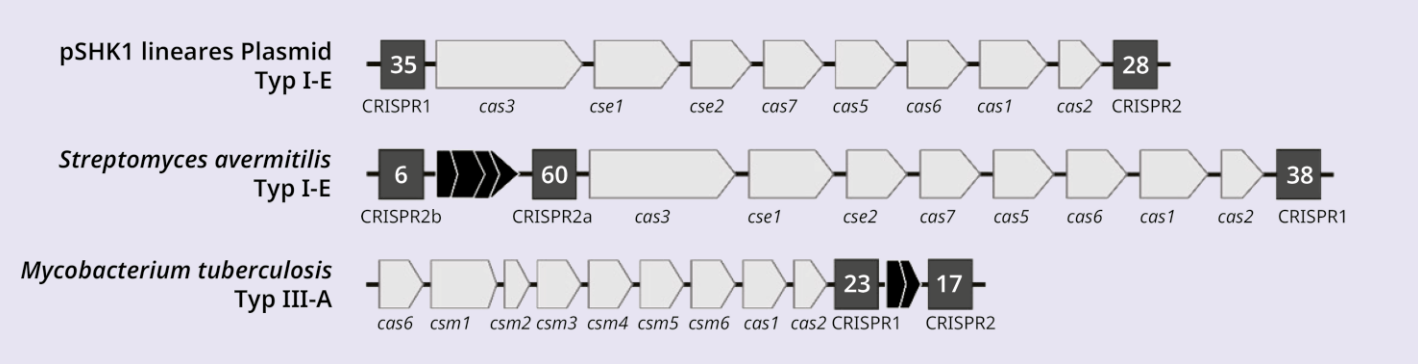
Unterhalb der Mediengrenze wächst das verzweigte Substratmycel. Dieses durchbricht die Grenze und differenziert sich zu unverzweigtem Luftmycel aus. Daraus werden einzelne rundliche Sporen abgeschnürt, die in Sporenketten vorliegen. Die Sporen können sich frei verteilen. Beim Auskeimen bildet sich wieder vegetatives Substratmycel und der Zyklus beginnt von vorne.

in *S. avermitilis* Zusammenhänge zwischen der CRISPR-Cas-Aktivität und der Phase des Lebenszyklus der Zellen festgestellt wurden. Die Aktivität des Abwehrsystems scheint während der Sporulation erhöht zu sein, da ein gesteigerter *spacer*-Einbau und Verlust eines fremden Plasmids nach der Sporulation der Zellen beobachtet wurde – im Gegensatz zum mycelartigen Wachstum.

Das dritte Beispiel eines funktional charakterisierten Systems in Aktinomyceten stammt aus *Mycobacterium tuberculosis* und wurde 2019 von Wei et al. [9] beschrieben. Hier handelt es sich um ein Typ-III-A-System (Abbildung 3). Die Untersuchung der natürlichen Funktion des CRISPR-Cas-Systems belegt, dass es in der Abwehr gegen mobile genetische Elemente aktiv ist. Im Vergleich zu anderen bekannten Typ-III-A-Systemen zeigt es aber auch untypische Besonderheiten beim Reifungsprozess der crRNA. Normalerweise werden in Typ-III-Systemen die crRNAs am 3'-Ende von nicht CRISPR-Cas-spezifischen Nukleasen getrimmt. Die gereifte crRNA bildet keine Sekundärstruktur. Die crRNAs aus *M. tuberculosis* hingegen werden nicht am 3'-Ende getrimmt und bilden eine Sekundärstruktur, die somit eher an die crRNAs aus Typ-I-Systemen erinnert. Bei diesem Reifungsprozess der crRNA ist das Cas-Protein Cas6 beteiligt. Während die Aktivität in anderen Systemen unabhängig von Metallionen ist, wurde für Cas6 aus *M. tuberculosis* eine Abhängigkeit von der

© 2024 Die Autoren. Biologie in unserer Zeit
veröffentlicht durch VBIO e.V. unter der CC-BY-SA 4.0-Lizenz

ABB. 3 | CRISPR-CAS-SYSTEME AUS AKTINOMYCETEN



Übersicht der CRISPR-Cas-Systeme aus den experimentell charakterisierten Beispielen *Streptomyces*-Plasmid pSHK1, *Streptomyces avermitilis* und *Mycobacterium tuberculosis*. Die hellen Pfeile stehen für die *cas*-Gene. Die Quadrate stellen CRISPR-Arrays dar, die Zahl darin steht für die Anzahl der *spacer*. Die dunklen Pfeile stehen für andere, nicht CRISPR-Cas-spezifische Gene. Hier sind es in beiden Fällen Transposasegene.

Anwesenheit von Ca^{2+} und Mn^{2+} gezeigt. Lange Zeit vor dieser ausführlichen funktionalen Charakterisierung des CRISPR-Cas-Systems aus *M. tuberculosis* wurden die CRISPR-Array-Sequenzen bereits genauer analysiert. Durch die Aktivität des Systems liegen in unterschiedlichen Isolaten Sequenzvariationen innerhalb der CRISPR-Arrays vor. Mit Hilfe der variablen *spacer*-Sequenzen ist es möglich, *Mycobacterium*-Isolate evolutionär und epidemiologisch einzuordnen. Bereits 1997 wurde die „spoligotyping"-Methode (= *spacer oligonucleotide typing*) für *M. tuberculosis* entwickelt [10]; zehn Jahre später wurde sie auch für *Corynebacterium diphteriae* etabliert [11].

CRISPR-Cas-Systeme aus *Streptoalloteichus tenebrarius*

Wir beschäftigen uns hauptsächlich mit Aktinomyceten und ihren Naturstoffen. Bei der Arbeit mit unserem Laborstamm *Streptoalloteichus tenebrarius* wurde aber auch das Interesse an CRISPR-Cas in Aktinomyceten geweckt. Der Stamm ist ein industrieller Produzent von Aminoglycosid-Antibiotika und wurde im Rahmen einer Stammentwicklung zur Steigerung der Produktion von Tobramycin, einem Breitspektrumantibiotikum, optimiert [12]. Die genetische Manipulation ist sehr herausfordernd, da viele Standardmethoden nicht oder nur sehr ineffizient funktionieren. Rekombinante DNA wird in *S. tenebrarius* nur über Konjugation aufgenommen. Die dabei verwendete DNA muss homologe Bereiche zum *S. tenebrarius*-Genom tragen und über Rekombination ins Genom integriert werden, da sie sonst nicht stabil in der Zelle bleibt. Zusätzlich ist der Stamm gegen die meisten herkömmlich verwendeten Selektionsmarker resistent, wodurch die verfügbaren Marker limitiert sind. Genauere Analysen der Genomsequenz zeigten, dass *S. tenebrarius* nicht nur 33 potenzielle BGCs trägt, sondern auch drei CRISPR-Cas-Systeme der Klasse 1. Um herauszufinden, ob eventuell die Aktivität der CRISPR-Cas-Systeme die Ursache für die Schwierigkeiten bei der genetischen Manipulation sein könnten, werden die Systeme genauer untersucht. Ziel ist es herauszufinden, welche Rolle CRISPR-Cas-Systeme allgemein in Aktinomyceten spielen und inwieweit sie auch an Prozessen abgesehen von Immunität beteiligt sind. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass eines der CRISPR-Cas-Systeme einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung in *S. tenebrarius* haben könnte.

Zusammenfassung

Aktinomyceten sind eine diverse Gruppe an Bakterien mit bedeutenden Eigenschaften für die Medizin und die Industrie. Ein Großteil der heutzutage verwendeten Antibiotika hat seinen Ursprung in Aktinomyceten. Durch die Produktion von biologisch aktiven Naturstoffen sind Aktinomyceten in der Umwelt gut vor Konkurrenten geschützt. Das prokaryotische Immunsystem CRISPR-Cas bietet Schutz vor Phagen und fremder DNA/RNA. Es ist in etwa 50 Prozent aller Aktinomyceten-Genome zu finden. Die Funktionsweise von CRISPR-Cas bei Aktinomyceten ist – bis auf wenige Beispiele – kaum untersucht. Dabei zeigen die charakterisierten Systeme aus S. avermitilis *und* M. tuberculosis *zum Teil untypische Eigenschaften. In* S. avermitilis *hängt die Aktivität des CRISPR-Cas-Systems mit der Phase des Lebenszyklus zusammen. Bei* M. tuberculosis *ist die crRNA-Reifung anders als bei ähnlichen Systemen. Unsere Untersuchungen der CRISPR-Cas-Systeme von* S. tenebrarius *weisen auf eine potenzielle Beteiligung an der Zelldifferenzierung hin.*

Summary

CRISPR-Cas in antibiotics-producing actinomycetes

Actinomycetes are a diverse group of bacteria with important properties for medicine and industry. Most of the antibiotics used today originate from actinomycetes. The production of biologically active natural products protects actinomycetes against competitors in the environment. The prokaryotic immune system CRISPR-Cas offers protection against phages and foreign DNA/RNA. It is found in about 50 per cent of all actinomycetes genomes. Apart from a few

© 2024 Die Autoren. Biologie in unserer Zeit
veröffentlicht durch VBIO e.V. unter der CC-BY-SA 4.0-Lizenz

examples, the function of CRISPR-Cas in actinomycetes has barely been investigated so far. The characterized systems of S. avermitilis *and* M. tuberculosis *show atypical features. In* S. avermitilis*, the activity of the CRISPR-Cas systems is linked to the phase of its life cycle. In* M. tuberculosis*, crRNA maturation differs from similar systems. Our studies of* S. tenebrarius *CRISPR-Cas systems suggest a possible involvement in cell differentiation.*

Schlagworte:

Aktinomyceten, Antibiotika, Naturstoffe, CRISPR-Cas

Literatur

[1] S. A. Waksman, H. B. Woodruff (1941). *Actinomyces antibioticus*, a New Soil Organism Antagonistic to Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria. J. Bacteriol 42, 231–249.

[2] J. Bérdy (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J. Antibiot, 65, 385–395.

[3] R. Seshadri et al. (2022). Expanding the genomic encyclopedia of Actinobacteria with 824 isolate reference genomes. Cell genomics 2, 12.

[4] C. Pourcel et al. (2019). CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. NAR 48, D535-D544.

[5] D. Burstein et al. (2016). Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. Nat. Commun 7, 10613.

[6] J. Zhang et al. (2018). Comparative Analysis of CRISPR Loci Found in *Streptomyces* Genome Sequences. Interdiscip. sci. comput. life sci. 10, 848–853.

[7] P. Guo et al. (2011). Characterization of the multiple CRISPR loci on *Streptomyces* linear plasmid pSHK1. ABBS 43, 630–639.

[8] Y. Qiu et al. (2016). An active type I-E CRISPR-Cas system identified in *Streptomyces avermitilis*. PloS one 11, e0149533-e0149533.

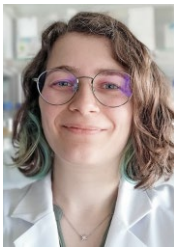
[9] W. Wei et al. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* type III-A CRISPR-Cas system crRNA and its maturation have atypical features. FASEB J 33, 1496–1509.

[10] J. Kamerbeek et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin.l Microbiol. 35, 907–914.

[11] I. Mokrousov et al. (2007). *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. Biotechnol J. 2, 901–906.

[12] L. Mitousis et al. (2021). Engineering of *Streptoalloteichus tenebrarius* 2444 for sustainable production of tobramycin. Molecules 26, 4343.

Verfasst von:



Lena Mitousis studierte Biologie und Mikrobiologie an der Universität Tübingen. Seit 2021 promoviert sie bei Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen zum Thema CRISPR-Cas-Systeme in Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten.

Wolfgang Wohlleben promovierte in Physik an der Universität Erlangen. Ab 1980 war er Gruppenleiter am Lehrstuhl Genetik der Universität Bielefeld, ab 1992 Professor an der Universität des Saarlandes und ab 1994 Professor am Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen. Seit 2019 ist er Senior-Professor an der Universität Tübingen.

Korrespondenz
Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben
Universität Tübingen
Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT)
Mikrobiologie/Biotechnologie
Auf der Morgenstelle 28
72076 Tübingen
E-Mail:
wolfgang.wohlleben@biotech.uni-tuebingen.de

© 2024 Die Autoren. Biologie in unserer Zeit
veröffentlicht durch VBIO e.V. unter der CC-BY-SA 4.0-Lizenz

VBiO

Verband | Biologie, Biowissenschaften & Biomedizin in Deutschland

GEMEINSAM FÜR DIE BIOWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.

Jetzt beitreten!

www.vbio.de