



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

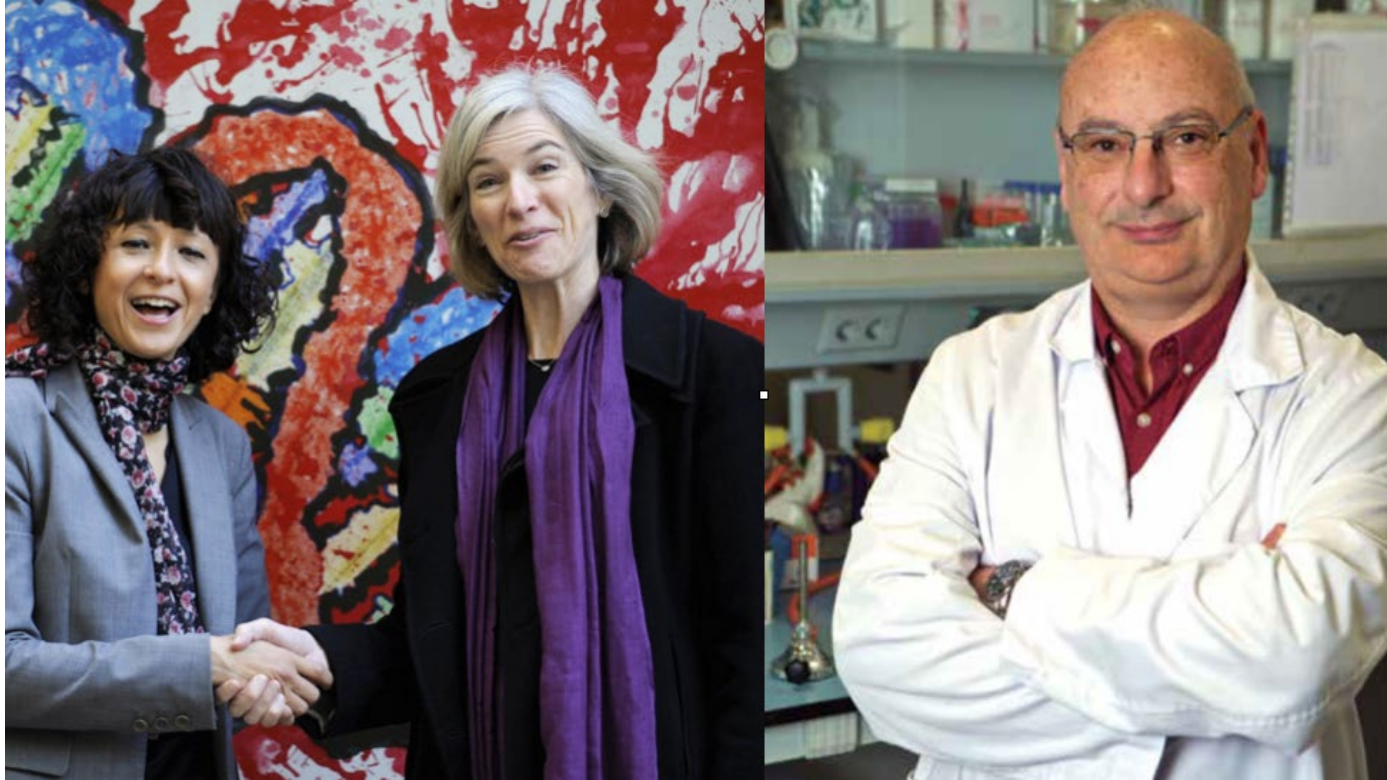
# Producció de proteïnes recombinants i biopolímers en *Bacillus subtilis* mitjançant l'ús de tecnologia CRISPR-Cas

Pere Picart Faiget, PhD

**Seminaris de Recerca i Seminaris Tecnològics**  
**Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació**  
**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

17-02-2022

# DESCOBRIMENT DEL SISTEMA CRISPR-Cas



**Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna  
premi Nobel de Química 2020 por CRISPR-Cas**

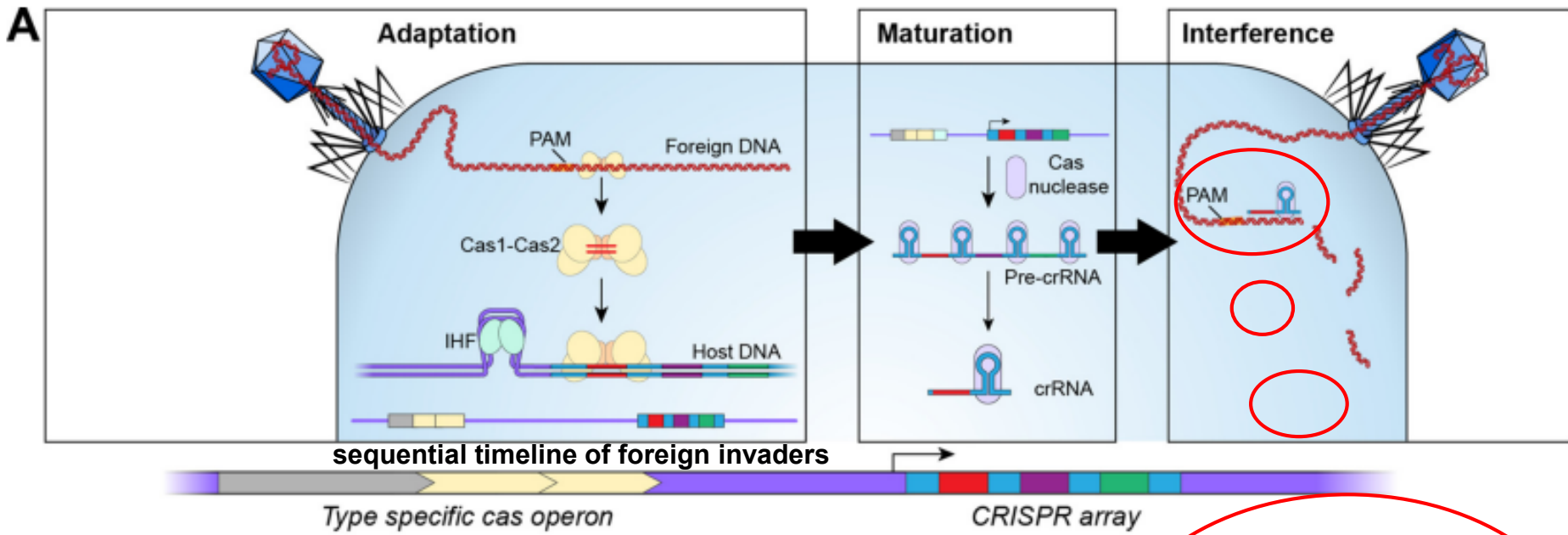
**Francis Mojica (Univ. Alacant), descobridor  
de les seqüències CRISPR l' any 1993**



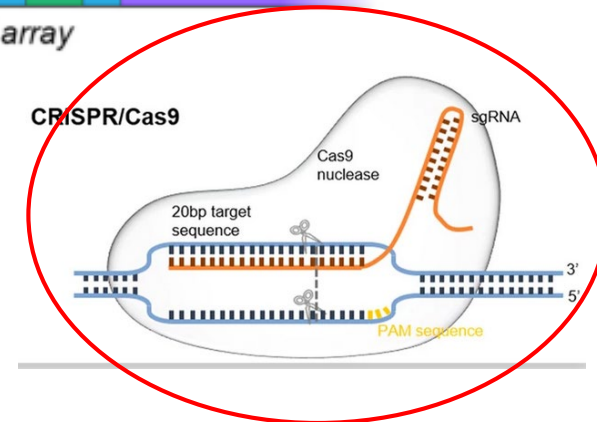
UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# QUÈ ÉS EL SISTEMA CRISPR-Cas ?



**CRISPR:** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*  
**Cas:** *CRISPR associated sequence*



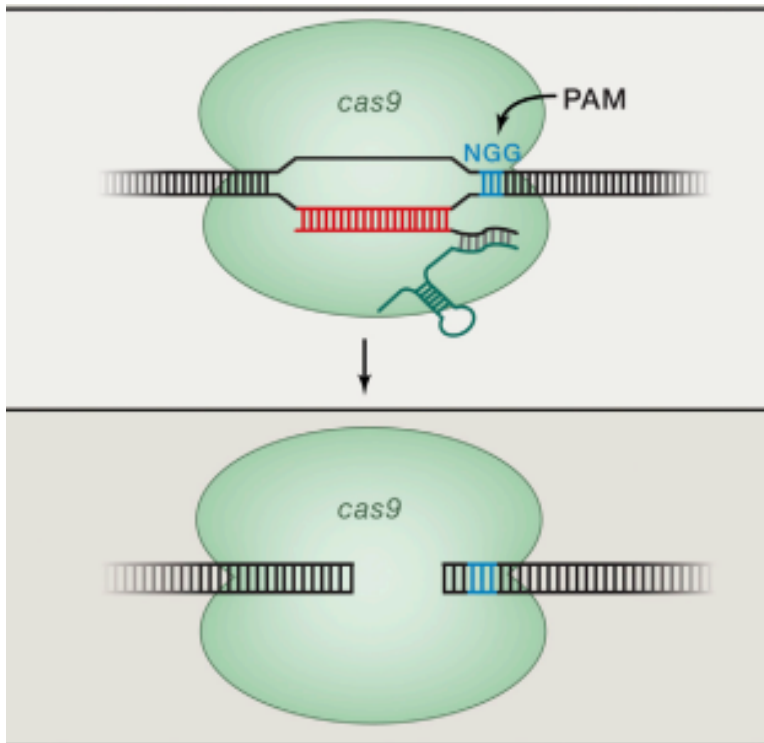
**Mecanisme d'immunització contra elements genètics forans (bacteriòfags, plasmidis, ADN lliure)**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# TALL DE DOBLE CADENA



crRNA busca seqüències d' ADN que s' aparellin amb la seqüència de l' espaiador (en vermell). L' unió al lloc diana requereix la presència de la seqüència PAM que permet a la nucleasa Cas9 romandre unida a l' ADN.

Un cop cas9 s' uneix al lloc diana i es produeix l'aparellament crRNA – ADN diana, es produeix un tall de doble cadena aproximadament a 4 bases cap amunt de la seqüència PAM



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

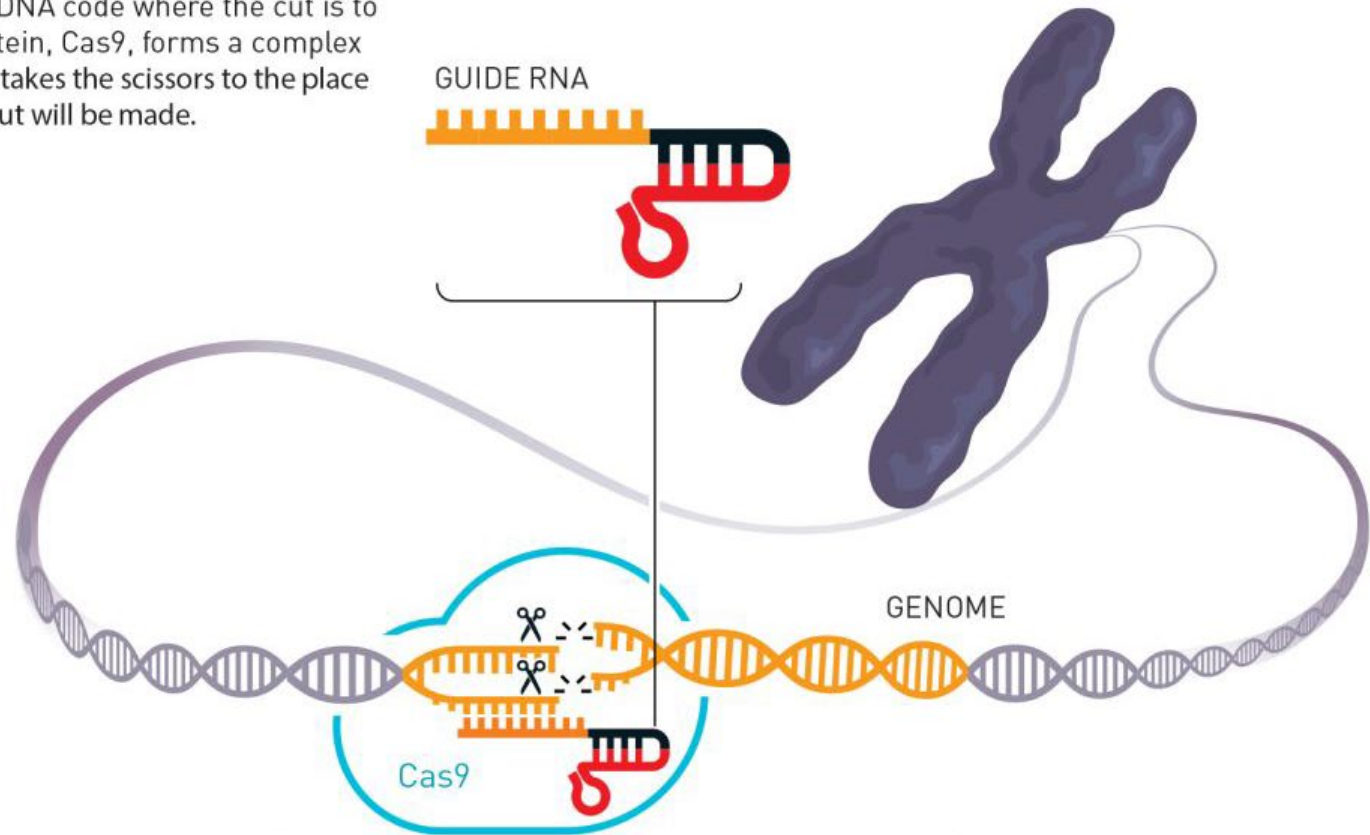
Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes.  
Nature 2015; 526 (7571): 55-61.

Núñez JK, Lee AS, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. Nature 2015; 519 (7542): 193-8.

# LES TISSORES GENÈTIQUES CRISPR-Cas9 (Nobel 2020)

When researchers are going to edit a genome using the genetic scissors, they artificially construct a guide RNA, which matches the DNA code where the cut is to be made. The scissor protein, Cas9, forms a complex with the guide RNA, which takes the scissors to the place in the genome where the cut will be made.



**QUALSEVOL ADN POT SER TALLAT I EDITAT !!!**

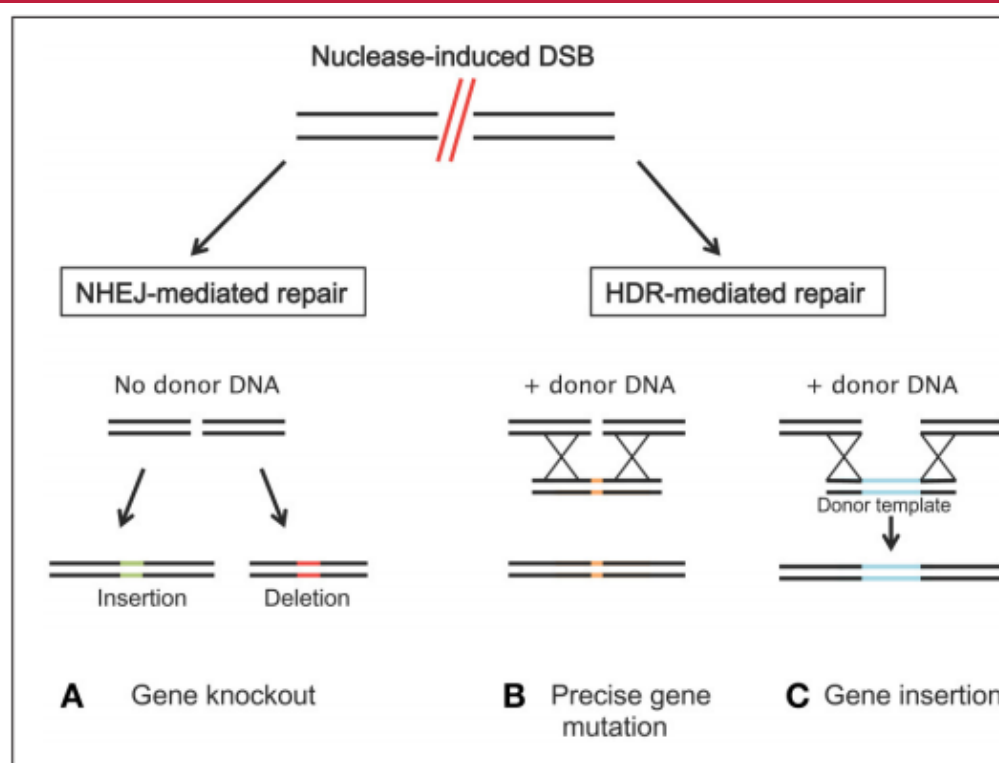


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

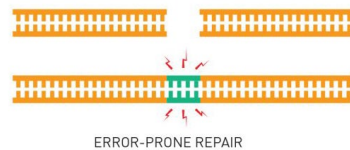
Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

<https://www.chemistryworld.com/news/explainer-what-is-crispr-and-why-did-it-win-the-nobel-prize/4012545.article>

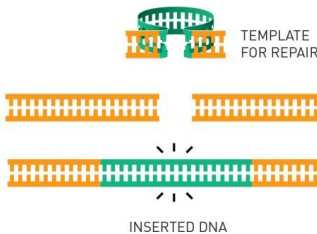
# REPARACIÓ DELS TALLS DE DOBLE CADENA



**Non Homologous DNA  
End Joining (NHEJ)**



**NHEJ funciona molt  
ineficientment o és absent  
en la majoria de bacteris**



**Homology Directed  
Repair (HDR)**

**HDRs és més eficient en  
Procariotes que en Eucariotes**

**MODIFICACIONS GÈNIQUES "A LA CARTA" !!!  
PROBLEMA: TALLS "OFF-TARGET" !!!**

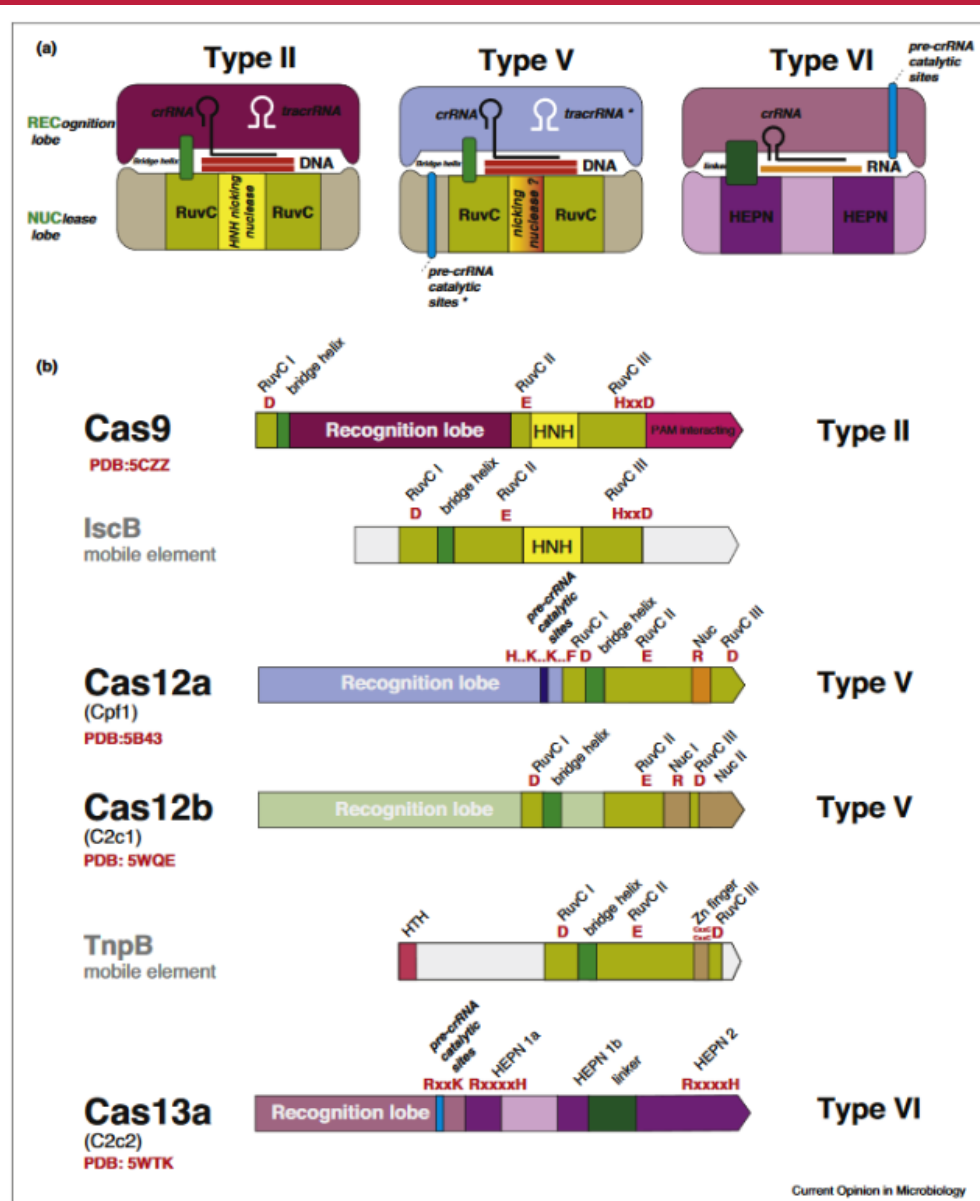


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# LES TISSORES GENÈTIQUES CRISPR-Cas9

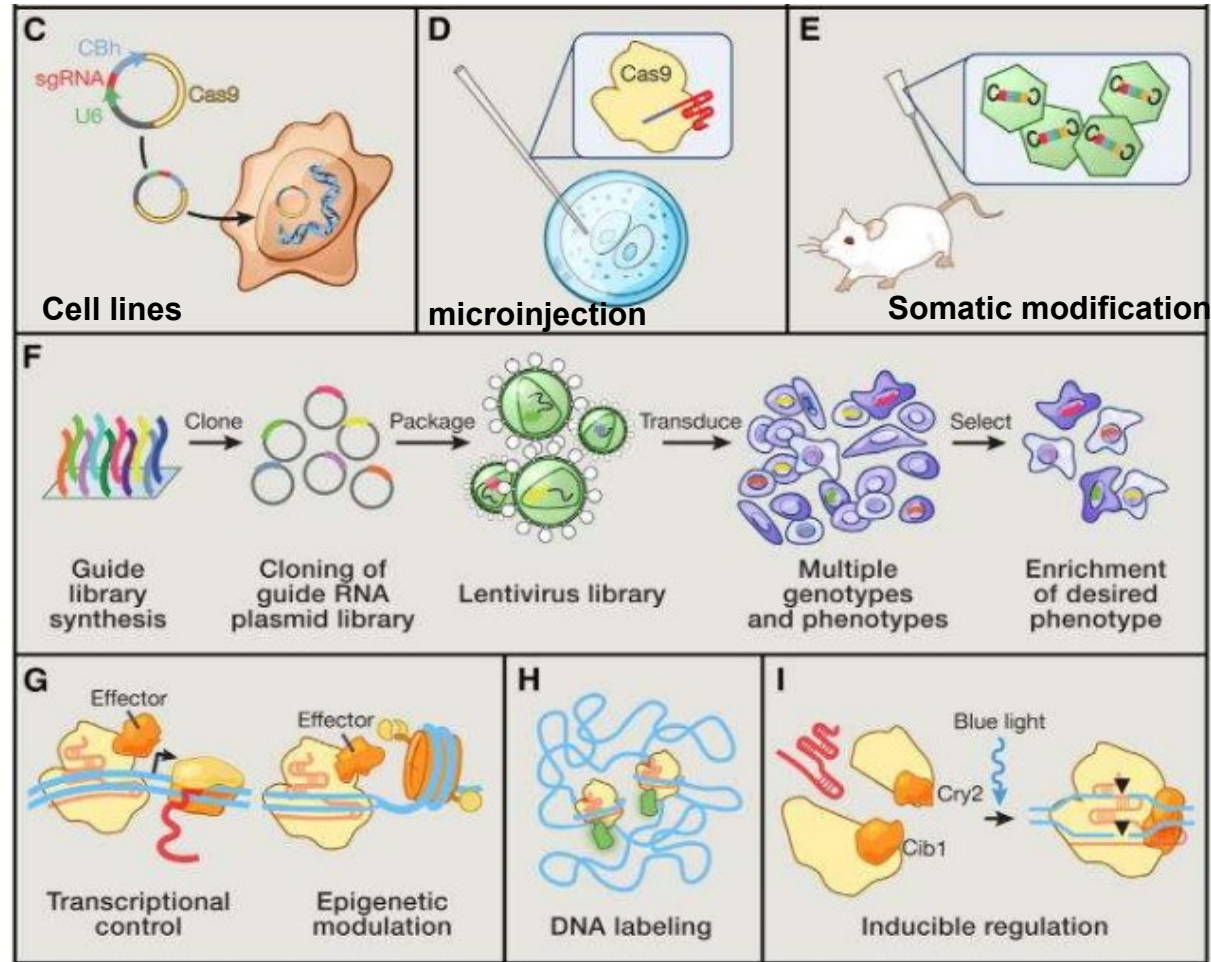
Existeixen molts tipus diferents de nucleases Cas



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

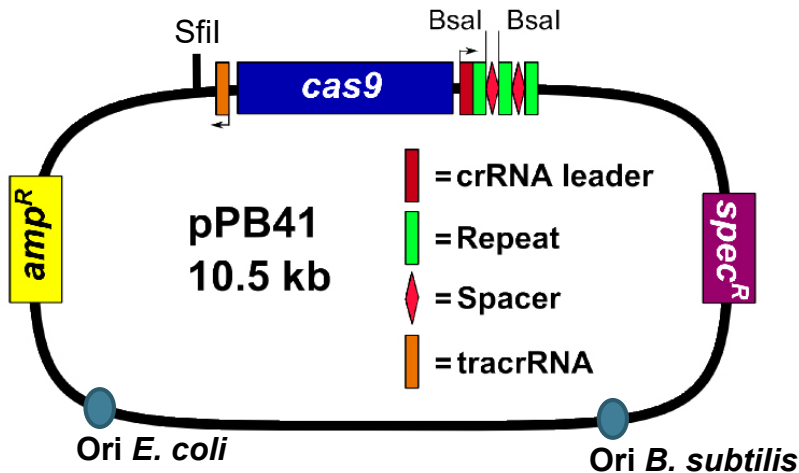
Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR-Cas9





# APLICACIÓ DEL SISTEMA CRISPR-Cas en *B. subtilis*

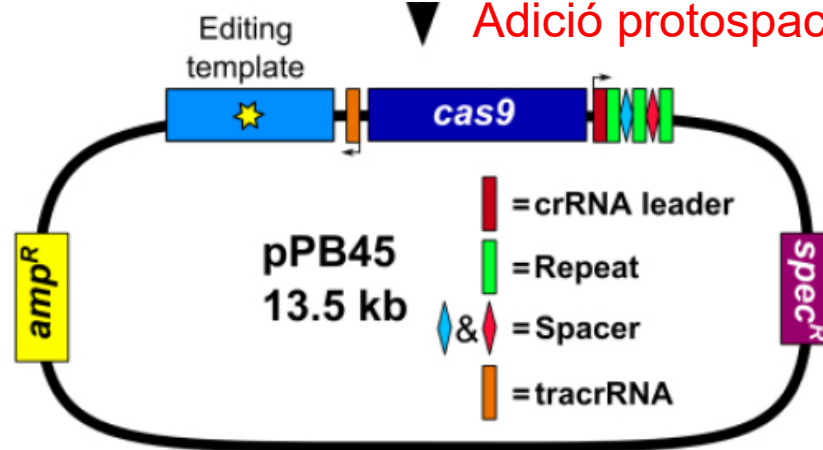


## PROPIETATS

1. Shuttle vector (*E. coli* / *B. subtilis*)
2. Origen de replicació sensible a temperatura en *B. subtilis*
3. Dos marcadors de selecció (amp i spec)
4. Protospacer intercanviable (*Bsal*)
5. Template intercanviable (*Sfil*)

<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>

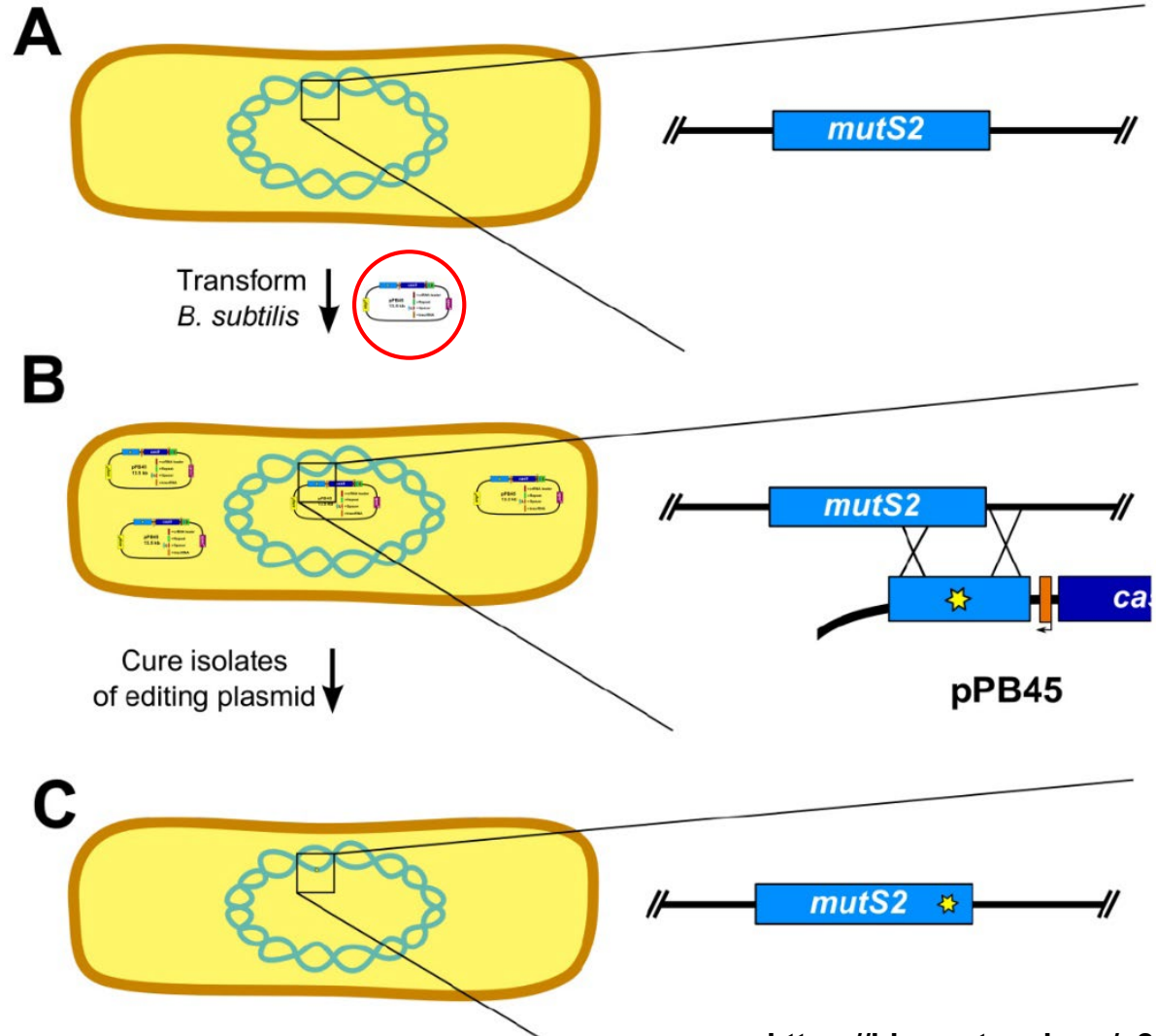
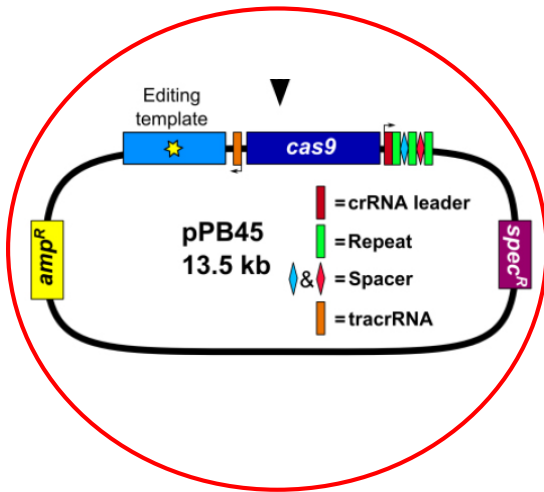
## ▼ Adició protospacer i ADN de reparació



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

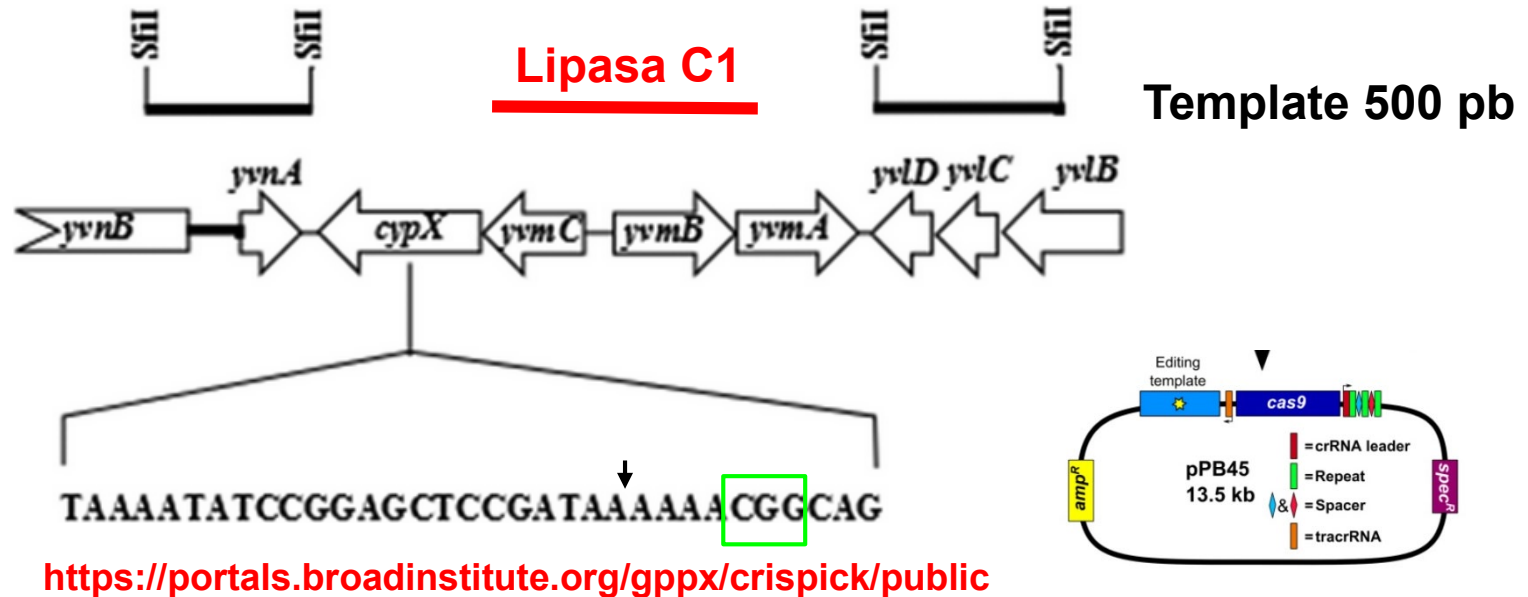
# ÚS DEL SISTEMA CRISPR-Cas9 en *B. subtilis*



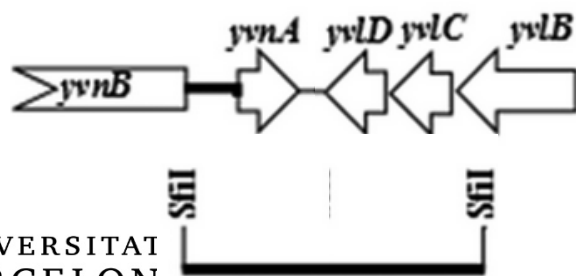
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

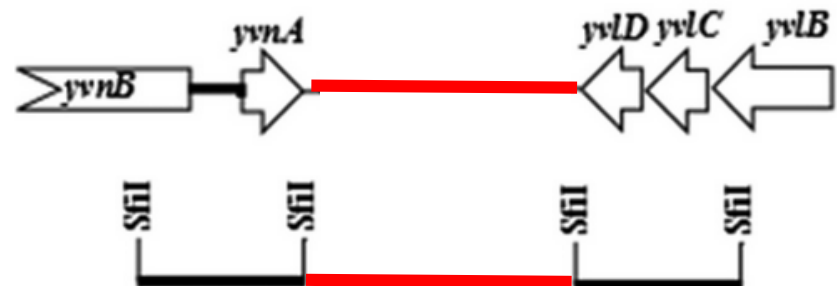
# EXEMPLE DE FUNCIONAMENT CRISPR-Cas9



**Deleció genoma**



**Inserció genoma**



**Eficiències d'edició gènica al voltant del 95%**



UNIVERSITAT  
BARCELON

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# PERQUÈ UTILITZAR *BACILLUS SUBTILIS* ?

## AVANTATGES

- Organisme GRAS (Generally Regarded As Safe)
- Secreció proteica al medi de cultiu (fàcil *downstream*)
- No presenta esviaixament de codons
- Fàcil manipulació genètica
- Gran diversitat de soques i plasmidis disponibles

## INCONVENIENTS

- ❖ No ofereix modificacions posttraduccional
- ❖ Elevada activitat proteolítica
- ❖ Baix rendiment en expressar certes proteïnes eucariotes, en especial les que contenen ponts disulfur



# PERQUÈ UTILITZAR *BACILLUS SUBTILIS* ?

## *B. subtilis* 6051 (soca salvatge)

- ❑ **D.O. molt elevades** (80 g/l), òptima utilització d'AAs i fonts de Carboni
- ❑ **Prototròfic** per Triptòfan
- ❑ Soca esporuladora (gen ***spollAC***)
- ❑ Produeix surfactina (gen ***srfC***)
- ❑ Elevada producció de proteases (gens ***aprE*** i ***nprE***) i amilases (gen ***amyE***) EC
- ❑ Eficiències de transformació baixes (**elevada estabilitat genòmica**)

**Deleció dels gens: *aprE*, *nprE*, *amyE*, *SpollAC*, *SrfC*  
per mitjà de CRISPR-Cas**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

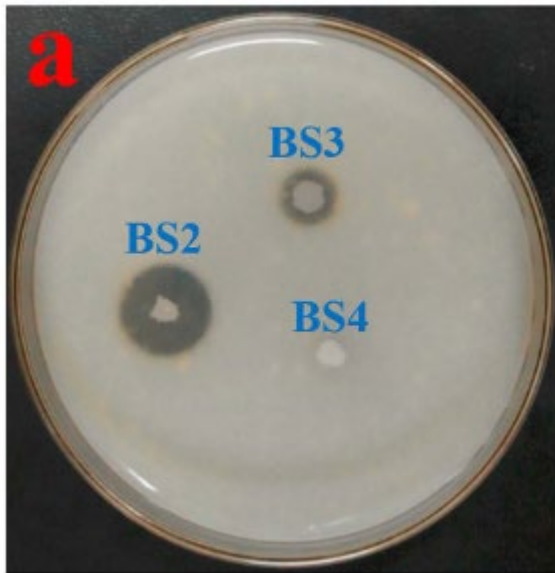
Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# OPTIMITZACIÓ DE LA SOCA *B. subtilis* 6051

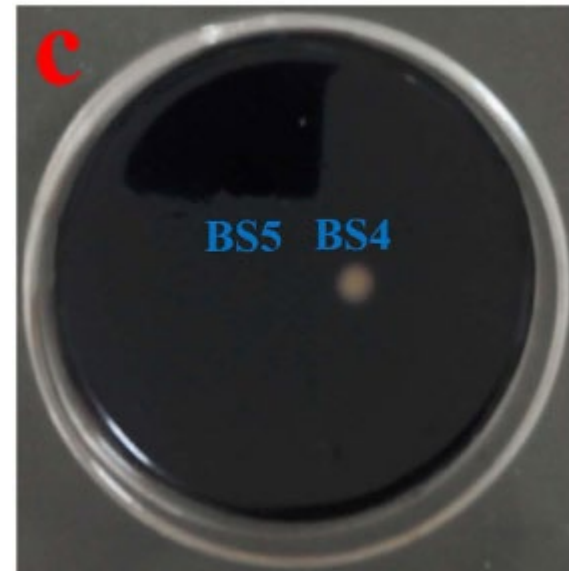
**B. Subtilis 6051 (BS1) → Soca que no produeix surfactina (disrupció gen *srfC*)**

**BS1 → 25% esporulació després de xoc tèrmic a 75°C durant 10 minuts**

**B. Subtilis 6051 amb gen *spollAC* deletzionat → 0% esporulació (soca BS2)**



**Soca lliure de proteases EC (BS4)**



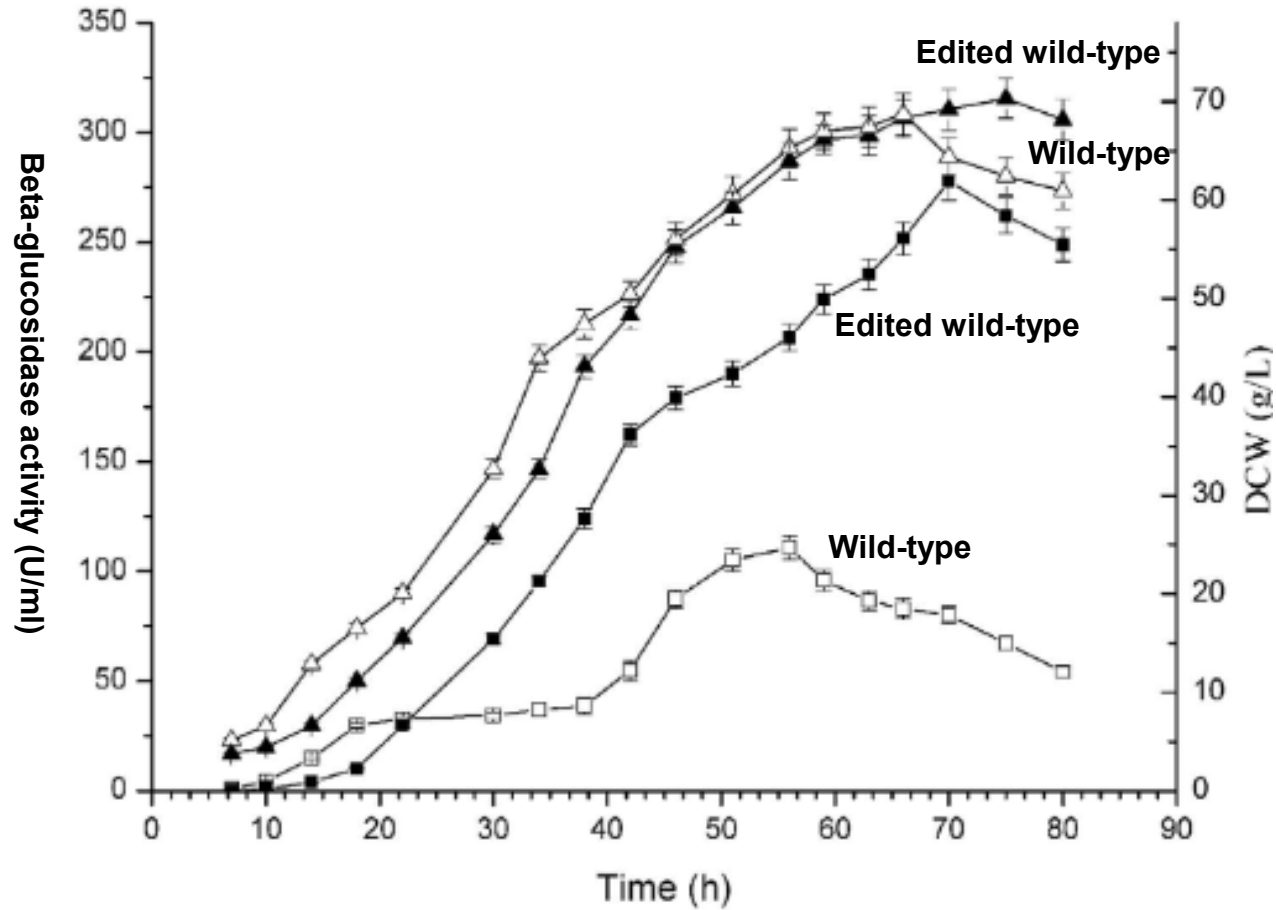
**Soca lliure d'amilases EC (BS5)**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# APLICACIONES DE *B. subtilis* 6051 (BS5)



**Soca amb un elevat potencial d'aplicació biotecnològica**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# APLICACIONS DE *B. subtilis* 6051 (BS5)

(Màster i Doctorat Industrial de Jordi Ferrando)

## 1. HOSTE PER A L'EXPRESSION DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

A) Companyia paperera interessada en produir enzims d'aplicació en la producció del paper:  $\alpha$ -amilases, cel.lulases i xilanases

B) Construcció gen sintètic

*B. thuringensis* *B. amyloliquefaciens*



C) Integració en el cromosoma de BS5 (CRISPR-Cas9)



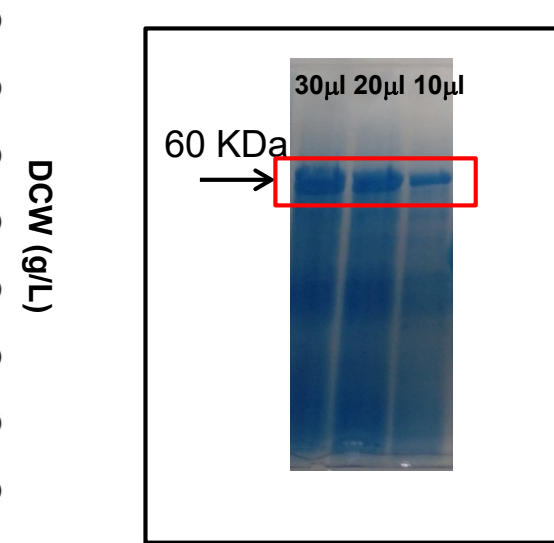
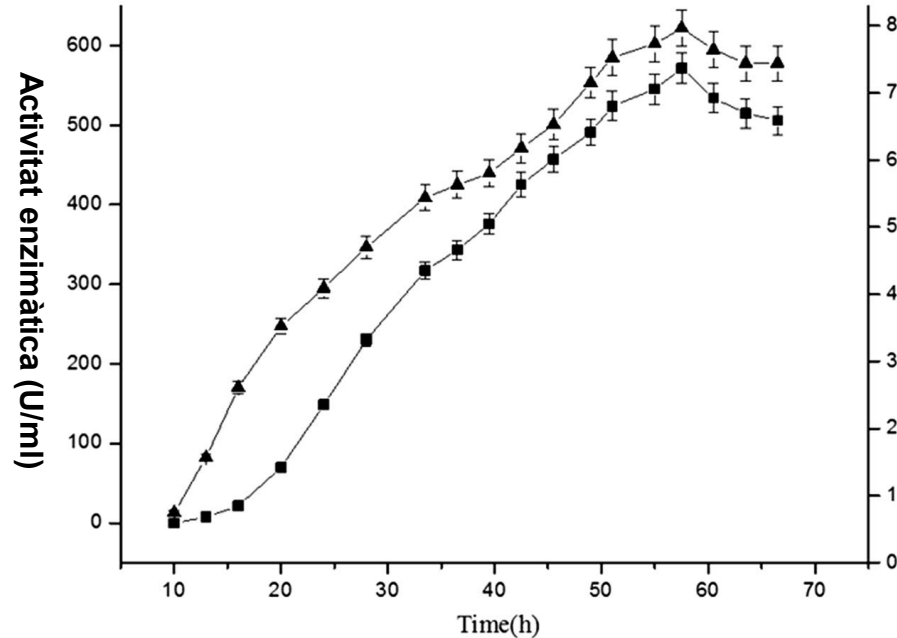
UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació



# APLICACIONES DE *B. subtilis* 6051 (BS5)

(Doctorat Industrial de Jordi Ferrando)



- Cultius d' alta densitat
- Medis de cultiu barats
- Valors de secreció elevats (g/L)
- Sense marcadors de resistència
- Sense ús de plasmidis
- Sense ús d' inductors

És suficient una còpia gènica per maximitzar expressió proteica?

Es pot augmentar la secreció en altres punts de la via de secreció?

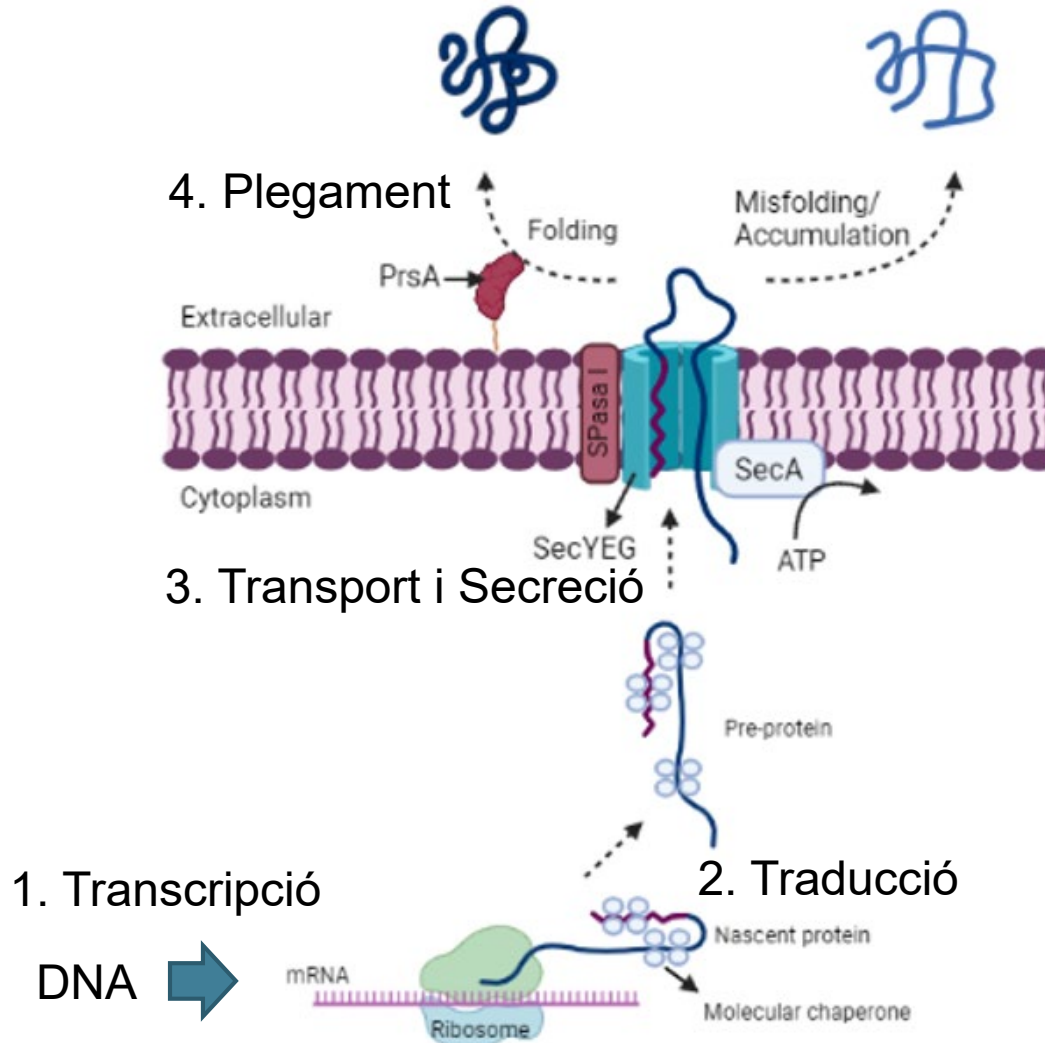


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# APLICACIONES DE *B. subtilis* 6051 (BS5)

(Doctorat Industrial de Jordi Ferrando)



**Secreció de proteïnes a *B. subtilis* per la via Sec**



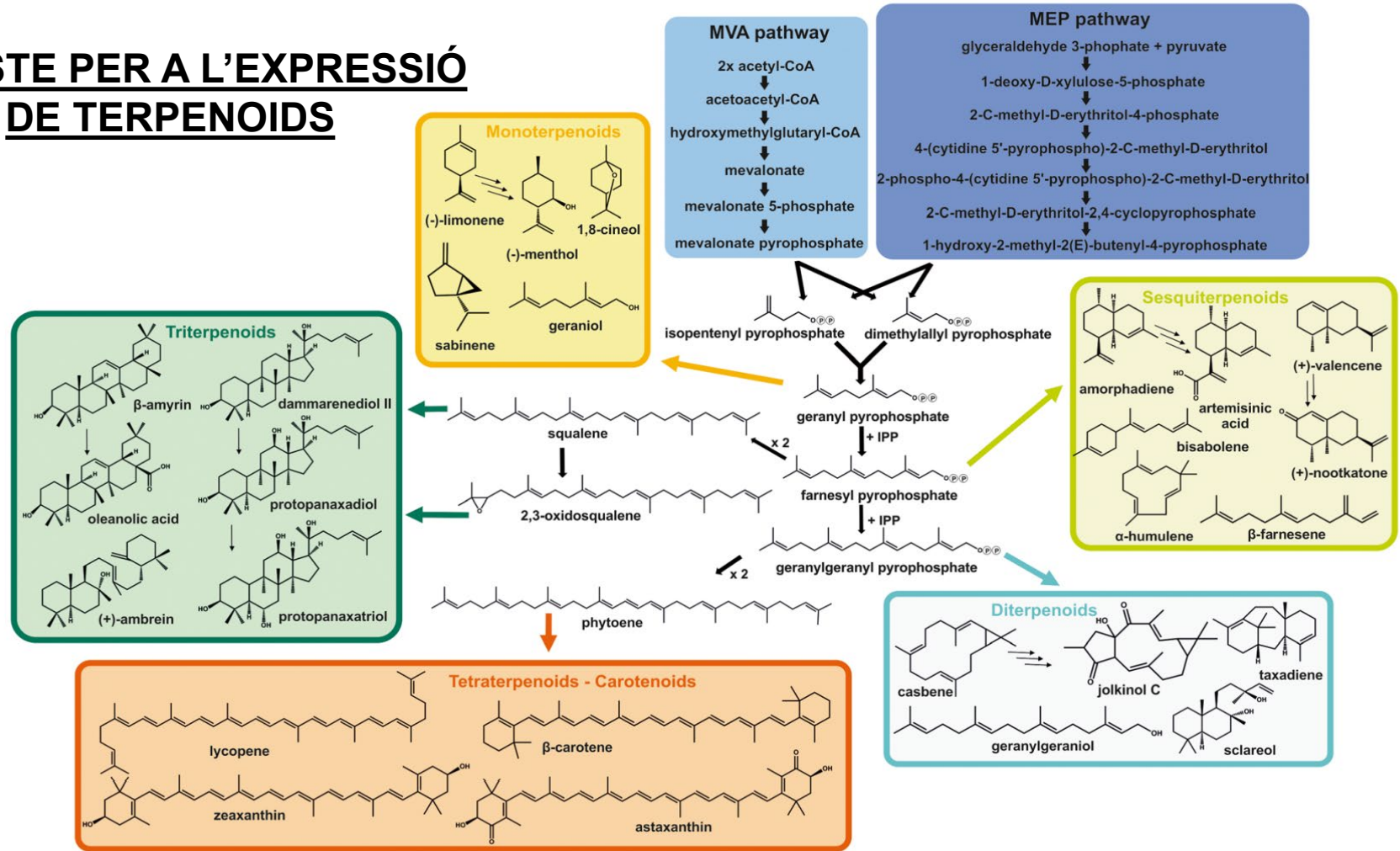
UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# APLICACIONS DE *B. subtilis* 6051 (BS5)

## Producció de terpenoids (TFG Joan Pérez, TFM Oriana Filluelo)

### 2. HOSTE PER A L'EXPRESSION DE TERPENIDS



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

La gran capacitat de *B. subtilis* 6051 per produir grans quantitats d'isoprè, posicionen la soca per ser una plataforma molt important per produir terpenoids


# APLICACIONES DE *B. subtilis* 6051 (BS5)

## Producció de terpenoids (TFG Joan Pérez, TFM Oriana Filluelo)

Applied Microbiology and Biotechnology  
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09892-y>

MINI-REVIEW

### Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host

Sandra Moser<sup>1,2</sup> · Harald Pichler<sup>1,2</sup> 

Received: 4 March 2019 / Revised: 3 May 2019 / Accepted: 6 May 2019  
© The Author(s) 2019

Appl Microbiol Biotechnol (2015) 99:9395–9406  
DOI 10.1007/s00253-015-6950-1

MINI-REVIEW

### Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production

Zheng Guan<sup>1,2</sup> · Dan Xue<sup>1</sup> · Ingy I. Abdallah<sup>1</sup> · Linda Dijkshoorn<sup>1</sup> · Rita Setroikromo<sup>1</sup> · Guiyuan Lv<sup>2</sup> · Wim J. Quax<sup>1</sup>

Received: 10 July 2015 / Revised: 17 August 2015 / Accepted: 20 August 2015 / Published online: 15 September 2015  
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com



Journal of  
Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

REVIEW ARTICLE

### Positioning *Bacillus subtilis* as terpenoid cell factory

H. Pramastya<sup>1,2</sup> , Y. Song<sup>1</sup> , E.Y. Elfahmi<sup>2</sup>, S. Sukrasno<sup>2</sup> and W.J. Quax<sup>1</sup>

1 University of Groningen, Groningen, The Netherlands

2 Pharmaceutical Biology Research Group, School of Pharmacy, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia

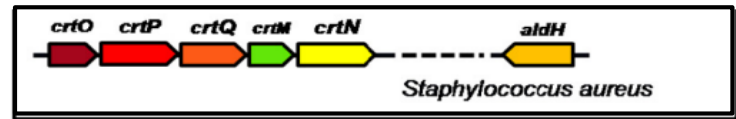
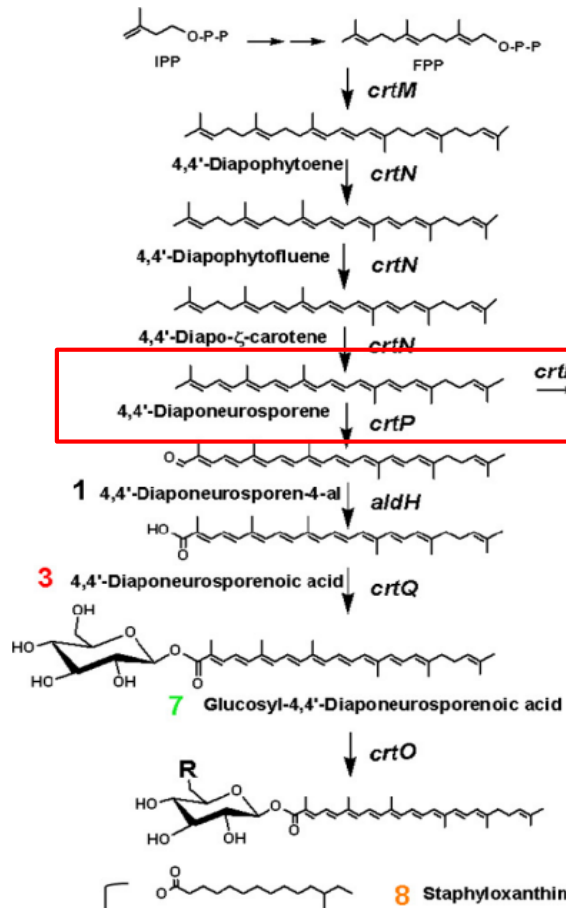
2020/1214: received 11 June 2020, revised  
29 September 2020 and accepted 9 October  
2020



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# BIOSÍNTESIS D' ESTAFILOXANTINA EN *S. aureus*



**C30 CAROTÈ  
(PIGMENT GROC)**

[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

Oncotarget, Vol. 7, No. 27

Research Paper: Immunology

**4,4'-diaponeurosporene, a C<sub>30</sub> carotenoid, effectively activates dendritic cells via CD36 and NF-κB signaling in a ROS independent manner**

Haofei Liu<sup>1</sup>, Wenwen Xu<sup>1</sup>, Xiaojing Chang<sup>1</sup>, Tao Qin<sup>1</sup>, Yinyan Yin<sup>1</sup> and Qian Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, People's Republic of China

Correspondence to: Qian Yang, email: zxyq@njau.edu.cn

Keywords: 4,4'-diaponeurosporene, C<sub>30</sub> carotenoids, dendritic cells, CD36, Immunology and Microbiology Section, Immune response, Immunity

Received: January 12, 2016

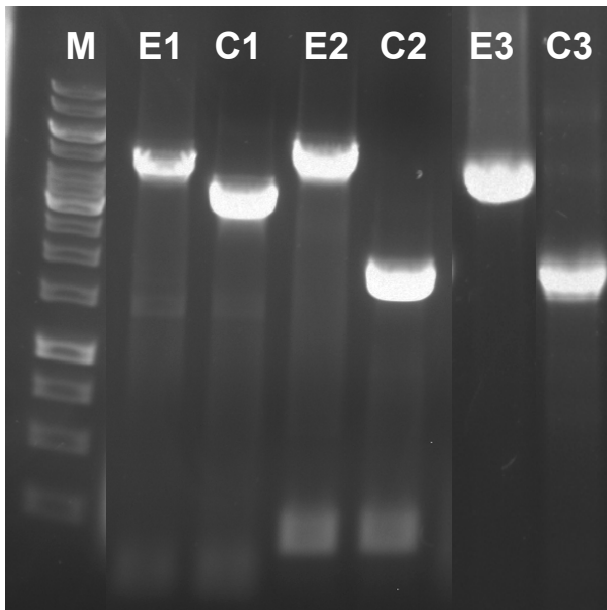
Accepted: May 28, 2016

Published: June 02, 2016

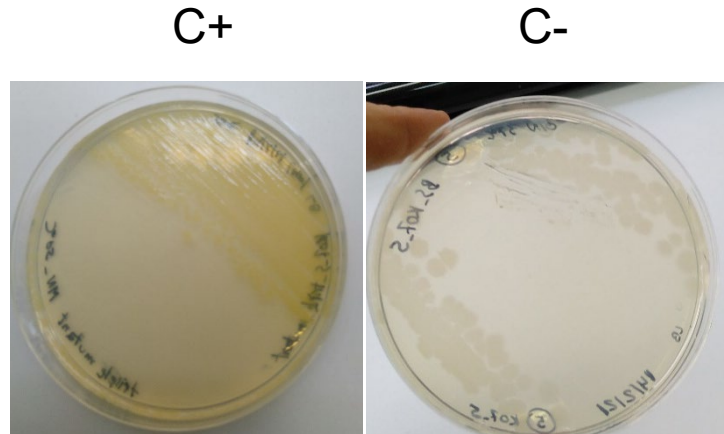
ABSTRACT

**C30 CAROTÈ  
(PIGMENT TARONJA)**

# PRODUCCIÓ RECOMBINANT C30 CAROTENOID GROC



Gel agarosa mostrant la inserció de l'operó MN (E1, E2 i E3) en els gens *amyE*, *aprE* i *spoVG* (C1, C2 i C3), respectivament

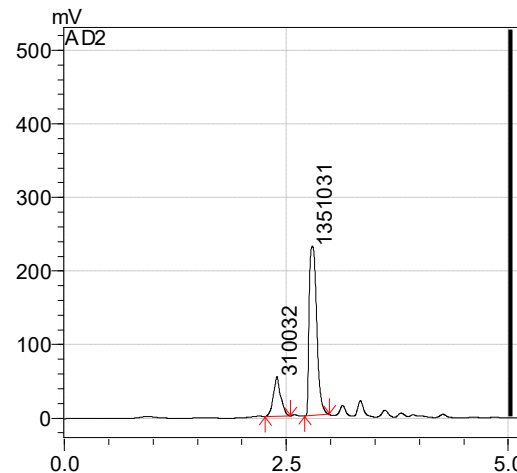


Soca editada amb triple inserció operó MN

Soca original (Control negatiu)



Extracció pigments amb acetona



Cromatograma d' HPLC mostrant els pics dels dos C30 carotenoides grocs produïts

**Quantificació pigments en progrés !**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# EL PROBLEMA DELS PLÀSTICS



La majoria provenen del **petroli** (font no renovable). Producció de gasos amb efecte hivernacle



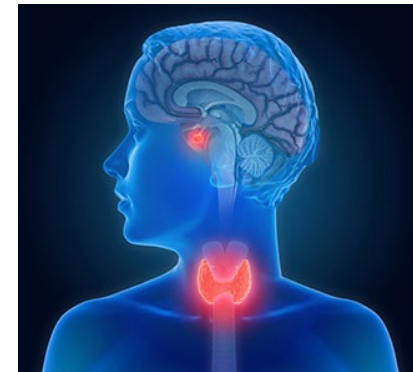
**Durabilitat** extrema (+1000 anys per decomposar-se)



De les 120 espècies de mamífers incloses en la llista d'espècies amenaçades, 54 esdevenen enredades en plàstic.



Alguns plàstics alliberen **disruptors endocrins** associats amb diversos problemes de salut



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

## BÚSQUEDA DE PLÀSTICS BIODEGRADABLES !

# PRODUCCIÓ DE PHB I CARACTERÍSTIQUES

## 3. HOSTE PER A L'EXPRESSION DE BIOPLÀSTICS

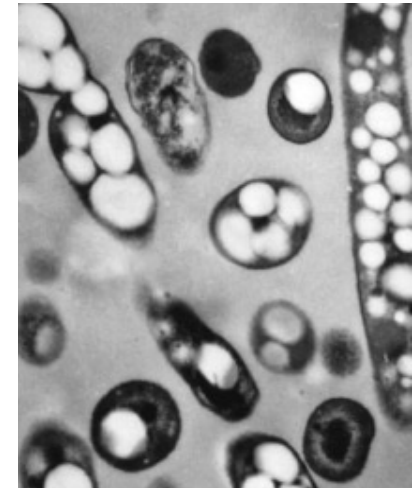
**Polihidroxicanoats (PHAs) són polièsters lineals d' origen microbià que molts procariotes acumulen com a material de reserva com a resposta a condicions ambientals adverses.**

**Entre els PHAs, el Polidroxibutirate (PHB) presenta propietats mecàniques molt interessants**

**Produïts a partir de substrats renovables i sostenibles**

**Biodegradables**

**Biocompatibles, aptes per aplicacions biomèdiques**



*Cupriavidus necator* containing PHB granules  
Singer *et al.* (2021) Trends in Biotechnology.

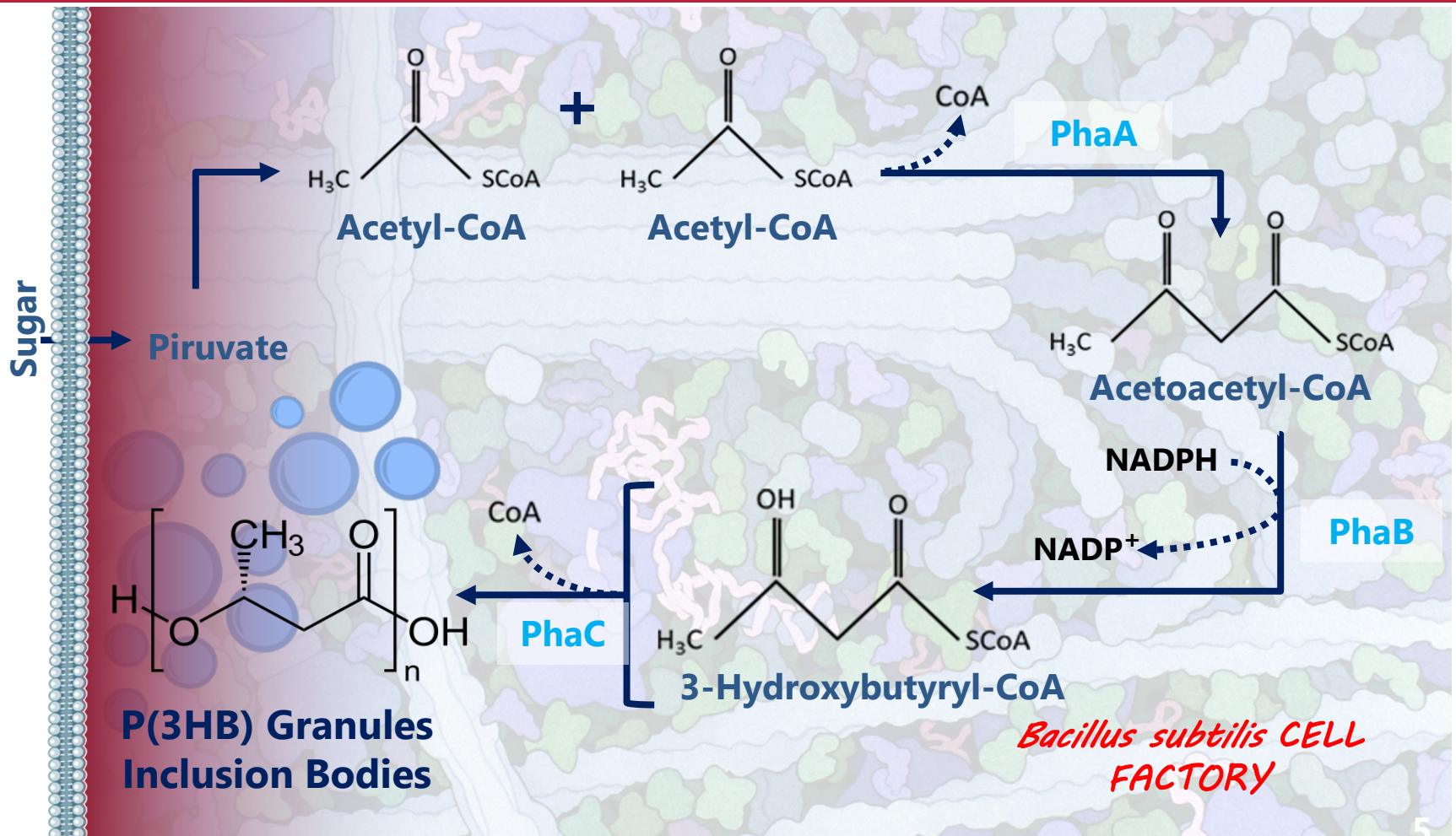


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació



# PRODUCCIÓ RECOMBINANT DE BIOPOLÍMERS (PHB)



- **Organisme GRAS: *Generally Regarded As Safe***
- **Absència de LPS (Lipopolisacàrid)**

# PRODUCCIÓ RECOMBINANT DE BIOPOLÍMERS (PHB)

**phaA**

*Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)

**phaB**

*Bacillus megaterium* QM B1551

} Promotor constitutiu

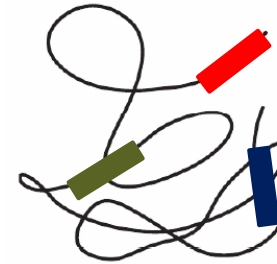
**phaC**

*Bacillus cereus* ATCC 14579

} Promotor induïble per xilosa



*B. subtilis* 6051



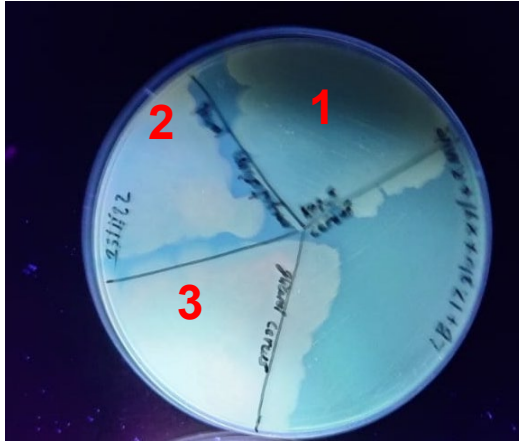
*B. subtilis* phaABC



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# PRODUCCIÓ RECOMBINANT DE BIOPOLÍMERS (PHB)



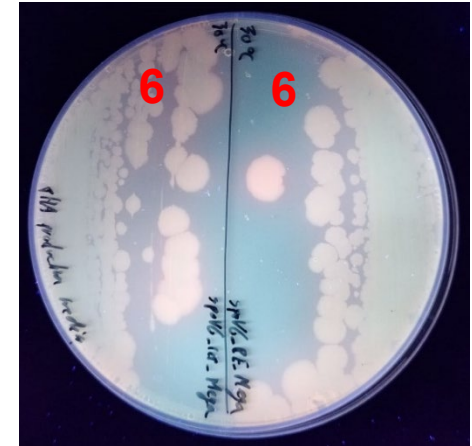
1: Soca *B. subtilis* (C-)

2: *B. megaterium* (C+)

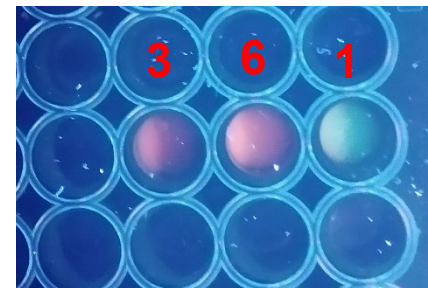
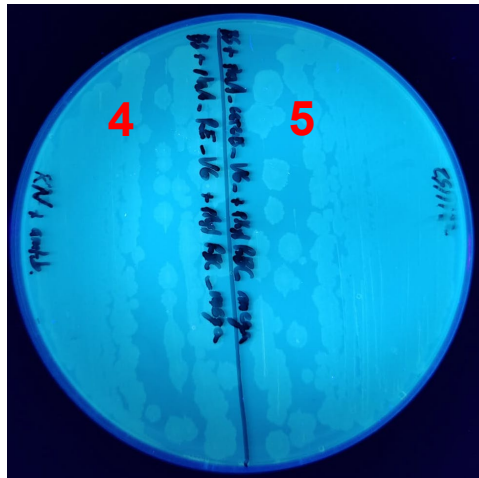
3: *B. cereus* (C+)

4: *B. subtilis*\_phaA

5: *B. subtilis*\_phaAB



6: *B. subtilis*\_phaABC



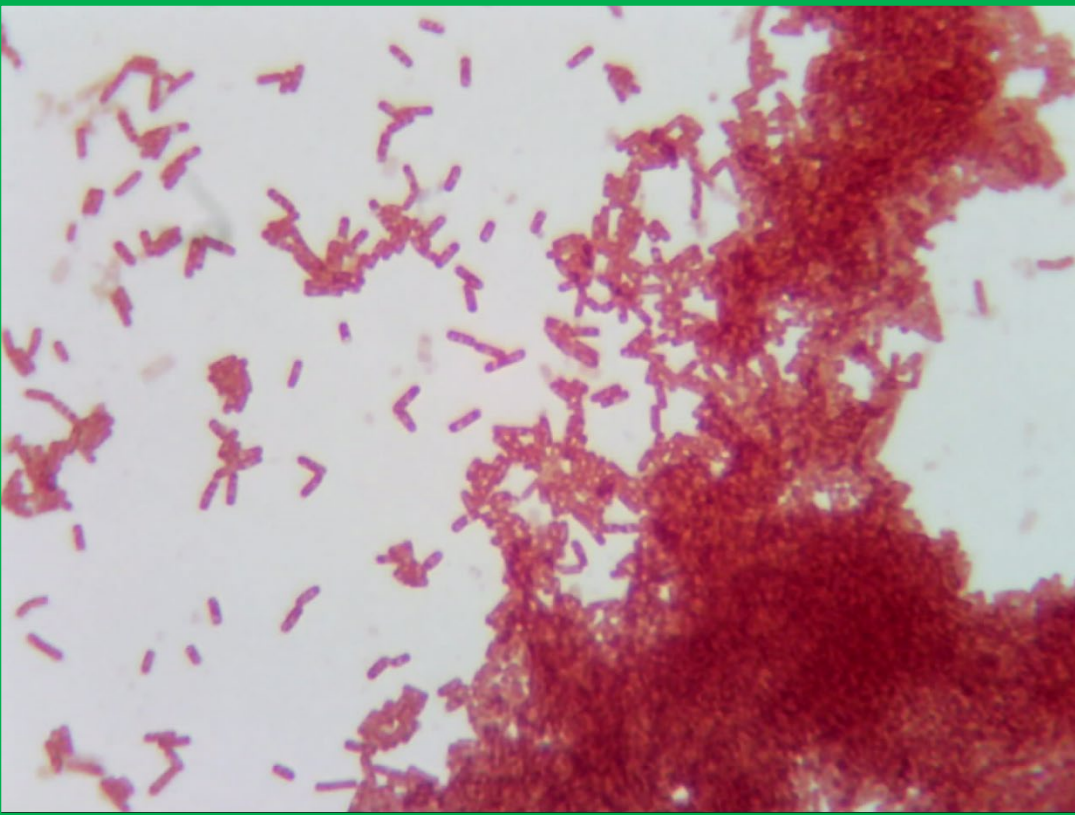
**Presència de PHB a la soca recombinant !**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

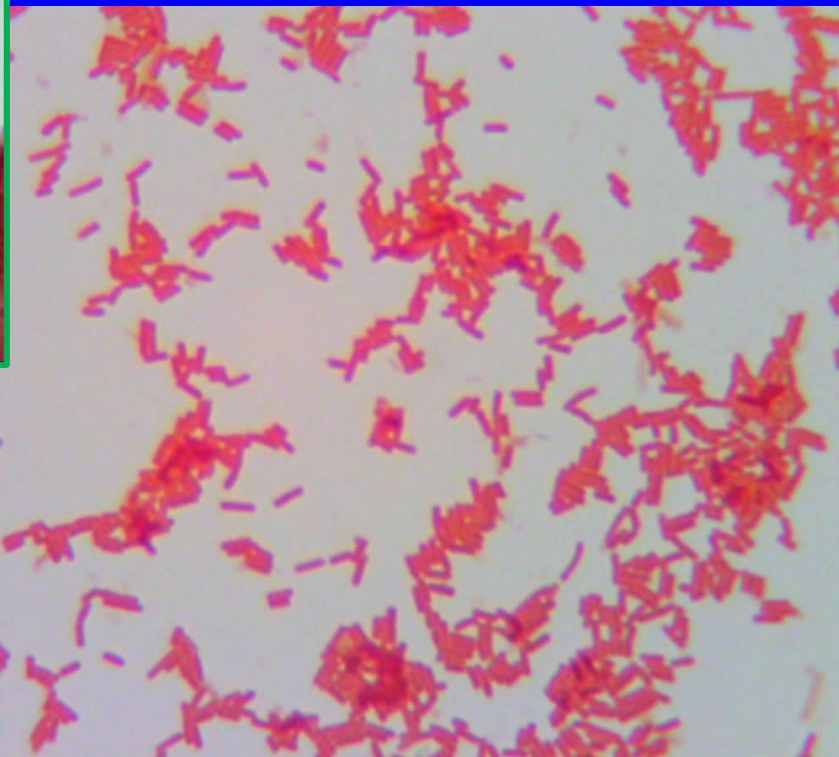
Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# TINCIÓ AMB NEGRE DE SUDAN



Soca productora de PHB

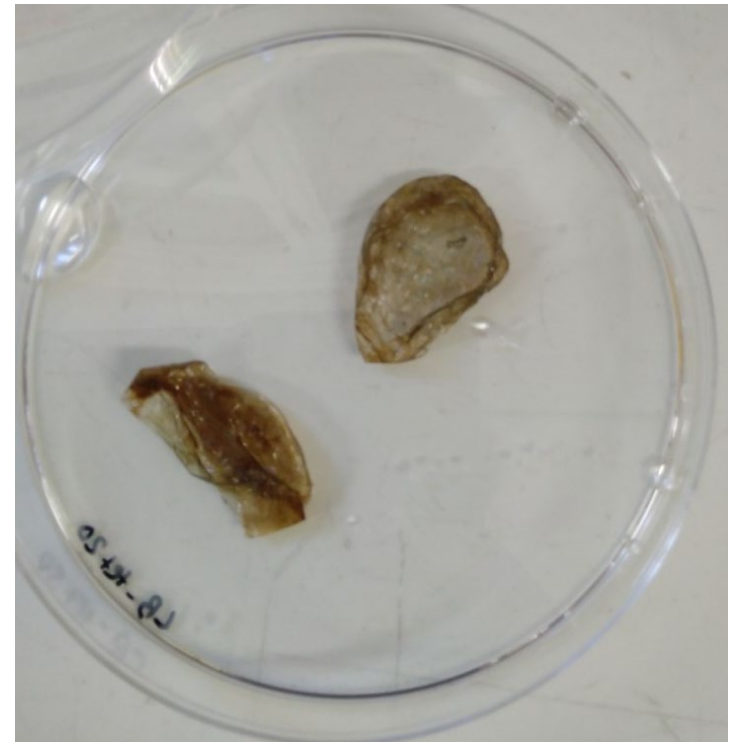
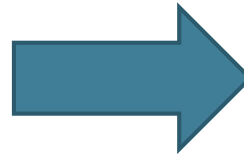
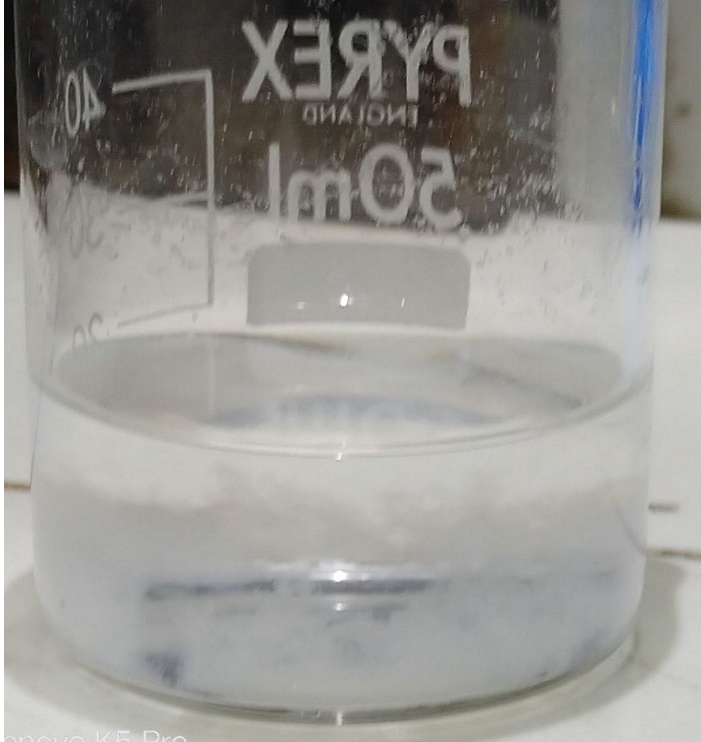
Soca control NO productora de PHB



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

# EXTRACCIÓ/PURIFICACIÓ DE PHB



Precipitació del biopolímer en metanol

Biofilm de PHB-plàstic

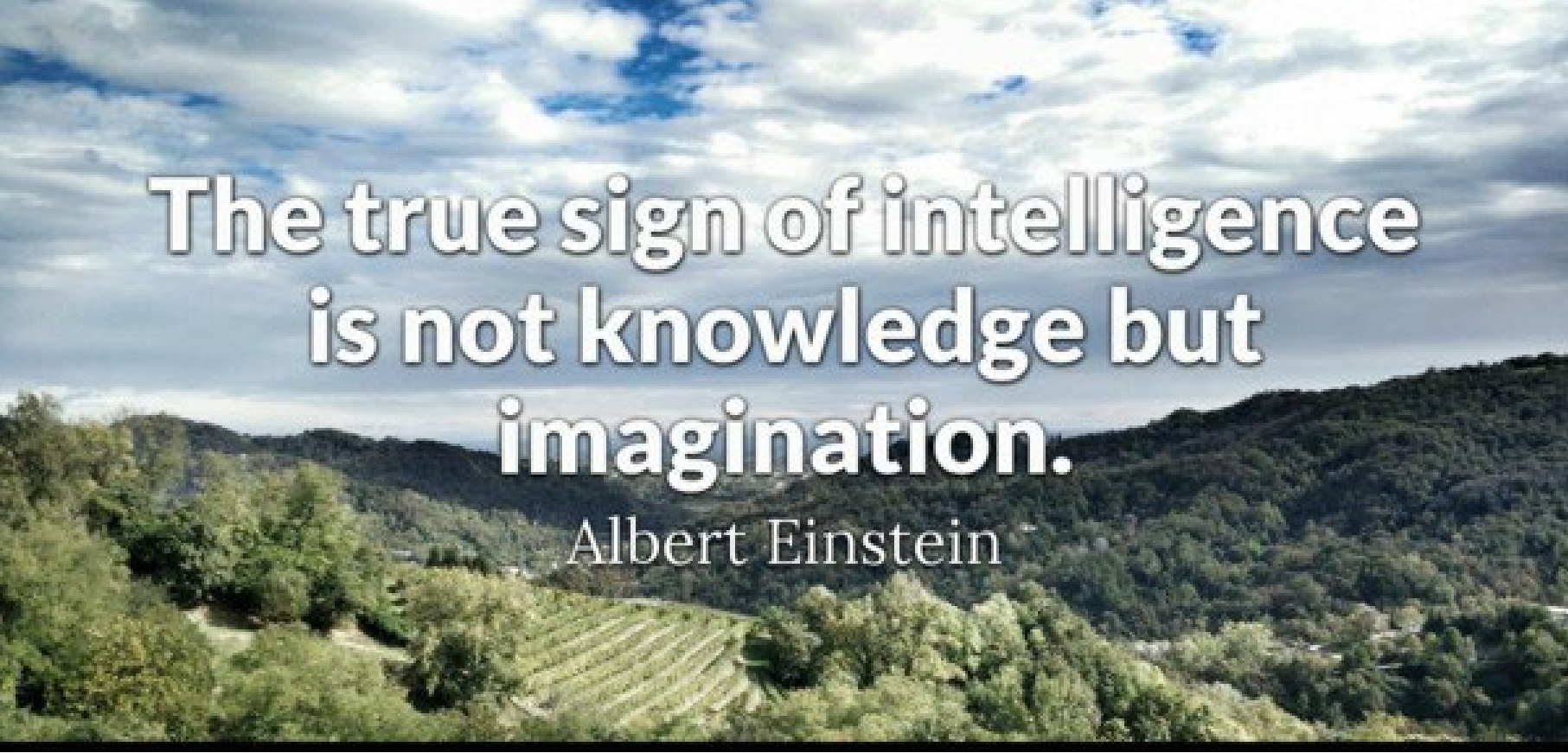
**Quantificació i caracterització  
PHB en progrés !**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

THANKS FOR YOUR ATTENTION!



The true sign of intelligence  
is not knowledge but  
imagination.

Albert Einstein



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació