

EDITORIAL KHUSUS 2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**BAHAN
PENELITIAN**
Jamur yang
menginvasi batu

**GENETIKA
TANAMAN**
Membuat urutan
genom terlihat

EKSPERIMEN
Pauline dan
para pelarian

BIOLOGI

DI MASA KITA

CRISPR-Cas

... Lebih dari
sekadar
pertahanan

Terlindungi dengan baik oleh sistem CRISPR-Cas

CRISPR-Cas dalam Actinomycetes Penghasil Antibiotik

LENA MITOUSIS | WOLFGANG WOHLLEBEN



Actinomycetes menghasilkan berbagai macam bahan alami yang sangat penting bagi kita manusia dalam bidang kedokteran dan industri. Antibiotik khususnya sangat diperlukan untuk pengobatan penyakit menular. Diasumsikan bahwa *Actinomycetes* melindungi diri mereka sendiri dari pesaing lain di habitat alami mereka melalui zat-zat alami tersebut. Namun, ada juga ancaman lain, seperti infeksi oleh fag. Sistem pertahanan seperti CRISPR-Cas dapat melindungi diri dari hal ini. Namun, masih sedikit yang diketahui tentang fungsi sistem CRISPR-Cas pada *Actinomycetes*.

Salah satu unit taksonomi terbesar dalam bakteri adalah kelas *Actinomycetes* (Abb. 1). Kelas ini mencakup bakteri gram positif, kaya GC dengan pertumbuhan yang sering kali berbentuk filamen. Banyak *Actinomycetes* memiliki siklus hidup yang kompleks (Gambar 2), di mana miselium substrat yang tumbuh secara vegetatif dan bercabang berdiferensiasi lebih lanjut menjadi miselium udara yang tidak bercabang. Kemudian terbentuk spora dari miselium udara. Setelah perkecambahan, tumbuh lagi sebagai miselium vegetatif dan siklus dimulai lagi dari awal. *Actinomycetes* sering ditemukan di tanah, tetapi juga dapat ditemukan di habitat lain seperti di perairan. Mereka memiliki peran penting dalam ekosistem masing-masing. Di tanah, misalnya, *Streptomyces*, *Nocardia* atau *Cellulomonas* terlibat dalam pembentukan humus, karena mereka dapat menguraikan jamur serta materi tanaman dan hewan. Selain itu, *Streptomyces* juga berkontribusi khususnya pada bau khas tanah berkaru melalui sintesis geosmin. Ada juga *Actinomycetes* yang bersimbiosis: Aktinomiset pengikat nitrogen seperti anggota genus *Frankia* yang hidup berasosiasi dengan akar tanaman. Beberapa spesies penghasil antibiotik seperti *Streptomyces*, *Pseudonocardia* atau *Amycolatopsis* hidup bersama dengan serangga (misalnya rayap, semut, atau tawon). Hampir semua *Actinomycetes* tidak berbahaya; hanya ada sedikit spesies patogen. Ini termasuk *Mycobacterium tuberculosis*, agen penyebab tuberkulosis, atau *Corynebacterium diphtheriae*, penyebab difteri

Actinomycetes sebagai sumber zat alami yang penting

Relevansi khusus *Actinomycetes* terletak terutama pada potensi besar mereka untuk menghasilkan nutrisi yang aktif secara biologis. Isolasi aktinomisin pada tahun 1941 [1], antibiotik pertama dari *Actinomycetes* hanyalah awal dari sejarah panjang kesuksesan. Sejak saat itu, strain *Actinomycetes* telah diisolasi dari berbagai sumber, beberapa di antaranya dengan hasil yang ekstrem.

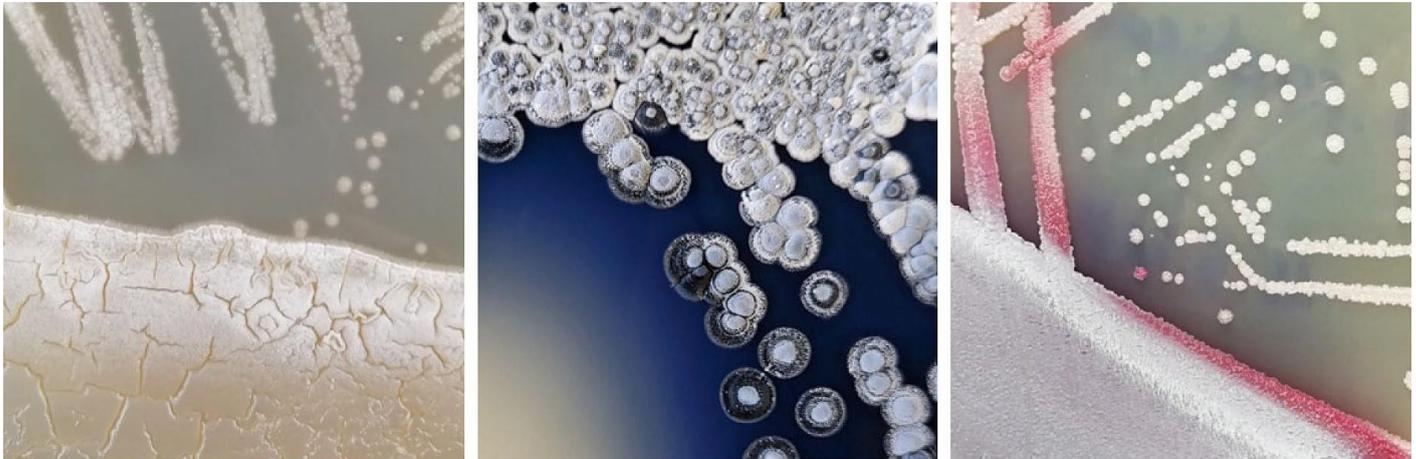


ABB. 1 Morfologi Actinomycetes yang beragam. Actinomycetes dapat tumbuh sebagai miselium substrat vegetatif, yang biasanya berwarna krem. Dalam kondisi tertentu, miselium ini dapat berdiferensiasi menjadi miselium udara berbentuk bubuk keputihan, yang kemudian membentuk spora berwarna keputihan atau abu-abu. Beberapa Actinomycetes menghasilkan zat alami yang dapat mewarnai sel dan agar. Ilustrasi ini menunjukkan *Streptoalloteichus tenebrarius*, *Streptomyces albidoflavus*, dan *Streptomyces coelicolor*.

kondisi (tanah, air tawar dan air asin, batu kapur, udara, spons, gurun, gua vulkanik). Semua ini disaring untuk produksi zat aktif. Antara tahun 1950 dan 1970 yang disebut sebagai “era keemasan antibiotik”, sekitar 60 persen dari semua antibiotik berasal dari Actinomycetes, sebagian besar dari strain *Streptomyces* [2]. Hingga saat ini, variasi yang sangat besar dari bahan alami yang berbeda telah ditemukan dalam Actinomycetes. Ini termasuk struktur kimia yang beragam seperti glikopeptida, beta laktam, makrolida, tetrasiklin, rifamisin, dan aminoglikosida. Bahan-bahan alami tersebut memiliki berbagai mekanisme kerja yang berbeda, dengan efek antibiotik, fungisida, insektisida, herbisida, dan antivirus, menghambat enzim, pertumbuhan tumor, atau memodulasi sistem kekebalan tubuh. Saat ini, hampir sepertiga dari semua antibiotik yang digunakan pada awalnya berasal dari Actinomycetes.

Potensi genetik dan aksesibilitas Actinomycetes

Gen yang mengkode sintesis produk alami biasanya dapat ditemukan dalam urutan genom Actinomycetes dalam apa yang disebut kluster gen biosintetik (BGC). Ini artinya,

gen-gen tersebut bertetangga pada DNA dan biasanya diekspresikan dan diatur bersama. Selain gen untuk sintesis produk, BGC sering kali juga memiliki gen untuk regulator atau gen resistensi yang terkait. Analisis bioinformatika genom aktinomiset telah menunjukkan bahwa mereka dapat memiliki beberapa BGC. Rata-rata, 16 BGC ditemukan per genom, meskipun ada juga contoh dengan lebih dari 60 kluster [3]. Namun, dalam kondisi laboratorium standar, seringkali hanya sebagian kecil dari semua BGC yang diekspresikan. Oleh karena itu, BGC yang tidak aktif juga disebut sebagai kluster gen biosintesis “tidak aktif”. Ada berbagai pendekatan untuk mengeksploitasi potensi “tersembunyi” ini dan “membangkitkan” BGC. Salah satunya adalah dengan memodifikasi secara genetik galur murni sedemikian rupa sehingga ekspresi BGC yang “tidak aktif” dapat diaktifkan. Sebagai alternatif, gen yang bertanggung jawab untuk sintesis dapat diisolasi dari galur murni dan diekspresikan secara heterolog dalam galur lain yang dioptimalkan. Hal ini mengasumsikan bahwa metode dan alat tersedia untuk pemrosesan genetik molekuler dari galur-galur ini. Ini termasuk, misalnya, isolasi DNA, kloning, transfer DNA rekombinan ke dalam sel dan pemilihan mutan. Pada Actinomycetes, sering terjadi bahwa metode laboratorium genetik molekuler standar tidak berfungsi atau tidak bekerja secara efisien. Kemungkinan penyebabnya dapat mencakup aktivitas mekanisme pertahanan seperti sistem modifikasi restriksi atau sistem CRISPR-Cas.

CRISPR-Cas dalam Actinomycetes

CRISPR-Cas dikenal sebagai sistem kekebalan adaptif prokariotik. Biasanya terdiri dari gen cas yang sesuai dan unit pengulangan *spacer*, yang dikenal sebagai

RINGKASAN

- Actinomycetes sering kali memiliki siklus hidup yang kompleks dan merupakan sumber penting bahan alami yang relevan secara medis dan industri seperti antibiotik.
- CRISPR-Cas ditemukan pada sekitar setengah dari semua genom aktinomiset. Meskipun demikian, fungsi CRISPR-Cas dalam aktinomiset saat ini masih kurang dipahami.
- Contoh dari *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium tuberculosis* dan *Streptoalloteichus tenebrarius* menunjukkan sifat-sifat yang tidak lazim, beberapa di antaranya terkait dengan siklus hidup mereka yang kompleks.

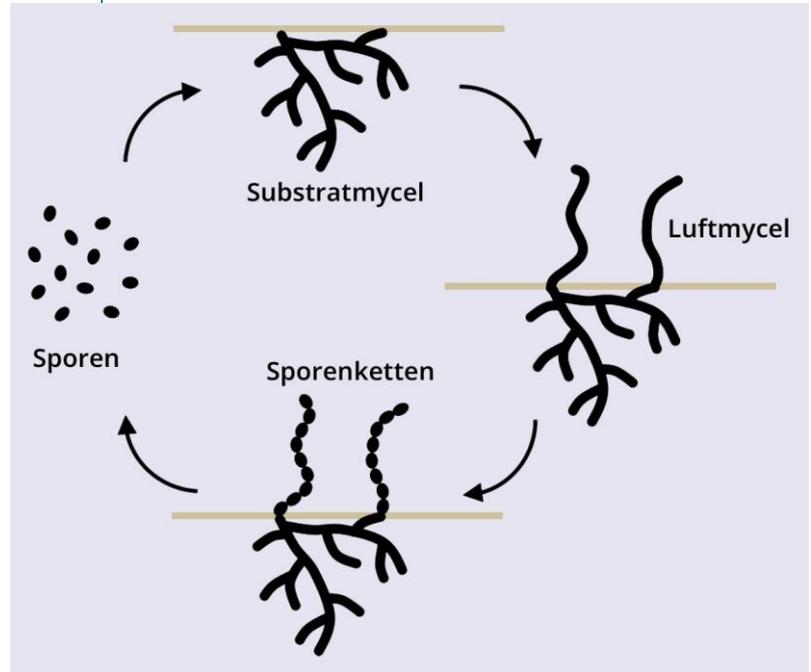
Larik CRISPR. Larik CRISPR sering ditemukan tepat di sebelah gen cas; keduanya disebut sebagai lokus CRISPR. Larik CRISPR juga dapat muncul di lokasi lain dalam genom selain di sekitar gen cas. Ada juga contoh larik CRISPR pada strain yang tidak memiliki gen cas. Analisis sekuens dari semua sekuens genom bakteri yang lengkap menunjukkan bahwa gen cas dan/atau susunan CRISPR dikodekan pada 41,9 persen genom bakteri [4]. Melihat pada kelompok aktinobakteri, lokus CRISPR ditemukan di hampir 50 persen genom [5]. Dalam genom *Streptomyces*, larik CRISPR ditemukan pada 65,7 persen, tetapi hanya 37,1 persen yang juga memiliki gen cas yang sesuai. [6].

Sistem CRISPR-Cas dapat dikategorikan ke dalam beberapa tipe (tipe I-VI). Analisis distribusi enam tipe CRISPR-Cas yang berbeda menunjukkan bahwa hampir semuanya adalah sistem tipe I, terutama tipe I-E. Meskipun analisis sekuens menunjukkan bahwa sistem CRISPR-Cas terjadi pada aktinomiset dengan frekuensi yang sama seperti pada semua gen bakteri, sangat sedikit penelitian eksperimental yang telah dilakukan pada sistem CRISPR-Cas dari aktinomiset. Sepengetahuan kami, saat ini hanya ada tiga contoh yang telah dikarakterisasi secara eksperimental dan fungsional dari Actinomycetes.

Contoh pertama yaitu CRISPR-Cas pada plasmid *Streptomyces linear pSHK1* - diterbitkan pada tahun 2011 oleh Guo et al [7]. Sistem ini terdiri dari delapan gen cas dengan dua larik CRISPR yang mengipasi (Gambar 3) dan lima larik tambahan yang didistribusikan ke seluruh urutan plasmid. Dengan demikian, sistem ini sesuai dengan sistem tipe I-E yang khas seperti yang ditemukan pada *Escherichia coli*. Menariknya, sistem ini tidak memberikan perlindungan terhadap infeksi fag atau plasmid dalam percobaan laboratorium. Selain itu, tidak ada homologi yang ditemukan antara sekuens *spacer* di satu sisi dan sekuens plasmid atau fag di sisi lain. Alasan untuk hal ini dan fungsi potensial apa yang dapat dimiliki oleh sistem ini belum diklarifikasi.

Contoh kedua adalah publikasi tahun 2016 oleh Qui et al [8], tentang sistem aktif pertama dari Actinomycetes. Publikasi tersebut menjelaskan sistem tipe I-E pada *Streptomyces avermitilis* (Gambar 3), yang secara genetik sangat mirip dengan sistem yang telah dikarakterisasi dengan baik dari *Escherichia coli*. Sistem ini menawarkan perlindungan terhadap fag dan plasmid, tetapi penggabungan bagian pengatur jarak yang baru pada umumnya agak jarang terjadi. Dibandingkan dengan sistem yang dikenal dari *E. coli*, perbedaan terlihat jelas berhubungan dengan kondisi akuisisi (adaptasi) *spacer*. Biasanya, tidak ada *spacer* baru yang disisipkan jika sudah ada *spacer* yang sama persis dengan DNA asing. Dalam hal ini, DNA yang diserang dapat segera terdegradasi. Namun, untuk sistem dari *S. avermitilis*, penggabungan segmen *spacer* tambahan juga diamati dalam kondisi ini. Namun, yang paling menarik adalah bahwa

ABB. 2 | SIKLUS HIDUP KOMPLEKS ACTINOMYCETES BERSERABUT

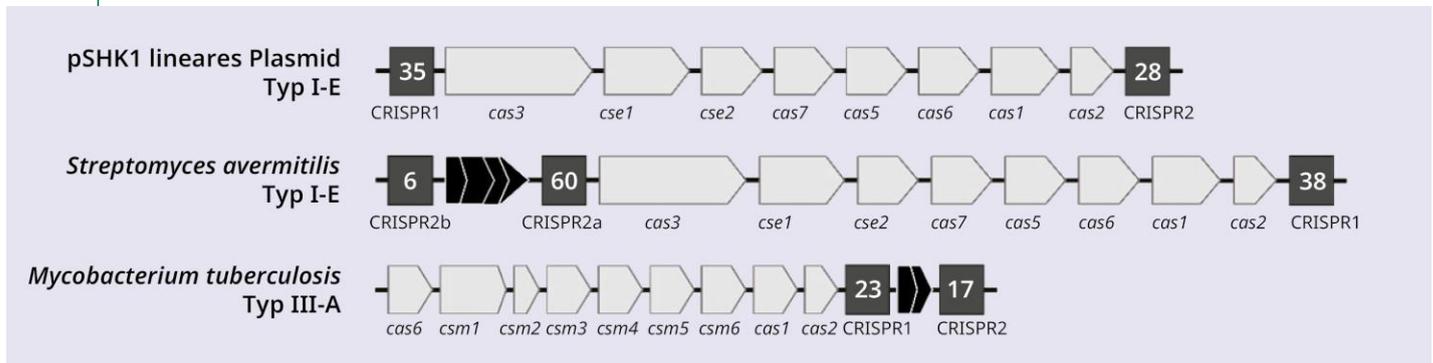


Miselium substrat bercabang tumbuh di bawah batas media. Ini menerobos batas dan berdiferensiasi menjadi miselium udara yang tidak bercabang. Dari sini, spora bulat individu terputus, yang hadir dalam rantai spora. Spora dapat menyebar dengan bebas. Pada perkecambahan, miselium substrat vegetatif terbentuk lagi dan siklus dimulai dari awal lagi.

Pada *S. avermitilis*, ditemukan korelasi antara aktivitas CRISPR-Cas dan fase siklus hidup sel. Aktivitas sistem pertahanan tampaknya meningkat selama sporulasi, karena peningkatan penggabungan *spacer* dan hilangnya plasmid asing diamati setelah sporulasi sel, berbeda dengan pertumbuhan miselium.

Contoh ketiga dari sistem yang dikarakterisasi secara fungsional dalam Actinomycetes berasal dari *Mycobacterium tuberculosis* dan dideskripsikan pada tahun 2019 oleh Wei et al [9]. Ini adalah sistem tipe III A (Gambar 3). Investigasi fungsi alami dari sistem CRISPR-Cas membuktikan bahwa sistem ini aktif dalam pertahanan terhadap elemen genetik yang bergerak. Dibandingkan dengan sistem tipe III A lainnya yang diketahui, sistem ini juga menunjukkan keanehan yang tidak lazim dalam proses pematangan crRNA. Biasanya, crRNA pada ujung 3'-ujung sistem tipe III dipangkas oleh nuklease spesifik non-CRISPR-Cas. CrRNA yang telah matang tidak membentuk struktur sekunder. Sebaliknya, crRNA dari *M. tuberculosis* tidak terpotong pada ujung 3' dan membentuk struktur sekunder yang lebih mirip dengan crRNA dari sistem tipe I. Protein Cas, Cas6, terlibat dalam proses pematangan crRNA ini. Sementara aktivitas pada sistem lain tidak tergantung pada ion logam, Cas6 dari *M. tuberculosis* ditemukan tergantung pada ion logam.

ABB. 3 | SISTEM CRISPR-CAS DARI ACTINOMYCETES



Gambaran umum sistem CRISPR-Cas dari contoh-contoh yang dikarakterisasi secara eksperimental *Streptomyces* plasmid pSHK1, *Streptomyces avermitilis*, dan *Mycobacterium tuberculosis*. Panah berwarna terang mewakili gen cas. Kotak-kotak mewakili susunan CRISPR, angka di dalamnya menunjukkan jumlah spacer. Panah gelap mewakili gen-gen lain yang tidak spesifik untuk CRISPR-Cas. Dalam kedua kasus tersebut, ini adalah gen transposase.

Keberadaan Ca^{2+} dan Mn^{2+} ditampilkan. Jauh sebelum karakterisasi fungsional yang mendetail dari sistem CRISPR-Cas dari *M. tuberculosis*, sekuens larik CRISPR telah dianalisis dengan lebih rinci. Karena aktivitas sistem, ada variasi urutan dalam susunan CRISPR dalam waktu yang berbeda. Dengan bantuan sekuens spacer yang bervariasi, dimungkinkan untuk mengkategorikan isolat *Mycobacterium* secara evolusi dan epidemiologi. Metode “spoligotyping” (= pengetikan oligonukleotida spacer) dikembangkan untuk *M. tuberculosis* pada awal tahun 1997 [10]; sepuluh tahun kemudian metode ini juga dikembangkan untuk *Corynebacterium diphtheriae* [11].

Sistem CRISPR-Cas dari *Streptoalloteichus tenebrarius*

Kami berurusan dengan Actinomycetes dan produk alaminya. Namun, ketika bekerja dengan strain laboratorium, *Streptoalloteichus tenebrarius*, kami juga tertarik pada CRISPR-Cas pada Actinomycetes. Strain ini adalah produsen industri antibiotik aminoglikosida dan dioptimalkan sebagai bagian dari proyek pengembangan strain untuk meningkatkan produksi tobramycin, antibiotik berspektrum luas [12]. Manipulasi genetik sangat menantang, karena banyak metode standar yang tidak berhasil atau hanya bekerja dengan sangat tidak efisien. DNA rekombinan hanya digunakan pada *S. tenebrarius* melalui konjugasi. DNA yang digunakan harus membawa daerah homolog dengan genom *S. tenebrarius* dan diintegrasikan ke dalam genom melalui rekombinasi, jika tidak, maka DNA tidak akan tetap stabil di dalam sel. Selain itu, strain ini resisten terhadap sebagian besar penanda seleksi yang digunakan secara konvensional, yang membatasi penanda yang tersedia. Analisis yang lebih rinci dari urutan genom menunjukkan bahwa *S. tenebrarius* tidak hanya membawa 33 BGC potensial, tetapi juga tiga sistem CRISPR-Cas kelas 1. Untuk mengetahui apakah aktivitas sistem CRISPR-Cas dapat menjadi penyebab kesulitan dalam manipulasi genetik dan sistem ini sedang diselidiki secara lebih rinci. Tujuannya adalah untuk

mengetahui peran apa yang secara umum dimainkan oleh sistem CRISPR-Cas pada Actinomycetes dan sejauh mana terlibat dalam proses selain imunitas. Hasil awal menunjukkan bahwa salah satu sistem CRISPR-Cas dapat memiliki pengaruh pada diferensiasi sel pada *S. tenebrarius*.

Rangkuman

Actinomycetes adalah kelompok bakteri yang beragam dengan khasiat yang penting untuk pengobatan dan industri. Mayoritas antibiotik yang digunakan saat ini berasal dari Actinomycetes. Dengan memproduksi zat alami yang aktif secara biologis, aktinomiset terlindungi dengan baik dari pesaing di lingkungan. Sistem kekebalan tubuh prokariotik CRISPR-Cas menawarkan perlindungan terhadap fag dan DNA/RNA asing. Hal ini ditemukan pada sekitar 50 persen dari semua genom aktinomiset. Kecuali beberapa contoh, fungsi CRISPR-Cas pada aktinomiset hampir tidak pernah diteliti. Sistem yang dikarakterisasi dari *S. avermitilis* dan *M. tuberculosis* menunjukkan beberapa sifat yang tidak lazim. Pada *S. avermitilis*, aktivitas sistem CRISPR-Cas terkait dengan fase siklus hidup. Pada *M. tuberculosis*, pematangan crRNA berbeda dengan sistem yang serupa. Investigasi kami terhadap sistem CRISPR-Cas dari *S. tenebrarius* menunjukkan keterlibatan potensial dalam diferensiasi sel.

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

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.

Kata Kunci:

Actinomycetes, Antibiotik, Bahan Alami, CRISPR-Cas

Daftar Pustaka:

- [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. 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.

Ditulis oleh:



Lena Mitousis belajar biologi dan mikrobiologi di Universitas Tübingen. Sejak 2021, ia telah mengerjakan gelar doktornya di bawah bimbingan Prof Dr Wolfgang Wohlleben di Ketua Mikrobiologi/Bioteknologi di Universitas Tübingen dengan topik sistem CRISPR-Cas pada Actinomycetes penghasil antibiotik.



Wolfgang Wohlleben menyelesaikan gelar doktornya di bidang fisika di Universitas Erlangen Sejak tahun 1980, beliau menjadi ketua kelompok di Departemen Genetika di Universitas Bielefeld, dari tahun 1992 menjadi profesor di Universitas Saarland, dan dari tahun 1994 menjadi profesor di Departemen Mikrobiologi/Bioteknologi di Universitas Tübingen. Beliau telah menjadi profesor senior di Universitas Tübingen sejak tahun 2019.

Korespondensi

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



Penerjemah dalam Bahasa Indonesia:

Anindya Kayla Eral, Stud. Med. merupakan Mahasiswa S1 Universitas Brawijaya Program Studi Kedokteran.

Kontak:

Malang, Jawa Timur
 65141
 Email: kaylaeral@student.ub.ac.id

Sumber Makalah:

Makalah ini awalnya diterbitkan dalam bahasa Jerman di *BiuZ* Bd. 54 (2024), edisi khusus (<https://www.biuZ.de/index.php/biuZ/issue/view/486>)

Terjemahan dibantu oleh:

DeepL, Microsoft Word, dan KKBI (untuk mencari sinonim kata.)

