

# **Inactivación de cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones asociadas a prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9.**

Memoria presentada por

**Jusdin Ruiz Umaña**

para optar al Título de Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de  
la Universidad Pública de Navarra

Director:

**Dra. Maite Echeverz Sarasúa\***

Tutor:

**Dr. Iñigo Lasa Uzcudum\*\***

**Pamplona**

**2019 – 2020**

\* Personal Investigador Doctor - Centro de Investigación Biomédicas NAVARRABIOMED.  
Grupo De Investigación En Patogénesis Microbiana.

\*\* Director Centro de Investigación Biomédicas NAVARRABIOMED.

La **Dra. MAITE ECHEVERZ SARASÚA**, Investigadora del Laboratorio de Patogénesis Microbiana de Navarrabiomed,

INFORMA:

Que la presente memoria de Trabajo Final de Máster “**Inactivación de cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones asociadas a prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9.**” elaborada por **JUSDIN RUIZ UMAÑA** ha sido realizada bajo su dirección y que cumple con las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada.

Y para que así conste, firma la presente en Pamplona, a 1 de Junio de 2020



Fdo. Maite Echeverz Sarasúa

VºBº Iñigo Lasa Uzcudum

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es el agente causal más frecuente de infecciones asociadas a prótesis articulares. Cuando este se establece en la superficie de la prótesis formando biofilm, la matriz autosecretada favorece su supervivencia y resistencia a los antimicrobianos, desencadenando la cronicidad de la infección. Es así que en la actualidad existe un enorme interés en desarrollar nuevos tratamientos alternativos y/o complementarios al uso clásico de los antibióticos. En este sentido, se ha evaluado la eficacia de inactivación de cepas de *S. aureus* procedentes de infecciones asociadas a prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9 contenida en tres plásmidos (previamente construidos en el laboratorio). La expresión del sistema CRISPR/Cas9 diseñado frente a dianas específicas y altamente conservadas en el cromosoma de *S. aureus*, produce una ruptura bicatenaria en el genoma y desencadena la muerte celular con una eficiencia del 100 % para los tres plásmidos analizados en este trabajo. Esta herramienta abre la puerta a futuros trabajos que permitan la búsqueda de estrategias que faciliten y potencien la aplicación de estas tecnologías a sistemas *in-vivo*.

**Palara claves:** *Staphylococcus aureus*; biofilms; CRISPR/Cas9; prótesis articulares.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is the most frequent causative agent of infections associated with joint prostheses. When it is established on the surface of the prosthesis forming biofilm, the self-secreted matrix favors its survival and resistance to antimicrobials, triggering the chronicity of the infection. Thus, there is currently an enormous interest in developing new alternative and/or complementary treatments to the classic use of antibiotics. In this sense, the inactivation efficacy of *S. aureus* strains from prosthetic joint infections has been evaluated using the CRISPR/Cas9 tool contained in three plasmids (previously constructed in the laboratory). The expression of the CRISPR/Cas9 system designed against specific and highly conserved targets on the *S. aureus* chromosome, produces a double-strand break in the genome and triggers cell death with 100% efficiency for the three plasmids analyzed in this work. This tool opens the door to future works that allow the search for strategies that facilitate and enhance the application of these technologies to *in-vivo* systems.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; biofilms; CRISPR/Cas9; joint prostheses.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE .....	iii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Infecciones asociadas a dispositivos médicos.....	1
2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
3. Biofilms.....	3
4. Herramienta CRISPR/Cas9.....	5
4.1 Sistema CRISPR .....	5
4.2. Sistema CRISPR/Cas9 .....	6
II. HIPÓTESIS .....	8
III. OBJETIVOS .....	9
3.1. Objetivo general.....	9
3.2. Objetivos específicos .....	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento .....	10
4.2. Obtención y purificación de los plásmidos. ....	12
4.3. Preparación de células competentes y transformación de cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	13
4.4. Eficiencia de la herramienta CRISPR/cas9 en la inactivación de cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	16
V. RESULTADOS.....	17
Obtención y purificación de los plásmidos .....	17
Transformación de cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	18
Eficiencia de la herramienta CRISPR/cas9.....	20
VI. DISCUSIÓN .....	22
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	25

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**Amp:** Ampicilina

**Ampr:** Resistencia a la Ampicilina

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNg o gRNA:** ARN guía

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNcr:** ARN corto de CRISPR

**tracrARN:** ARN Transcripto CRISPR

**C1:** plásmido control 1

**C2:** plásmido control 2

**Cat:** Cloranfenicol acetil-transferasa

**Catr:** Resistencia al cloranfenicol acetil-transferasa

**Cas9:** Proteína 9 a asociada a CRISPR

**CRISPR:** Repeticiones Palindrómicas  
Cortas Agrupadas Regularmente  
Interespaciada

**dNTPs:** deoxinucleótidos

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**EDTA:** Etilen Diamino Tetra Acético

**LB:** Luria – Bertani

**MGE:** Elemento Genético Móvil

**p1:** Plásmido 1

**p2:** Plásmido 2

**p3:** Plásmido 3

**pb:** pares de base

**PAM:** Motivo Adyacente  
Protoespaciador

**PCR:** Reacción en Cadena de la  
Polimerasa

**rpm:** Revoluciones Por Minuto

***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*

**TAE:** Tris Acetato EDTA

**TSA:** Agar soja tripticaseína

**TSB:** Caldo soja tripticaseína

**UFC:** Unidad formadora de colonia

**pmol:** picomoles

**h:** horas

**µl:** microlitro

**ml:** mililitro

**ng:** nanogramo

**µg:** microgramo

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. Infecciones asociadas a dispositivos médicos**

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias son infecciones que se contraen durante un ingreso hospitalario, las cuales no se habían manifestado ni estaban en período de incubación en el momento del ingreso del paciente (1). Usualmente este tipo de infecciones, suelen estar asociadas al debilitamiento del sistema inmune de la persona hospitalizada, al desequilibrio de la flora microbiana debido al uso de antibióticos, y en mayor medida por la realización de procedimientos invasivos como la colocación de dispositivos médicos (2). Las complicaciones de estas infecciones presentan un impacto muy elevado en los costes hospitalarios y en términos de mortalidad, son causantes de alrededor de 250.000 muertes anuales entre Europa y Estados Unidos (3).

Entre los dispositivos médicos invasivos, asociados con las infecciones nosocomiales, se encuentran los catéteres, tubos endotraqueales, ventiladores mecánicos y con una mayor frecuencia de infección, las válvulas y prótesis, destacando las prótesis articulares de cadera y de rodilla (4) (5).

Más del 60% de las infecciones asociadas a prótesis de cadera y rodilla, tienen como origen más frecuente la contaminación en el acto quirúrgico, a partir de la flora cutánea del propio paciente, del personal que interviene en la cirugía e inclusive del medio ambiente del quirófano. En menor proporción, estas infecciones se producen por contaminación previa del material protésico, en el post-operatorio inmediato y en algunos casos raramente, por vía hematológica o por infecciones quiescentes del hueso previas a la colocación del implante (6).

Trampuz y Zimmerli (7), plantean una clasificación para estas infecciones de tres categorías de acuerdo con la cronología del inicio de los síntomas. a) infección precoz, cuando se presenta antes de los 3 meses después de la operación; b) infección intermedia que se manifiesta de entre 3 a 24 meses después de la operación y c) infección tardía, la cual se manifiesta a partir de los 24 meses. Cabe resaltar que las infecciones precoces e intermedias suelen ocurrir durante la cirugía y son consideradas la causa más común de infecciones asociadas a artroplastias (8).

Se estima que las infecciones de artroplastias articulares, presentan una incidencia de entorno al 4%. En el año 2010 en Estados Unidos se realizaron más de 300.000 artroplastias de cadera y alrededor de 700.000 artroplastias de rodilla y se estima que para el año 2030

estas cifras aumenten llegándose a realizar alrededor de 3,5 millones de intervenciones (9).

En España, según la OECD en su informe del 2019, reporta que las cirugías de remplazos de cadera en 2017 fueron de 116 por cada 100.000 habitantes y 130 cirugías de remplazos de rodilla por cada 100.000 habitantes. Es decir, se colocaron más de 100.000 implantes, entre prótesis de cadera y rodilla, y se proyecta que estas vayan en ascenso, debido al aumento de la población del adulto mayor (10).

Estos cuadros infecciosos se caracterizan por ser procesos crónicos o recurrentes, que pueden conllevar desde un daño en la funcionabilidad y/o remoción de la prótesis de forma temporal o definitiva, e inclusive convertirse en cuadros sépticos potencialmente mortales en un 18% de los casos (11). Desde el punto de vista económico, según la OECD, estas intervenciones quirúrgicas, pueden llegar a representar un coste medio estimado de 5.700 euros para el remplazo de la prótesis de cadera y casi similar coste para el remplazo de la prótesis de rodilla, (12). Siendo el coste total asociado al tratamiento de la extracción de la prótesis y la terapia con antibióticos de más de 45.000 euros por paciente (13).

De forma general, las bacterias de la flora microbiana de la piel y mucosas como los estafilococos, principalmente *S. aureus* y las especies coagulasa negativas (ECN), son los agentes etiológicos más frecuentes en las infecciones asociadas a prótesis (14) (15). Según Holleyman *et al.* (16), un pequeño subconjunto de especies de *Staphylococcus* constituye la mayoría de los patógenos, siendo *S. aureus* y *S. epidermidis* los causantes de alrededor del 60% de las infecciones asociadas a implantes. Similares datos se reflejan en el estudio epidemiológico del Instituto Ortopédico Rizzoli, donde se logró aislar 1027 cepas bacterianas de 699 pacientes sometidos a cirugía de revisión de prótesis. El estudio muestra que el 75,5% de todos estos microorganismos fueron identificados dentro del género *Staphylococcus*, el 8% pertenecían a la familia Enterobacteriaceae, el 7,43% al género *Pseudomonas*, el 5,3% al género *Enterococcus* y el 1,9% al género *Streptococcus*. Donde cabe resaltar que *S. aureus* fue el causante del 40% de las infecciones asociadas a prótesis articulares de cadera y rodilla. (17).

## **2. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva, ubicua, no esporulada, ampliamente distribuida en el entorno y con una capacidad de adaptación a diferentes nichos, que le permite comportarse como comensal o patógeno. Se estima que el 20% de la población adulta



sana es portador de *S. aureus* en sus fosas nasales, y que hasta el 60% está colonizada de forma intermitente, pudiendo también estar presente en la piel, axilas, ingles, o el tracto intestinal (18) (19).

La presencia de *S. aureus* sobre estas superficies bióticas, no implica un problema para la salud, pero este se vuelve patógeno cuando atraviesa la barrera epitelial del huésped y logra acceder a los tejidos más profundos. A partir de ahí puede ocasionar diferentes infecciones, pudiendo ser estas leves, tales como infecciones dérmicas o convertirse en infecciones graves, comprometiendo gravemente la salud del huésped (20) (21). Entre estas complicaciones podemos mencionar la endocarditis, osteomielitis, neumonía, meningitis, sepsis y las infecciones asociadas con implantes médicos (22).

*S. aureus*, es considerado la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial, debido a sus características específicas de patogenicidad, como la expresión de proteínas de superficie, super antígenos, toxinas y la capacidad de formar biofilms (20) (23). Estos factores de virulencia hacen que *S. aureus* pueda colonizar fácilmente la superficie de materiales implantados, convirtiéndolo así, en el agente causal más frecuente de infecciones crónicas asociadas a dispositivos médicos, principalmente válvulas cardíacas y prótesis de cadera y rodilla (24).

### **3. Biofilms**

Los biofilms son comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie tanto de naturaleza biótica como abiótica embebidos en una matriz de naturaleza proteica y/o polisacáridica, que ellos mismos producen (25). En la formación del biofilm se distinguen 3 etapas; la primera es la adherencia primaria, en la que las bacterias se adhieren irreversiblemente a la superficie, la cual se ve favorecida por proteínas de superficie. La segunda etapa, constituye la proliferación celular en la que las bacterias se multiplican y forman grupos de células rodeadas de la matriz extracelular que las engloba. Y por último la etapa de dispersión, en la que algunas de las bacterias se liberan del biofilm para la colonización de nuevas superficies a través de la linfa y el torrente sanguíneo estableciendo infecciones secundarias (26) (27).

Esta forma de crecimiento constituye un ambiente favorable para las bacterias proporcionándoles ciertas ventajas en la colonización de nuevas superficies y supervivencia en condiciones hostiles (28). El biofilm establece una barrera física y química que protege a las bacterias del sistema inmune del hospedador (evita la

fagocitosis, la opsonización por complemento, dificulta la difusión de moléculas, frena la destrucción oxidativa y la acción de péptidos catiónicos) y a la acción del tratamiento antibiótico. (29). Además, las bacterias en el interior del biofilm presentan una menor tasa de crecimiento y un estado fisiológico latente que les hace ser menos susceptibles al tratamiento antibiótico (30).

Las últimas tecnologías aplicadas en el campo de los biomateriales están dirigidas a favorecer los procesos de oseointegración de los implantes médicos. Sin embargo, el cambio de su porosidad y adaptaciones de la microestructura de la superficie, no solo ayudan a la aposición del tejido óseo, sino que también pueden favorecer la adherencia bacteriana y su posterior formación de biofilm durante el proceso infeccioso, dando lugar a lo que se conoce como “carrera por la superficie” (31) (32).

Por otro lado, en los últimos años la aparición y propagación de cepas de *S. aureus* meticilin resistentes (MRSA) sea visto incrementada, lo cual dificulta aún más el tratamiento de este tipo de infecciones. La aparición de resistencias acompañada al rápido aumento del uso de estos dispositivos constituye un área de gran preocupación clínica, que muestra la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (33).

El desarrollo de nuevas herramientas que faciliten el tratamiento de este tipo de infecciones, se ha centrado en cada una de las etapas de formación del biofilm. Respecto de la adhesión primaria se ha estudiado la modificación de la superficie de los implantes de forma directa o con sustancias que pueden ser antiadherentes o antimicrobianas para evitar así el inicio del biofilm. Para contrarrestar la síntesis de los componentes de la matriz del biofilm y con ello impedir la formación la matriz extracelular, destacan las moléculas inhibidoras de sortasas, del quorum-sening y moléculas anti-amieloides. Por otra parte, una vez formado el biofilm los tratamientos están dirigidos a desestabilizarlo, haciendo uso de enzimas, agentes quelantes o dispersantes. Además, existen otros tratamientos que utilizan diferentes mecanismos de acción, como el uso de bacteriófagos, terapia fotodinámica y la inmunoterapia (34).

Pese al esfuerzo que conlleva el desarrollo y la implementación de todas estas medidas de prevención y tratamiento, no es suficiente para afrontar el gran problema que estas infecciones suponen en el ámbito hospitalario. En efecto, existe un enorme interés en el desarrollo de tratamientos alternativos o complementarios a los ya existentes. Es así que en la actualidad la inactivación genética, puede constituir un enfoque alternativo contra

las infecciones de *S. aureus*, siendo la edición génica mediada por el sistema CRISPR (acrónimo de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) la principal herramienta de ataque debido a su alta especificidad, eficiencia, asequibilidad y accesibilidad (35).

#### **4. Herramienta CRISPR/Cas9**

##### **4.1 Sistema CRISPR**

El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa adaptativa utilizado para degradar material genético de virus y plásmidos invasores en Archea y bacterias. En estos organismos, el material genético extraño es integrado en el loci CRISPR. Esta inmunidad adaptativa mediada por CRISPR, se desarrolla en tres etapas, una primera conocida como la etapa de adquisición, en la cual los fragmentos cortos del ácido nucleico extraño (protoespaciadores), se integran en el cromosoma del huésped, en un extremo de la matriz CRISPR. En la segunda etapa o de expresión, se da la transcripción de la matriz CRISPR y el procesamiento de los ARN CRISPR cortos (ARNcr) y por último la tercera etapa o de interferencia, donde las nucleasas dirigidas por el ARNcr realizan la escisión del ADN invasor (36) (37).

Los sistemas CRISPR-Cas son muy diversos, posiblemente gracias a la rápida evolución necesaria para dar respuesta a las presiones dinámicas selectivas que imponen los elementos genéticos móviles (MGE) invasores. La comparación genómica de los loci CRISPR revela que existen diferencias importantes en las secuencias repetidas CRISPR, en las secuencias del gen *cas* y en la arquitectura de los operones *cas* (37) (38). Basados en estas diferencias, se clasificaron los sistemas CRISPR-Cas en tres tipos principales y varios subtipos. El primer sistema, es el tipo I, el cual contienen la nucleasa-helicasa Cas3, los sistemas tipo II están definidos por la nucleasa Cas9 y los sistemas tipo III contienen la Cas10. (39) (40).

Para señalar y escindir el ácido nucleico invasor, los ARNcr y las proteínas Cas forman complejos de crRNP, cuya nomenclatura está definida por su composición. Los complejos de tipo I-A a tipo I-F crRNP se conocen como Cascade (complejo asociado CRISPR para defensa antiviral), mientras que todos los crRNP en sistemas tipo II (es decir, sistemas tipo II-A, tipo II-B y tipo II-C) son conocidos como complejos Cas9. Por otra parte, los complejos crRNP tipo III-A se conocen como complejos Csm y los sistemas de tipo III-B complejo Cmr (40) (41).

Los sistemas CRISPR-Cas tipo I y tipo III parecen estar relacionados tanto bioquímica como estructuralmente y esto da lugar a un mecanismo de actuación relativamente similar, presente en Archeas y bacterias. Por otro lado, los sistemas tipo II son filogenéticamente distintos, están restringidos a bacterias y parecen haber desarrollado un mecanismo de actuación frente a elementos portadores de material genético que sigue los mismos pasos ya descritos (adquisición, expresión e interferencia) pero de forma sustancialmente distinta a los tipos I y III, ya que requiere de una molécula de RNA transactivador (tracrRNA) (36).

#### **4.2. Sistema CRISPR/Cas9**

El sistema CRISPR/Cas9 o tipo II, es hasta ahora uno de los más estudiados, ya que es el más empleado en ingeniería genética debido a la alta tasa de eficiencia de la enzima Cas9, lo que ha llevado a una mejor comprensión de sus componentes y organización estructural. Cas9 es una enzima que presenta una estructura bilobular, posee un lóbulo de reconocimiento (REC) y un lóbulo de actividad nucleasa (NUC). El lóbulo REC presenta 3 dominios: el dominio mayor RECI, esencial para la unión con el ARNg, el dominio de la gran hélice (*Brige Helix*), esencial en la iniciación del corte del ADN y el dominio menor RECII, cuya función es desconocida. Por otro lado, el lóbulo NUC se divide en tres dominios, el dominio PI (*PAM Interacting*), localizado en la región C-terminal y encargado de reconocer a la secuencia PAM del ADN diana en la hebra no complementaria al ARNg. Y los dominios RuvC y HNH los cuales presentan actividad nucleasa, donde HNH escinde la hebra complementaria al ARNg, mientras que dominio RuvC, escinde la hebra no complementaria. (36) (42).

En este sistema, se requiere adicionalmente un segundo ARN no codificante, llamado tracrARN, el cual es complementario a la secuencia palindrómica repetida. Una vez que finaliza la transcripción del loci CRISPR, el tracrARN forma un dímero (ARNcr/tracrARN), el cual es reconocido por RNasa III y procesado para generar un transcrito maduro de aproximadamente 40 nucleótidos y un asa de doble cadena en la región 3' de 20 nucleótidos, denominado ARN guía (ARNg). Así la asociación de la nucleasa Cas9 con el ARNg, permite un cambio en su conformación generando el complejo CRISPR/Cas9, el cual está dirigido por el ARNcr hacia su ADN diana por medio del reconocimiento de la secuencia complementaria y el motivo adyacente protoespaciador "PAM" (secuencia 5'-NGG) induciendo así el desenrollamiento del ADN. En el momento en que la enzima Cas9 se une a un PAM, la hélice puente dentro del lóbulo

REC crea un heterodúplex de ARN-ADN, con el ADN diana. El reconocimiento del sitio PAM activa los dominios HNH y RuvC, y genera cada uno un corte en una hebra distinta, por lo que el proceso se conoce como double strand break “DSB” (42)(43).

Por último, la reparación de estos cortes, se puede dar de dos formas: no homóloga (NHEJ), la cual resulta imprecisa, debido a que puede incorporar la misma cantidad de nucleótidos que se cortaron o generar un cambio en el marco de lectura con inserciones o deleciones. Mientras que la forma homóloga (HDR), permite incluir un ADN molde con un alto porcentaje de homología en sus extremos 5' y 3' permitiendo insertar, de esta forma, una secuencia específica (44) (45).

Hoy en día una de las proteínas Cas9 más estudiada, es la de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), la cual presenta los cuatro genes cas (*cas9*, *cas1*, *cas2* y *csn2*) necesarios para la adquisición de espaciadores. Este sistema se ha adaptado tanto para la edición del genoma guiada por ARN como para la regulación génica en una gran variedad de organismos (46).

Es debido a las características del sistema CRISPR/Cas9 y sus actividades como endonucleasa y capacidad de reconocimiento de secuencias específicas, las cuales han permitido que esta herramienta sea de gran utilidad en ingeniería genética, tanto para la activación y represión de genes, como para generar mutaciones puntuales y cambiar secuencias mediante recombinación homóloga (47) (48).

En este contexto y aprovechando las virtudes de esta herramienta, números estudios se han enfocado en la edición génica bacteriana, Gu *et al.* (49), diseñó un modelo altamente eficiente de edición en *S. aureus* utilizando una citidina desaminasa guiada por un ARN/CRISPR. Dada la gran variabilidad de las cepas circulantes de *S. aureus*, algunos trabajos se han centrado en el entendimiento de los mecanismos básicos del sistema CRISPR/Cas9 y el análisis de las características de loci CRISPR identificados en cepas circulantes *S. aureus* (50). Otros estudios se han centrado en la inactivación o silenciamiento de genes implicados en la adhesión primaria de *S. aureus*, como la proteína de adherencia extracelular (Eap), la proteína de unión al fibrinógeno extracelular (Efb), la proteína de unión a la matriz extracelular (Emp) y la proteína de unión al factor von Willebrand (vWbp) (51). Además, se han evaluado factores que intervienen como represores de la formación de biofilm como SarZ y CodY (52) o la inactivación de diferentes grupos de toxinas, como forma potencial de terapia anti-virulencia (53).

## II. HIPÓTESIS

Dada la necesidad de búsqueda de alternativas al tratamiento antibiótico convencional contra las infecciones de *Staphylococcus aureus* asociadas a prótesis articulares, nos planteamos la utilización de la herramienta CRISPR/Cas9 como posible estrategia de acción. Previo a este trabajo se construyeron en el laboratorio de Patogénesis Microbiana tres plásmidos, cada uno de ellos conteniendo el sistema CRISPR/Cas9 frente a tres dianas específicas y muy conservadas dentro del genoma de *S. aureus*.

En el trabajo anterior y utilizando como base el plásmido pCN38 se clono el gen *cas9* de *Streptococcus piogenes* que codifica para la enzima Cas9 bajo el promotor pTetR inducible por anhidrotetraciclina, y la secuencia de tres ARNs guías diferentes bajo el control del promotor constitutivo pSP01. La expresión de este sistema debería producir una ruptura bicatenaria en el genoma del huésped y desencadenar la muerte celular. Para estudiar esta herramienta sobre cepas clínicas asociadas a infecciones de prótesis articulares, primero se evaluaría la eficiencia en la transformación de 12 cepas de una colección de aislados cedidos por el departamento de biomateriales de la Universidad de Gotenburgo con el plásmido control C1. Una vez seleccionadas las cepas transformables en el laboratorio, se procedería a estudiar la eficiencia de la inactivación de la herramienta contenida en los plásmidos p1, p2 y p3 comparándola con el plásmido C2 que carece de la secuencia del ARNg y no es capaz de guiar a la proteína Cas9 hasta el sitio de corte cromosómico.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar la eficacia de inactivación de cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones de prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Obtención y purificación de los plásmidos de estudio a partir del mismo fondo genético (*Escherichia coli* IM01B)
- Preparación de células competentes de las cepas clínicas de *S. aureus* en estudio.
- Evaluar la eficacia de la transformación de las cepas clínicas *S. aureus*.
- Evaluar la eficacia de la herramienta CRISPR/Cas9 en la inactivación de las cepas clínicas de *S. aureus*.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Fueron seleccionadas 12 cepas de *Staphylococcus aureus*, de una colección de aislados clínicos cedidos por el Departamento de Biomateriales de la Universidad de Gotenburgo (Suecia). Esta colección reúne diferentes cepas aisladas de infecciones asociadas a prótesis articulares de rodilla y cadera de pacientes en los que tras una artroplastia articular sufrieron complicaciones postoperatorias (Tabla 1). Gran parte de estos aislados fueron secuenciados por el Laboratorio de Patogénesis Microbiana permitiendo la selección de las cepas de trabajo atendiendo a su pertenencia a diferentes complejos clonales y su sensibilidad al antibiótico cloranfenicol, necesario para la selección plasmídica objeto del estudio. Para la propagación de los plásmidos de estudio se utilizó la cepa *Escherichia coli* (IM01B).

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en el estudio

Cepas	Características y genes de resistencia	Complejo clonal	MIC*	
<i>Staphylococcus aureus</i>				
1	blaZ-like,norA-like	CC-22	6920	
2	blaZ,norA-like	CC-30	6921	
3	Aislamiento clínico - infección asociada a prótesis de cadera	blaZ,norA-like	CC-45	6922
4	blaZ-like,norA-like	CC-5	6927	
5	dfrG,norA-like	CC-15	6935	
6	norA-like	CC-8	6947	
7	blaZ,norA-like	CC-8	7002	
8	norA	CC-45	7004	
9	Aislamiento clínico – infección asociada a prótesis de rodilla	blaZ-like,erm(C),mecA,norA-like	CC-5	7009
10	blaZ-like,norA-like	CC-30	7014	
11	blaZ-like,norA-like	CC-NN**	7018	
12	blaZ,norA-like	CC-15	7026	
<i>Escherichia coli</i>				
IM01B	<i>mcrAA(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697galU</i> <i>galK rpsL endA1 nupG Δdem</i> <i>ΩPhelp-hsdMS (CC1-2)</i> <i>ΩPN25-hsdS (CC1-1)</i>	(56).		

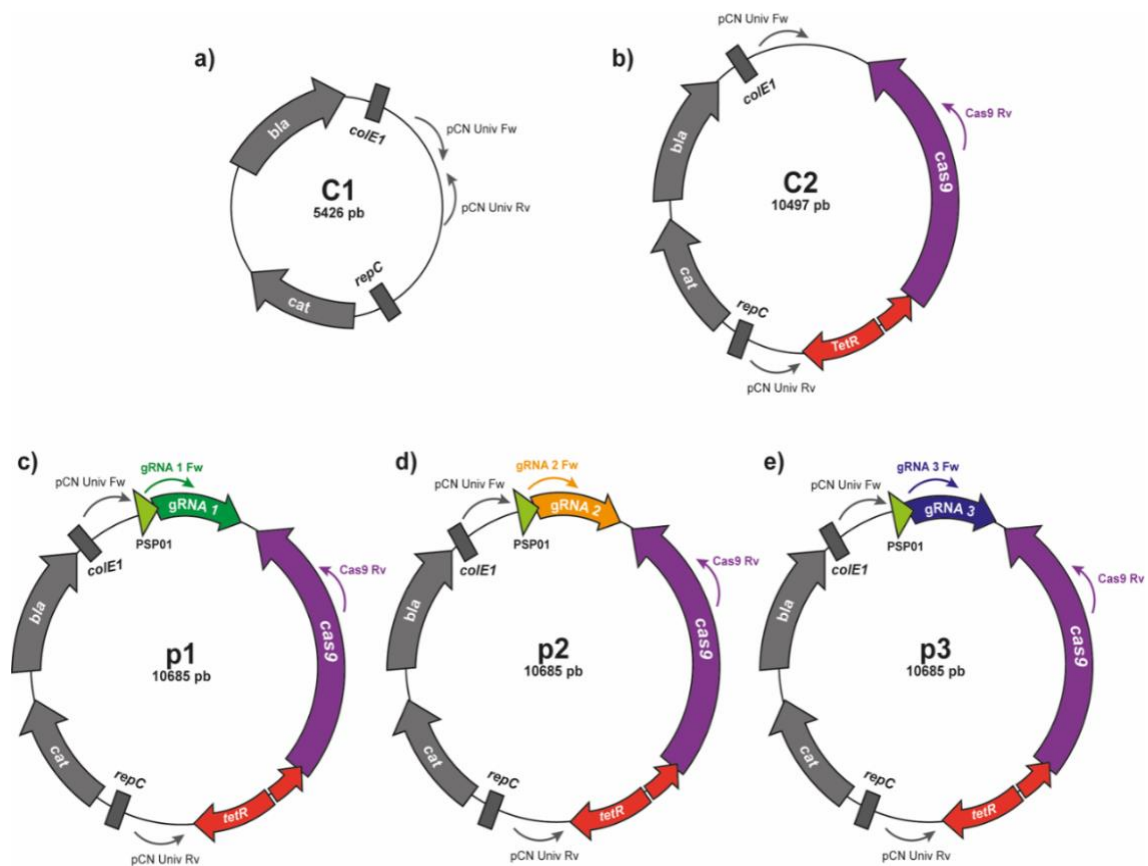
\*Referencia Laboratorio de Patogénesis Microbiana – NavarraBiomed.

\*\*no se tiene la información de Complejo clonal al que pertenece

Los cuatro plásmidos del estudio se generaron previamente en el laboratorio de Patogénesis Microbiana de Navarrabiomed durante la elaboración de la Tesis Doctoral de Pedro Luis Dorado Morales (Figura 1). Estos plásmidos fueron generados a partir del plásmido pCN38 (C1). El plásmido pCN38 contiene dos orígenes de replicación, el origen de replicación pT181 *cop-wt repC* para *Staphylococcus aureus*, y el origen de replicación ColE1 para *Escheria coli*, así como dos genes de resistencia antibiótica ampicilina (*amp*) y cloranfenicol (*catI94*) para su selección en *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.



Los otros 4 plásmidos (C2, p1, p2 y p3), llevan clonado el gen *cas9* de *Streptococcus piogenes* que codifica para la enzima Cas9 del sistema CRISPR/Cas9 bajo el promotor pTetR inducible por anhidrotetraciclina (54). Dado que previamente en el laboratorio se ha visto que este promotor inducible, tiene un escape en la expresión, es decir que, en ausencia del inductor, el promotor presenta niveles de expresiones basales, probaremos primero la expresión de la proteína Cas9 en ausencia del inductor. Los plásmidos p1, p2 y p3 contienen además la secuencia de tres ARNs guías diferentes bajo el control del promotor constitutivo pSP01 (55). Estos ARNs guías fueron diseñados frente a dianas específicas y muy conservadas del genoma de *S. aureus*.



**Figura 1. Dibujo esquemático de los plásmidos de estudio.** (a) pCN38 (C1), 5426 pb. Plásmido base a partir del cual se generan los plásmidos C2, p1, p2 y p3. Presenta un origen de replicación *pT181 cop-wt repC* para *S. aureus*, y el origen de replicación *ColE1* para *E. coli*, así como dos genes de resistencia antibiótica ampicilina (*bla*) y cloranfenicol (*cat*), componentes también presentes, en los otros cuatro plásmidos del estudio. (b) Plásmido C2 de 10497 pb. Lleva clonado el gen *cas9* de *S. piogenes*, bajo el promotor pTetR inducible por anhidrotetraciclina. Los plásmidos p1 (c), p2 (d) y p3 (e) de 10685 pb, además del gen *cas9*, contienen la secuencia de un ARN guía (p1, el p2 y p3) bajo el control del promotor constitutivo pSP01. También se muestran los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados en la PCR de comprobación (pCN Univ Fw, gRNA1 Fw, gRNA2 Fw, gRNA3 Fw, pCN Univ Rv y Cas9Rv).

Los medios de cultivos y las condiciones empleadas para cultivar las cepas, se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Medios y condiciones de cultivo

Cepa	Medio de cultivo	Antibiótico	Condiciones
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo B2	-	37°C, 250 rpm, hasta alcanzar una OD 0.5 a 600 mn.
	SMMP	-	37°C, 250 rpm, 3 h
	TSA	Cloranfenicol (20 µg/ml)	37°C, 24h
<i>Escherichia coli</i> IM01B	Caldo LB	Ampicilina (100 µg/ml)	37°C, 250 rpm, 16 h

#### 4.2. Obtención y purificación de los plásmidos.

*Escherichia coli* IM01B, es una cepa manipulada en laboratorio, que se caracteriza por imitar los perfiles de metilación de adenina tipo I de diferentes complejos clonales de *S. aureus*, gracias a ello permite la transformación directa con alta eficiencia de los principales linajes de *S. aureus* (56).

Con la finalidad de obtener todos los plásmidos de un mismo fondo genético, se transformó por electroporación *E. coli* IM01B (con cada uno de los plásmidos a evaluar), utilizando el electroporador Gene pulser X-Cell (Bio Rad) (200Ω, 25µF y 1250 V). Posteriormente se cultivaron en Agar Luria-Bertani “LB” (Pronadisa), suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C.

De las *E. coli* transformadas, se creció un preinóculo en 5ml de caldo LB-Amp (100 µg/ml), a 37 °C y 250 rpm durante 16 h. Tras el crecimiento del preinóculo se realizó una dilución (1:100) en 150 ml de caldo LB-Amp (100 µg/ml) y se cultivó bajo las condiciones antes mencionadas, con la finalidad de obtener un mayor volumen de cultivo.

Este inóculo (150 ml), se centrifugó a 4000 rpm para recuperar el pellet bacteriano. A partir del cual se realizó una extracción de ADN plasmídico utilizando GenElute™ High Performance Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich).

Los plásmidos productos de las extracciones fueron cuantificados mediante espectrofotometría a una OD 260 nm. Como control de la extracción se realizó una PCR convencional utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los plásmidos del estudio (Tabla 3). Como control de esta PCR (p1\*), se añadió una reacción con los oligonucleótidos pCN Univ Fw y Cas9 Rv, utilizando como ADN molde el plásmido p1 (Fig. 1).

**Tabla 3.** Características de la PCR de comprobación.

<b>ADN molde- Plásmido</b>	<b>C1</b>	<b>p1*</b>	<b>C2</b>	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>
<b>Oligonucleótido Fw</b>	pCN Univ	pCN Univ	pCN Univ	gRNA 1	gRNA 2	gRNA 3
<b>Oligonucleótido Rv</b>	pCN Univ	Cas9	Cas9	Cas9	Cas9	Cas9
<b>Producto PCR (pb)</b>	254	950	750	750	750	750

p1\* Control positivo de la PCR.

Para la PCR, se utilizó una concentración de 25 ng/reacción de los diferentes plásmidos como ADN molde, y la enzima “DreamTaq DNA Polymerase” (Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización, 3 min a 95°C.
2. Desnaturalización, 30 s a 95°C.
3. Hibridación, 30 s a 56°C.
4. Elongación, 1 min a 72°C, (del paso 2 al 4 se repite 29 veces).
5. Elongación final, 5 min a 72°C.

Los productos de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) en tampón TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8.0) y Midori Green Advance, a un voltaje constante de 120V. Las bandas de ADN se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Chemi Doc de Bio-Rad).

#### **4.3. Preparación de células competentes y transformación de cepas clínicas de *S.***

##### ***aureus***

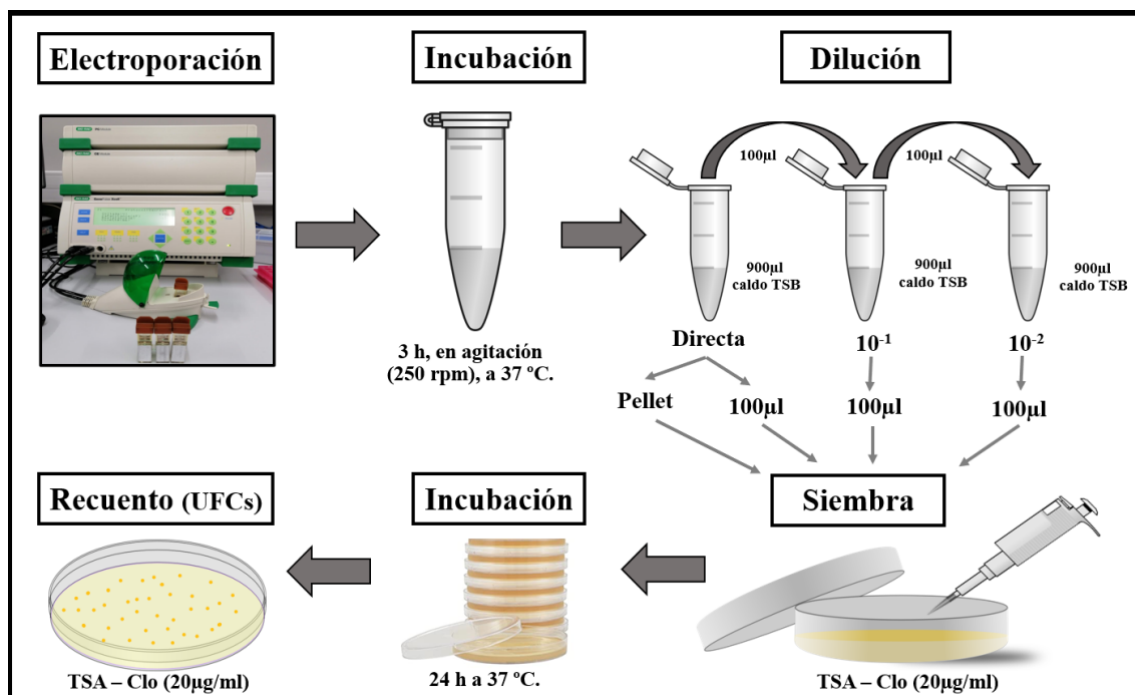
Para generar las células electro-competentes de *S. aureus*, a partir de las cepas clínicas, se siguió el protocolo descrito por Lee (57), para el cual se creció un preinóculo en 5 ml de medio B2, agitación (250 rpm) y a 37 °C overnight (16 h). A partir de este se realizó una dilución (1:125) en 250 ml de medio B2 y se incubó a 37 °C y 250 rpm, hasta alcanzar una OD de 0.5 a 600nm (58).

Una vez alcanzada la OD de 0,5, se dejó enfriar en hielo durante 15 min cada uno de los cultivos. Posteriormente el total del cultivo repartido en 5 tubos cónicos estériles de 50 ml, se centrifugo a 4000 rpm durante 5 min a 4°C. Tras la centrifugación, el pellet de células se lavó 3 veces con 50ml agua estéril a 4 °C y centrifugo a 4000 rpm durante 5 min a 4°C (en cada lavado se juntaron los pellets, hasta concéntralos en un solo tubo cónico). Posteriormente, se realizaron dos lavados con 30ml y 15ml de glicerol al 10%, se incubó a 20 °C durante 15 min y tras una última centrifugación el pellet bacteriano se

resuspendió con los restos de glicerol del falcón para ser fraccionado en alícuotas de 50  $\mu$ l para su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para la electroporación se descongelaron las alícuotas de células a transformar a temperatura ambiente y se añadió 2  $\mu$ g de ADN plasmídico de cada uno de los plásmidos a evaluar. Tras la incubación de las células con cada uno de los plásmidos durante 30 min a temperatura ambiente, se procedió a la electroporación (100 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 1250 V) y resuspensión las células transformadas en 950  $\mu$ l de SMMP para su incubación durante 3 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm.

Trascurrida la incubación se sembró en TSA suplementado con cloranfenicol (20  $\mu$ g/ml), para la selección de transformantes. Para asegurar el recuento se sembraron 100  $\mu$ l directamente del cultivo, el pellet de este y 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , obteniéndose un total de 4 placas por cada plásmido a evaluar y cepa. Estas placas se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  para el recuento de las UFCs (Fig. 2).



**Figura 2.** Diagrama de la transformación de las cepas clínicas del estudio.

### c) Eficiencia de transformación:

El plásmido pCN38 (C1), se utilizó como control de la transformación de las cepas clínicas de *S. aureus*, ya que se desconocía, si estos aislados, tenían la capacidad de ser transformables (aceptar el plásmido y expresar su información). Una vez probada la

capacidad de transformación de las cepas con este plásmido, se procedió a transformar solo los aislados transformables, con los demás plásmidos del estudio.

Para determinar la eficiencia de la transformación (UFC)/ $\mu\text{g}$  de ADN, de cada una de las cepas de *S. aureus*, con cada uno plásmidos a evaluar, primero se calculó el número total de UFCs transformadas, basados en la siguiente formula:

$$\text{UFC transformadas} = n^{\circ} \text{ de UFCs} \times \text{F. Dil.} \times \frac{\text{Vol. T}}{\text{Vol. S}}$$

Donde:

**F. Dil.** = Factor de dilución

**Vol. T.** = Volumen total transformado (1000  $\mu\text{l}$ )

**Vol. S.** = Volumen sembrado (100  $\mu\text{l}$ )

Una vez obtenido el número total UFCs transformadas, se calculó la “Eficiencia de la Transformación/ $\mu\text{g}$  de ADN”, basado en la cantidad de ADN plasmídico utilizado para la transformación (2  $\mu\text{g}$ ).

$$\text{Eficiencia de Trasnformación } / \mu\text{g ADN} = \frac{\text{UFC transformadas}}{2 \mu\text{gADN}}$$

Dada la diferencia del tamaño (pb) de los plásmidos a evaluar, se vio necesario determinar la eficiencia de la transformación respecto del número de Pico Moles (pmol) de cada uno de los plásmidos, para ello se utilizó el “Calculator and Converters” de la página en línea del GENE INFINITY (59).

Esta herramienta convierte microgramos de ADN en picomoles de ADN de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{pmol de ADN} = \text{ADN } \mu\text{g} \times \frac{\text{pmol}}{660\text{pg}} \times \frac{10^6}{1\mu\text{g}} \times \frac{1}{\text{N}}$$

Donde:

**N** = Longitud del ADN en pb.

Entonces se calculó la “Eficiencia de la Transformación UFCs/pmol de ADN” en cada una de las cepas clínicas de *S. aureus*, por cada plásmido a evaluar, partiendo del cálculo del número total de UFCs transformadas.

#### **4.4. Eficiencia de la herramienta CRISPR/cas9 en la inactivación de cepas clínicas de *S. aureus*.**

Para evaluar la eficiencia de la inactivación de *S. aureus*, mediada por la herramienta CRISPR/Cas9 incluida en los plásmidos p1, p2 y p3, se utilizó como control de la eficiencia de transformación del sistema CRISPR/Cas9, el plásmido C2. Este plásmido carece de la secuencia de ARN guía y como consecuencia no puede guiar a la proteína Cas9 hasta el sitio de corte en el genoma de *S. aureus*. De esta manera, las cepas clínicas transformadas con el plásmido C2 continúan viables y expresan la resistencia *cat* contenida en el plásmido. Por ello para el cálculo de la eficiencia de la inactivación del sistema se compararon los valores de UFCs/ pmol ADN obtenidos mediante el recuento poblacional con el C2 y los valores de UFCs/ pmol ADN obtenidos con los plásmidos p1, p2 y p3 expresados como porcentaje.

$$\% \text{ Eficiencia de la herramienta CRISPR/Cas9} = \frac{\text{UFCs transformadas (p1, p2 y p3)}}{\text{UFCs transformadas C2}} \times 100$$

Donde:

% Eficiencia de la herramienta CRISPR/Cas9 para cada cepa y plásmido

UFCs obtenidas de la transformación con el plásmido C2

UFCs obtenidas de la transformación con los plásmidos p1, p2 o p3

## V. RESULTADOS

### Obtención y purificación de los plásmidos

Producto de la transformación de *E. coli* (IM01B), con los plásmidos en estudio, su posterior cultivo, extracción y cuantificación de ADN plasmídico por espectrofotometría, se obtuvieron los valores presentados en la tabla 4.

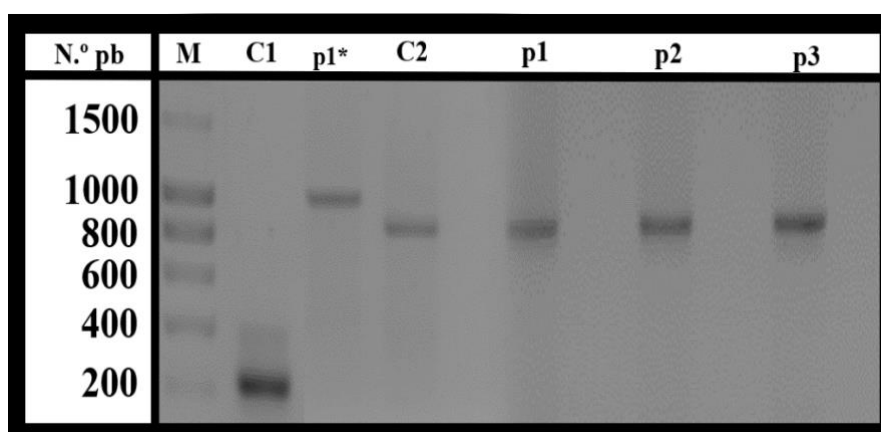
La concentración de ADN (ng/ $\mu$ l) obtenida en la extracción plasmídica, del plásmido C1, fue menor en relación a los demás plásmidos en estudio. Sin embargo, este presenta un mayor número de pmol de ADN por cada 2  $\mu$ g (utilizados para transformar las cepas clínicas), debido al menor tamaño de este (5426 pb), en relación al C2 (10497 pb) y los plásmidos p1, p2 y p3 (10685 pb).

**Tabla 4.** Concentración plasmídica tras la purificación

Plásmido	Concentración (ng/ $\mu$ l)	pico Moles de ADN (pmol) *
C1	220	5,576
C2	319	2,887
p1	310,6	2,836
p2	405,9	2,836
p3	372	2,836

\*Por cada 2  $\mu$ g de ADN

El producto de la PCR, su posterior electroforesis y fotografiado de las bandas, permitió comprobar la correcta extracción plasmídica. El tamaño de los productos de la PCR se correspondió con el esperado (Tabla 4). Siendo el de mayor tamaño, el amplicón del control de la PCR p1\* de 950 pb, seguido de los amplicones del C2 y de los plásmidos p1, p2 y p3 con tamaños de 750 pb y de menor tamaño el del C1 de 254 pb (Figura 3).

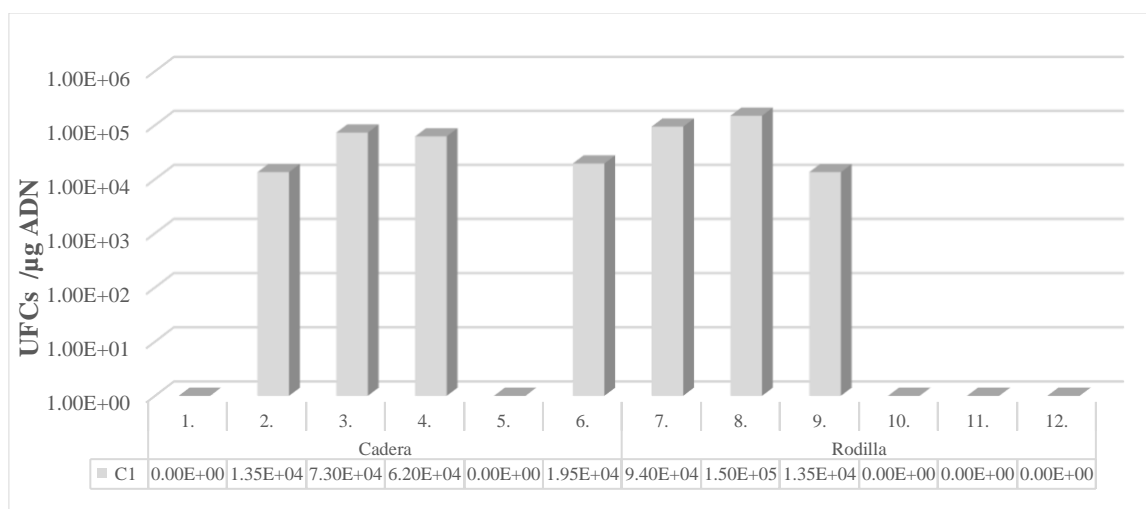


**Figura 3.** Electroforesis de los productos de la PCR realizada a los plásmidos en estudio. M) marcador de peso molecular Hiperladder I (pb), p1\*) control de la PCR



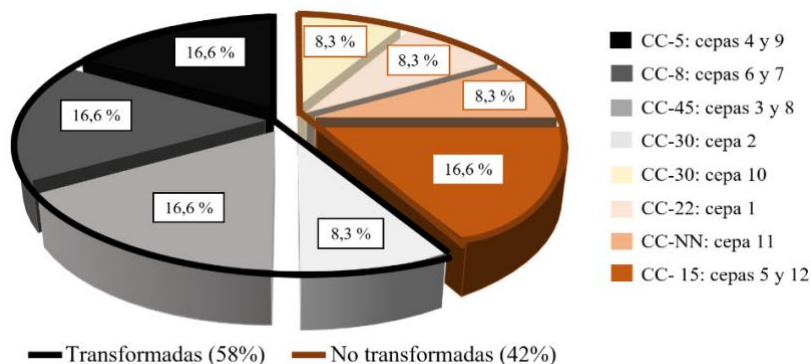
### Transformación de cepas clínicas de *S. aureus*

A partir de las células competentes obtenidas de las cepas clínicas de *S. aureus* y su posterior transformación con el plásmido C1, se puede observar que los mayores valores de “UFC/μg ADN” los presentaron las cepas 8 y 7, ambas procedentes de infecciones asociadas a prótesis de cadera, seguidas de las cepas 3 y 4 aisladas de infecciones asociadas a prótesis de rodilla. En cuanto a las cepas 2, 6 y 9 se observaron valores ligeramente más bajos pero muy similares entre sí, sin embargo, en las cepas 1, 5, 10, 11 y 12 no se logró obtener transformantes (Fig. 4).



**Figura 4. Eficiencia de la transformación.** Cepas clínicas de *S. aureus*, transformadas con el plásmido C1

Es decir, se observó que 7 (58%) de las 12 cepas clínicas de *S. aureus*, sometidas a transformación con plásmido C1, fueron transformables, mientras que en 5 cepas (42%), no se logró obtener transformantes (Figura 5). Dentro las cepas transformables se encuentran las cepas 4 y 9 del CC-5, las cepas 6 y 7 del CC-8, las cepas 3 y 8 del CC-45 y la cepa 2 del CC-30. Por el contrario, la cepa 10 del mismo CC-30, no se logró transformar, al igual que las cepas 5 y 12 del CC-15, la cepa 1 del CC-22, y la cepa 11 de la cual se desconoce el complejo clonal (CC- NN).

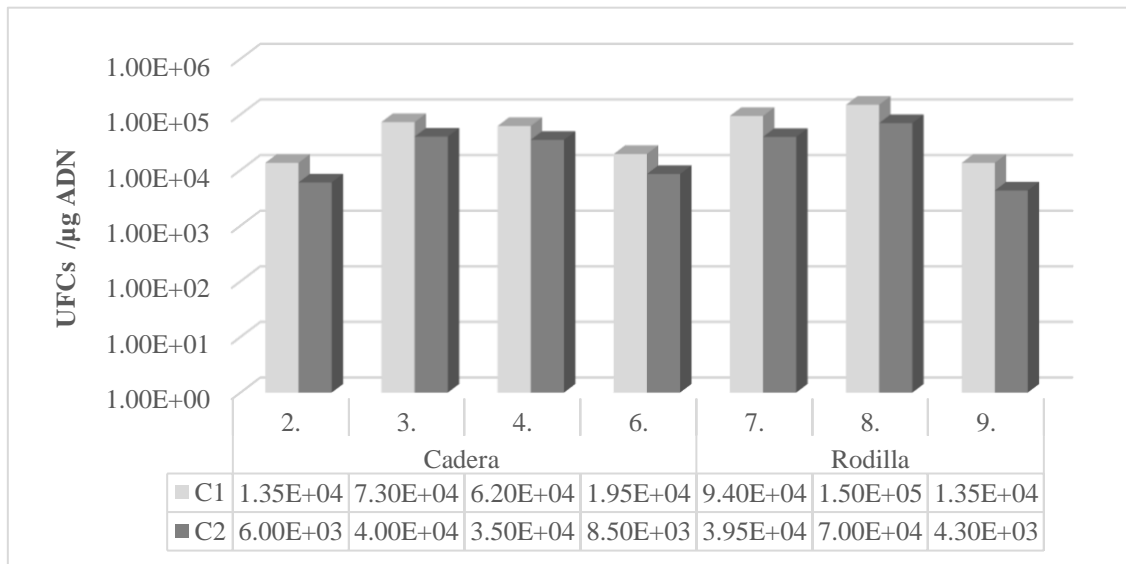


**Figura 5. Porcentaje de las cepas transformadas con el plásmido C1**



Por consiguiente, la transformación con el plásmido C2, plásmidos p1, p2 y p3, solo se realizó sobre las cepas en las cuales se obtuvieron transformantes con éxito para el C1, debido a que al no aceptar las cepas de *S. aureus* 1, 5, 10, 11 y 12 la transformación con plásmido C1, las excluye de la posible evaluación de la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9.

Posteriormente se decidió evaluar si los dos plásmidos control C1 y C2 presentaban valores similares en la eficiencia de la transformación, para comprobar que la proteína Cas9 por sí sola no causa un detrimento en la eficiencia de la transformación. Esta comparativa nos permitió observar que los valores de las “UFCs/μg de ADN” obtenidos con el C1, en relación al C2, reflejan una mayor eficiencia de transformación sobre las cepas de *S. aureus*. (Fig. 6).



**Figura 6. Eficiencia de la transformación en UFCs /μg ADN para los plásmidos C1 y C2**

Debido a que el plásmido C1 es de menor tamaño que los plásmidos C2, p1, p2 y p3, el número de pmol de ADN disponibles en los 2 μg de ADN utilizados para transformar las cepas de *S. aureus*, es diferente. Decidimos, por tanto, comparar la eficiencia de la transformación teniendo en cuenta en nº de pmoles de ADN transformados (Fig.7). En este caso los resultados mostraron, que ambos controles presentan valores de eficiencia en la transformación prácticamente iguales y por tanto valida el uso del plásmido C2 como control de la transformación en el ensayo de la inactivación con el sistema CRISPR/Cas9 descrito a continuación.

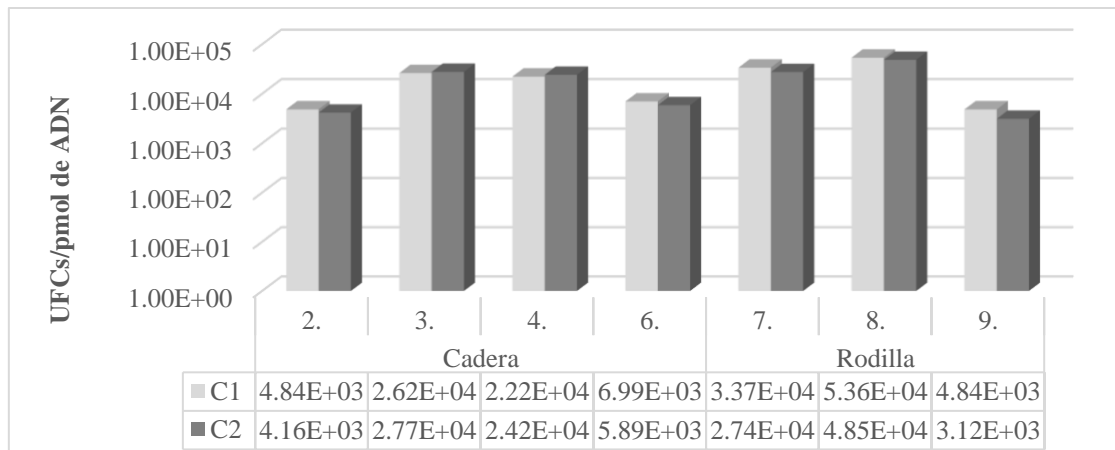


Figura 7. Eficiencia de la transformación en UFCs/pmol de ADN, para los plásmidos C1y C2

### Eficiencia de la herramienta CRISPR/cas9

El análisis de la eficiencia de la inactivación de *S. aureus*, mediada por el sistema CRISPR/Cas9 incluido en los plásmidos p1, p2 y p3, en comparación con los valores de UFCs obtenidos mediante el recuento poblacional con el C2, muestra la gran eficiencia del sistema. La transformación con los plásmidos p1, p2 y p3 no dio lugar a ninguna colonia en el recuento de las UFC, ni siquiera en la placa donde se siembra directamente el pellet del cultivo. Sin embargo, la transformación con el plásmido C2 muestra eficiencias en torno a  $1 \times 10^4$  UFCs/pmol en todas las cepas. Esto sugiere que los tres ARNs guías diseñados frente a las dianas cromosómicas de *S. aureus* son capaces de reconocer de manera específica su secuencia diana en todas las cepas clínicas testadas. Por otra parte, demuestra que los niveles de expresión de la enzima Cas9 bajo el promotor inducible pTetR, en ausencia del inductor, son suficientes para generar el corte cromosómico y por consiguiente la muerte bacteriana (Fig. 8).

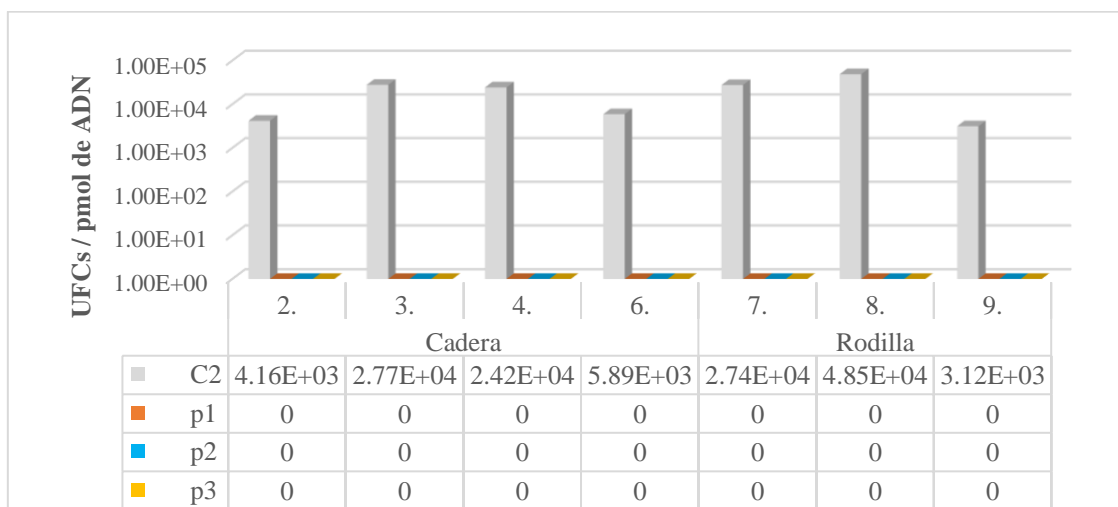


Figura 8. Eficiencia de la transformación en UFCs/pmol de ADN, para el plásmido C2, en relación a los plásmidos p1, p2 y p3.

Realizando entonces el análisis del porcentaje de eficiencia en la de inactivación de las cepas 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 de *S. aureus*, mediante la herramienta CRISPR/Cas9, incluidas en los plásmidos 1, 2 y 3, se muestra una eficiencia del 100% del sistema. Es decir que la transformación de las cepas clínicas de *S. aureus*, con plásmidos 1, 2 y 3 y la expresión de la información contenida en estos, actuaron sobre dianas específicas en el ADN cromosómico bacteriano, generaron un daño y desencadenaron la muerte celular de células transformadas, no observándose su desarrollo en el medio de cultivo empleado.

## VI. DISCUSIÓN

La gran ubicuidad y su capacidad para formar biofilms son las características que hacen que *Staphylococcus aureus* y los *Staphylococcus* coagulasa negativo, sean responsables de alrededor del 60% de las infecciones de prótesis de cadera y rodilla (16). Teniendo en cuenta este escenario y sumado a la creciente aparición de resistencias antibióticas hace que el tratamiento antibiótico sistémico resulte ineficaz en este tipo de infecciones, convirtiéndose la búsqueda de tratamientos alternativos y/o complementarios al uso clásico de los antibióticos, una necesidad cada vez es más evidente (6) (60). Es por ello que en la actualidad la inactivación genética, se ha convertido en el enfoque central y alternativo contra las infecciones de *S. aureus*, siendo la edición génica mediada por el sistema CRISPR/Cas9, la principal herramienta de ataque debido a su alta especificidad y eficiencia (42). Con este motivo, se planteó como objetivo del trabajo evaluar la eficiencia en la inactivación de cepas de *S. aureus* procedentes de infecciones de prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9 contenida en tres plásmidos (previamente construidos en el laboratorio). La expresión del sistema CRISPR/Cas9 diseñada frente a tres dianas específicas y altamente conservadas en el cromosoma de *S. aureus* debería producir una ruptura bicatenaria en el genoma del huésped y desencadenar la muerte celular.

Debido a que se desconocía, si estas cepas clínicas, tenían la capacidad de ser transformables, se plantearon las siguientes interrogantes, ¿se pueden transformar las cepas clínicas de *S. aureus* aisladas a partir de infecciones de prótesis de cadera y rodilla? y ¿cuál será la eficiencia de estas transformaciones? En primer lugar, se tuvo que solucionar uno de los principales problemas que se tiene en el momento de la manipulación genética bacteriana, que son los sistemas de restricción (RM), que actúan como barrera para la entrada de ADN exógeno. Estos sistemas previenen la infección por bacteriófagos, dificultan la transferencia de plásmidos conjugativos y restringen la absorción natural de ADN mediante mecanismos de competencia. En el caso de que el ADN logre introducirse y no presente los perfiles de metilación específicos de huésped, es degradado (61) (62) (63).

Monck *et al.* (56) desarrolló diferentes cepas de *E. coli* que actúan como huéspedes de clonaje específicos para diferentes complejos clonales (CC) de *S. aureus*, denominadas IMXXB donde XX corresponde al complejo clonal. Estas cepas expresan de manera estable genes de restricción de tipo I específicos de cada CC en el cromosoma de *E. coli*

DC10B con la finalidad de simplificar y mejorar la manipulación de cepas de *S. aureus* clínicamente relevantes (56). Teniendo en cuenta estas características, en este estudio se obtuvieron los 5 plásmidos a analizar a partir de la cepa *E. coli* IM01B, la cual es una cepa generada en el laboratorio, caracterizada por imitar los perfiles de metilación de adenina tipo I de diferentes los complejos clonales de *S. aureus*. Gracias a ello, esta cepa permite la transformación directa con alta eficiencia y la manipulación genética simplificada de los principales linajes de *S. aureus* (61).

Una vez obtenidos los plásmidos a partir del mismo fondo genético, se pasó a transformar las cepas clínicas de *S. aureus*, lográndose obtener transformantes en 7 de las 12 cepas utilizadas, correspondientes a los complejos clonales CC-5, CC-8, CC-45 y CC-30. Según Jones *et al.* (64) los sistemas de restricción (RM) que reconocen y restringen la entrada de ADN exógeno, son específicos dentro del mismo complejo clonal. De acuerdo a Corvaglia *et al.* (65), las cepas de *S. aureus* del CC- 5 presentan mutaciones en el gen *SaUSI* (sistema R-M tipo IV), las cuales resultan en la pérdida de la función de la enzima SaUSI, lo cual permite que estas cepas pueden aceptar fácilmente el ADN plasmídico a partir de *E. coli*. Así mismo Waldron & Lindsay (66), han observado que algunas las cepas pertenecientes al CC-8, son transformables con ADN proveniente *E. coli*, debido a que estas cepas tienen una mutación en sus genes *hsdR* (llamada *sau1hsdR*) y por ende carecen de una *hsdR* funcional (sistema R-M tipo II).

Los valores de eficiencia de transformación de cepas clínicas de *S. aureus* obtenidos en este estudio oscilan entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  UFCs/ $\mu$ g de ADN. Anteriores estudios muestran resultados similares, como el de Monk *et al.* (56), que obtuvo entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^5$  UFCs/ $\mu$ g de ADN al transformar cuatro aislados clínicos de *S. aureus* con plásmidos purificados a partir de diferentes *E. coli* IMXXB. Kraemer & Iandolo (67) obtuvieron valores de entre  $2.7 \times 10^4$  y  $3 \times 10^5$  UFCs/ $\mu$ g de ADN en *S. aureus* RN4220 a partir de plásmidos purificados mediante dos técnicas diferentes a partir *E. coli*. Sin embargo estudios donde los plásmidos utilizados para la transformación de *S. aureus* son purificados a partir de cepas de *S. aureus*, reportan valores mucho mayores, que oscilan entre  $3 \times 10^5$  y  $6 \times 10^9$  UFCs/ $\mu$ g de ADN (58)(68)(69).

Una vez probada la capacidad de transformación de las cepas clínicas de *S. aureus*, con el plásmido control C1, se procedió a transformar solo las cepas transformables, con los demás plásmidos del estudio. Al comparar valores de la eficiencia de transformación de

acuerdo UFCs/pmol de ADN, entre C1 y el C2, se observan valores similares, confirmando que las Cas9 contenida en el C2 no causa detrimento en la transformación.

Al evaluar la eficacia de la inactivación de los tres plásmidos p1 p2 y p3 en las cepas clínicas de *S.aureus* seleccionadas, obtuvimos una eficiencia del 100 %. Esto sugiere que los tres ARNs guías diseñados frente a dianas cromosómicas de *S. aureus* son capaces de reconocer y cortar la secuencia diana en todas las cepas clínicas testadas, provocando la muerte celular. Estos resultados validan *in vitro* el uso de la herramienta CRISPR/Cas9 diseñada para combatir las infecciones asociadas a prótesis articulares de *S. aureus*.

En estudios previos, Chen *et al.* (70), adaptó el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes*, para *S. aureus*, obteniendo altas eficiencias de edición en la eliminación de genes, la mutación puntual de nucleótidos y la inserción de genes. Así mismo Penewit *et al.* (71) desarrolló un sistema mediado por CRISPR/Cas9, para generar mutaciones puntuales en el cromosoma de *S. aureus* y seleccionar únicamente las cepas mutagenizadas. Sin embargo, estas pruebas solo se han podido desarrollar de forma *in-vitro*, lo que sugiere la búsqueda de herramientas para aplicar dichas tecnologías en sistemas animales. Una forma de aplicación de esta herramienta de edición genética sería el uso de bacteriófagos como vectores, ya que estos también presentan una alta especificidad, y riesgo mínimo de toxicidad del huésped (72). En sinergia ambos sistemas, (sistema CRISPR/Cas9 y el bacteriófago) serían totalmente específicos sobre los agentes causales de las infecciones sin causar daño sobre el microbiota del huésped como en el caso del tratamiento clásico con antibióticos.

Existen varios trabajos a cerca de la utilización de los fagos como tratamiento frente a la infección (73). Un ejemplo es el trabajo realizado por Cobb *et al.* (74), el cual utilizó un bacteriófago editado con el sistema CRISPR/Cas9 como tratamiento alternativo para la osteomielitis e infección de tejidos blandos en un modelo de infección en rata.

Por lo tanto, aprovechando los avances recientes en la edición genética bacteriana mediante el sistema CRISPR/Cas9, en este trabajo hemos podido validar la eficacia en la inactivación de cepas de *S. aureus* asociadas a infecciones de prótesis articulares. Estos resultados marcan el inicio de una primera fase de análisis y sugieren la búsqueda de herramientas que faciliten y potencien la aplicación de estas tecnologías a sistemas *in-vivo*.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial para la Salud “OMS”. Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía práctica. Segunda edición. 2002.
2. Sáenz J.A., Barcenilla GF., Torres J., Mas Atance J., Garrido S., Porcel J. M. Infección de prótesis total de rodilla y cadera. Epidemiología descriptiva, terapéutica y evolución en un hospital de segundo nivel durante 10 años. *An. Med. Interna.* 2007; 24(1): 19-23.
3. Guggenbichler JP, Assadian O, Boeswald M, and Kramer A. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials-catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 6: 2011.
4. Whitehouse JD, Friedman ND, Kirkland KB, Richardson WJ, and Sexton DJ. The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002; 23: 183–189.
5. Mermel L.A. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 391–402.
6. Barberan J, Bouza E, Aguado JM, Azanza JA, Prieto J, Cordero R, Hernández-Quero J, Pelletier R. Diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección de prótesis articulares. *Rev. Es. Quimioterapia.* 2003;16(4); 467-478
7. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep* 2008; 10 (5): 394-403
8. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner P E. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med* 2004; 351 (16): 1645-54.
9. Kurtz S M, Ong K L, Schmier J, Mowat F, Saleh K, Dybvik E, Karrholm J, Garellick G, Havelin L I, Furnes O, Malchau H. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89 (3): 144-51.
10. OECD. Health at a Glance: OECD Indicators, OECD Publishing. 2019: Paris

11. Carvajal R, Londoño A. Factores de riesgo de infección del sitio quirúrgico en procedimientos de cirugía ortopédica con prótesis. *Revista Chilena Infectología* 2012; 29 (4): 395-400.
12. OECD. Hip and knee replacement. In *Health at a Glance: Europe 2016*.
13. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah T-F, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018;4(12): 1067.
14. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28 (2): 163-175.
15. Yousif A, Jamal MA, Raad I. *Biofilm-Based Healthcare-associated Infections: Volume I*. Springer International Publishing, Cham. (2015)
16. Holleyman R, Baker P, Charlett A, Gould K, Deehan D. Microorganisms Responsible for Periprosthetic Knee Infections in England and Wales *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.2016; 24(10):3080-3087.
17. Arciola, C. R., An, Y. H., Campoccia, D., Donati, M. E., & Montanaro, L. (2005). Etiology of Implant Orthopedic Infections: A Survey on 1027 Clinical Isolates. *The International Journal of Artificial Organs*, 28(11), 1091–1100.)
18. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5: 751–762.
19. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*. 2017;75(1):005
20. Gordon RJ, and Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (5): 350–359.
21. Dağ HT, Fındık D, Demirel G, Arslan U. Detection of methicillin resistance and various virulencia factors in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. *Balkan Med J*. 2015;32(2):171–5.



22. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603–61.
23. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology.* 2004; 186:1838–1850.
24. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, and Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52: 13–22.
25. Conlon BP. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *Bioessays.* 2014; 36:991–996
26. Stoodley, P, Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 2009; 11: 1034–1043.
27. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013; 64: 175–188.
28. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics.* 2020; 9: 59-87
29. Kraus D, Peschel A. *Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense. *Future Microbiol.* 2008; 3: 437–451.
30. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49–79.
31. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987; 237:1588.
32. Raphael J, Holodniy M, Goodman S, Heilshorn S. Multifunctional Coatings to Simultaneously Promote Osseointegration and Prevent Infection of Orthopaedic Implants. *Biomaterials.* 2016; 84: 301–314
33. Jones RN. Key considerations in the treatment of complicated staphylococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (2): 3–9.

34. Burgui S, Valle J (dir), Lasa I (dir). Evaluation of new strategies to combat *Staphylococcus aureus* biofilm mediated infections in medical devices. Tesis. Navarra: Universidad Pública de Navarra; 2018.
35. Penewit K, Holmes E, McLean K, Ren M, Waalkes A, Salipante SJ. Efficient and Scalable Precision Genome Editing in *Staphylococcus aureus* through Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection. *mBio*. 2018; 9(1):67-85.
36. Van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7): 479–492
37. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315:1709–1712.
38. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005; 1: e60
39. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 2006; 1:7
40. Makarova KS, et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Rev Microbiol*. 2011; 9:467–477.
41. Heidrich N, Vogel J. Same same but different: new structural insight into CRISPR–Cas complexes. *Mol Cell*. 2013; 52:4–7.
42. Nishimasu H, Ran A, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014; 156, 935–949.
43. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria. Interactions. *Annu. Rev. Microbiol*. 2010; 64: 475-493.

44. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 Nature. 2014; 507(7490): 62–67.
45. Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, García-Sandoval CD, Avilez-Bahena MC, Trejo-Reveles V, Muñoz-Soto RB, López-Camacho C. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas The revolution in genetic engineering: CRISPR/Cas system. *Investigación en discapacidad*. 2016; 5(2): 116-128
46. Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., & Church, G. M. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nature Methods*. 2013; 10(11);1116–1121. doi:10.1038/nmeth.2681
47. Doudna J.A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346(6213): 1258096–1258096.
48. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. 2014; 57:1263 – 1278
49. Gu T, Zhao S, Pi Y, Chen W, Chen C, Liu Q, Ji Q. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase. *Chemical Science*.2018; 9(12), 3248–3253.
50. Yang S, Liu J, Shao F, Wang P, Duan G, Yang H. Analysis of the features of 45 identified CRISPR loci in 32 *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015; 464(3): 894–900.
51. Donga X, Jin Y, Ming D, Li B, Dong H, Wang L, Wang T, Wang D. CRISPR/dCas9-mediated inhibition of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*. 2017; 139: 79–86
52. Ouyang P, Chen J, Sun M, Yin Z, Lin J, Fu H, Shu G, He C, Lv C, Deng X, Wang K, Geng Y, Yin L. Imperatorin inhibits the expression of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus* strain BAA-1717 (USA300). 2016 ;109(7): 915-922
53. Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*. 2016; 8 (3): 72.
54. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004; 70(10): 6076–6085.

55. <https://biobricks.org/#>
56. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. Complete bypass of restriction systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. *MBio*. 2015; 6(3):308-315.
57. Lee JC. Methods in Molecular Buiology. En: Nickoloff JA. Methods molecular biology. Electroporation Protocols for Microorganisms. Vol 47. Humana Press Inc. 1995. p 371.
58. Schenk S, Laddaga RA. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Micn) biology Letters*. 1992; 94: 133-138
59. [http://www.geneinfinityorg.geneinfinity.com/cc/cc\\_dnaconverter.html](http://www.geneinfinityorg.geneinfinity.com/cc/cc_dnaconverter.html)
60. Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, Mazzei T, Pea F, Soriano A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016; 7:178-186
61. Zhang G, Wang W, Deng A, Sun Z, Zhang Y, Liang Y, Che Y, Wen T. A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria. *PLoS Genet*. 2012; 8: e1002987
62. Veiga H, Pinho MG. Inactivation of the *SauI* type I restriction modification system is not sufficient to generate *Staphylococcus aureus* strains capable of efficiently accepting foreign DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:3034–3038.
63. Roer L, Aarestrup FM, Hasman H. The *EcoKI* type I restriction modification system in *Escherichia coli* affects but is not an absolute barrier for conjugation. *J Bacteriol*. 2015; 197:337–342.
64. Jones MJ, Donegan NP, Mikheyeva IV, Cheung AL. Improving Transformation of *Staphylococcus aureus* Belonging to the CC1, CC5 and CC8 Clonal Complexes. *PLoS ONE*. 2015; 10(3):0119487.
65. Corvaglia, A. R., Francois, P., Hernandez, D., Perron, K., Linder, P., & Schrenzel, J. A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010;107(26):11954–11958.

66. Waldron, D. E., & Lindsay, J. A. SauI: a Novel Lineage-Specific Type I Restriction-Modification System That Blocks Horizontal Gene Transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* Isolates of Different Lineages. *Journal of Bacteriology*, 2006; 188(15):5578–5585.
67. Kraemer, G. R., & Iandolo, J. J. High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. *Current Microbiology*, 1990; 21(6):373–376.
68. Augustin, J., & Gotz, F. Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 1990; 66(1-3):203–207.
69. Lindberg M, Sjöström J., Johansson T. Transformation of Chromosomal and Plasmid Characters in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1972; 109(2): 844–847.
70. Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.-S., Bae, T., & Ji, Q. Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. *Journal of the American Chemical Society*. 2017; 139(10): 3790–3795.
71. Penewit, K., Holmes, E. A., McLean, K., Ren, M., Waalkes, A., & Salipante, S. J. Efficient and Scalable Precision Genome Editing in *Staphylococcus aureus* through Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection. *mBio*. 2018; 9(1).
72. Wittebole, X., De Roock, S., and Opal, S.M. (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5:226–235.
73. Furfaro, L. L., Payne, M. S. & Chang, B. J. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 376 (2018).
74. Cobb LH, Park J, Swanson EA, Beard MC, McCabe EM, Rourke AS, Seo SS, Oliver AK, Priddy LB. CRISPRCas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection. *PLoS ONE*. 2019; 14(11): e0220421



## Borrador de Artículo



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

Journal of  
Bacteriology

### JOURNAL OF BACTERIOLOGY

American Society for Microbiology

ISSN: 0021-9193

eISSN: 1098-5530

Journal Citation Report Category: Microbiology

### **Inactivation of *Staphylococcus aureus* strains from infections associated with joint prostheses using the CRISPR/Cas9 tool.**

Jusdin Ruiz<sup>1</sup>, Maite Echeverz<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Laboratory of Microbial Pathogenesis, Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra (UPNA)-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), IdiSNA, Irunlarrea 3. Pamplona-31008, Navarra, Spain

\*Corresponding author: [maite.echeverz@unavarra.es](mailto:maite.echeverz@unavarra.es)

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; biofilms; CRISPR/Cas9; joint prostheses.

1 **ABSTRACT**

2 *Staphylococcus aureus* is the most frequent causative agent of infections associated with  
3 joint prostheses. When it is established on the surface of the prosthesis forming biofilm,  
4 the self-secreted matrix favors its survival and resistance to antimicrobials, triggering the  
5 chronicity of the infection. Thus, there is currently an enormous interest in developing  
6 new alternative and/or complementary treatments to the classic use of antibiotics. In this  
7 sense, the inactivation efficacy of *S. aureus* strains from prosthetic joint infections has  
8 been evaluated using the CRISPR/Cas9 tool contained in three plasmids (previously  
9 constructed in the laboratory). The expression of the CRISPR/Cas9 system designed  
10 against specific and highly conserved targets on the *S. aureus* chromosome, produces a  
11 double-strand break in the genome and triggers cell death with 100% efficiency for the  
12 three plasmids analyzed in this work. This tool opens the door to future works that allow  
13 the search for strategies that facilitate and enhance the application of these technologies  
14 to *in-vivo* systems.

15

16

17 **IMPORTANCE**

18

19 *S. aureus* is an important human pathogen that causes infections that are difficult to treat  
20 due to its high capacity to form biofilms, as well as the increasing appearance and spread  
21 of *S. aureus* meticillin resistant (MRSA) strains. This context renders the classic antibiotic  
22 treatment ineffective and the search for alternative treatments it is increasingly evident.  
23 In this work, we have addressed the study of the inactivation efficiency of *S. aureus*  
24 clinical strains using the CRISPR/Cas9 tool. This system is capable of recognizing and  
25 producing a double-stranded break in specific and highly conserved targets in the  
26 bacterial genome, and consequently, triggers cell death in the tested clinical strains. This  
27 work raises the possibility of developing new control strategies for the treatment of *S.*  
28 *aureus* caused infections.

29



## 1 INTRODUCTION

2  
3 Joint arthroplasty infections have become one of the main clinical complications and it is  
4 estimated that these infections have an incidence of around 4%. In 2010, more than  
5 300,000 hip arthroplasties and around 700,000 knee arthroplasties were performed in the  
6 United States, and it is expected that by 2030 these numbers will increase, reaching  
7 around 3.5 million interventions (1). In Spain, according to the OECD in its 2019 report,  
8 it reflects that in 2017 hip replacement surgeries were 116 for every 100,000 habitants  
9 and 130 knee replacement surgeries for every 100,000 habitants. In other words, more  
10 than 100,000 implants were placed between hip and knee prostheses, and these are  
11 projected to increase, due to the increased population aging (2).

12 In general, these infectious are characterized by being chronic or recurrent processes,  
13 which can lead to damage to the functionality and/or removal of the prosthesis  
14 temporarily or permanently, with a high economic implication for the affected population.  
15 The costs associated with the treatment of prosthesis removal and antibiotic therapy  
16 amount to more than 45,000 euros per patient and, in the worst case, become life-  
17 threatening septic infections (3) (4).

18 The most frequent origin of these infections can be associated with the contamination of  
19 the prosthetic material in the surgical act, from the cutaneous flora of the patient or the  
20 personnel involved in the surgery, including the operating room environment. To a lesser  
21 extent, these infections are caused by prior contamination of the prosthetic material, in  
22 the immediate post-operative period and in some cases rarely, by hematogenous route or  
23 by quiescent infections of the bone prior to implant placement (5)

24 The etiology of these infectious symptoms is well known, staphylococci, mainly  
25 *Staphylococcus aureus* and coagulase negative species (NEC), are the most frequent  
26 etiologic agents in prosthesis-associated infections (6) (7). It should be noted that *S.*  
27 *aureus* was the cause of 40% of infections associated with hip and knee joint prostheses.  
28 (8). This is due to the specific characteristics of pathogenicity, resulting from its multiple  
29 virulence factors, and its ability to form biofilms, which are factors that favor its  
30 persistence and antimicrobial treatment resistance (9) (10).

31 The growth of *S. aureus* forming biofilm, constitutes a favorable environment that  
32 provides certain advantages when colonizing new surfaces and that also allows it to

1 survive in hostile conditions (11). The biofilm establishes a physical and chemical barrier  
2 that protects bacteria from the host's immune system (prevents phagocytosis, complement  
3 opsonization, hinders the diffusion of molecules, stops oxidative destruction and the  
4 action of cationic peptides) and the action of the antibiotic treatment. (12). Furthermore,  
5 the bacteria inside the biofilm have a lower growth rate and a latent physiological state  
6 that makes them less susceptible to antibiotic treatment (13).

7 The development of new tools that facilitate the treatment of this type of infection has  
8 focused on each of the stages of biofilm formation. Regarding primary adhesion, the  
9 modification of the surface of the implants has been studied directly or with substances  
10 that can be non-stick or antimicrobial to avoid the start of the biofilm. To counteract the  
11 synthesis of the components of the biofilm matrix and thus prevent the formation of the  
12 extracellular matrix, the molecules that inhibit sortase, quorum-sensing and anti-amyloid  
13 molecules stand out. On the other hand, once the biofilm has formed, the treatments are  
14 aimed at destabilizing it, making use of enzymes, chelating or dispersing agents. In  
15 addition, there are other treatments that use different mechanisms of action, such as the  
16 use of bacteriophages, photodynamic therapy and immunotherapy (14). However, despite  
17 the effort that goes into the development and implementation of all these prevention and  
18 treatment measures, they are not enough to face the great problem that these infections  
19 have in the hospital setting.

20 Taking this scenario into account and adding to this, the growing appearance of *S. aureus*  
21 strains resistant to methicillin "MRSA" (15), make systemic antibiotic treatment  
22 ineffective. In this type of infections associated with hip and knee prostheses, the search  
23 for alternative and/or complementary treatments to the classic use of antibiotics has  
24 become an increasingly evident need (5) (16). For this reason, genetic inactivation has  
25 now become one of the alternative approaches against *S. aureus* infections, with gene  
26 editing mediated by the CRISPR system (acronym for Clustered Regularly Interspaced  
27 Short Palindromic Repeats) the main tool of attack due to its high specificity and  
28 efficiency (17).

29 For this reason, we considered the use of the CRISPR/Cas9 tool as a possible strategy for  
30 action. Inactivation efficacy of three plasmids constructed in the Microbial Pathogenesis  
31 laboratory, each one containing the CRISPR/Cas9 system against three specific and  
32 highly conserved targets within the *S. aureus* genome have been evaluated. The

1 expression of these plasmids on *S. aureus* clinical isolates produces a cell death with  
2 100% efficiency in all the cases analyzed, suggesting the development of this strategy as  
3 a new alternative attack to this type of infections.

4

## 1     **RESULTS**

### 3     **Obtaining and purifying the plasmids**

5     As a result of the transformation of *E. coli* (IM01B) with the plasmids under study, their  
6     subsequent cultivation, extraction and quantification of plasmid DNA by  
7     spectrophotometry, we obtained the values showed in Table 1.

8     The DNA concentration (ng/μl) obtained with plasmid extraction of C1, it is lower in  
9     relation to the other plasmids under study. However, this presents a greater number of  
10    pmol of DNA for each 2 μg (used to transform the clinical strains), due to its smaller size  
11    (5426 bp), in relation to C2 (10497 bp) and plasmids p1, p2 and p3 (10685 bp).

12    The PCR product, its subsequent electrophoresis and photographed of the bands, allowed  
13    verifying the correct plasmid extraction. The size of the PCR products corresponded to  
14    that expected (Table 1). Being the largest, the 950 bp PCR control product p1\*, followed  
15    by C2 and plasmids p1, p2 and p3 products with sizes of 750 bp, and the smallest that of  
16    C1 with 254 bp (Figure 1).

### 17    **Transformation of clinical strains of *S. aureus***

19    From the competent cells obtained from the clinical strains of *S. aureus* and their  
20    subsequent transformation with plasmid C1, it can be seen that the highest values of  
21    "CFU/μg of DNA" were presented by strains 8 and 7, both from infections associated  
22    with hip prostheses, followed by strains 3 and 4 isolated from infections associated with  
23    knee prostheses. About strains 2, 6 and 9, slightly lower values were observed but very  
24    similar between each other, however, in strains 1, 5, 10, 11 and 12, it was not possible to  
25    obtain transformants (Figure 2).

26    That is, it was detected that 7 (58%) of the 12 clinical *S. aureus* strains transformed with  
27    plasmid C1, were transformable, while in 5 strains (42%), it was not possible to obtain  
28    transformants (Figure 3). Within the transformable strains, are strains 4 and 9 belonging  
29    to CC-5 clonal complex, strains 6 and 7 of CC-8, strains 3 and 8 of CC-45 and strain 2 of  
30    CC-30. On the contrary, the strain 10 of the same CC-30, it was not transformable, like  
31    strains 5 and 12 of CC-15, strain 1 of CC-22, and strain 11 of which the clonal complex  
32    is unknown (CC-NN) .

1 Therefore, the transformation with plasmid C2, plasmids p1, p2 and p3, was only carried  
2 out on the strains in which transformants were successfully obtained for C1. The inability  
3 to transform the strains 1, 5, 10, 11 and 12 with plasmid C1, excludes them of  
4 CRISPR/Cas9 system efficiency assay.

5 Later, it will be evaluated whether the two plasmids control C1 and C2 present similar  
6 values in the transformation efficiency to verify that the Cas9 protein by itself does not  
7 cause a detriment in the transformation efficiency. This comparison allows us to observe  
8 that the values of the "CFUs/  $\mu\text{g}$  of DNA" with C1, in relation to C2, were slightly higher  
9 (Figure 4). However, the plasmid C1 is smaller in size than plasmids C2, p1, p2 and p3  
10 and the number of pmol of DNA available in the 2  $\mu\text{g}$  of DNA used to transform *S. aureus*  
11 strains is different. Therefore, we decided to compare the efficiency of the transformation  
12 considering the number of pmoles of DNA transformed (Figure 5). In this case, the results  
13 show that both controls present practically equal transformation efficiency and therefore  
14 validates the use of the C2 plasmid as a transformation control in the inactivation assay  
15 with the CRISPR/Cas9 system described below.

16

### 17 **CRISPR / cas9 tool efficiency**

18

19 The analysis of inactivation efficiency of *S. aureus* strains mediated by the CRISPR/Cas9  
20 system included in the plasmids p1, p2 and p3, in comparison with the CFU values  
21 obtained by the population count with C2 plasmid, shows the great system efficiency.  
22 Transformation with plasmids p1, p2 and p3 didn't result in any colony, even in the plate  
23 where the pellet of the culture is directly plated. However, transformation with plasmid  
24 C2 shows efficiencies around  $1 \times 10^4$  CFUs/pmol in all strains. This suggests that the three  
25 guide RNAs directed to selected *S. aureus* chromosomal genes, specifically recognize  
26 their target sequence in all the strains tested. On the other hand, it demonstrates that the  
27 expression levels of the Cas9 enzyme under the inducible promoter pTetR, are capable of  
28 generating chromosomal cleavage and bacterial death in the absence of the inducer.  
29 (Figure 6).

30 Then performing the analysis of the percentage of efficiency in the inactivation of strains  
31 2, 3, 4, 6, 7, 8 and 9, using the CRISPR/Cas9 tool, shows a 100% system efficiency in all  
32 the tested plasmids. In other words, the transformation of the clinical strains of *S. aureus*,  
33 with plasmids 1, 2 and 3 and the expression of the information contained in them, acted

1 on specific targets in the bacterial chromosomal DNA, causing cell death in all  
2 transformed cells.

3

## 1 DISCUSSION

2 The great ubiquity and its ability to form biofilms are the characteristics that make  
3 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus coagulase negative* responsible for more than  
4 60% of hip and knee prosthesis infections (18). Taking this scenario into account and  
5 added to the increasing appearance of antibiotic resistance, it makes systemic antibiotic  
6 treatment ineffective in this type of infections, making the search for alternative and/or  
7 complementary treatments to the classic use of antibiotics an increasingly evident need.  
8 (5) (16). That is why, currently, genetic inactivation has become the central and  
9 alternative approach against *S. aureus* infections, with gene editing mediated by the  
10 CRISPR/Cas9 system, the main attack tool due to its high specificity and efficiency (17).  
11 For this reason, the objective of the work was to evaluate the efficiency in the inactivation  
12 of *S. aureus* strains from prosthetic joint infections, using the CRISPR/Cas9 tool  
13 contained in three plasmids (previously built in the laboratory). Expression of the  
14 designed CRISPR/Cas9 system against three highly conserved specific targets on the *S.*  
15 *aureus* chromosome should produce a double-stranded break in the host genome and  
16 trigger cell death.

17 Because it was unknown, if these clinical strains had the ability to be transformable, the  
18 following questions were raised, can isolated *S. aureus* clinical strains be transformed?  
19 And what will be the efficiency of these transformations? First of all, one of the main  
20 problems at the time of bacterial genetic manipulation had to be solved, which are  
21 restriction systems (MR), which act as a barrier to the entry of exogenous DNA. These  
22 systems prevent bacteriophage infection, hinder the transfer of conjugative plasmids, and  
23 restrict natural DNA absorption through competition mechanisms. In the event that the  
24 DNA manages to enter and does not present the host-specific methylation profiles, it is  
25 degraded (19) (20) (21).

26 Monck *et al.* (22) developed different strains of *E. coli* that act as specific cloning hosts  
27 for different *S. aureus* clonal complexes (CC), called IMXXB where XX corresponds to  
28 the clonal complex. These strains stably express each CC-specific type I restriction genes  
29 on the *E. coli* DC10B chromosome in order to simplify and improve the handling of  
30 clinically relevant *S. aureus* strains (22). Taking these characteristics into account, in this  
31 study the 5 plasmids to be analyzed were obtained from the *E. coli* IM01B strain, which  
32 is a laboratory-generated strain, characterized by mimicking the type I adenine  
33 methylation profiles of different *S. aureus* clonal complexes. Thanks to this, this strain

1 allows direct transformation with high efficiency and simplified genetic manipulation of  
2 the main *S. aureus* lineages (19).

3 Once the plasmids were obtained from the same genetic background, the clinical strains  
4 of *S. aureus* were transformed, obtaining transformants in 7 of the 12 strains used,  
5 corresponding to the clonal complexes CC-5, CC-8, CC- 45 and CC-30. According to  
6 Jones *et al.* (23) restriction systems (RM) that recognize and restrict the entry of  
7 exogenous DNA are specific within the same clonal complex. According to Corvaglia *et*  
8 *al.* (24), *S. aureus* strains of CC-5 present mutations in the *SauUSI* gene (RM type IV  
9 system), which result in the loss of the function of the SauUSI enzyme allowing these  
10 strains to easily accept plasmid DNA from *E. coli*. Likewise, Waldron & Lindsay (25)  
11 have observed that some strains belonging to CC-8 are transformable with DNA from *E.*  
12 *coli*, because these strains have a mutation in their *hsdR* genes (called sau1hsdR) and  
13 therefore lack of a functional hsdR (RM type II system).

14 The transformation efficiency values obtained in this study range from  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^5$   
15 CFUs/ $\mu$ g of DNA. Previous studies show similar results, such as that of Monk *et al.* (22),  
16 where obtained between  $1 \times 10^3$  and  $1 \times 10^5$  CFUs/ $\mu$ g of DNA by transforming four clinical  
17 isolates of *S. aureus* with plasmids purified from different *E. coli* IMXXB. Kraemer &  
18 Iandolo (26) obtained values between  $2.7 \times 10^4$  and  $3 \times 10^5$  CFUs/ $\mu$ g of DNA in *S. aureus*  
19 RN4220 from plasmids purified by two different techniques from *E. coli*. However,  
20 studies where the plasmids used for the transformation of *S. aureus* are purified from *S.*  
21 *aureus* strains, report much higher values, ranging between  $3 \times 10^5$  and  $6 \times 10^9$  CFUs/ $\mu$ g of  
22 DNA (27)(28)(29).

23 Once the transformation capacity of *S. aureus* clinical strains was tested with the control  
24 plasmid C1, we proceeded to transform only the transformable strains with the other  
25 plasmids under study. When comparing transformation efficiency values according to  
26 CFUs/ $\mu$ mol of DNA, between C1 and C2, similar values are observed, confirming that  
27 the Cas9 contained in C2 does not cause detriment in the transformation.

28 By evaluating the inactivation efficacy of the three plasmids p1 p2 and p3 in the selected  
29 *S. aureus* clinical strains, we obtained 100% efficiency. This suggests that the three guide  
30 RNAs designed against *S. aureus* chromosomal targets are able to recognize and cut the  
31 target sequence in all the clinical strains tested, causing cell death. These results *in-vitro*



1 validate the use of CRISPR/Cas9 tool designed to combat infections associated with *S.*  
2 *aureus* joint prostheses.

3 In previous studies, Chen *et al.* (30), adapted the *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 system for  
4 *S. aureus*, obtaining high editing efficiencies in gene deletion, nucleotide point mutation  
5 and gene insertion. Likewise, Penewit *et al.* (31) developed a CRISPR/Cas9-mediated  
6 system to generate point mutations in the *S. aureus* chromosome and select only  
7 mutagenized strains. However, these tests have only been developed *in-vitro*, suggesting  
8 the search for tools to apply these technologies in animal systems. One way of applying  
9 this genetic editing tool would be to use bacteriophages as vectors, since they also have  
10 high specificity and minimal risk of host toxicity (32). In synergy, both systems  
11 (CRISPR/Cas9 system and the bacteriophages) would be totally specific on the  
12 causative agents of the infections without causing damage to the host microbiota as in the  
13 case of classic antibiotic treatment.

14 There are several studies on the use of phages as a treatment against infection (33). An  
15 example is the work done by Cobb *et al.* (34), who used a bacteriophage edited with the  
16 CRISPR/Cas9 system as an alternative treatment for osteomyelitis and soft tissue  
17 infection in a rat infection model.

18 Therefore, taking advantage of recent advances in bacterial genetic editing using the  
19 CRISPR/Cas9 system, in this work we have validated the efficacy in the inactivation of  
20 *S. aureus* strains associated with prosthetic joint infections. These results mark the  
21 beginning of a first phase of analysis and suggest the search for tools that facilitate and  
22 enhance the application of these technologies to *in-vivo* systems.

23

## 1 MATERIALS AND METHODS

### 3 Bacterial strains, plasmids and growth conditions

4 The strains, plasmids, and culture media used in this study are listed and described in  
5 Table 2 and Figure 7 respectively. Twelve strains of *Staphylococcus aureus* were selected  
6 from a collection of clinical isolates provided by the Department of Biomaterials at the  
7 University of Gothenburg (Sweden). This collection brings together different strains  
8 associated with knee and hip joint prostheses infections from patients who suffered  
9 postoperative complications after joint arthroplasty. A large part of these isolates was  
10 sequenced by the Microbial Pathogenesis Laboratory allowing the selection of the  
11 working strains attending to their belonging to different clonal complexes and their  
12 sensitivity to the chloramphenicol antibiotic, necessary for the plasmid selection object  
13 of the study. *Escherichia coli* IM01B strain was used to propagate the study plasmids.

14  
15 The four plasmids in the study were previously generated in other work (unpublished  
16 data) (Figure 7). These plasmids were generated from plasmid pCN38 (C1). The plasmid  
17 pCN38 contains two origins of replication, the origin of replication pT181 *cop-wt repC*  
18 for *Staphylococcus aureus*, and the origin of replication ColE1 for *Escheria coli*, as well  
19 as two antibiotic resistance genes ampicillin (*amp*) and chloramphenicol (*cat194*) for its  
20 selection in *E. coli* and *S. aureus* respectively. The other 4 plasmids (C2, p1, p2 and p3)  
21 carry the *Streptococcus piogenes cas9* gene that encodes the Cas9 enzyme of the  
22 CRISPR/Cas9 system under the anhydrotetracycline-inducible pTetR promoter (35).  
23 Given that this inducible promoter has previously been found to have an escape in the  
24 expression in the absence of the inducer, we will first test the expression of the Cas9  
25 protein in the absence of inductor. Plasmids p1, p2 and p3 also contain the sequence of  
26 three different guide RNAs under the control of the constitutive promoter pSP01 (36).  
27 These guide RNAs were designed against specific and highly conserved targets of the *S.*  
28 *aureus* genome.

### 30 Obtaining and purifying the plasmids.

31  
32 In order to obtain all the plasmids from the same genetic background, *E. coli* IM01B was  
33 transformed by electroporation (with each of the plasmids to be evaluated), using the  
34 Gene pulser X-Cell (Bio Rad) electroporator (200Ω, 25μF and 1250 V). Subsequently,

1 they were cultivated in Luria-Bertani "LB" Agar (Pronadisa), supplemented with  
2 ampicillin (100 µg/ml) at 37 °C (27). Of the transformed *E. coli*, a preinoculum was grown  
3 in 5 ml of LB-Amp broth (100 µg/ml), at 37 °C and 250 rpm for 16 h. After the growth  
4 of the preinoculum, a dilution (1: 100) was made in 150 ml of LB-Amp broth (100 µg/ml)  
5 and it was cultivated under the aforementioned conditions, in order to obtain a greater  
6 volume of culture. This inoculum (150 ml) was centrifuged at 4000 rpm to recover the  
7 bacterial pellet. Bacterial pellet was used to plasmid DNA extraction using GenElute™  
8 High Performance Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich).

9 The plasmids products of the extractions were quantified by spectrophotometry at an OD  
10 260 nm. As control of the extraction, a conventional PCR was performed using specific  
11 oligonucleotides for each of the plasmids in the study (Table 3). As a control for this PCR  
12 (p1\*), a reaction was added with the oligonucleotides pCN Univ Fw and Cas9 Rv, using  
13 the plasmid p1 as template DNA (Figure 7). PCR products were visualized by agarose  
14 gel electrophoresis (1%) in TAE buffer (40mM Tris acetate, 1mM EDTA, pH8.0) and  
15 Midori Green Advance, at a constant voltage of 120V. The DNA bands were visualized  
16 and photographed on an ultraviolet light transilluminator (Chemi Doc from Bio-Rad).

### 18 **Preparation of competent cells and transformation of clinical strains of *S. aureus***

19  
20 To generate the electrocompetent cells of *S. aureus* clinical strains, the protocol described  
21 by Lee (37) was followed. Initially a preinoculum was grown in 5 ml of B2 medium,  
22 agitation (250 rpm) and 37 °C overnight (16 h). From this, a dilution (1: 125) was made  
23 in 250 ml of B2 medium and incubated at 37 °C and 250 rpm, until reaching an OD of 0.5  
24 to 600nm (27).

25 Once the OD of 0.5 was reached, each of the cultures was allowed to cool on ice for 15  
26 min. Subsequently, the total culture distributed in 5 sterile 50 ml conical tubes was  
27 centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4°C. After centrifugation, the cell pellet was washed  
28 3 times with 50 ml of sterile water at 4°C and centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4°C  
29 (in each wash the pellets were combined, until concentrated in a single conical tube).  
30 Subsequently, two washes were carried out with 30 ml and 15 ml of 10% glycerol,  
31 incubated at 20°C for 15 min and after a last centrifugation, the bacterial pellet was  
32 resuspended with the glycerol residues of the falcon to be fractionated in 50 µl aliquots  
33 to its conservation at -80°C.

1 For electroporation, aliquots of cells to be transformed were thawed at room temperature  
2 and 2 µg of plasmid DNA was added from each of the plasmids to be evaluated. After  
3 incubating the cells with each of the plasmids for 30 min at room temperature,  
4 electroporation (100Ω, 25µF and 1250V) was carried out and the cells transformed in 950  
5 µl of SMMP were resuspended for incubation for 3h at 37 ° C and 250 rpm.  
6 After incubation, it was seeded in TSA supplemented with chloramphenicol (20 µg/ml),  
7 for the selection of transformants. To ensure the count, 100 µl were plated directly from  
8 the culture, its pellet and 100 µl of dilutions 10<sup>-1</sup> and 10<sup>-2</sup>, obtaining a total of 4 plates for  
9 each plasmid and strain to be evaluated. These plates were incubated overnight at 37 °C  
10 for counting the CFUs (Figure 8).

### 12 **Transformation efficiency**

14 Plasmid pCN38 (C1) was used as transformation control of *S. aureus* clinical strains.  
15 Since it was unknown whether these clinical strains had the ability to be transformable  
16 (accept the plasmid and express its information). Once the transformation capacity of the  
17 clinical strains of *S. aureus* was tested with this plasmid C1, we proceeded to transform  
18 only the transformable strains, with the other plasmids in the study.

19 To determine the transformation efficiency CFU/µg of DNA, of each strain, with each of  
20 the plasmids under evaluation, we calculated the total number of CFUs transformed  
21 having into account the amount of electroporated DNA (2 µg)

22 Given the difference in the size (bp) of the plasmids to be evaluated, it was necessary to  
23 determine the transformation efficiency with respect to the number of picomoles (pmol)  
24 of each of the plasmids with the "Calculator and Converters" tool of the GENE INFINITY  
25 online page (38). This tool converts micrograms of DNA into picomoles of DNA  
26 according to the following formula: pmol of DNA = DNA µg × (pmol/660pg) × (10<sup>6</sup>/1µg)  
27 × (1/ DNA length in bp.).

28 The “Transformation Efficiency/pmol of DNA” was then calculated in each of the strains  
29 and for each of the plasmid to be evaluated, starting from the calculation of the total  
30 number of transformed CFUs. Where “Transformation Efficiency”/pmol of DNA =  
31 (transforming CFUs × pmol of DNA)/ pmol of plasmid DNA.

### 33 **Efficiency of the CRISPR/ cas9 tool in the inactivation of clinical strains of *S. aureus*.**

1 To evaluate the inactivation efficiency of *S. aureus* mediated by the CRISPR / Cas9 tool  
2 included in the plasmids p1, p2 and p3, first the plasmid C2 was used as a control of the  
3 transformation efficiency of the CRISPR/Cas9 system. This plasmid lacks the guide RNA  
4 sequence and consequently cannot guide the Cas9 protein to the cleavage site in the *S.*  
5 *aureus* genome. In this way, the clinical strains transformed with the C2 plasmid remain  
6 viable and express the cloranfenicol resistance contained in the plasmid. Therefore, to  
7 calculate the inactivation efficiency of the system, the CFU/pmol of DNA values obtained  
8 with the plasmids p1, p2 and p3 were compared with CFU/pmol of DNA values obtained  
9 with the plasmid control C2 expressed as a percentage. Where % Efficiency of  
10 CRISPR/Cas9 tool = (CFUs (p1, p2 and p3)/ CFUs C2) x 100

11

## 1 **BIBLIOGRAPHY**

- 2 1. Kurtz S M, Ong K L, Schmier J, Mowat F, Saleh K, Dybvik E, Karrholm J, Garellick  
3 G, Havelin L I, Furnes O, Malchau H. Future clinical and economic impact of  
4 revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89 (3): 144-51.
- 5 2. OECD. *Health at a Glance: OECD Indicators*, OECD Publishing. 2019: Paris
- 6 3. Carvajal R, Londoño A. Factores de riesgo de infección del sitio quirúrgico en  
7 procedimientos de cirugía ortopédica con prótesis. *Revista Chilena Infectología*  
8 2012; 29 (4): 395-400.
- 9 4. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah T-F, Alarcon EI. Bacterial biofilm  
10 formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention.  
11 *Heliyon*. 2018;4(12): 1067.
- 12 5. Barberan J, Bouza E, Aguado JM, Azanza JA, Prieto J, Cordero R, Hernández-Quero  
13 J, Pelletier R. Diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección de prótesis  
14 articulares. *Rev. Es. Quimioterapia*. 2003;16(4); 467-478
- 15 6. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist.*  
16 *Sanit. Navar*. 2005; 28 (2): 163-175.
- 17 7. Yousif A, Jamal MA, Raad I. *Biofilm-Based Healthcare-associated Infections:*  
18 *Volume I*. Springer International Publishing, Cham. (2015)
- 19 8. Arciola, C. R., An, Y. H., Campoccia, D., Donati, M. E., & Montanaro, L. (2005).  
20 Etiology of Implant Orthopedic Infections: A Survey on 1027 Clinical Isolates. *The*  
21 *International Journal of Artificial Organs*, 28(11), 1091–1100.)
- 22 9. Gordon RJ, and Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus*  
23 *aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (5): 350–359.
- 24 10. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum Sensing in  
25 *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186:1838–1850.
- 26 11. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse L. Bacterial Biofilm and its Role in the  
27 Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*. 2020; 9: 59-87
- 28 12. Kraus D, Peschel A. *Staphylococcus aureus* evasión of innate antimicrobial defense.  
29 *Future Microbiol*.2008; 3: 437–451.
- 30 13. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu*  
31 *Rev Microbiol*. 2000; 54: 49–79.
- 32 14. Burgui S, Valle J (dir), Lasa I (dir). Evaluation of new strategies to combat  
33 *Staphylococcus aureus* biofilm mediated infections in medical devices. Tesis.  
34 Navarra: Universidad Pública de Navarra; 2018.

- 1 15. Jones RN. Key considerations in the treatment of complicated staphylococcal  
2 infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (2): 3–9.
- 3 16. Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, Mazzei T, Pea F, Soriano A, et al. Methicillin-  
4 resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available  
5 treatment options. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2016; 7:178-186
- 6 17. Nishimasu H, Ran A, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R,  
7 Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and  
8 Target DNA. *Cell.* 2014; 156, 935–949.
- 9 18. Holleyman R, Baker P, Charlett A, Gould K, Deehan D. Microorganisms  
10 Responsible for Periprosthetic Knee Infections in England and Wales *Knee Surg*  
11 *Sports Traumatol Arthrosc.* 2016; 24(10):3080-3087.
- 12 19. Zhang G, Wang W, Deng A, Sun Z, Zhang Y, Liang Y, Che Y, Wen T. A mimicking-  
13 of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of  
14 bacteria. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002987
- 15 20. Veiga H, Pinho MG. Inactivation of the *SauI* type I restriction modification system  
16 is not sufficient to generate *Staphylococcus aureus* strains capable of efficiently  
17 accepting foreign DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:3034–3038.
- 18 21. Roer L, Aarestrup FM, Hasman H. The *EcoKI* type I restriction modification system  
19 in *Escherichia coli* affects but is not an absolute barrier for conjugation. *J Bacteriol.*  
20 2015; 197:337–342.
- 21 22. Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. Complete bypass of restriction  
22 systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. *MBio.* 2015; 6(3):308-315.
- 23 23. Jones MJ, Donegan NP, Mikheyeva IV, Cheung AL. Improving Transformation of  
24 *Staphylococcus aureus* Belonging to the CC1, CC5 and CC8 Clonal Complexes.  
25 *PLoS ONE.* 2015; 10(3):0119487.
- 26 24. Corvaglia, A. R., Francois, P., Hernandez, D., Perron, K., Linder, P., & Schrenzel, J.  
27 A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal  
28 gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proceedings of the National*  
29 *Academy of Sciences,* 2010;107(26):11954–11958.
- 30 25. Waldron, D. E., & Lindsay, J. A. *SauI*: a Novel Lineage-Specific Type I Restriction-  
31 Modification System That Blocks Horizontal Gene Transfer into *Staphylococcus*  
32 *aureus* and between *S. aureus* Isolates of Different Lineages. *Journal of Bacteriology,*  
33 2006; 188(15):5578–5585.



- 1 26. Kraemer, G. R., & Iandolo, J. J. High-frequency transformation of *Staphylococcus*  
2 *aureus* by electroporation. *Current Microbiology*, 1990; 21(6):373–376.
- 3 27. Schenk S, Laddaga RA. Improved method for electroporation of *Staphylococcus*  
4 *aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992; 94: 133-138
- 5 28. Augustin, J., & Gotz, F. Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other  
6 staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiology*  
7 *Letters*, 1990; 66(1-3):203–207.
- 8 29. Lindberg M, Sjöström J., Johansson T. Transformation of Chromosomal and Plasmid  
9 Characters in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1972; 109(2): 844–847.
- 10 30. Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.-S., Bae, T., & Ji, Q. Rapid and Efficient Genome  
11 Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System.  
12 *Journal of the American Chemical Society*. 2017; 139(10): 3790–3795.
- 13 31. Penewit, K., Holmes, E. A., McLean, K., Ren, M., Waalkes, A., & Salipante, S. J.  
14 Efficient and Scalable Precision Genome Editing in *Staphylococcus aureus* through  
15 Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection. *mBio*.  
16 2018; 9(1).
- 17 32. Wittebole, X., De Roock, S., and Opal, S.M. (2014) A historical overview of  
18 bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial  
19 pathogens. *Virulence* 5:226–235.
- 20 33. Furfaro, L. L., Payne, M. S. & Chang, B. J. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials  
21 and Regulatory Hurdles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 376 (2018).
- 22 34. Cobb LH, Park J, Swanson EA, Beard MC, McCabe EM, Rourke AS, Seo SS, Oliver  
23 AK, Priddy LB. CRISPRCas9 modified bacteriophage for treatment of  
24 *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection. *PLoS ONE*.  
25 2019; 14(11): e0220421
- 26 35. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. Novel Cassette-  
27 Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Applied and*  
28 *Environmental Microbiology*, 2004; 70(10): 6076–6085.
- 29 36. <https://biobricks.org/#>
- 30 37. Lee JC. *Methods in Molecular Biology*. En: Nickoloff JA. *Methods molecular*  
31 *biology. Electroporation Protocols for Microorganisms*. Vol 47. Humana Press Inc.  
32 1995. p 371.
- 33 38. [http://www.geneinfinityorg.geneinfinity.com/cc/cc\\_dnaconverter.html](http://www.geneinfinityorg.geneinfinity.com/cc/cc_dnaconverter.html)
- 34



1

**Table 1.** Plasmid concentration after purification

Plasmid	Concentration (ng/μl)	pico Moles of DNA (pmol) *
<b>C1</b>	220	5,576
<b>C2</b>	319	2,887
<b>p1</b>	310,6	2,836
<b>p2</b>	405,9	2,836
<b>p3</b>	372	2,836

\* For every 2 μg of DNA

2

3

4

5

**Table 2.** Bacterial strains used in the study.

Strains	Characteristics and resistance genes	Clonal complex	MIC*	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>				
1	blaZ-like,norA-like	CC-22	6920	
2	blaZ,norA-like	CC-30	6921	
3	Clinical isolation - infection associated with hip replacement	blaZ,norA-like	CC-45	6922
4		blaZ-like,norA-like	CC-5	6927
5		dfrG,norA-like	CC-15	6935
6		norA-like	CC-8	6947
7	blaZ,norA-like	CC-8	7002	
8	norA	CC-45	7004	
9	Clinical isolation - infection associated with knee prosthesis	blaZ-like,erm(C),mecA,norA-like	CC-5	7009
10		blaZ-like,norA-like	CC-30	7014
11		blaZ-like,norA-like	CC-NN**	7018
12		blaZ,norA-like	CC-15	7026
<b><i>Escherichia coli</i></b>				
IM01B	<i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697galU</i> <i>galK rpsL endA1 nupG Δdcm</i> <i>ΩPhelp-hsdMS (CC1-2)</i> <i>ΩPN25-hsdS (CC1-1)</i>	(21).		

\* Reference Laboratory of Microbial Pathogenesis - NavarraBiomed.

\*\* the information of clonal complex to which it belongs is not available

6

7

8

9

10

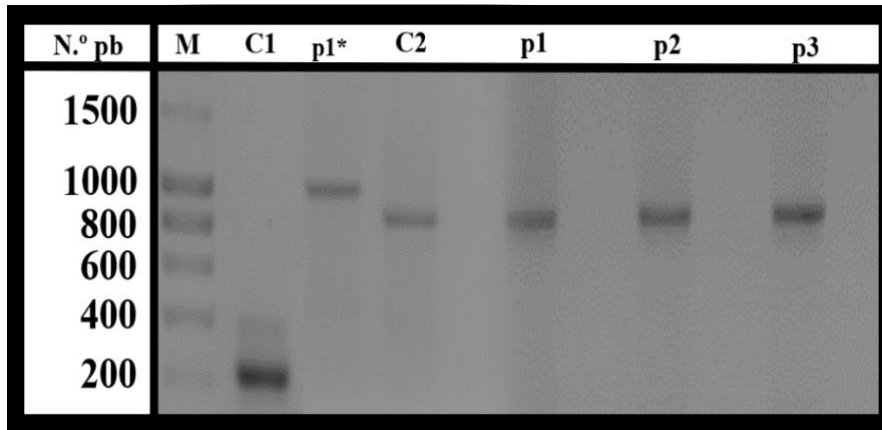
**Table 3.** Characteristics of the check PCR.

Template DNA- Plasmid	C1	p1*	C2	p1	p2	p3
<b>Oligonucleotide Fw</b>	pCN Univ	pCN Univ	pCN Univ	gRNA 1	gRNA 2	gRNA 3
<b>Oligonucleotide Rv</b>	pCN Univ	Cas9	Cas9	Cas9	Cas9	Cas9
<b>PCR product (bp)</b>	254	950	750	750	750	750

p1 \* Positive PCR control.

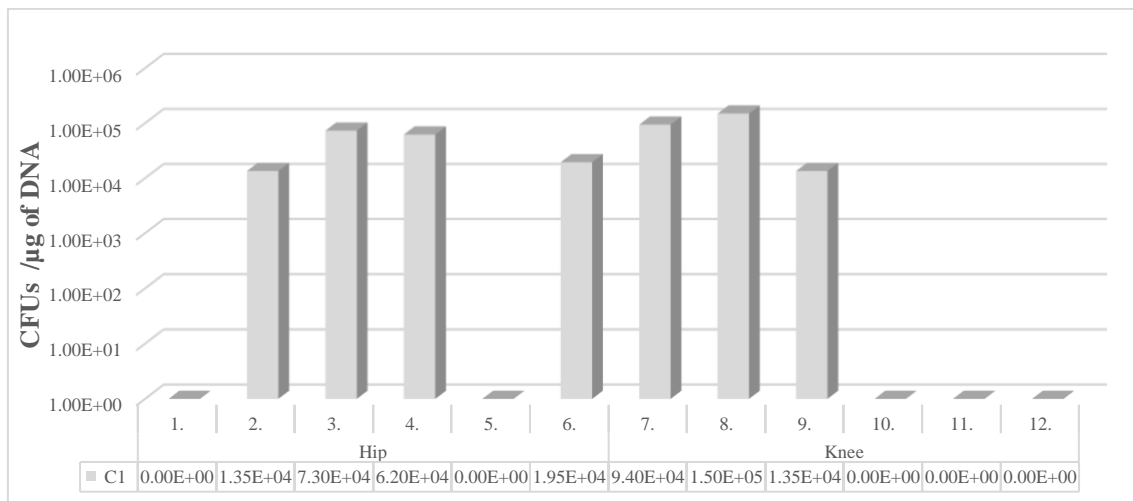
11

12



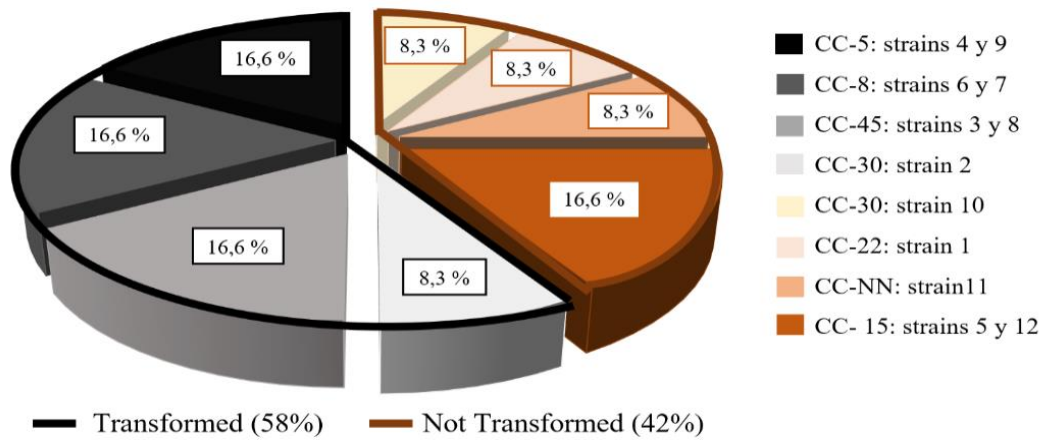
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

**Figure 1. Electrophoresis of the PCR products performed on the plasmids under study.** The sizes of the different PCR products obtained are: **C1)** 254 bp, **p1\*)** 950 bp, **C2)** 750 bp, **p1, p2** and **p3)** 750 bp. **M)** Hiperladder I molecular weight marker (bp).



8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

**Figure 2. Efficiency Transformation.** CFUs/ $\mu$ g DNA obtained to transform 12 *S. aureus* clinical strains with plasmid control C1.

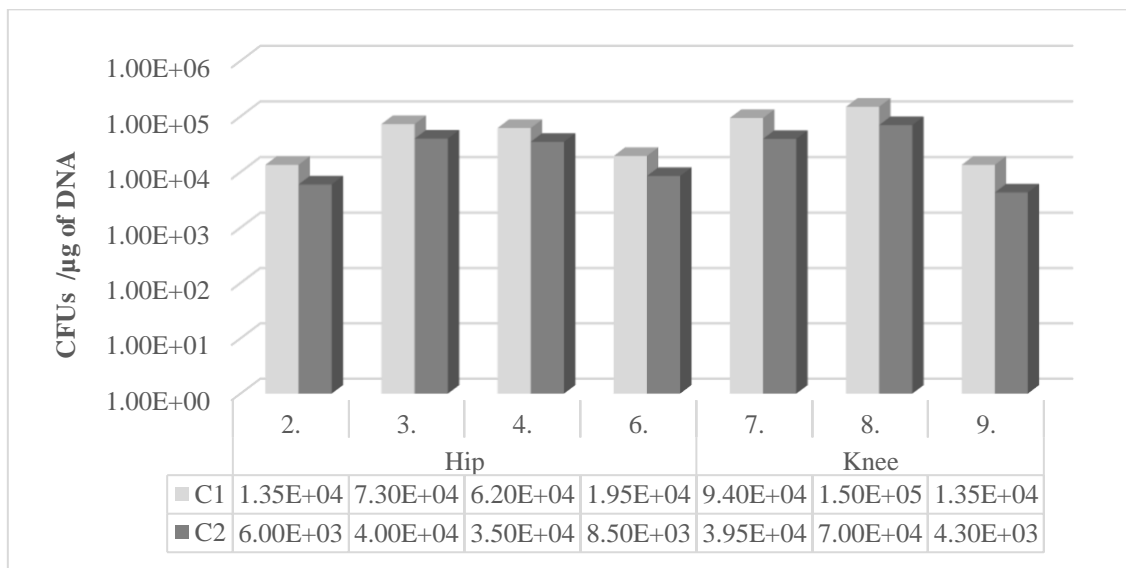


1

2 **Figure 3. Percentage of strains transformed with plasmid C1 according to the clonal**  
 3 **complex.**

4

5



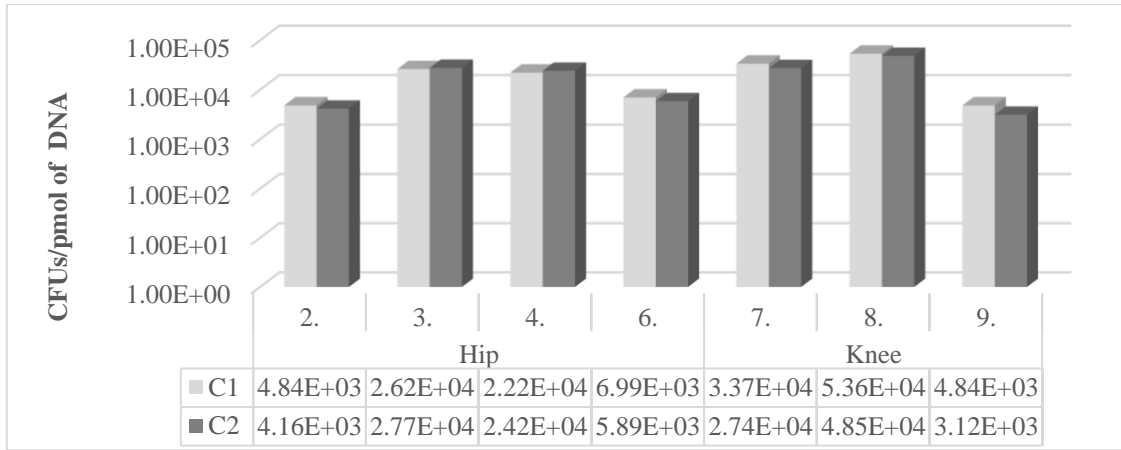
6

7

8 **Figure 4. Transformation Efficiency.** CFUs/ $\mu$ g DNA obtained to transform 2,3,4,6,7,8  
 9 and 9 strains with C1 and C2 plasmids.

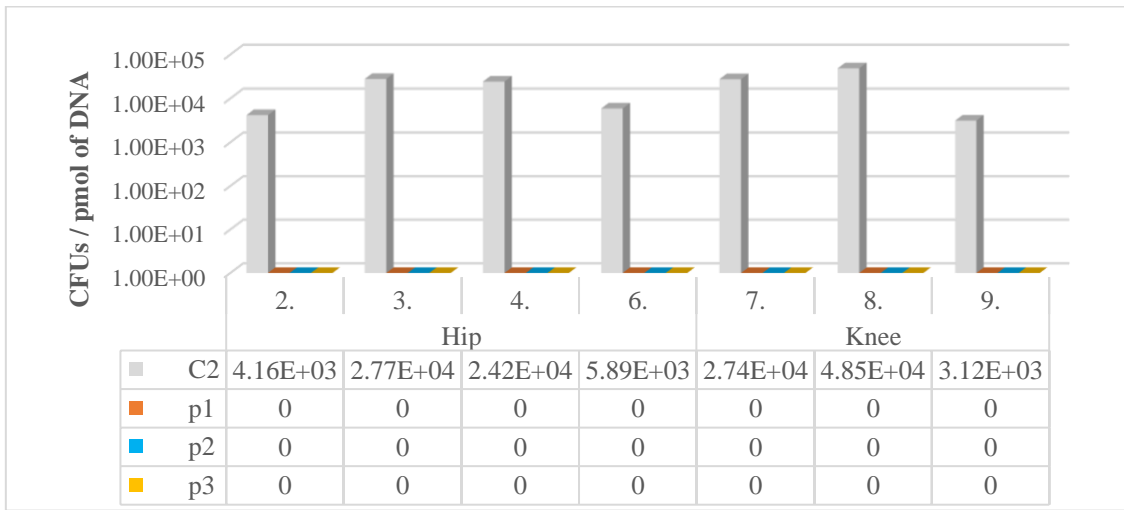
10

11



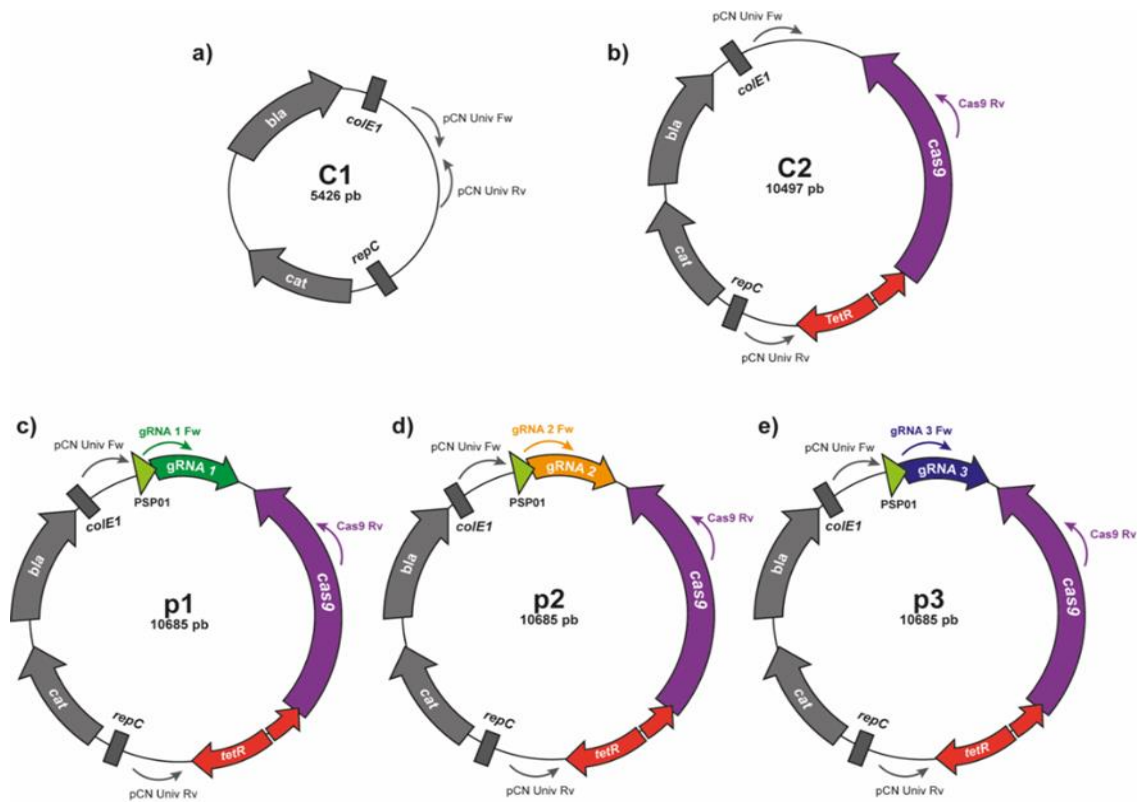
1  
2  
3  
4  
5  
6

**Figure 5. Transformation Efficiency** CFUs/pmole DNA obtained to transform 2,3,4,6,7,8 and 9 strains with C1 and C2 plasmids.



7  
8  
9  
10  
11  
12

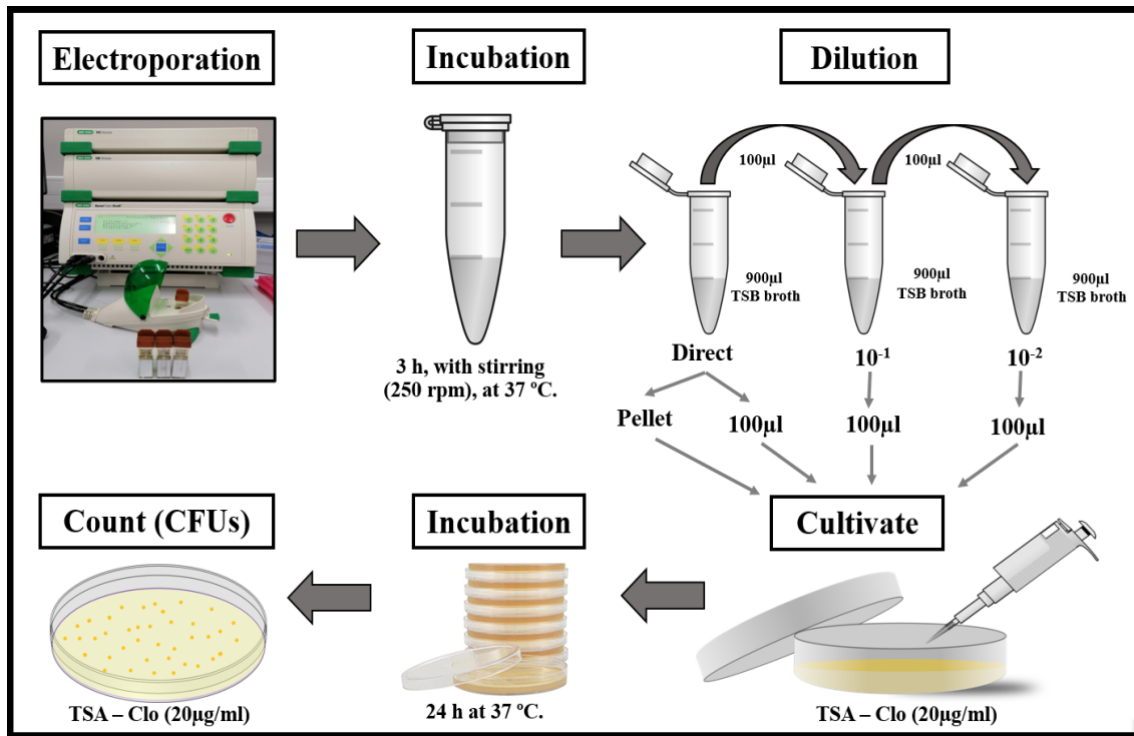
**Figure 6. Transformation Efficiency.** CFUs/pmole DNA obtained to transform 2,3,4,6,7,8 and 9 *S. aureus* strains with C2, p1, p2, and p3 plasmids.



1  
2

3 **Figure 7. Schematic drawing of the study plasmids.** (a) pCN38 (C1), of 5426 pb (40),  
 4 is the base plasmid from which plasmids C2, p1, p2 and p3 were generated. It has an  
 5 origin of replication pT181 *cop-wt repC* for *S. aureus*, and the origin of replication  
 6 *ColE1* for *E. coli*, as well as two antibiotic resistance genes, ampicillin (*bla*) and  
 7 chloramphenicol (*cat*), components also present, in the other four plasmids of the  
 8 study. (b) C2 plasmid (10497 pb). The *Streptococcus piogenes cas9* gene is cloned  
 9 under the anhydrotetracycline inducible pTetR promoter. The plasmids p1 (c), p2 (d)  
 10 and p3 (e) (10685 pb), in addition to the *cas9* gene, contain the sequence of a guide  
 11 RNA (p1, p2 y p3) under the control of the constitutive promoter pSP01. The  
 12 binding sites of the oligonucleotides used in the test PCR (pCN Univ Fw, gRNA1  
 13 Fw, gRNA2 Fw, gRNA3 Fw, pCN Univ Rv y Cas9Rv) are also shown.

14



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

**Figure 8. Diagram of the transformation process of the clinical strains.** After incubation of the different bacterial cells with the corresponding plasmids, electroporation was carried out (100Ω, 25µF and 1250 V). The cells were recovered in 950 µl of SMMP and incubated during 3 h at 37 °C and 250 rpm. Subsequently, to ensure the count of the transformants, serial dilutions of these cells were performed. Bacterial pellet and 100 µl of the serial dilutions were plated onto TSA supplemented with chloramphenicol (20 µg/ml), obtaining a total of 4 plates for each plasmid and strain to be evaluated. These plates were incubated overnight at 37 °C to count the CFUs