

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE SISTEMAS CRISPR-CAS EN LACTOBACILOS DEL GRUPO *casei*

Galliani, Valentina

¹Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET)
Director: Mercanti, Diego

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan bacterias, y en el caso de las bacterias lácticas (BAL) pueden retrasar o incluso detener fermentaciones a gran escala para la producción de yogur, quesos y otros productos, problema agravado con el actual uso intensivo de cepas puras como cultivos iniciadores (Garneau y Moineau, 2011).

Actualmente se sabe que es imposible erradicar completamente los fagos de los ambientes industriales, por lo cual las numerosas estrategias desarrolladas (adecuado diseño de equipamiento, óptima sanitización de plantas, rotación de cultivos, entre otras) se enfocan en minimizar la incidencia de las infecciones. No obstante, ninguna estrategia resulta completamente efectiva. Más aún, las cepas probióticas poseen atributos únicos, lo que hace inaplicable la rotación de cultivos. Sin embargo, el desarrollo de cepas fagorresistentes derivadas de la cepa original resulta promisorio (Leenay y Beisel, 2017).

Desde hace tiempo, tales derivados resistentes se han obtenido exitosamente como clones bacterianos seleccionados naturalmente y de manera espontánea luego de la exposición de una cepa sensible a fagos virulentos y consecuente lisis de la mayor parte del cultivo (Briggiler Marcó y col., 2011). Sin embargo, resulta un método empírico en el cual se desconocen los mecanismos involucrados en la fagorresistencia.

Poco a poco, numerosos mecanismos de este tipo fueron descubiertos y estudiados en detalle. El último (y probablemente más importante) de estos mecanismos descubierto es el constituido por los sistemas CRISPR-Cas (Makarova y col., 2011). Los CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) consisten en secuencias de ADN repetitivas, cortas y altamente conservadas (*repeats* o repeticiones), intercaladas con secuencias variables (espaciadores o *spacers*). Los espaciadores corresponden a ADN foráneo principalmente de virus o plásmidos, (denominados protoespaciadores o *protospacers* en virus), que son incorporados en los sistemas CRISPR, en el caso de los virus, durante el proceso de infección.

Título del proyecto: Diseño de cultivos fagorresistentes para la industria láctea: tecnología de inmunización natural de bacterias. Origen, diversidad y estrategias novedosas para su control en la industria láctea

Instrumento: Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT)

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Andrea Quiberoni

La adquisición de estos fragmentos otorga a la bacteria inmunidad, la cual se transmite a la descendencia en las subsiguientes divisiones celulares. Tanto la adquisición de espaciadores a partir de un fago como el proceso efector de la inmunidad en caso de posterior ataque por dicho virus son llevados a cabo por los genes *cas* (por **CRISPR-associated**). Por lo tanto, un sistema de defensa activo debe poseer tanto secuencias CRISPR como genes *cas* (CRISPR-Cas). El esquema simplificado de un locus CRISPR-Cas se muestra en la Figura 1.

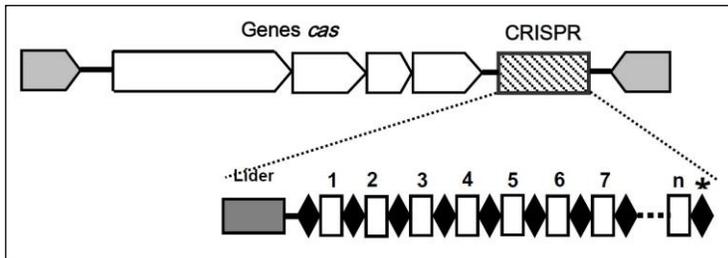


Figura 1. Esquema simplificado de un locus CRISPR-Cas:

(◆) Repeticiones directas

(□) Espaciadores

El asterisco indica la repetición terminal.

En *Streptococcus thermophilus* los sistemas CRISPR-Cas son muy activos y han sido estudiados profundamente, al punto de haberse generado, gracias a esta tecnología, cultivos comerciales con fagorresistencia mejorada para uso en la industria quesera (CHOOZIT™ SWIFT, DuPont™) (Horvath y col., 2012). En otros géneros y especies de BAL, sin embargo, el estudio ha sido mucho más limitado, si bien por las razones expuestas anteriormente, sería muy interesante la obtención de lactobacilos probióticos con fagorresistencia mejorada. El objetivo planteado en este trabajo fue realizar un relevamiento sistemático de la presencia de sistemas CRISPR-Cas en las cepas de lactobacilos del grupo *casei* presentes en la colección del INLAIN.

OBJETIVOS

Estudiar la presencia y diversidad de sistemas CRISPR-Cas, sistemas bacterianos de defensa contra fagos y otros elementos invasores, en cepas de lactobacilos del grupo *casei*, el cual comprende numerosas cepas reconocidas como probióticas.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Relevamiento y análisis bioinformático de secuencias CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*

En primer lugar, se realizó una búsqueda en bases de datos de secuencias CRISPR en el cromosoma de cepas del grupo *casei*. De este modo, se identificaron 16 cepas (10 *Lb. paracasei*, 5 *Lb. rhamnosus* y 1 *Lb. casei*) con al menos una secuencia CRISPR confirmada en su cromosoma; todas las cepas presentaron además genes *cas*, principalmente *csn2*, *casi1*, *cas2* y *cas9*. Las secuencias de las repeticiones fueron conservadas entre cepas de *Lb. paracasei* (5'-GCTCTTGA^uACTGATTGATTCGACATCTACCTGAGAC-3') y *Lb. rhamnosus* (5'-GTTCTTGA^uACTGATTGATTCGACATCTACCTGAGAC-3') con solo 3 bases distintas (subrayadas) de 36 en total, mientras que *Lb. casei* mostró repeticiones más cortas y diferentes (5'-GTTTTCCCCGCACATGCGGGGGTGATCC-3'). El número de repeticiones encontrado en bases de datos, para distintas cepas, fue variable (1 a 46).

Relevamiento de cepas de la colección del INLAIN que contienen el sistema CRISPR-Cas en su ADN cromosómico

A partir de la información recolectada en la actividad anterior, se diseñaron *primers* específicos sobre secuencias conservadas, de modo de lograr la amplificación de regiones CRISPR-Cas (y así determinar su presencia o no) en cepas presentes en la colección del INLAIN. De esta manera, se diseñaron los siguientes *primers* específicos para amplificar tanto la zona CRISPR propiamente dicha, como de los genes *cas1* y *cas9*.

	primers para <i>Lb. paracasei</i>	primers para <i>Lb. rhamnosus</i>
Arreglo CRISPR	crispr_para_f / crispr_para_r	crispr_rham_f / crispr_rham_r
Gen <i>cas9</i>	cas9_para_f / cas9_uniq_r	cas9_rham_f / cas9_uniq_r
Gen <i>cas1</i>	cas1F / cas1R	csn2_rham_1f / cas1cas9_rham_r

Los *primers* fueron utilizados para analizar 40 cepas de las especies *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* pertenecientes a la colección del INLAIN. Sus secuencias están presentes en los genomas de las cepas *Lb. paracasei* BL23 y *Lb. rhamnosus* GG (ambas totalmente secuenciadas), que se usaron como control positivo. El ADN bacteriano se extrajo empleando el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, Argentina). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl. La temperatura de hibridación fue variable según el par de *primers* utilizado. Asimismo, el tiempo de elongación fue de 3 min, considerando tamaños máximos (~3 kbp) esperados para los amplicones. El resto de las condiciones y concentraciones de reactivos fueron estándar para reacciones de PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Relevamiento de sistemas CRISPR-Cas en cepas de la colección del INLAIN.

Especie	Cepa	Amplificación de sistemas CRISPR-Cas		
		Arreglo CRISPR	Gen <i>cas1</i>	Gen <i>cas9</i>
	72	+	+	+
	81	-	-	-
	84	-	-	-
	85	+	+	+
	86	-	-	-
	88	-	-	-
	A	+	+	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	A13	+	+	+
	A14	+	+	+
	ATCC 25302	-	-	-
	ATCC 27092	+	+	+
	ATCC 27139	+	+	+
	Bio	+	+	+
	CNRZ 1308	-	-	-
	CNRZ 1976	-	-	-

CNRZ 318	+	+	+
Dn	+	+	+
Hn	+	+	+
BL23	+	+	+
Jp-1	+	+	+
L26	-	-	-
SA	-	-	+
Yk	+	+	+
FSM 320n	-	-	-
FSM 323	-	-	-
FSL 343	-	-	-
FSL 346	-	-	-
FSL 347	-	-	-
FSL 436	-	-	-
FSL 541	+	+	+
FSL 564	-	-	-
FSL 574	+	+	+
FSL 576	-	-	-
906	+	+	+
<hr/>			
ATCC 7469	-	-	-
CNRZ 1224	+	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> INL1	+	+	+
INL2	+	+	+
PR	+	+	+
90	-	-	-

Como se observa, más de la mitad de las cepas (21/40), tanto de *Lb. paracasei* (17/34) como de *Lb. rhamnosus* (4/6), poseen regiones CRISPR completas, dando lugar a la posibilidad de realizar estudios posteriores: secuenciación de las regiones amplificadas, análisis de los espaciadores y comparación con secuencias de fagos disponibles, y obtención de mutantes fagorresistentes mediante este mecanismo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Briggiler Marcó M., Mercanti D., Reinheimer J.A., Quiberoni, A., 2011. Performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus plantarum* in fermented milk manufacture. International Dairy Journal, 21, 857-862.

Garneau J., Moineau S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. Microbial Cell Factories 10, S20.

Horvath P., Barrangou P., Fremaux C., Boyaval P., Romero D., 2012. Use of CRISPR associated genes (CAS). European Patent Specification EP 2, 325-332.

Leenay RT., Beisel CL., 2017. Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. Journal of molecular biology 429, 177-191.

Makarova K., Haft D., Barrangou R., Brouns S., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F., Wolf Y., Yakunin A., 2011. Evolution and classification of the CRISPR/Cas systems. Nat Rev Microbiol.