

ANÁLISIS DE SISTEMAS CRISPR-Cas EN CEPAS REGIONALES DE *Streptococcus thermophilus*

Pedrón, Lara

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829, Santa Fe.

Director: Mercanti, Diego

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Clave: CRISPR-Cas, *Streptococcus thermophilus*, Bacteriófagos

INTRODUCCIÓN

La fermentación de la leche con bacterias lácticas (BAL) ha sido empleada desde los inicios de la historia como método para mejorar su conservación (Halász, A., 2009), y continúa actualmente a través de la elaboración de distintos productos de consumo masivo en todo el mundo, entre los que se destacan el yogur, otras leches fermentadas, y muchas variedades de quesos. Para ser aplicable en la industria moderna, dicho proceso ha tenido que sufrir modificaciones, especialmente en lo referido a la estandarización de calidad y mejor control de parámetros en elaboraciones a gran escala. Por esta razón, fermentos inicialmente constituidos por una mezcla compleja de bacterias lácticas (y otros microorganismos) provenientes de un producto ya fermentado y aplicados en un nuevo proceso de fermentación (Khalid, K., 2011) fueron progresivamente reemplazados por fermentos seleccionados (Carminati, D., y col, 2010). Los bacteriófagos (o simplemente “fagos”) son virus que infectan bacterias, y como tales son encontrados en cualquier ecosistema en el que haya bacterias presentes, no siendo las fermentaciones con bacterias lácticas una excepción. Los fagos infectan la célula huésped y normalmente siguen lo que se conoce como ciclo lítico, en el cual el ácido nucleico del virus ingresa al citoplasma y se producen nuevas partículas víricas haciendo uso de la maquinaria bacteriana, que son finalmente liberadas produciendo la lisis de la bacteria hospedadora; este mecanismo se repite hasta lograr la lisis de todo el cultivo (Pujato, S. A., y col, 2019).

Título del proyecto: Alternativas para el mejoramiento del perfil de fagorresistencia en cepas de *Streptococcus thermophilus* empleadas como cultivos iniciadores por la industria láctea argentina.

Instrumento: PICT-2019-2019-00400 (Equipos de trabajo de reciente formación).

Año de convocatoria: 2019.

Organismo financiador: Agencia Nacional de la Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación.

Director: Mercanti, Diego.

Un gran inconveniente del uso de fermentos seleccionados, compuestos por uno o unos pocos microorganismos, es el efecto devastador que pueden tener las infecciones por fagos, siendo actualmente la causa más común de fallas durante procesos industriales de fermentación a gran escala en la industria láctea (Briggiler Marcó, M., y col, 2012). Se han buscado distintas estrategias para impedir la contaminación por fagos en las industrias, sin embargo estos son un agente difícil de controlar. En la manufactura de productos lácteos a nivel global las BAL más importantes son *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Delorme, C., 2008), siendo esta última la más importante en Argentina. Algunas cepas de BAL poseen mecanismos de resistencia frente a bacteriófagos; esto llevó al aislamiento de cepas con resistencia frente a la infección por estos virus, de alto valor para enfrentar la problemática anteriormente mencionada. En *S. thermophilus*, la defensa más importante está dada por los sistemas CRISPR (Pujato, S. A., y col, 2019).

Brevemente, los sistemas CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) comprenden un locus dentro del genoma bacteriano con una secuencia líder, y regiones repetidas (o *repeats*) intercaladas con secuencias espaciadoras cortas (o *spacers*) provenientes de virus u otras moléculas de ADN invasor (**Figura 1**). Estos espaciadores son incorporados tras una infección por un bacteriófago como consecuencia de la detección de una secuencia conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Ante una nueva infección, los ARN generados a partir de los sistemas CRISPR podrán formar un complejo con una proteína Cas (de **CRISPR associated**, codificadas por genes *cas* adyacentes al locus CRISPR, **Figura 1**) para dirigirla y digerir el ADN del fago impidiendo la infección. La preponderancia de los sistemas CRISPR-Cas en *S. thermophilus* justifica la importancia de su estudio en cepas de esta especie seleccionadas para su uso en la industria láctea. Además, no existen estudios reportados para las cepas empleadas a tal fin en nuestra región.

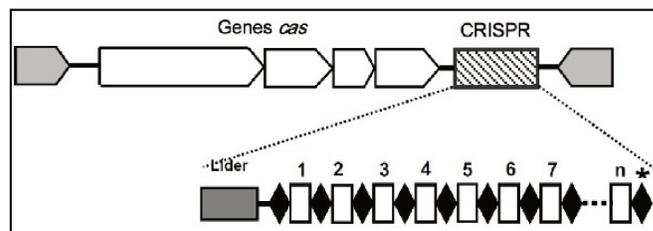


Figura 1: Esquema simplificado de un locus CRISPR-Cas. Los espaciadores se ven representados por rectángulos blancos, las regiones repetidas se encuentran representadas por rectángulos negros.

OBJETIVOS

- Analizar la presencia de sistemas CRISPR en cepas de *S. thermophilus* aisladas y/o empleadas en nuestro país.
- Secuenciar los sistemas encontrados, determinando las repeticiones y espaciadores.
- Mediante análisis *in silico*, comparar la cantidad y distribución de espaciadores con los sistemas CRISPR reportados en bases de datos para cepas de *S. thermophilus*, así como en genomas de fagos, en forma de protoespaciadores.

METODOLOGÍA

Se utilizaron 40 cepas de *S. thermophilus* pertenecientes a la colección del INLAIN. Las mismas fueron nombradas consecutivamente como Sth-01 a Sth-40. Para la secuenciación de los sistemas CRISPR se extrajo ADN bacteriano empleando el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, Argentina). Los ADNs extraídos se emplearon en reacciones de PCR, para detectar los dos sistemas CRISPR activos en *S. thermophilus* usando primers específicos: CRISPR1 (primers CR1F: 5'-TGCTGAGACAACCTAGTCTCTC-3' y CR1R: 5'-TAAACAGAGCCTCCCTATCC-3'), y CRISPR3 (primers CR3F: 5'-GGTGACAGTCACATCTTGTCTAAAACG-3' y CR3R: 5'-GCTGGATATTCGTATAACATGTC-3'). La presencia de bandas de tamaño dentro de un rango esperable para arreglos CRISPR, indicó la presencia de estos dentro de los genomas bacterianos. Los productos de PCR fueron purificados y enviados a la empresa Macrogen (Seúl, Corea) para su secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias fueron analizadas y ensambladas utilizando el paquete de software Staden (v2.0.0b9). La comparación con bases de datos se realizó utilizando la herramienta Nucleotide BLAST (<https://bit.ly/3P3bteV>).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se analizaron los sistemas CRISPR1 y CRISPR 3 en 40 cepas de *S. thermophilus*. En la **Tabla 1** se observan las cepas que poseen cada sistema (CRISPR1 y CRISPR3), y se destacan aquellas para las cuales se logró obtener la secuencia completa del arreglo CRISPR correspondiente. Tal como se observa, 21 de las cepas poseen el sistema CRISPR1 (52,5 %) y 28 poseen el sistema CRISPR3 (70,0 %), de las cuales 13 cepas (32,5 %) poseen ambos sistemas, mientras que solo 4 cepas (Sth-13, Sth-23, Sth-25 y Sth-38), es decir el 10 %, no posee ninguno de los dos sistemas CRISPR.

Tabla 1: Sistemas CRISPR 1 y 3 detectados en las cepas analizadas.

Cepas con sistemas CRISPR1	Sth-01, Sth-05, Sth-07, Sth-08, Sth-10, Sth-11, Sth-12, Sth-14, Sth-15 , Sth-16, Sth-17, Sth-18, Sth-19, Sth-27, Sth-28, Sth-29 , Sth-31, Sth-32 , Sth-35, Sth-36 , Sth-37, Sth-39
Cepas con sistemas CRISPR3	Sth-02 , Sth-03, Sth-04 , Sth-05, Sth-06, Sth-07, Sth-08, Sth-09, Sth-10, Sth-12, Sth-14 , Sth-15, Sth-18, Sth-19, Sth-20, Sth-21, Sth-22, Sth-24, Sth-26, Sth-27 , Sth-28 , Sth-29, Sth-30 , Sth-33 , Sth-34 , Sth-35, Sth-39 , Sth-40

En negrita se indican las cepas para las cuales al día de hoy ya se cuenta con la secuencia completa del arreglo CRISPR correspondiente.

Para aquellos arreglos CRISPR que ya contamos con las secuencias completas, se determinaron las repeticiones y espaciadores, empleando la herramienta online CRISPR-Cas Finder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>). En la **Tabla 2** y la **Tabla 3** se detallan la cantidad de repeticiones, cantidad de espaciadores y su tamaño de las secuencias obtenidas hasta el momento. Además, se muestra la cantidad de espaciadores para los cuales se obtuvo al menos una coincidencia con genomas bacterianos (CRISPR) o fágicos (protoespaciadores) de *S. thermophilus*, al realizar la búsqueda en bases de datos con la herramienta bioinformática Nucleotide BLAST.

Tabla 2: Sistemas CRISPR1 para los que se obtuvo la secuencia completa

Cepa	Nº y tamaño de espaciadores	Matches positivos (Nucleotide BLAST)
Sth-15	2 (32pb)	Para 2/2 espaciadores
Sth-29	23(29-31 pb)	Para 23/23 espaciadores
Sth-32	11 (30pb)	Para 9/11 espaciadores
Sth-36	23 (30-31pb)	Para 23/23 espaciadores

Tabla 3: Sistemas CRISPR3 para los que se obtuvo la secuencia completa

Cepa	Nº y tamaño de espaciadores	Matches positivos (Nucleotide BLAST)
Sth-02	15 (30-34pb)	Para 11/15 espaciadores
Sth-04	12(30pb)	Para 12/12 espaciadores
Sth-14	18(30pb)	Para 9/18 espaciadores
Sth-27	15(30pb)	Para 15/15 espaciadores
Sth-28	15(30pb)	Para 15/15 espaciadores
Sth-30	20(30pb)	Para 20/20 espaciadores
Sth-33	14(30pb)	Para 14/14 espaciadores
Sth-34	14(30pb)	Para 14/14 espaciadores
Sth-39	12(30pb)	Para 12/12 espaciadores

La continuación de este estudio será importante para llegar a conocer mejor las cepas empleadas por industrias de nuestra región, de manera de poder definir específicamente estrategias destinadas a mejorar la resistencia a fagos de fermentos comerciales, con beneficios económicos importantes para la industria láctea fermentativa.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., & Reinheimer, J. (2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 177, 177-192.
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International journal of food microbiology*, 126(3), 274-277
- Halász, A. (2009). Lactic acid bacteria. *Food quality and standards*, 3, 70-82.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci*, 1(3), 1-13
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en discapacidad*, 5(2), 116-128.
- Marcó, M. B., Moineau, S., & Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2(3), 149-158.
- Pujato, S. A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. J. (2019). Bacteriophages on dairy foods. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 14-30.