



PRESENCIA Y DIVERSIDAD DE SISTEMAS CRISPR-CAS EN LOS GENOMAS DE CEPAS DE LACTOBACILOS DEL GRUPO *casei*

Galliani, Valentina

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

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Lactobacillus* del grupo *casei*; CRISPR-Cas; bacteriofagos.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL), ampliamente utilizadas en la industria láctea como cultivos iniciadores de la fermentación, incluyen especies empleadas como probióticos (Curry y Crow, 2003). Los fagos son virus que infectan bacterias, y las BAL no están exentas de sus ataques, que pueden bloquear fermentaciones industriales, alterando la calidad del producto, disminuyendo la producción y provocando pérdidas económicas (Rodríguez González y col., 2010). La industria aplica medidas para minimizar las infecciones, pero ninguna es 100% efectiva. La rotación de cultivos, aplicada a cultivos iniciadores, no sirve para cultivos probióticos (cepas con características únicas), por lo que se apunta a obtener derivados de la cepa original resistentes a fagos (Leenay y Beisel, 2017). Hoy se conocen diversos mecanismos de resistencia, de los cuales CRISPR-Cas son los últimos descubiertos y probablemente los más importantes (Makarova y col., 2011). Se trata de sistemas inmunes adaptativos, heredables, exclusivos de procariotas, constituidos por secuencias de ADN repetitivas, cortas y altamente conservadas (repeticiones), intercaladas con secuencias variables (espaciadores), y genes asociados a CRISPR (*cas*) (Fig.1) (McGinn y Marraffini, 2016). Los espaciadores se incorporan a partir de virus (donde se denominan protoespaciadores) durante una infección, o de plásmidos. *Streptococcus thermophilus* posee sistemas CRISPR activos, cuyo estudio permitió obtener cepas fagorresistentes para uso industrial (Horvath y col., 2012), pero otras BAL, entre ellas los lactobacilos probióticos, han sido menos estudiadas.

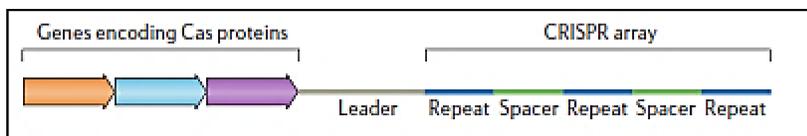


Figura 1: Estructura básica del locus CRISPR-cas. (—) repeticiones; (—) espaciadores

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

OBJETIVOS

Estudiar la presencia y diversidad de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*), que incluye cepas probióticas.

METODOLOGÍA

Con el fin de: I) encontrar secuencias CRISPR en *Lactobacillus* del grupo *casei*, II) identificar las secuencias líder y PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), III) agrupar las cepas en *clusters* de acuerdo al tipo de estructuras presentes, y IV) alinear las secuencias agrupadas con el fin de diseñar *primers* y amplificar sistemas CRISPR-Cas en cepas de la colección del INLAIN, se emplearon las bases de datos CRISPRdb e IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>). Las secuencias se alinearon utilizando *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Diseño de primers, amplificación y secuenciación de región CRISPR y genes *cas* en cepas de la colección del INLAIN

Se diseñaron *primers* específicos sobre secuencias conservadas, para detectar y amplificar los arreglos CRISPR y genes *cas1* y *cas9*, en 40 cepas del grupo *casei* (de colección, comerciales y salvajes) presentes en el cepario del INLAIN. Las reacciones de PCR se realizaron en 50 μ L, con el siguiente programa: 94 °C / 3 min (1 ciclo); 94 °C / 30 s + 55 °C / 30 s + 72 °C / 5 min (40 ciclos); 72 °C / 10 min (1 ciclo). Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v), teñidos con GelRed™, visualizados en transiluminador UV, purificados con el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma Aldrich) y secuenciados en Macrogen (Corea).

RESULTADOS

Relevamiento y análisis bioinformático de secuencias CRISPR

Se identificaron 16 cepas con al menos una secuencia CRISPR (11 *L. paracasei* y 5 *L. rhamnosus*). El número de repeticiones fue variable (1-46), con secuencias muy conservadas y similares entre *L. paracasei* (5'-CTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC-3') y *L. rhamnosus* (5'-GTTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC-3'), con solo 3 bases diferentes de 36. Los genes *cas* encontrados (*casn*, *cas1*, *cas2* y *cas9*) fueron muy conservados en *L. paracasei*, con identidad >90% con respecto a *Lb. paracasei* BL23, y menor para las cepas de *L. rhamnosus* (<71%), a excepción de *Lb. rhamnosus* Lc 705 (identidad = 99 %).

Determinación de las secuencias líder y PAM

El análisis informático ubicó a la secuencia líder, como se esperaba, entre los arreglos de repeticiones-espaciadores y el gen *casn2*. El alineamiento indicó 84% de similitud entre las secuencias líder de *L. rhamnosus* y *L. paracasei*. La secuencia PAM deducida del alineamiento de las regiones adyacentes a protoespaciadores fue 5'-NGAA-3' o 3'-TTCN-5'. Las secuencias PAM y líder se orientaron de modo inverso al alinear protoespaciadores y espaciadores.

Cepas que contienen el sistema CRISPR-Cas en su ADN cromosómico

Más del 50% de las cepas (21/40), tanto de *L. paracasei* (17/34) como de *L. rhamnosus* (4/6), poseen regiones CRISPR completas (Tabla 1). Las repeticiones, siempre de 36 pb, fueron muy

conservadas en cepas de *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, con solo 3 bases distintas entre ambas especies. Su número fue variable (10-26). Del total, 5 cepas de *L. paracasei* y 2 de *L. rhamnosus* presentaron repeticiones homólogas a secuencias reportadas de plásmidos y fagos.

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	+	+	+
	A13	+	+	+
	A14	+	+	+
	ATCC 25302	-	-	-
	ATCC 27092	+	+	+
	ATCC 27139	+	+	+
	Bio	+	+	+
	CNRZ 1308	-	-	-
	CNRZ 1976	-	-	-
	CNRZ 318	+	+	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	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	+	+	+	
	ATCC 7469	-	-	-
	CNRZ 1224	+	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	INL1	+	+	+
	INL2	+	+	+
	PR	+	+	+
	90	-	-	-

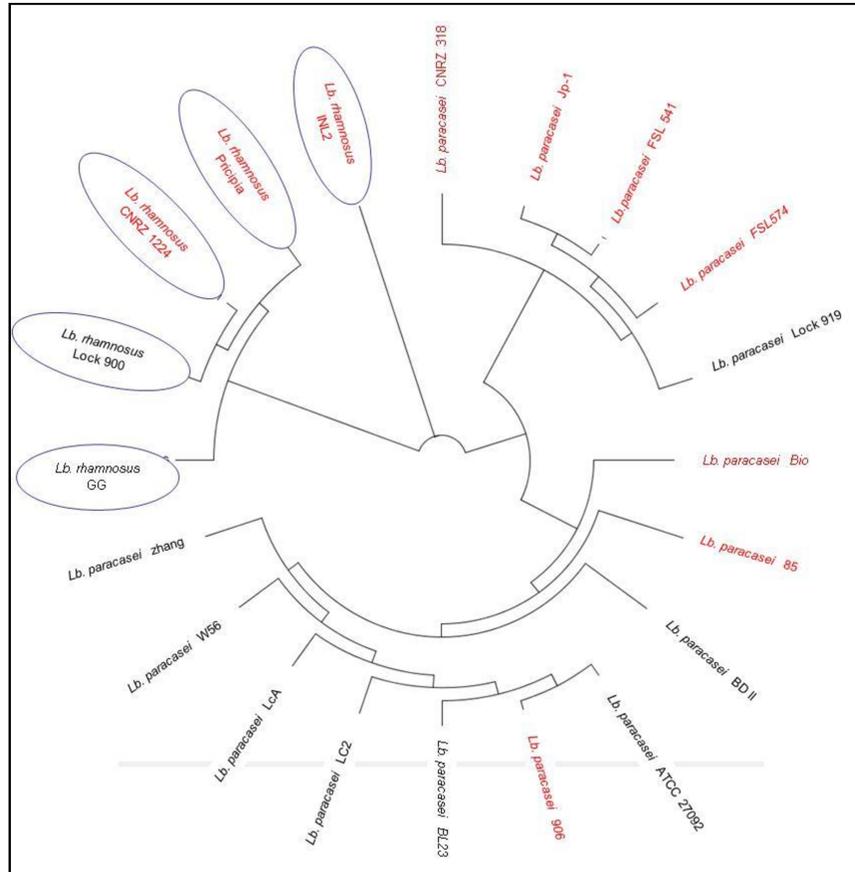


Figura 2. Árbol filogenético basado en *cas1*

CONCLUSIONES

Los resultados indican que los sistemas CRISPR hallados en 21 cepas de *L. paracasei* y *L. rhamnosus* podrían estar activos, ya que poseen regiones CRISPR completas, y algunos de ellos poseen espaciadores homólogos a fagos y plásmidos de lactobacilos. Posteriores estudios de interferencia confirmarán si estos sistemas CRISPR se encuentran efectivamente activos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Curry, B. y Crow, V.** (2003). *Lactobacillus* spp. En Encyclopedia of Dairy Sciences. Ed. por Roginski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F. Academic Press. Imprint of Elsevier Science. p. 1479-1511.
- 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.
- McGinn, J. y Marraffini, L.A.** 2016. "CRISPR-Cas Systems Optimize Their Immune Response by Specifying the Site of Spacer Integration". *Molecular Cell*, nº64, pp. 1-8.
- Rodríguez González, A.; García, P. y Raya, R.R.** (2010) Bacteriophage of lactic acid bacteria. En: Biotechnology of lactic acid bacteria (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.), Blackwell Publishing, Iowa, USA, p. 111-123.