

OPTIMIZACIÓN DE TRANSFORMACIÓN DE CEPAS DE *LACTICASEIBACILLUS* PARA SER UTILIZADAS COMO HERRAMIENTA GENÉTICA A FIN DE EVALUAR LA ACTIVIDAD DE SISTEMAS CRISPR

Simonutti, Antonella

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET)

Directora: Pujato, Silvina

Co-directora: Quiberoni Andrea

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Lacticaseibacillus*; CRISPR-Cas; transformación.

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). Se conocen diversos mecanismos de resistencia, siendo CRISPR-Cas 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.

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio con una amplia variedad de cepas de *Lacticaseibacillus*, confirmaron la abundancia del sistema tipo IIA en comparación con los demás sistemas, y revelaron que los genes *cas1*, *cas2* y *csn2* están muy conservados entre cepas de la misma especie, mientras que *cas9* presenta mayor variabilidad, reflejada principalmente en el dominio que interactúa con el Motivo Adyacente al Protoespaciador (PAM) (Pujato y col., 2021). Estos resultados preliminares nos podrían estar indicando que la eficiencia del sistema dependería de *cas9*, por lo que el análisis de la actividad del sistema CRISPR tipo IIA mediante ensayos de interferencia permitiría seleccionar las cepas que posean un sistema CRISPR más activo y eficaz.

Los ensayos de interferencia consisten en transformar bacterias lácticas con un plásmido que incluye un fragmento de secuencia igual al que tienen dichas BAL en el *locus* CRISPR. Si el sistema se encuentra activo, las BAL reconocerán dichas secuencias y activarán el sistema CRISPR, degradando el plásmido incorporado. La relación entre las transformantes con un plásmido genérico versus aquellas transformadas con el plásmido *target* permitirá determinar la actividad de los sistemas CRISPR en dichas BAL.

Título del proyecto: Tecnología de inmunización natural de bacterias: Cultivos más robustos para la industria.

Instrumento: Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT)

Año convocatorio: 2019

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Silvina Pujato

OBJETIVOS

Optimizar la transformación de 9 cepas de *Lacticaseibacillus* que contienen sistemas CRISPR- Cas, como paso necesario para la realización de los ensayos de interferencia antes descriptos.

METODOLOGÍA

Con el fin de optimizar las condiciones de transformación de cepas de *Lacticaseibacillus* (Tabla 1): I) Se realizaron ensayos con eritromicina, cloranfenicol y ampicilina para encontrar la concentración de antibiótico inhibitoria para cada cepa en estudio. II) Se seleccionó el plásmido pNZ123 que posee origen de replicación para *Escherichia coli* y BAL y un gen de resistencia a cloranfenicol. III) Se prepararon células competentes, y IV) se transformaron las diferentes cepas variando las condiciones de transformación (voltaje y resistencia).

RESULTADOS

Concentración inhibitoria mínima de antibiótico

Como se observa en la Tabla 1, la concentración inhibitoria mínima de antibiótico fue evaluada para todas las cepas en estudio, siendo 2,5 µg/mL ampicilina, 15 µg/mL cloranfenicol y 5 µg/mL eritromicina, las concentraciones mínimas que lograron inhibir la totalidad de las cepas con la excepción de la cepa *Lb. rhamnosus Principia*, que fue resistente a todas las concentraciones de eritromicina analizadas, y la cepa *Lb. paracasei* 906 que se inhibió con una concentración de 15 µg/mL de eritromicina.

Tabla 1. Resultados de inhibición por antibióticos; Amp (ampicilina), Erit (eritromicina), CM (cloranfenicol). La presencia de crecimiento se indica con un +.

Cepa/ATB (µg/mL)	Amp 2,5	Amp 5	Erit 2,5	Erit 5	Erit 15	CM 2,5	CM 5	CM 15
<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lb. paracasei</i> Bio	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Lb. rhamnosus</i> CNRZ 1224	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i> CNRZ 318	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i> JP-1	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Lb. rhamnosus</i> Principia	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Lb. paracasei</i> 85	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> FSL 541	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lb. paracasei</i> 906	-	-	+	+	-	+	+	-

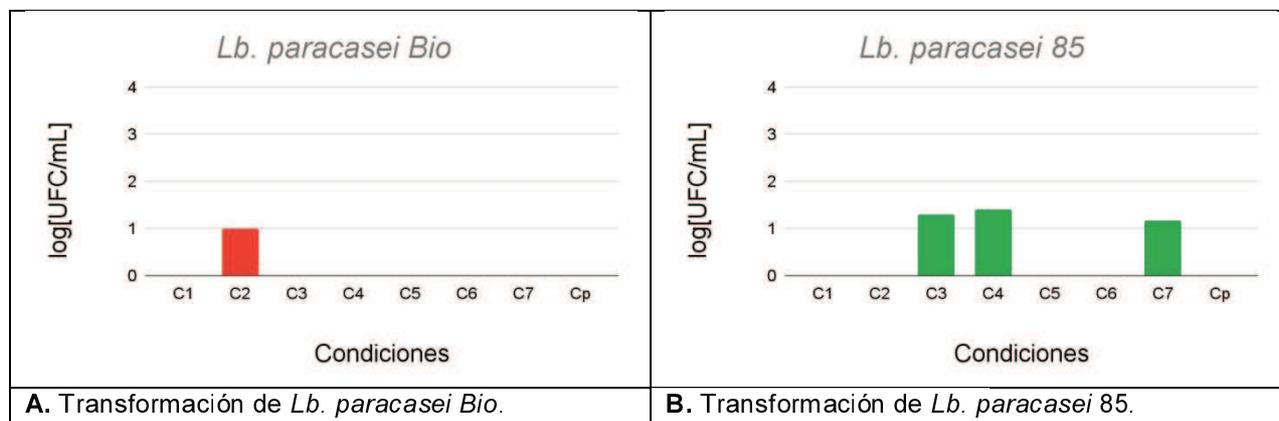
Optimización de la transformación

Se evaluaron distintas condiciones de transformación (Tabla 2) para cepas de *Lacticaseibacillus*, siendo la condición 4 la óptima para las cepas *Lb. paracasei* 85 (Figura 1B), *Lb. paracasei* 906 (Figura 1C), *Lb. paracasei* 318 (Figura 1D), y la condición 2, la óptima para *Lb. paracasei* Bio (Figura 1A). Para el resto de las cepas en estudio, se logró obtener transformantes en la C2 y C4 en medio líquido con 15 µg/mL de cloranfenicol. Si bien, fue posible transformar todas las cepas, la eficiencia de transformación fue baja para la

mayoría de ellas, lo que muestra una baja estabilidad del plásmido utilizado. El plásmido pNZ123 posee un origen de replicación para BAL del tipo *Rolling Circle* (Kleinschmidt y col, 1993). A pesar de que este ORI es el más utilizado en BAL, es posible que no sea estable en las cepas de *Lacticaseibacillus* con baja eficiencia de transformación, debido a que dichas cepas pueden poseer plásmidos propios con el mismo ORI. El uso de plásmidos con origen de replicación tipo Theta, sería una opción para aumentar la estabilidad (Pérez-Arellano y col. 2001). A su vez, es posible que el crecimiento acelerado de las cepas de *Lacticaseibacillus* genere inestabilidad en los plásmidos, favoreciendo la pérdida de los mismos. El uso de temperaturas inferiores a las óptimas para dicho género y el empleo de medios de cultivos sin dextrosa, podrían desacelerar el crecimiento permitiendo mayor estabilidad del plásmido y, por ende, un aumento en la eficiencia de transformación (Pérez-Arellano y col. 2001).

Tabla 2: Condiciones de electroporación.

Condición	Voltaje (Volt)	Resistencia (Ohm)
C1	1200	100
C2	1700	200
C3	1700	300
C4	1700	400
C5	2000	400
C6	1250	300
C7	2500	200
Cp	Controles sin plásmido	



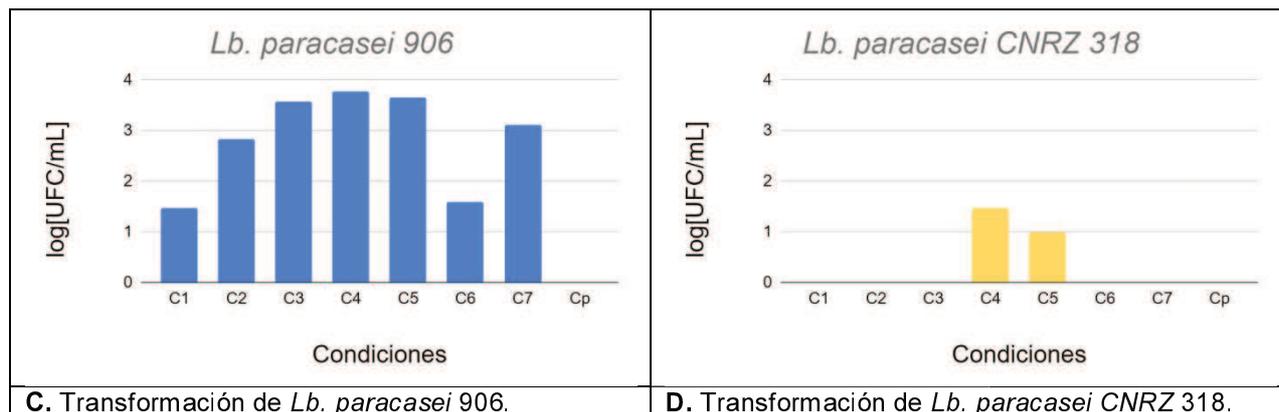


Figura 1: Transformación de *Lacticaseibacillus*

CONCLUSIONES

La concentración de cloranfenicol mínima que logró inhibir la totalidad de las cepas en estudio fue de 15 µg/mL. A su vez, la condición que logró una mayor eficiencia de transformación para la mayoría de las cepas fue aquella en la que se utilizaron 1700 V y 400 Ohm. Futuros estudios utilizando otros plásmidos y medios de cultivos nos permitirán obtener una mejor eficiencia de transformación para las cepas de *Lacticaseibacillus*.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Barrangou R, Horvath P. 2012.** CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification. Annual Review of Food Science and Technology 3. p 143-162.
- Crawley A.B, Henriksen E.D, Stout E, Brandt K y Barrangou R. 2018.** Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. Scientific Reports. 8, 11544 (2018) doi:10.1038/s41598-018-29746-3.
- Curry B. y Crow, V. 2003.** *Lactobacillus spp.* Encyclopedia of Dairy Sciences. Ed. por Roginski, H; Fuquay J.W. y Fox, P. F. Academic Press. Imprint of Elsevier Science. p.1479-1511
- Goh Y.J y Barrangou R. 2019.** Harnessing CRISPR-Cas systems for precision engineering of designer probiotic lactobacilli. Current Opinion in Biotechnology, 56C. p163-171.
- Kleinschmidt, J.B, Soeding, M. Teuber, and H. Neve. 1993.** Evaluation of horizontal and vertical gene transfer and stability of heterologous DNA in *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt and yogurt starter cultures. Syst. Appl. Microbiol.16. p. 287–295.
- Kok J, van der Vossen J.M, Venema G. 1984.** Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 48:726-31.
- Leenay R.T, Beisel C.L. 2017.** Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. Journal of molecular biology 429. p. 117-191.
- Pérez-Arellano I, Zúñiga M, y Pérez-Martínez G. 2001.** Construction of Compatible Wide-Host-Range Shuttle Vectors for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli*. Plasmid. 46. 106-16.
- Pujato S, Galliani V, Irazoqui J.M, Amadío A, Quiberoni A, Mercanti D. 2021.** Analysis of CRISPR systems of types II-A, I-E and I-C in strains of *Lacticaseibacillus*, International Dairy Journal, Volume 118.
- Pujato S.A, Quiberoni A, Mercanti D. 2019.** Bacteriophages on Dairy Foods. Journal Of Applied Microbiology 126,14–14.
- Rodríguez González A, García P, y Raya, R.R. 2010.** Bacteriophage of lactic acid bacteria. Biotechnology of lactic acid bacteria (Eds.: Mozzi, F; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.), Blackwell Publishing Iowa, USA. p. 111-123.