

## TECNOLOGÍA DE INMUNIZACIÓN NATURAL DE BACTERIAS: CULTIVOS MÁS ROBUSTOS PARA LA INDUSTRIA.

**Simonutti, Antonella**

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

Director: Pujato, Silvina

Co-director: Quiberoni, Andrea

Área: Ciencias Biológicas

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

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) son ampliamente utilizadas en la industria láctea como cultivos iniciadores de la fermentación. Algunas especies de BAL también se emplean como probióticos (Curry y Crow, 2003). Estas bacterias son atacadas por fagos, que son virus que infectan bacterias. Estos ataques pueden bloquear las fermentaciones industriales, afectar la calidad del producto, reducir la producción y causar pérdidas económicas (Rodríguez González y col., 2010). Para evitar infecciones, la industria toma medidas para minimizar los ataques de fagos. No obstante, ninguna de estas medidas es completamente efectiva. Se suele aplicar la rotación de cultivos para los cultivos iniciadores, pero esta estrategia no es válida para los cultivos probióticos, que poseen características únicas. Por tanto, se busca obtener derivados de la cepa original que sean resistentes a los fagos (Leenay y Beisel, 2017).

Entre los diversos mecanismos de resistencia conocidos, los sistemas CRISPR-Cas son los más recientes y probablemente los más importantes (Makarova y col., 2011). Estos sistemas inmunes adaptativos y heredables son exclusivos de procariontes. Como se observa en la

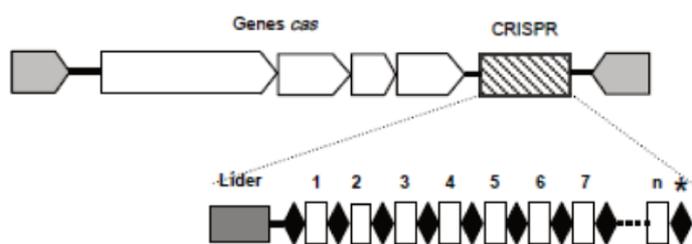


Figura 1, se componen de secuencias de ADN repetitivas cortas y altamente conservadas (repeticiones), junto con secuencias variables (espaciadores) y genes asociados a CRISPR (cas). Los espaciadores se incorporan a partir de virus (a los que se les denomina protoespaciadores) durante una infección, o de plásmidos.

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

repeticiones directas (◆) y espaciadores (□).

El asterisco indica la repetición terminal.

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

Directora: Silvina Pujato

En nuestro laboratorio, se realizaron estudios preliminares con diversas cepas de *Lactocaseibacillus*. Se confirmó que el sistema tipo IIA es abundante en comparación con otros sistemas, y se observó que los genes cas1, cas2 y csn2 están altamente conservados entre cepas de la misma especie, mientras que cas9 muestra mayor variabilidad (Pujato y col., 2021). A pesar de estos hallazgos, aún no se tiene información sobre la actividad de los sistemas CRISPR en estas BAL ni sobre su eficiencia. Por esta razón, en el presente estudio se plantea evaluar la actividad de los sistemas CRISPR en las cepas de *Lactocaseibacillus* bajo investigación mediante ensayos de interferencia. Los ensayos de interferencia consisten en transformar bacterias lácticas con un plásmido que contiene un fragmento de secuencia idéntico al que tienen las BAL en el locus CRISPR. Si el sistema está activo, las BAL reconocerán estas secuencias y activarán el sistema CRISPR, lo que llevará a la degradación del plásmido incorporado. Comparando las transformantes con un plásmido genérico y aquellas transformadas con el plásmido objetivo, será posible determinar la actividad de los sistemas CRISPR en dichas BAL.

## OBJETIVOS

Evaluar la actividad de los sistemas CRISPR-Cas en las cepas de *Lactocaseibacillus* bajo investigación mediante ensayos de interferencia.

## METODOLOGÍA

Diseño y construcción del vector para los ensayos de interferencia: Para evaluar la maquinaria natural del sistema CRISPR-Cas de cada cepa, se diseñaron insertos, que fueron incorporados en el plásmido pNZ123. Los insertos se presentan en la Tabla 1, cada uno contiene un espaciador (en negro), la secuencia PAM (en celeste, a la derecha) y sitios de corte para enzimas (azul). La secuencia PAM (Motivo adyacente al protoespaciador) utilizada en este ensayo, fue la determinada por Crawley y col. (2018). Para su diseño se analizaron las secuencias CRISPR de las cepas *Lb. paracasei* 906 y *Lb. paracasei* 85. El inserto 906sp1 contiene el espaciador más cercano a la secuencia líder de la cepa *Lb. paracasei* 906, el inserto 906sp1mut corresponde al mismo espaciador con una mutación (en rosado), el inserto 906sp7 contiene el séptimo espaciador (contando desde la líder) de la misma cepa y el inserto 85sp1 tiene el espaciador más cercano a la secuencia líder de la cepa *Lb. paracasei* 85.

**Tabla 1:** Insertos

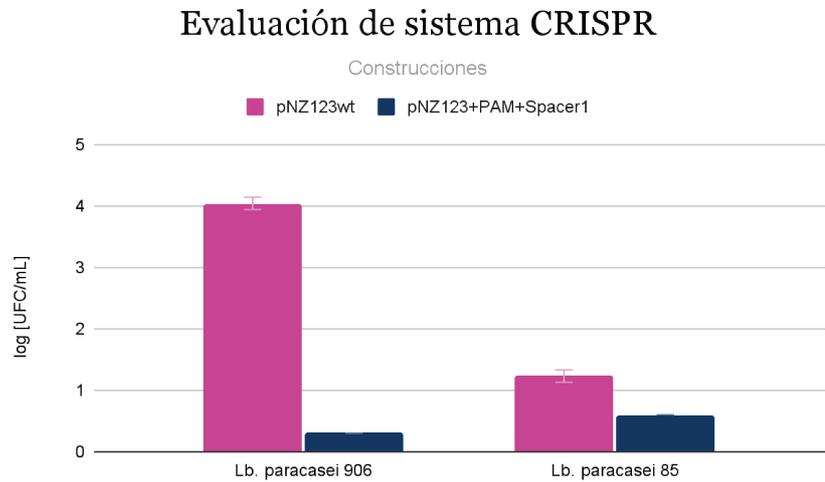
| Nombre de inserto | Secuencia                                     |
|-------------------|---|
| 906sp1            | TCGACCACCAATGACGATTTTCATTAGTGCTGGGTGAAAAAATT  |
| 906sp1mut         | TCGACCACCAATGACGATTTCCCTTAGTGCTGGGTGAAAAAATT  |
| 906sp7            | TCGAAAACCTGCCTTCCGTTGCGATCAACTCGCGCTGAAAAAATT |
| 85sp1             | TCGAGGTGATACCCCTGCCCTTCGCATGACAACATGAAAAAATT  |

Ensayos de interferencia: Se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Crawley y col. (2018). En dicho ensayo las cepas en estudio se transformaron con el plásmido pNZ123 + PAM + espaciador (pNZ123+PAM+Spacer) y con el plásmido pNZ123 sin modificar (pNZ123<sub>wt</sub>), y se incubaron por 48 hs en MRS-agar-cloranfenicol. La diferencia entre la cantidad de colonias crecidas cuando la cepa fue transformada con el plásmido pNZ123<sub>wt</sub> en

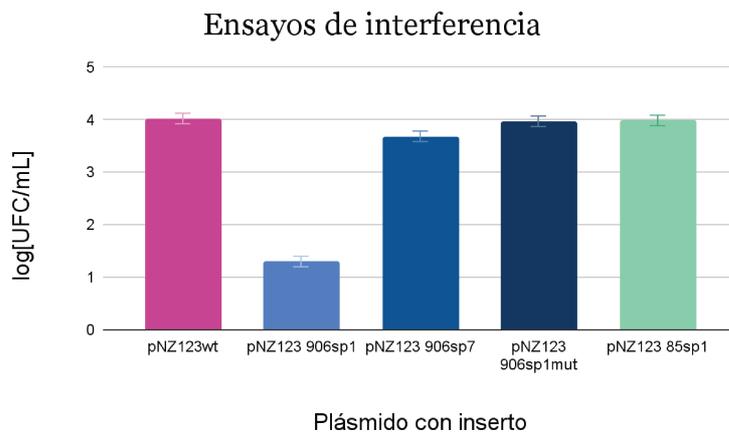
comparación con pNZ123+PAM+Spacer, demostró la eficiencia que tienen las cepas para degradar ADN exógeno.

## RESULTADOS

Como puede observarse en la Figura 2, cuando la cepa *Lb. paracasei* 906 se transformó con el plásmido pNZ123<sub>wt</sub> (sin inserto), crecieron  $1,1 \times 10^4$  UFC/mL, sin embargo, cuando se transformó con el plásmido pNZ123<sub>906sp1</sub>, sólo lograron crecer 2 UFC/mL. Esta diferencia demostró que la cepa posee el sistema CRISPR activo. Cuando la cepa *Lb. paracasei* 85 fue transformada con el plásmido pNZ123<sub>wt</sub> y pNZ123<sub>85sp1</sub> lograron crecer 17 UFC/mL y 4 UFC/mL respectivamente.



**Figura 2:** Evaluación de la eficacia del sistema CRISPR.



**Figura 3:** Resultados de los ensayos de interferencia.

Como se puede apreciar en la Figura 3, al transformar la cepa *Lb. paracasei* 906 con el plásmido pNZ123<sub>wt</sub>, se observó un crecimiento de  $> 1 \times 10^4$  UFC/mL. Un crecimiento similar se observó cuando *Lb. paracasei* 906 fue transformada con los plásmidos pNZ123<sub>906sp1mut</sub> y pNZ123<sub>85sp1</sub>. Sin embargo, al transformar la cepa *Lb. paracasei* 906 con pNZ123<sub>906sp1</sub> y pNZ123<sub>906sp7</sub>, se obtuvo un crecimiento de 20 UFC/mL y  $4,88 \times 10^3$  UFC/mL,

Debido a la alta actividad del sistema CRISPR en la cepa *Lb. paracasei* 906, se realizaron repeticiones de ensayos de interferencia utilizando plásmidos con diferentes espaciadores de la cepa, con el propósito de evaluar la eficacia del sistema CRISPR en relación con la distancia del espaciador a la secuencia líder y las mutaciones presentes en los espaciadores.



respectivamente. Estos resultados sugieren que cuando la cepa *Lb. paracasei* 906 es transformada con el plásmido que contiene el primer espaciador, lo reconoce y lo degrada casi por completo. En cambio, cuando se transforma con el plásmido que posee el espaciador 7, la degradación es menos eficiente. Esto demuestra que la distancia a la secuencia líder es un factor crucial para la efectividad del sistema CRISPR. Además, cuando el espaciador 1 tuvo una mutación, el sistema CRISPR de la bacteria en estudio no lo reconoció y no fue capaz de degradar el ADN, lo que sugiere que cualquier mutación en los fagos podría generar resistencia nuevamente al sistema CRISPR.

### CONCLUSIONES

La cepa *Lb. paracasei* 906 presentó mayor actividad CRISPR tipo II-A que la cepa *Lb. paracasei* 85. Los ensayos de interferencia con distintos espaciadores mostraron que aquellos más cercanos a la secuencia líder generan una mayor interferencia. A su vez, una mutación en el espaciador 1, causa que no se genere la interferencia. Estos resultados son prometedores, ya que el estudio de los sistemas CRISPR permitirá diseñar cepas probióticas de *Lactocaseibacillus* con la resistencia a fagos mejorada.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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, Crow V, 2003.** *Lactobacillus* spp.: general characteristics. In: Roginski, H., Funquay, J., Fox, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press (1511), pp. 1479.
- Makarova, Haft, Barrangou, Brouns, Charpentier, Horvath, Koonin, 2011.** Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6): 467-477.
- Pujato S, Galliani V, Irazoqui JM, Amadio A, Quiberoni A, Mercanti D. 2021.** Analysis of CRISPR systems of types II-A, I-E and I-C in strains of *Lactocaseibacillus*, *International Dairy Journal*, Volume 118.
- Rodríguez G, García, 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, 111-123.

