

CURSO INTERNACIONAL



Secuenciación y Análisis de Datos Genómicos para la Detección Microbiológica de Enfermedades transmitidas por Alimentos y Aguas

Análisis de la diversidad de los genes Cas5 y Cas7 del sistema CRISPR-Cas en diferentes géneros bacterianos

Layla Paola Chmeit Rangel

Centro de Cálculo Científico de la Universidad de Los Andes (CeCalCULA)

U.L.A. Mérida - Venezuela





Caracas, Noviembre 2023





Como estudiante de la Lic. En Biología de la U.L.A. he tenido la oportunidad de enriquecer mi formación académica en diferentes áreas, siendo las que mayor interés me despiertan, la biología celular, genética y microbiología. He sido parte en varios proyectos, siendo los más relevantes el diseño de alimentos para truchas en base de larvas de la mosca *Hermetia illucens*, y las pasantías en el laboratorio DIAGEN, donde desarrollé diferentes técnicas de bioquímica e inmunología.

El centro de cómputo científico de la Universidad de los Andes (CeCalCULA), ha llevado a cabo diversos estudios de parásitos que afectan a gran variedad de especies incluyendo los humanos, desde un enfoque de biología computacional. Entre los patógenos que han sido investigados, se encuentran el *Plasmodium, Leishmania, Trypanosoma,* y diferentes hemoparásitos en bovinos, además de virus como Herpes, influenza y VIH. Estos estudios se llevan a cabo mediante el procesamiento de datos moleculares en ramas de la epidemiología, evolución y genética de poblaciones molecular, siendo cruciales para comprender, prevenir y controlar enfermedades infecciosas, desarrollar tratamientos y vacunas, mejorar la vigilancia epidemiológica, así como, garantizar la seguridad alimentaria y contribuir a la salud pública global.



En el trabajo que actualmente estoy desarrollando en CeCalCULA, nos planteamos la meta de diseñar un sistema que permita la identificación y clasificación de diferentes bacterias psicrófilas mediante el sistema CRISPR-Cas, debido a que los estudios previos han demostrado que el marcador 16S no ha permitido diferenciar con suficiente precisión las especies de bacterias psicrófilas en el laboratorio.



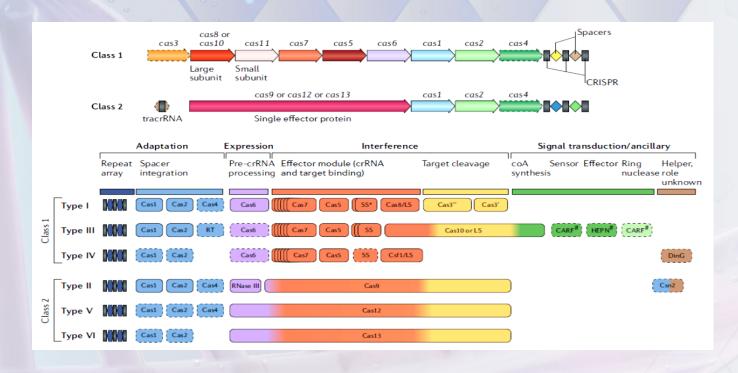
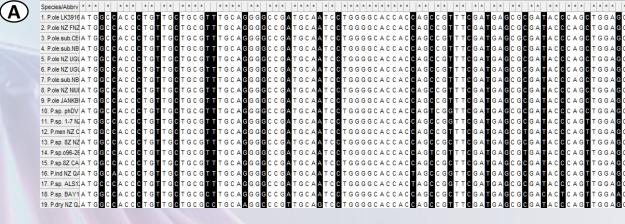


Figura 1. Representación y clasificación de la matriz CRISPR-Cas. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Koonin, E. V. (2019). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology.

En el estudio preliminar se trabajó con 8 géneros bacterianos incluvendo organismos psicrófilos y mesófilos, donde se buscó identificar el tipo de sistema CRISPR mayor representado, siendo la clase 1 y el subtipo I el más abundante, este sistema tiene a su vez una clasificación en 9 subtipos que se basa en la agrupación por similitud de secuencia de proteínas efectoras, así como por la comparación de organizaciones de loci y las secuencias repetidas (figura 1). El subtipo I-E se encontraba representado en los 8 géneros evaluados.







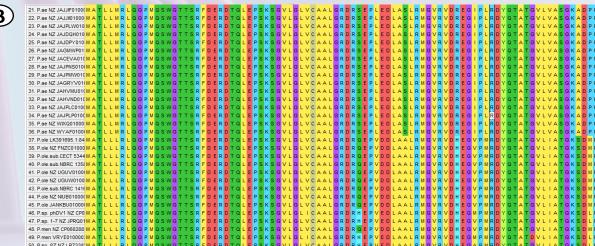


Figura 2. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) del gen *Cas5* de diferentes especies del género Pseudomonas.

Al analizar los genes cas5 y cas7 encontramos que son altamente conservados en cada género (figura 2A), especialmente en la región inicial. Para determinar qué papel juega la selección natural sobre la conservación de estas regiones encontramos que posiblemente existen presiones selectivas tanto positivas como negativas sobre estas proteínas.

Principalmente encontramos una alta acumulación de mutaciones sinónimas (selección negativa) lo que se evidencia en una gran similitud entre proteínas de diferentes especies (figura 2B), seguramente relacionadas a su función. La diversidad encontrada está principalmente representada por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), quizás estas variaciones en la matriz CRISPR estén asociadas por el estilo de vida de la bacteria y sus bacteriófagos.

Estos resultados nos dan indicios para plantearnos regiones de interés en la matriz CRISPR que nos permitan diseñar un sistema molecular para clasificar las especies bacterianas de ambientes psicrófilos y mesófilos.





El análisis genómico haciendo uso de la secuenciación de nueva generación desempeña un papel fundamental en la identificación y caracterización de bacterias en diversos entornos, permitiendo la distinción de cepas altamente similares y brindando una comprensión profunda de sus características genéticas y evolutivas.

Esto resulta esencial para la identificación de genes relacionados con la adaptación a condiciones extremas, como en nuestro caso a bajas temperaturas, y su impacto en el estilo de vida microbiano en entornos desafiantes. La metagenómica se vuelve invaluable al investigar comunidades microbianas complejas, como las presentes en ambientes psicrófilos, ya que posibilita el análisis del ADN de múltiples organismos sin la necesidad de cultivarlos en el laboratorio. Estas técnicas y enfoques, que serán desarrollados en este curso, sientan las bases para una investigación más precisa y profunda, proporcionando una oportunidad para abordar los desafíos biotecnológicos emergentes de forma más capacitada. Además, la comprensión del sistema CRISPR-Cas en entornos extremos y la influencia de los fagos en la variación del mismo ofrecen la posibilidad de obtener información valiosa sobre su dinámica en diferentes ecosistemas. Es importante destacar que este enfoque no solo es relevante para la investigación en entornos extremos, sino que también puede extrapolarse a la identificación y caracterización de bacterias patógenas, lo que puede contribuir significativamente a la prevención y el control de enfermedades infecciosas.