

Informe final publicable de proyecto

Diseño racional de vectores para la implementación de *Pseudomonas* y *Arthrobacter* psicrófilas en la construcción de bibliotecas metagenómicas funcionales especialmente diseñadas para la identificación de enzimas psicrófilas

Código de proyecto ANII: FCE_3_2018_1_148885

06/10/2021

AMARELLE LARROSA, Vanesa (Responsable Técnico - Científico)

ROLDÁN REVUELTA, Diego (Investigador)

FABIANO GONZÁLEZ, Elena (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

La metagenómica funcional es una técnica que permiten acceder a la información genética de una comunidad sin la necesidad de cultivar en el laboratorio cada una de las bacterias que la componen. Se basa en la obtención de la información genética de la comunidad (ADN metagenómico), el cual se introduce en una bacteria de laboratorio (hospedero). El hospedero por excelencia es *Escherichia coli*, quien debe reconocer e interpretar correctamente el fragmento de ADN metagenómico introducido, y así adquirir nuevas capacidades (ej., actividades enzimáticas). Uno de los grandes sesgos de la técnica es que *E. coli* no siempre es capaz de reconocer e interpretar el ADN introducido, y por lo tanto no es capaz de producir nuevas enzimas de interés. Para sortear este problema se está avanzando en el uso de hospederos distintos a *E. coli*.

Para poder introducir fragmentos de ADN en una bacteria, debemos tener las herramientas moleculares necesarias que nos permitan trabajar con esa bacteria. En este proyecto nos propusimos diseñar algunas de estas herramientas para poder usar como hospederos alternativos a *Pseudomonas* y *Arthrobacter* aisladas de la Antártida. Estas bacterias tienen la particularidad de crecer a bajas temperaturas (bacterias psicrófilas). ¿Por qué bacterias psicrófilas? Porque nos interesa buscar actividades enzimáticas que puedan funcionar a bajas temperaturas (enzimas psicrófilas).

Las enzimas psicrófilas pueden trabajar a temperatura ambiente, siendo muy codiciadas en algunos procesos biotecnológicos. ¿Por qué? Porque realizar un proceso a temperatura ambiente es más económico porque no se precisa energía para calentar los reactores. Nuestra hipótesis de trabajo es que al usar hospederos psicrófilos en una aproximación de metagenómica funcional aumentaremos la probabilidad de identificar enzimas psicrófilas de interés biotecnológico.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología molecular en procariotas

Palabras clave: metagenómica funcional / hospederos alternativos / enzimas psicrófilas /

Introducción

La metagenómica funcional como herramienta de bioprospección

La aproximación microbiológica clásica para la búsqueda de enzimas de origen bacteriano se basa en el aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales y en la detección de la actividad enzimática de interés. Esta aproximación tiene la limitante del bajo número de especies bacterianas que se estiman son capaces de ser cultivadas (alrededor del 1%) (Ekkers, Cretoiu, Kielak, & Elsas, 2012). Es así que surge la metagenómica, un conjunto de técnicas capaces de abordar la diversidad presente en una comunidad sin la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que la componen. La metagenómica funcional (Fig. 1) se basa en el aislamiento de ADN genómico a partir de muestras de ambientes de interés y la construcción de bibliotecas en bacterias de uso corriente en el laboratorio. Las bibliotecas son posteriormente utilizadas para la búsqueda e identificación de funciones de interés. Esta aproximación tiene como ventajas que no depende de la capacidad de aislar y cultivar microorganismos, que permite acceder a genes posiblemente desconocidos para la función buscada y que se pueden evaluar varias funciones de interés simultáneamente.

Hospederos alternativos

Una de las limitantes que presenta el abordaje de metagenómica funcional es la capacidad del hospedero utilizado (mayormente *E. coli*) de expresar correctamente el ADN metagenómico introducido. Diferencias en la maquinaria transcripcional, traduccional y post-traduccional entre el organismo del cual proviene el ADN y la cepa hospedera son factores que influyen en el éxito de encontrar una función de interés. Por esta razón, la utilización de hospederos alternativos que permitan evaluar las bibliotecas metagenómicas en distintos contextos genómicos es una necesidad (Liebl et al., 2014).

Si bien están surgiendo aproximaciones que contemplan el uso de más de un hospedero, aún son muy pocos los trabajos en este campo. En los casos donde se ha implementado, los resultados demuestran claramente la importancia utilizar distintos hospederos para aumentar la probabilidad de identificar funciones de interés (Craig, Chang, & Brady, 2009; Craig, Chang, Kim, Obiajulu, & Brady, 2010; Iqbal, Craig, & Brady, 2014; Lam, Martens, & Charles, 2018; Li, Wexler, Richardson, Bond, & Johnston, 2005; Wang et al., 2006).

En todos estos ejemplos se utilizaron hospederos mesófilos, que a la hora de expresar genes provenientes de microorganismos extremófilos presentan limitantes aún mayores. Hasta el momento se ha publicado un único trabajo donde desarrollaron un sistema para la utilización de un hospedero extremófilo en la construcción y análisis de bibliotecas metagenómicas (Angelov, Mientus, Liebl, & Liebl, 2009). La utilización de *Thermus thermophilus* para la búsqueda de enzimas hidrolíticas a partir de bibliotecas metagenómicas de muestras de aguas termales y de compost demostró que se identificaron más clones con actividad lipolítica en *T. thermophilus* que en *E. coli* y que la mayoría de las secuencias de ADN metabólicamente activas en *T. thermophilus* no presentaban actividad en *E. coli* (Leis et al., 2015).

Los ambientes fríos como fuente de enzimas con aplicación biotecnológica

Los ambientes fríos son el hábitat de microorganismos especialmente adaptados a vivir en esas condiciones, denominados microorganismos psicrófilos. Estos microorganismos suelen presentar diferentes adaptaciones fisiológicas que le permiten llevar a cabo sus funciones vitales a bajas temperaturas, siendo la producción de enzimas psicrófilas uno de los principales mecanismos (Makhalanyane, Van Goethem, & Cowan, 2016). Si bien las enzimas psicrófilas son capaces de llevar a cabo procesos metabólicos a bajas o muy bajas temperaturas, su temperatura óptima suele ubicarse a temperaturas moderadas haciendo posible su aplicación a temperatura ambiente. Otra ventaja de las enzimas psicrófilas es que no se requirieron temperaturas excesivamente elevadas para inactivarlas en caso de ser necesaria. Estas propiedades son altamente favorables en procesos industriales, haciendo de las enzimas adaptadas al frío una alternativa interesante y de gran impacto en el desarrollo biotecnológico (Feller, 2013). Por estas razones, los ambientes fríos y los microorganismos que lo habitan constituyen un recurso atractivo para la identificación de nuevas enzimas con potencial aplicación biotecnológica (de Pascale, De Santi, Fu, & Landfald, 2012).

Aporte de este proyecto al campo de la metagenómica funcional

La metagenómica funcional ha demostrado ser una herramienta invaluable a la hora de identificar nuevas enzimas y compuestos bacterianos con potencial aplicación biotecnológica. Una de las limitantes que tiene esta aproximación es la dependencia del contexto genómico donde las bibliotecas son construidas a la hora de identificar funciones de interés. Para intentar disminuir este sesgo es que se han comenzado a utilizar hospederos alternativos a *E. coli*, que han demostrado la relevancia del contexto genómico en la identificación de actividades enzimáticas de interés. Esto ha llevado a que la utilización simultánea de varios hospederos en la construcción y análisis funcional de bibliotecas metagenómicas sea una tendencia creciente. A la hora de buscar enzimas o compuestos con actividad biológica a altas temperaturas, realizar el screening funcional en microorganismos mesófilos ha demostrado presentar desventajas con respecto a la utilización de microorganismos termófilos. Análogamente se podría inferir que para buscar enzimas o compuestos con actividad biológica a bajas temperaturas, el uso de microorganismos psicrófilos como hospederos repercute positivamente. Hasta la fecha no se han construido bibliotecas metagenómicas en hospederos psicrófilos, haciendo de éste un campo novedoso y con un gran potencial biotecnológico. Sin duda el diseño racional de herramientas moleculares que permitan la construcción de bibliotecas metagenómicas en hospederos alternativos es una necesidad. Que estas herramientas sean funcionales en hospederos psicrófilos, una ventaja adicional no implementada hasta la fecha.

La hipótesis de este proyecto es que el empleo de bacterias psicrófilas como hospederos en la construcción de metagenotecas funcionales favorecerá el descubrimiento de enzimas psicrófilas de interés biotecnológico. Nos planteamos entonces como objetivo diseñar herramientas adecuados para la implementación de *Pseudomonas* y *Arthrobacter* psicrófilas en la construcción de bibliotecas metagenómicas, lo que sin dudas será un aporte novedoso al conocimiento científico y de gran utilidad en el área de la biotecnología.

Metodología/diseño del estudio

Orígenes de replicación

Un elemento crucial a la hora de pensar en un único vector para la construcción de bibliotecas metagenómicas en distintos hospederos es que sea replicable en todos ellos y que no se integre al genoma del hospedero. Con esta finalidad planteamos el diseño de un vector híbrido basado en los vectores pSEVA (Rafael et al., 2013), vectores modulares que pueden ser diseñados a demanda mediante el intercambio de los distintos módulos. Se caracterizan por un módulo de origen de replicación (existen 9 orígenes de replicación distintos que pueden utilizarse), un módulo de marcador de selección (se puede seleccionar entre 6 genes de resistencia a antibiótico) y otro módulo al que se denomina cargo, el cual puede utilizarse para el clonado, la expresión de proteínas o el análisis de regiones regulatorias. De los 9 orígenes de replicación disponibles, 4 de ellos son replicables tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas* (RK2, pBBR1, pR01600/ColE1 y RSF1010).

Dado que los orígenes de replicación funcionales en bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas no son los

mismos, debemos incluir en la construcción un origen de replicación funcional en *Arthrobacter*. Nuestra estrategia fue agregar el origen de replicación del plásmido pCG100 (Mih??an, 2015), el cual es replicable en *Arthrobacter*, a los vectores pSEVA de manera de generar un vector híbrido que sea replicable en ambos hospederos.

Búsqueda de promotores funcionales

A la hora de evaluar una biblioteca metagenómica desde un enfoque funcional, la correcta expresión de los genes presentes en los fragmentos de ADN introducidos es un requerimiento indispensable (Liebl et al., 2014). Dicha expresión está sujeta, entre otros factores, a la presencia de secuencias promotoras que deben ser reconocidas por la maquinaria transcripcional del hospedero. Como resultado, la expresión de genes en base a secuencias promotoras nativas es un evento que dependerá del hospedero y del origen del ADN introducido (Gabor, Alkema, & Janssen, 2004). Una manera de favorecer la expresión es la utilización de secuencias promotoras reconocidas por el hospedero, las cuales son introducidas en el vector en una posición cercana al sitio utilizado para generar la biblioteca metagenómica.

Nuestra estrategia fue utilizar como aproximación la captura de promotores in vivo (promoter trapping) (Jackson & Giddens, 2006; Rediers, Rainey, Vanderleyden, & De Mot, 2005).

Prueba de concepto

Como prueba de concepto de que el vector híbrido construido es apropiado para la detección de funciones enzimáticas de interés, nuestra estrategia fue utilizar secuencias de ADN que codifican actividades de interés previamente identificadas y evaluar su actividad en los distintos a distintas temperaturas.

Construcción y análisis funcional de bibliotecas metagenómicas utilizando hospederos psicrófilos

Finalmente nos planteamos utilizar los hospederos psicrófilos y las herramientas moleculares generadas para la construcción de bibliotecas metagenómicas y la búsqueda de enzimas psicrófilas con aplicación biotecnológica. Nuestra estrategia implica aislar ADN metagenómico de comunidades bacterianas antárticas, clonarlo en el vector híbrido, e introducirlo en los distintos hospederos. Las bibliotecas metagenómicas serán luego evaluadas en búsqueda de las actividades enzimáticas de interés. Para determinar la importancia del contexto genómico en la función observada, planteamos extraer el plásmido de los clones positivos e introducirlo en el/los otros hospederos.

Resultados, análisis y discusión

Vector híbrido: Logramos construir un vector híbrido con un origen de replicación que ha sido reportado como funcional en *Arthrobacter* y otro funcional en *Pseudomonas*, pero no logramos que sea replicable en *Arthrobacter*.

A partir de la secuencia del plásmido pART2, se diseñaron cebadores específicos para amplificar el origen de replicación pCG100, el cual ha sido reportado como funcional en *Arthrobacter*. Utilizando el plásmido pART2 como molde se pusieron a punto las condiciones de PCR, se purificó el producto y se clonó en el vector pSEVA232. Llamamos a este plásmido híbrido pSEVA232-pCG100 (Fig. 2). Se verificó la presencia del inserto mediante PCR de colonia y se seleccionaron 2 colonias para secuenciar y corroborar la secuencia. Ambas secuencias presentaron un 99% de identidad con el origen pCG100, conteniendo 1% de gaps. Secuenciamos también el origen pCG100 en el plásmido pART2 y verificamos que los gaps también estaban presentes.

Se realizó la puesta a punto de la transformación de *Arthrobacter* mediante electroporación (Luo et al., 2016; Zhang, Li, Chen, Sheng, & An, 2011) con 6 cepas de *Arthrobacter* psicrófilas (Ganzert, Bajerski, Mangelsdorf, Lipski, & Wagner, 2011; Ignacio Ferrés & Ignacio Ferrés, n.d.) sensibles a kanamicina (UYEF1, UYEF2, Cu512, Cu712, Cu723 y *Arthrobacter livingstonensis* LI2T) y el plásmido pART2. Se evaluó la presencia de un origen de replicación tipo pCG100 mediante PCR, ya que la presencia de un plásmido críptico con el mismo origen de replicación que pCG100 resultaría en la incompatibilidad del plásmido pART2 con el plásmido críptico. La cepa UYEF2 fue descartada por este motivo. Se ensayaron varias condiciones de transformación modificando parámetros como la utilización de distintos agentes que desestabilizan la pared celular (penicilina G, lisozima, glicina), utilizando distinta concentración de ADN plasmídico (pART2), y modificando los tiempos de recuperación post-electroporación. En ninguno de los casos se obtuvieron colonias resistentes a Km.

Se intentaron también protocolos de inducción de competencia alternativos. Se probó la realización de lavados sucesivos con agua destilada, así como lavados sucesivos con glicerol 10%. En uno de los intentos, la cepa *Arthrobacter* sp. Cu512 presentó colonias resistentes a Km con una eficiencia muy baja (1×10^2 ufc/ μ g de ADN). Se realizó miniprep de 2 colonias para verificar la presencia del plásmido y se determinó la presencia de un plásmido con un perfil distinto al de pART2. Igualmente se realizó PCR utilizando los primers diseñados para pCG100 para descartar la presencia del origen de replicación. No se observó amplificación sugiriendo que el plásmido presente no era pART2.

Nos planteamos como estrategia alternativa la utilización del vector híbrido pSEVA232-pCG100 para realizar la transformación de *Arthrobacter* mediante conjugación triparental. El plásmido pSEVA232 contiene el OriT que permite la transferencia del plásmido en presencia de los genes *mob* en trans. Se utilizó como cepa donadora DH5 α pSEVA232-pCG100 (KmR), DH5 α pRK600 (Cfr) como cepa helper, y las cepas de *Arthrobacter* UYEF1, Cu512 y Cu712 como receptoras. Dado que las cepas de *Arthrobacter* no presentan un mecanismo de selección posible del evento de transferencia (no presentan resistencia a antibióticos específicos), se realizó la selección en función de la temperatura. Una vez realizada la conjugación, las placas se incubaron a 10 °C ya que las cepas de *E. coli* no son capaces de crecer a esta temperatura. Con este procedimiento tampoco se obtuvieron transformantes.

El hecho de no haber logrado transformar *Arthrobacter* podría deberse a que al contener *gaps*, el origen pCG100 pueda no ser reconocido y por lo tanto el plásmido pART2 no se replique en *Arthrobacter*. Otra posibilidad es que nuestras cepas de *Arthrobacter* antárticas no se comporten de la misma manera que las cepas de *Arthrobacter* utilizadas previamente para la puesta a punto de los protocolos. Recientemente un grupo de investigadores españoles se ha contactado para solicitarnos el plásmido híbrido pSEVA232-pCG100 porque ellos tampoco han podido transformar *Arthrobacter*. Dado que en la literatura hay sólo dos ejemplos de éxito de transformación de este género bacteriano, quizá el protocolo descrito sea válido únicamente para las especies con las que los autores trabajaron y no para otras especies de *Arthrobacter*. Se solicitó a los autores que nos enviaran los plásmidos y las cepas que ellos utilizaron como control de procedimiento y no obtuvimos respuesta.

A pesar de estos resultados poco alentadores continuamos trabajando con *Pseudomonas* psicrófilas como hospederos, logrando resultados interesantes.

Orígenes de replicación: Determinamos la funcionalidad de 4 orígenes de replicación en *Pseudomonas* de origen antártico y verificamos su estabilidad estructural y segregacional.

Se seleccionaron las cepas de *Pseudomonas* antárticas UYIF39 y UYIF41 previamente aisladas en nuestro laboratorio (Ignacio Ferrés & Ignacio Ferrés, n.d.) para la puesta a punto. Como control se utilizó la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian et al., 1981), la cual es una cepa tipo habitualmente usada en técnicas de biología molecular. Se evaluó la eficiencia de transformación utilizando los plásmidos pSEVA conteniendo los 4 orígenes de replicación funcionales en *Pseudomonas*: pSEVA232 (origen pBBR1), pSEVA228 (origen RK2), pSEVA247Y (origen pR01600/ColE1) y pSEVA257Y (origen RSF1010). Todos los orígenes de replicación demostraron ser funcionales en *Pseudomonas* antárticas con eficiencias de transformación en el rango de 10⁵-10⁷ UFC / μ g de ADN, siendo la única excepción el origen de RK2 (pSEVA228) en la cepa UYIF41. Cuando la cepa UYIF41 se transformó con pSEVA228, se observaron dos fenotipos de colonias diferentes, que no crecieron adecuadamente en presencia de antibiótico y que no presentaron plásmido. Por tanto, el origen RK2 no es funcional en la cepa UYIF41.

Posteriormente, evaluamos la estabilidad estructural y segregacional de los plásmidos. Como se muestra en la figura 3, después de crecer durante 12 h en ausencia de antibiótico, la cepa UYIF39 mantiene la resistencia en el 100% de los clones para los orígenes RK2 (pSEVA228), pBBR1 (pSEVA232) y pR01600 / ColE1 (pSEVA247Y), y 87,5% para el origen RSF1010 (pSEVA257Y). El mejor desempeño de la cepa UYIF41 fue para el origen pBBR1 (pSEVA232), mientras que el peor desempeño (68% -81% de los clones) se observó para el origen pR01600/ColE1 (pSEVA247Y). Todos los plásmidos permanecieron de forma extracromosómica y estructuralmente sin cambios, como lo demuestra la extracción de plásmidos y el análisis de restricción (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta estos resultados, concluimos 3 de los orígenes de replicación demostraron ser funcionales y estables en ambas *Pseudomonas* antárticas.

Secuencias promotoras: Determinamos que los promotores canónicos Pj100 y Pj106 son promotores funcionales en *Pseudomonas* antárticas, e identificamos 13 nuevas secuencias promotoras mediante promoter trapping

Se ha demostrado que las secuencias promotoras canónicas BBa_J23100 (Pj100), BBa_J23106 (Pj106) y BBa_J23114 (Pj114) actúan como promotores fuertes, medios y débiles en *E. coli*, respectivamente (Sanches-Medeiros, Monteiro, & Silva-Rocha, 2018). Nos propusimos entonces evaluar si las secuencias Pj100 y Pj106 son funcionales en las *Pseudomonas* antárticas. Como primera aproximación utilizamos el plásmido pRGL2 que contiene los genes *lux* (*luxCDABE*) sin promotor, y los plásmidos pRGL2-Pj100 y pRGL2-Pj106 donde los genes *lux* están bajo el control de las regiones promotoras Pj100 y Pj106 respectivamente. Determinamos que en la cepa UYIF39 el promotor Pj106 es reconocido (Fig. 4). Si bien se intentó varias veces introducir en esta cepa el plásmido conteniendo el promotor Pj100, no fue posible. Quizá una alta expresión de

estos genes resulte tóxica para la célula. En la cepa UYIF41 la luminiscencia presentó un fenotipo de expresión con localizaciones discretas dentro de una misma colonia (Fig. 4). El plásmido pRGL2 contiene el origen de replicación RK2 (el mismo que el pSEVA228) que presentó inestabilidad en esta cepa y se ve claramente que la segregación no es homogénea. Debido a estos resultados decidimos utilizar una estrategia alternativa.

Clonamos las secuencias promotoras Pj100, Pj106 y Pj114 controlando la expresión de la proteína GFP usando el plásmido pSEVA231 como andamio. Evaluamos la actividad promotora a diferentes temperaturas. Como se muestra en la figura 5A, las secuencias promotoras Pj100 y Pj106 son funcionales en las *Pseudomonas* antárticas y en *P. putida* a todas las temperaturas evaluadas en las que crecían las bacterias. La cepa UYIF39 no crece a 30° C mientras que *P. putida* no crece a 4° C. Como se muestra en la figura 5B, la actividad promotora en *P. putida* es similar a la observada previamente en *E. coli* (Sanches-Medeiros et al., 2018) siendo Pj100 y Pj106 promotores de fuerza fuerte y media, respectivamente. En el caso de las *Pseudomonas* antárticas, esta tendencia no se mantuvo. La expresión de Pj100 y Pj106 fue similar, ejerciendo en ambas cepas una expresión que puede considerarse media si se compara con la expresión en *P. putida* (Fig. 5B).

Posteriormente, determinamos la expresión del promotor a nivel de población mediante citometría de flujo (células planctónicas) y en colonias individuales (biofilms) (Fig. 6). Como se muestra en la figura 6A, en las colonias de *P. putida* conteniendo el plásmido pSEVA231-Pj106GFP, la expresión no fue homogénea. Algunas colonias mostraron una expresión fuerte, otras no mostraron expresión en absoluto y otras colonias mostraron una expresión segregada en la misma colonia. Este efecto también se vio mediante citometría de flujo (Fig. 6B). Para la cepa UYIF39, la expresión de GFP controlada por el promotor Pj100 fue homogénea en colonias individuales (Fig 6A) pero presentó dos poblaciones distintas en la población planctónica (Fig 6B). En la cepa UYIF41 las poblaciones fueron homogéneas en ambas aproximaciones (Fig 6A y 6B).

No se detectó diferencia entre la expresión del promotor Pj114 y el control negativo en ninguna de las cepas, lo que sugiere que la actividad de Pj114 es demasiado débil para ser detectada o que la secuencia no se reconoce.

Concluimos que las *Pseudomonas* antárticas (UYIF39 y UYIF41) responden a las secuencias promotoras Pj100 y Pj106, que actúan como promotores funcionales independientemente de la temperatura.

Promoter trapping: Identificamos 13 nuevas secuencias promotoras reconocidas por *Pseudomonas*.

Usando como andamio el plásmido pSEVA231-GFP (sin promotor), se introdujeron fragmentos de ADN metagenómico de una muestra de sedimento antártico. Se obtuvo el ADN metagenómico, se optimizó la digestión con la enzima de corte frecuente Sau3AI para obtener fragmentos de 100-500pb, se purificaron los fragmentos y se clonaron en el sitio BamHI del plásmido, el cual se encuentra corriente arriba de la GFP. Se generó una biblioteca de aproximadamente 3000 clones, de los cuales 13 expresaron GFP, sugiriendo que las secuencias clonadas son reconocidas como promotores funcionales en *Pseudomonas*. Una de estas secuencias demostró ser un promotor inducible por bajas temperaturas (10°C) (Fig. 7).

Efecto de las construcciones en el crecimiento celular: Demostramos que los plásmidos generados no afectan significativamente el crecimiento de las cepas

Evaluamos el efecto de los plásmidos conteniendo los distintos orígenes de replicación y las secuencias promotoras en la fisiología celular mediante curvas de crecimiento. Si bien algunos plásmidos generan un retardo o disminución en el crecimiento, sobre todo en las cepas *P. putida* y UYIF41, no son efectos muy marcados que desalienten el uso de éstos (Fig. 8). Podemos concluir que los plásmidos evaluados y generados en este trabajo son aptos para ser utilizados en las *Pseudomonas* antárticas.

Prueba de concepto: Demostramos que las *Pseudomonas* antárticas son capaces de expresar de forma heteróloga enzimas previamente identificadas en *E. coli* y que tienen una mejor performance que la cepa modelo *P. putida* KT2440

Como prueba de concepto de la pertinencia de nuestros aislamientos como hospederos en bibliotecas metagenómicas, nos planteamos evaluar qué ocurre al introducir plásmidos conteniendo genes codificantes para actividades enzimáticas previamente identificadas en *E. coli*. Utilizamos dos construcciones distintas: 1) pSEVA232 conteniendo un fragmento metagenómico que confiere actividad b-glicosidasa; 2) pSEVA232 conteniendo una enzima celulasa amplificada a partir de un genoma y a la que se agregó además un péptido de secreción. La b-glicosidasa se expresa a partir de su promotor nativo (promotor metagenómico) y la celulasa se expresa a partir del promotor presente en el plásmido (pLac). Las cepas UYIF39 y UYIF41 fueron capaces de expresar ambas actividades enzimáticas (Fig. 9) sugiriendo que tanto el promotor pLac presente en el plásmido (celulasa), como el promotor nativo proveniente de un metagenoma (b-glicosidasa) son reconocidos por ambas *Pseudomonas*. La presencia de actividad en el entorno de la colonia evidencia que estas cepas no sólo expresan la enzima, sino que son capaces de secretarla correctamente. Ambas *Pseudomonas* antárticas fueron

capaces de expresar de forma heteróloga ambas enzimas aún a bajas temperaturas (10 °C). Estos resultados sugieren que los hospederos psicrófilos son adecuados para identificar enzimas previamente evaluadas en bacterias mesófilas. Las cepas UYIF39 y UYIF41 expresaron la β -glucosidasa más eficientemente que la cepa KT2440 en todas las temperaturas evaluadas, demostrando que son más eficientes que esta cepa modelo de *Pseudomonas*.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones:

- Se construyó un vector híbrido el cual es replicable en *Pseudomonas* y *E.coli*.
- No se logró transformar *Arthrobacter*. El hecho que en la literatura sólo hayan 2 reportes de esta técnica y que recientemente nos contactara un grupo de España con nuestros mismos problemas, sugiere que la transformación de este género no es trivial.
- Se identificaron 3 orígenes de replicación funcionales en ambas *Pseudomonas* antárticas (pBBR1, pR01600/ColE1y RSF1010). El origen RK2 no es apropiado para la cepa UYIF41.
- Se determinó la funcionalidad de las secuencias canónicas BBa_J23106 (Pj106) y BBa_J23100 (Pj100) en ambas *Pseudomonas* antárticas.
- Se identificaron 13 nuevas regiones promotoras funcionales en *Pseudomonas* a partir de una aproximación metagenómica funcional basada en captura de promotores. Unos de estos promotores es inducible por bajas temperaturas (10°C). Estas nuevas secuencias promotoras contribuyen al acervo de partes biológicas en biología sintética.
- Ambas *Pseudomonas* lograron expresar correctamente enzimas previamente caracterizadas en *E. coli*. Interesantemente, fueron capaces expresar la actividad a bajas temperaturas, y fueron más eficientes que su contraparte mesófila *P. putida* KT2440, la cual es además una cepa modelo en aproximaciones biotecnológicas.

Por motivo de la pandemia, que atrasó la ejecución del proyecto así como la posibilidad de contar con los recursos humanos que se plantearon originalmente, el proyecto se encuentra aun en ejecución no formal. Se está finalizando una publicación científica ("Validation of psychrotolerant Antarctic *Pseudomonas* as host for functional metagenomics using pSEVA modular vectors") resumiendo los resultados presentados en este informe a excepción de la aproximación de búsqueda de promotores por promoter trapping, la que será publicada de forma independiente luego de la caracterización de los nuevos promotores encontrados. También se está preparando material gráfico de divulgación de los resultados del proyecto de manera de hacerlos más accesibles a la población.

Recomendaciones

- Emplear *Pseudomonas* UYIF39 como hospedero para la generación de metagenotecas funcionales especialmente diseñadas para la búsqueda de enzimas psicrófilas, utilizando el origen de replicación pBBR1 presente en el pSEVA23x, y la secuencia promotora canónica BBa_J23106 (Pj106) en caso de querer favorecer la expresión de los genes exógenos introducidos.

Referencias bibliográficas

- Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S., & Liebl, W. (2009). A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.01.003>
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J., & Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1–3), 237–247.
- Craig, J. W., Chang, F.-Y., & Brady, S. F. (2009). Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chemical Biology*, 4(1), 23–28. <https://doi.org/10.1021/cb8002754>
- Craig, J. W., Chang, F.-Y., Kim, J. H., Obiajulu, S. C., & Brady, S. F. (2010). Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1633–1641. <https://doi.org/10.1128/AEM.02169-09>
- de Pascale, D., De Santi, C., Fu, J., & Landfald, B. (2012). The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics*, 8, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.04.004>
- Ekkers, D. M., Cretoiu, M. S., Kielak, A. M., & Elsas, J. D. van. (2012). The great screen anomaly--a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1005–1020. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3804-3>
- Feller, G. (2013). Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica*, 2013, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2013/512840>
- Gabor, E. M., Alkema, W. B. L., & Janssen, D. B. (2004). Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology*, 6(9), 879–886. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00640.x>
- Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A., & Wagner, D. (2011). *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 4), 979–984. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021022-0>
- Ignacio Ferrés, V. A. F. N. & E. F., & Ignacio Ferrés, V. A. F. N. & E. F. (n.d.). Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. *????*, 26(1-English), 71–79. <https://doi.org/10.13679/J.ADVPS.2015.1.00071>
- Iqbal, H. A., Craig, J. W., & Brady, S. F. (2014). Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*. *FEMS Microbiology Letters*, 354(1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12431>
- Jackson, R. W., & Giddens, S. R. (2006). Development and application of in vivo expression technology (IVET) for analysing microbial gene expression in complex environments. *Infectious Disorders Drug Targets*, 6(3), 207–240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918484>
- Lam, K. N., Martens, E. C., & Charles, T. C. (2018). Developing a *Bacteroides* System for Function-Based Screening of DNA from the Human Gut Microbiome. *MSystems*, 3(3), e00195-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00195-17>
- Leis, B., Angelov, A., Mientus, M., Li, H., Pham, V. T. T., Lauinger, B., ... Liebl, W. (2015). Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 275. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00275>
- Li, Y., Wexler, M., Richardson, D. J., Bond, P. L., & Johnston, A. W. B. (2005). Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environmental Microbiology*, 7(12), 1927–1936. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00853.x>
- Liebl, W., Angelov, A., Juergensen, J., Chow, J., Loeschcke, A., Drepper, T., ... Jaeger, K.-E. (2014). Alternative hosts for functional (meta)genome analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), 8099–8109. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5961-7>
- Luo, J., Xue, H., Zhao, S., Liu, X., Chen, X., Liu, J., ... Wang, M. (2016). Optimization of Electroporation Conditions for *Arthrobacter simplex*. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 444, 393–402. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4801-2_40
- Makhalanyane, T. P., Van Goethem, M. W., & Cowan, D. A. (2016). Microbial diversity and functional capacity in polar soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.011>
- Mih??an, M. (2015). Bioinformatics-Based Molecular Classification of *Arthrobacter* Plasmids. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 20(4), 612–625. <https://doi.org/10.1515/cmb-2015-0036>

Rafael, S.-R., Esteban, M.-G., Belén, C., Max, C., Alejandro, A.-R., Aitor, de las H., ... de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41.

Rediers, H., Rainey, P. B., Vanderleyden, J., & De Mot, R. (2005). Unraveling the Secret Lives of Bacteria: Use of In Vivo Expression Technology and Differential Fluorescence Induction Promoter Traps as Tools for Exploring Niche-Specific Gene Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 217–261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.217-261.2005>

Sanches-Medeiros, A., Monteiro, L. M. O., & Silva-Rocha, R. (2018). Calibrating Transcriptional Activity Using Constitutive Synthetic Promoters in Mutants for Global Regulators in *Escherichia coli*. *Int J Genomics*, 2018, 9235605. <https://doi.org/10.1155/2018/9235605>

Wang, C., Meek, D. J., Panchal, P., Boruvka, N., Archibald, F. S., Driscoll, B. T., & Charles, T. C. (2006). Isolation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism genes from complex microbial communities by phenotypic complementation of bacterial mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 384–391. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.384-391.2006>

Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H., & An, L. (2011). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid PART2. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.002>

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)