



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## Diseño y construcción de un minicromosoma con capacidad autorreplicativa

Laura Espíndola<sup>1</sup>, Cyntia Paola Rangel<sup>1,2</sup>, Ana Lilia Hernández<sup>1</sup> y Agustino Martínez-Antonio<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Sintética y Biosistemas, Depto. de Ingeniería Genética, Cinvestav Irapuato, CP 36821

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Torreón, CP27000

*Palabras clave: biología sintética, sistema mínimo, auto-replicación*

**Introducción.** Una de las principales metas de la biología sintética es la obtención de una célula mínima funcional, la cual contendrá la información mínima necesaria para sustentar su autorreproducción y la cual podrá utilizarse como una plataforma para la obtención de bioproductos dirigidos. Hay varios obstáculos para lograr esto, y creemos que una de las tareas primarias es definir la información genética mínima que permita la autoreplicación física de la información genética, de aquí se desprende uno de los principales objetivos de nuestro grupo de trabajo:

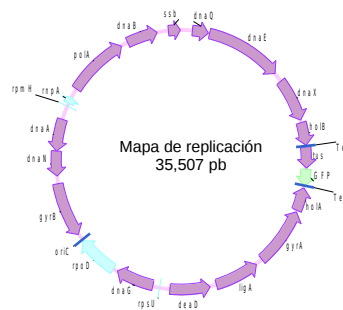
Construir un minicromosoma con un número reducido de genes, capaz autorreplicarse, transcribir y traducir su propia información genética *in vitro*. Un primer paso es construir un sistema autorreplicativo.

**Metodología.** Mediante la búsqueda de ortólogos de la enterobacteria simbiótica *Carsonella ruddii* PV<sup>2,3</sup> en *E. coli* K12 MG1655 y su comparación con modelos *in silico* de genomas mínimos<sup>1</sup> y genoma núcleo se propusieron los genes mínimos para las funciones de replicación y transcripción que pudieran existir en carsonella (de tan sólo 182 genes) y que podamos recuperar del genoma de *E. coli* (carsonella es no cultivable). De esta manera los genes identificados más sus sitios de regulación se obtuvieron del cromosoma de *E. coli* mediante PCR y se clonaron en el plásmido pJET1.2 (Fermentas). Las biopartes resultantes se ensamblarán mediante ligación de sitios de restricción compatibles entre las diferentes biopartes cuidando de mantener el orden como en *E. coli*. La funcionalidad del minicromosoma y del sistema de transcripción se verificará por transcripción y traducción *in vitro*<sup>4</sup>.

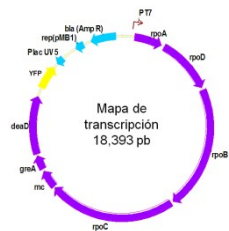
**Resultados.** El diseño para el sistema autorreplicativo resultó en una lista de 16 genes para replicación, un gen reportero para GFP y un oriC (Figura 1). Los genes de interés más su región de regulación constituyen cada una de las biopartes las cuales se ensamblarán de acuerdo a como se muestran en la figura 1.

Para la expresión de estos genes requerimos una maquinaria de transcripción que estemos seguros que no proviene de los extractos de *E. coli* a utilizarse. Para ello se diseñó una maquinaria mínima de la RNA polimerasa (y el sigma70) expresada a partir de un promotor T7 (viral): *rpoD*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, además de YFP como reportero (Figura 2).

Hasta ahora se han obtenido por clonación todas las biopartes tanto del sistema de autoreplicación como de transcripción y se ha comprobado su identidad por secuenciación. En este momento se está realizando el ensamblado de los sistemas y en esta reunión presentaremos nuestros más recientes avances de este proyecto.



**Fig. 1** Mapa del minicromosoma para la función de autoreplicación.



**Fig. 2** Mapa del sistema de transcripción

**Perspectivas.** El sistema de transcripción mínimo servirá para expresar los genes del minicromosoma autorreplicativo, con la ayuda de extractos celulares de *E. coli* libres de ADN y kits comerciales. Las proteínas expresadas por el minicromosoma serán las responsables de su replicación, por lo que monitorearemos la fluorescencia de GFP como indicador de producción de las proteínas y se cuantificará periódicamente la concentración de DNA. Una vez comprobado esto la maquinaria de transcripción será integrada a la de replicación. Los sistemas están diseñados para ir aumentando el número de genes en cada uno y así probar los elementos mínimos requeridos en cada caso.

**Agradecimiento.** Al CONACYT por los donativos 102854 y 103686 donde incluye una beca de tesis de licenciatura para CPR. LE es becario de doctorado No. 208153 del CONACYT.

### Bibliografía.

1. Gil R et al., (2004) Environ Microbiol. 6(11):1109-22.
2. Tamames J et al., (2007) BMC Evol Biol. 1;7:181.
3. Nakabachi A et al., (2006) Science. 13;314(5797):267.
4. Asahara H, Chong S. (2010) Nucleic Acids Res. 38(13):e141.