

Silenciamiento de sectores no usados del proteoma de *E. coli* usando CRISPRi y su aplicación en biología sintética.

Miguel Angel Bello González, José Utrilla Carreri. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas, Laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Cuernavaca, utrilla@ccg.unam.mx
Palabras clave: CRISPRi, Líneas de isocosto

Introducción. La Biología Sintética intenta lograr el diseño racional y expresión de circuitos sintéticos, con funciones biológicas generalmente no naturales. La estabilidad y predictibilidad adecuado de estos circuitos dentro del organismo hospedero son algunas de las principales problemáticas a las que se enfrenta esta disciplina (1). Una de las principales razones que provocan estas problemáticas es la limitada disponibilidad de recursos celulares por los cuales deben competir los circuitos genéticos y la maquinaria endógena de la célula, ocasionando un fenómeno denominado como sobrecarga metabólica (2). Los microorganismos expresan proteínas cuya función es brindarles protección ante efectos negativos del medio y garantizar su supervivencia, dedicando una parte considerable de su proteoma y recursos celulares en general a esta función (3). En el sistema CRISPRi se emplea una versión catalíticamente muerta de la enzima Cas9 (death) y es utilizado para regular a nivel transcripcional la expresión de genes sin afectar la integridad de la secuencia de ADN (4).

El objetivo de nuestro trabajo es reducir la expresión de sectores del proteoma no asociado al crecimiento de *E. coli* para mejorar la integración de funciones sintéticas.

Metodología. Se empleó el sistema CRISPRi, para poder reprimir la expresión de factores transcripcionales que regulen positivamente la expresión de genes involucrados con funciones de cobertura. Se empleó el plásmido pCRISPathBrick, del repositorio Addgene (#65006), una región que mantiene la arquitectura de un arreglo CRISPR, con un non-targeting gRNA modificado con el único sitio de corte de para la enzima de restricción BsaI, sitio donde se ensamblarán los nuevos gRNA(5). Se eligieron como TF's dianas *csgD*, *marA* y el factor sigma *rpoS*. Se empleará el plásmido pSEVA63-Dual, el cual contiene una GFP expresada constitutivamente y RFP inducible por AHL. Lo que permitió cuantificar la relación de la fluorescencia de ambas proteínas, siguiendo un principio microeconómico denominado líneas de isocosto, el cual se refiere al manejo de un presupuesto determinado de manera más óptima, en nuestro caso dicho presupuesto son los recursos celulares(6).



Fotografía 1. Gel al 2% de agarosa. En los pocillos 2, 3, 4 y 5 se ubican los productos de PCR del CPB, CPB-marA, CPB-csgD, CPB-rpoS y CPB-csgD_marA.

Resultados.

Se puede observar en la **fotografía 1** un incremento de 56 nucleótidos aproximadamente con lo que se puede comprobar

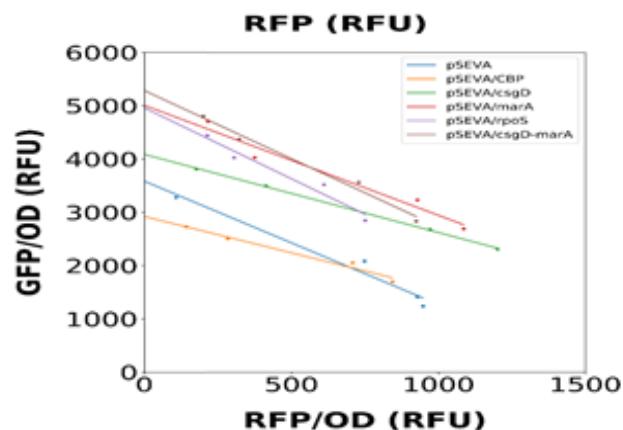


Figura 1. Líneas de isocosto de la fluorescencia normalizada de los diferentes factores de transcripción reprimidos por el sistema CRISPRi.

la presencia de los gRNA's insertados en el plásmido y la presencia de una doble combinación.

Se puede observar en la **figura 1**, como existe un incremento en la fluorescencia emitida por las cepas transformadas con las variantes de los distintos gRNA's, donde en todos los casos se pudo observar un incremento superior a la cepa WT.

Conclusiones. Los factores de transcripción reprimidos utilizando el sistema CRISPRi fueron capaces de liberar suficientes recursos celulares para incrementar una producción de proteína fluorescente. La doble combinación de TF's reprimidos fue capaz de liberar una gran cantidad de recursos celulares, lo que sugiere que este fenómeno puede ser aditivo.

Agradecimientos. Al financiamiento otorgado por el proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IA201518

Bibliografía.

- Cardinale S and Arkin AP (2012) *J Biotechnology* 7:856-866
- Borkowski O, Ceroni F, Guy Bart S and Ellis T (2016) *Current Opinion in Microbiology* 33:123-130
- Mitchell A et al (2009) *Nature* 460:220-224
- Qi et al (2013) *Cell* 152: 1173-1183
- Cress B et al (2015) *ACS Synthetic Biology* 4:987-1000
- Gyorgy et al (2015) *Biophysical Journal* 109:639-646