

Implementación del Sistema CRISPR/Cas9 en *Escherichia coli* y sus aplicaciones en la ingeniería de vías metabólicas

Luz Teresa Reyes González¹, M.C. Eliseo Ronay Molina Vázquez², M.C. Eduardo Brito Alarcón³,
Dr. Martín Peralta-Gil⁴, M. Dr. Alfredo Martínez Jiménez⁵

Resumen: Durante la última década, la práctica de edición genómica ha tenido gran relevancia tras el descubrimiento de un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas, denominado Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, dependiente de la proteína Cas9 (CRISPR/Cas9, por sus siglas en inglés). Para resaltar su importancia, en este trabajo se describe la implementación metodológica del Sistema CRISPR/Cas9, así como las ventajas, desventajas y modificaciones del sistema. Los resultados describen el proceso de la optimización del sistema, incluyendo los factores que comprometen el rendimiento y la efectividad de la técnica en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*. En conclusión, la implementación de CRISPR/Cas9 representó un gran reto y desafío que potencialmente otorgará grandes ventajas para realizar edición genómica en cualquier locus de *E. coli*, con fines de aprovecharla en diversas áreas de Biología Sintética e Ingeniería de Vías Metabólicas.

Palabras clave: CRISPR, Cas9, Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas.

Introducción

El sistema denominado CRISPR (por sus siglas en inglés, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) o Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas surge como una alternativa para realizar edición genética. En otras palabras, induce alteraciones en regiones específicas del ADN (por sus siglas en inglés, Deoxyribonucleic Acid o Ácido Desoxirribonucleico), modificando así partes del genoma y características fenotípicas de un organismo. Las regiones repetidas o CRISPR, se localizan en los cromosomas de algunas bacterias y arqueas, y están representadas por secuencias palindrómicas repetidas, también conocidas como *repetidor* o *repetidas*. Cerca de esas secuencias repetidas se localizan genes denominados *cas*, los cuales codifican nucleasas o posibles helicasas, asociados a las secuencias repetidas CRISPR (Cas por sus siglas en inglés, CRISPR associated) (Mojica et al., 2005). En general, el sistema CRISPR proporciona inmunidad adquirida contra la invasión de ADN extraño a través de la escisión de ADN guiada por RNA (por sus siglas en inglés, Ribonucleic acid o ácido ribonucleico) (Hryhorowicz et al., 2017).

El sistema CRISPR funciona como memoria para identificar ADN exógeno requiriendo de las proteínas Cas (asociadas a CRISPR). Al identificar las secuencias de ADN invasor, las proteínas Cas introducen una ruptura de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés Double strand DNA breaks) para evitar la infección viral (Zhao & Zhang, 2020; Makarova et al, 2015) (Brito-Alarcón, 2016). Generalmente este proceso se efectúa en tres etapas (se muestra en la Figura 1). Durante la etapa de adaptación o adquisición, el ADN exógeno invade las células procariontas y el motivo adyacente PAM que consta de 3 nucleótidos 5'-NGG-3', es reconocido por la proteína Cas (principalmente Cas1 y Cas2) que lo cortan e integran en el loci de CRISPR, como nuevos espaciadores representados por 20 nucleótidos, la finalidad es proporcionar inmunidad (Doudna and Charpentier, 2014). En la segunda etapa o etapa de expresión, se produce la transcripción del locus CRISPR sintetizando un precursor denominado CRISPR-RNA (pre-crRNA). Posteriormente se procesa hasta generar un RNA maduro (crRNA), el cual consiste de una secuencia 5'-repetidor-espaciador-repetidor-3' y es complementario a las secuencias de DNA invasor. Finalmente, en la etapa de interferencia, las proteínas Cas se asocian con el crRNA funcional, formando un complejo ribonucleoproteico conocido como crRNP, el cual buscará la secuencia PAM que servirá como anclaje en el DNA objetivo y, si las bases del crRNA y el ADN protoespaciador coinciden, se realizara un corte específicamente en el ADN o ARN viral.

Actualmente se han identificado seis tipos de sistemas, agrupados en dos clases: Clase 1 que requiere un complejo multiprotéico para degradar el ADN exógeno, abarca el tipo I, III y IV presente en bacterias/arqueas y, la Clase 2 donde solo participa una enzima para formar el complejo CRISPR/Cas con sistemas de tipo II, V y VI, y se encuentran principalmente en bacterias (Cho et al., 2018; Haft et al., 2005).

¹ Luz Teresa Reyes González, alumna de la Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ESAp-UAEH), Apan. Hgo. re353523@uaeh.edu.mx (primer autor).

² M.C. Eliseo Ronay Molina Vázquez alumno de Doctorado en el Instituto de Biotecnología-UNAM. eliseo.molina@mail.ibt.unam.mx

³ M.C. Eduardo Brito Alarcón alumno de Doctorado en el Instituto de Biotecnología-UNAM. bral@ibt.unam.mx

⁴ Dr. Martín Peralta-Gil, Profesor Investigador en la ESAP-UAEH. martin_peralta10391@uaeh.edu.mx

⁵ Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Investigador en el Instituto de Biotecnología-UNAM, alfredo@ibt.unam.mx (autor corresponsal)

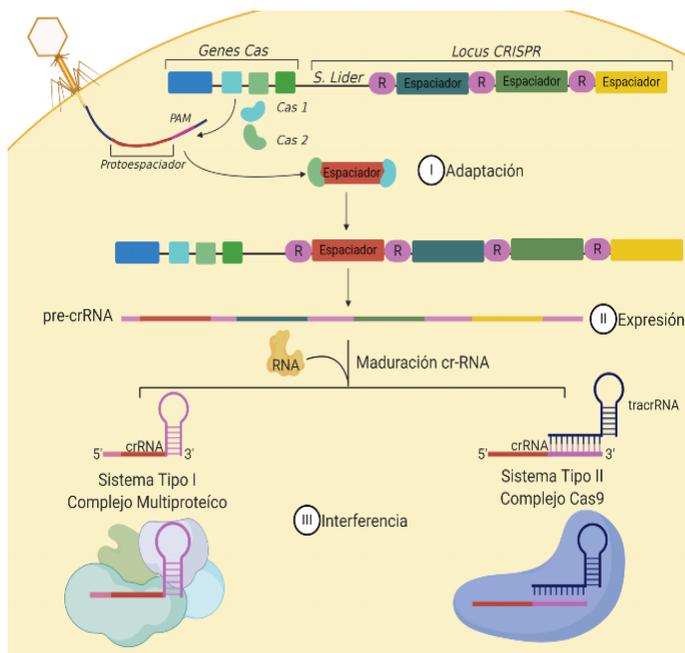


Figura 1. CRISPR como inmunidad adaptativa: fases del Sistema CRISPR/Cas9. I) Adaptación o Adquisición, el organismo infectado integra el ADN exógeno en el locus CRISPR, como un espaciador. II) Expresión, la secuencia se transcribe y se procesa hasta sintetizar crRNA. III) Interferencia, se forman los complejos constituidos por crRNA y las proteínas Cas para degradar el ADN exógeno (Sternberg et al, 2014). Imagen creada con BioRender.com.

El sistema CRISPR/Cas utilizado para editar genomas es de tipo II, este sistema tiene como característica que el complejo crRNP está formado por: la enzima Cas9, que realiza un DSB entre el 3er y 4to nucleótido río arriba de la secuencia PAM y el dúplex crRNA/tracrRNA (por su nombre en inglés trans-activating CRISPR RNA). El estudio de este sistema en *E. coli*, permite usarla como un modelo de estudio para otras bacterias (Zhao and Zhang, 2020). Este sistema es muy específico y permite la identificación exacta de una región específica de interés para cortar casi cualquier región del ADN, aunque tiene ciertas restricciones, tales como: las secuencias PAM (por sus siglas en inglés, Protospacer Adjacent Motifs) y secuencias fuera del objetivo (off-targeting).

Durante la última década, las aplicaciones que se le están dando al sistema CRISPR/Cas son múltiples y variadas. De tal forma que esta tecnología se está aplicando en la inmunización artificial contra virus y fagos, aplicaciones en terapia génica, desarrollo de modelos murinos, aplicaciones en la agricultura, identificación de secuencias genómicas no codificantes, entre otras. Debido a su gran importancia, se ha hecho necesaria la implementación de este tipo de tecnología en los laboratorios interesados en modificaciones metabólicas de microorganismos.

El presente proyecto se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, en donde se implementó el sistema CRISPR/Cas9 en las áreas de biología sintética e ingeniería de vías metabólicas para generar cepas recombinantes de *E. coli*, con la finalidad de que estos microorganismos sean capaces de producir biocombustibles o moléculas de interés industrial a partir de azúcares simples. De tal forma que esta tecnología pueda proporcionar procesos alternativos para la obtención de metabolitos que tradicionalmente se obtienen del petróleo.

Descripción del Método

La metodología del sistema CRISPR/Cas9 fue una combinación entre la propuesta de Jiang y colaboradores en 2015 y la de Reisch y Prather el mismo año (Jiang et al., 2015; Reisch & Prather, 2015). Estos protocolos requieren dos plásmidos, pCas y pTarget, que contienen los elementos necesarios para el sistema CRISPR/Cas 9, los cuales fueron obtenidos en el laboratorio del Dr. Alfredo Martínez del Instituto de Biotecnología-UNAM. El vector pCas contiene la endonucleasa Cas9 y el sistema de recombinasas que permiten realizar la integración en el genoma y el plásmido pTarget es el vector a través del cual se introduce el ARN guía (gRNA por sus siglas en inglés “guide RNA”) (Cho et al., 2018). Este último es un transcrito de fusión conformado por el crRNA y tracrRNA, la cual hibrida

con el repetidor de crRNA. Posteriormente el dúplex crRNA/tracrRNA es reconocido por la endonucleasa Cas9 para formar el complejo ribonucleoprotéico CRISPR/Cas9, facilitando el uso del sistema, ya que en lugar de expresar dos transcritos en locus diferentes, sólo se requiere un transcrito (Doudna and Charpentier, 2014; Hryhorowicz et al., 2017).

El uso de la nucleasa Cas9 del sistema CRISPR, es importante debido a que tiene un lóbulo de reconocimiento del RNA guía (REC) y un lóbulo nucleasa (NUC). A su vez, el lóbulo NUC presenta un dominio RuvC, otro HNH y, por último, un dominio de interacción con la secuencia PAM, llamado PI. Los dominios, HNH y RuvC, cortan respectivamente la hebra del DNA diana complementaria al RNA guía y la no complementaria al RNA guía. Además, el dominio PI reconoce la secuencia PAM en la hebra no complementaria en el DNA diana (Nishimasu et al., 2014). El DSB inducido por Cas9 permite la modificación de la secuencia a través de la vía de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ), donde generalmente ocurren inserciones o deleciones. Otra vía es el sistema de reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) donde se requiere el uso del fragmento de ADN donador, flanqueada por las homologías mismas que permitirán la recombinación en el sitio de corte.

Se desarrolló un sistema molecular inducible por temperatura. Para ello, se integró la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de la cepa BL21, específicamente en el locus *htpG* dependiente del factor transcripcional σ 32 que se expresa como respuesta a estrés térmico (Molina-Vázquez, 2019).

Resultados

Purificación del plásmido y caracterización de los plásmidos pTarget y pCas.

El primer paso para implementar el Sistema CRISPR/Cas consistió en sembrar colonias de las cepas DH5 α pTarget Spe^r y DH5 α pCas Km^r, con la finalidad de purificar a los plásmidos pTarget y pCas (Figura 2).

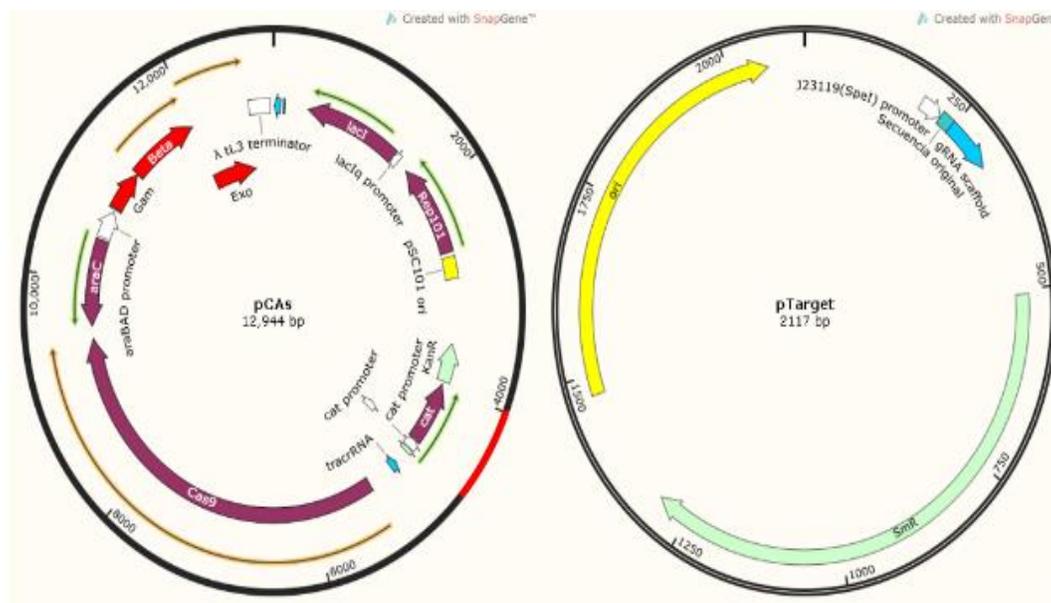


Figura 2. Plásmidos usados en este estudio: pCas, contiene todos los elementos para realizar la integración en el genoma (Cas9 y Sistema λ -red) y pTarget, permite la expresión del gRNA (Brito-Alarcón, 2016). Imagen creada con SnapGene.

Posteriormente se caracterizaron los plásmidos con las enzimas de restricción PvuI y SmaI, respectivamente. La digestión de pTarget libera un fragmento de 1900pb, mientras que la longitud de pCas es de 12,944pb. Se procedió a linearizar el vector pTarget con los oligos LV1 y LV2, los cuales presentan homologías con Fwd_CPEC_pT y Rev_CPEC_pT y durante el proceso de PCR alternativo se presenta el cambio de gRNA (Figura 3a).

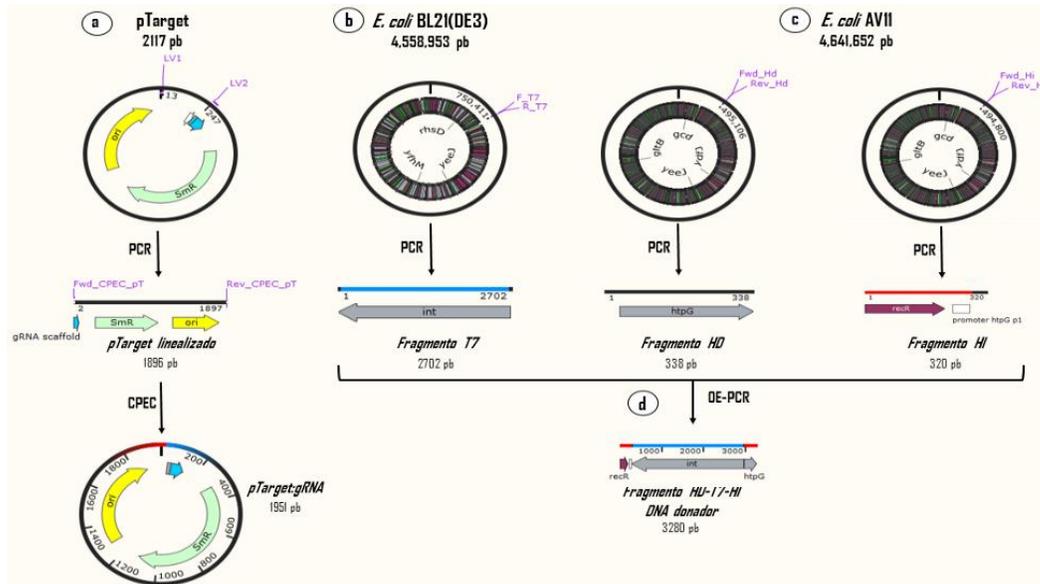


Figura 3. Estrategias utilizadas para generar los elementos previos a la técnica. a) Linearización del vector pTarget para agregar el gRNA mediante la técnica de CPEC. b) Obtención de fragmento T7, a partir de la cepa BL21 (DE3). c) Obtención de fragmento HD y HI de la cepa AV11. d) ADN donador, como producto final de la amplificación por el protocolo de OE-PCR (Molina-Vázquez, 2019). Imagen creada con SnapGene.

Sustitución del RNA guía (gRNA).

Para realizar el cambio de gRNA es necesario utilizar una técnica de PCR denominada Clonación de Extensión de Polimerasa Circular (CPEC), la cual se realizó utilizando los oligos Fwd_CPEC_pT y Rev_CPEC_pT, con 100 ng del vector pTarget linealizado. La finalidad de utilizar estos oligos es modificar el gRNA, debido a que tiene homología con los extremos del vector pTarget linealizado de tal forma que se conserva la mayor parte de los elementos del vector pTarget, pero se modifica la secuencia del espaciador, es decir, los 20nt que van a hibridar. El espaciador que se diseñó se amplifica con los oligos Fwd_CPEC_pT y Rev_CPEC_pT (Figura 3a); y el vector pTarget solo tiene un sitio de corte de Pvu1 (Figura 4a). Cuando el gRNA es sustituido, se comprueba mediante digestión con Pvu1 que debe generar dos fragmentos (1300 pb y 700 pb) (Figura 4b). Para desarrollar la técnica CPEC, se requirieron 100 ng del pTarget linealizado, de 1900pb, contenidos en 3.8 µL a una concentración de $(26.3 \frac{ng}{\mu L})$.

Integración de la RNA polimerasa T7 al locus htpG.

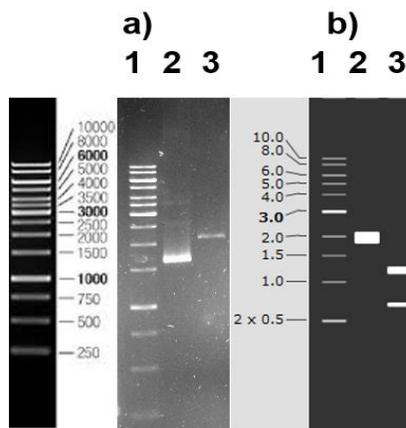


Figura 4. Sustitución del gRNA. a) Carril 1 MPM, Carril 2 pTarget sin digerir, Carril 3 pTarget digerido con Pvu1 sin gRNA b) Carril 1 MPM, Carril 2 pTarget sin digerir, Carril 3 pTarget: gRNA digerido con Pvu1 (1300 pb y 700 pb).

La clonación del gen de la RNA polimerasa T7 en el locus *htpG* se realizó con el siguiente procedimiento. Se amplificó el gen de la RNA polimerasa T7 (T7), a partir de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), utilizando los oligos Fwd_T7 y Rev_T7 (Figura 3b). Por otra parte se utilizó el cromosoma de la cepa AV11 para amplificar las regiones homologas, derecha (HD) e izquierda (HI), del gen *htpG*. La amplificación de las regiones HD y HI se realizó con los oligos Fwd_Hd/Rev_Hd y Fwd_Hi/Rev_Hi (Figura 3c). Para conocer la temperatura óptima de alineamiento de los fragmentos obtenidos por PCR del gen RNA polimerasa T7, homología izquierda y derecha, se realizaron barridos de temperatura de 50°C-60°C con intervalos de 3°C, obteniendo las siguientes temperaturas para las reacciones de PCR: HD 55°C, HI 53°C y T7 58°C. La confirmación del tamaño de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y posteriormente se purificaron (Figura 5a).

El empalme de los productos amplificados por PCR, RNAPol T7, HI y HD, se logró utilizando una variante de PCR denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa de Extensión y Sobrelape (OE-PCR) (Figura 3d). El producto final integra al gen de la polimerasa T7, flanqueado por las regiones homologas al locus *htpG* (HD y HI), de 300 pb cada una (HI-T7-HD). El producto amplificado, que servirá como ADN donador, se observó en gel de agarosa al 1%, se purificó y amplificó mediante PCR (Molina-Vázquez 2019) (Figura 5b).

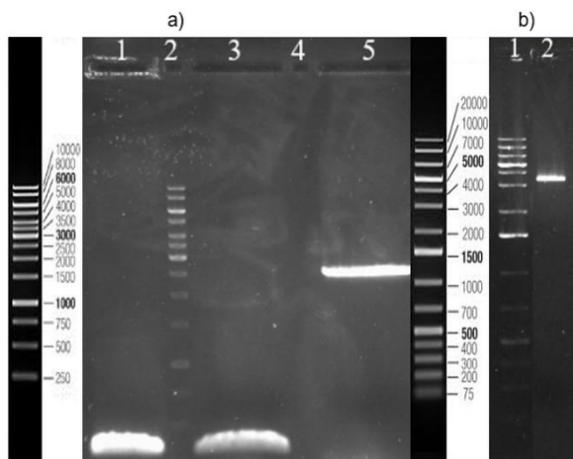


Figura 5. Fragmentos de DNA sintetizados mediante PCR y empalmados mediante la técnica OE-PCR. a) Carril 1, fragmento HD con 338 pb; carril 2, MPM; carril 3 fragmento HI con 320pb; carril 5, amplificado T7 con 2702 pb. b) Fragmento sintetizados después de amplificarlo mediante OE-PCR: Carril 1, MPM y carril 2, fragmento HI-T7-HD. En la primer reacción de OE-PCR se agregó 2.5 μL de HI con una $(37.2 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}})$, 20 μL de T7 con una $(27.2 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}})$ y 3 μL de HD con una $(30.4 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}})$.

Transformación de los productos CPEC y OE-PCR en la cepa BL21.

En este paso se transformaron células electrocompetentes de la cepa BL21, con 100 ng del plásmido pCas (Figura 6a). Las células electrocompetentes se prepararon mediante el protocolo de “Electrocompetentes de alta eficiencia” (Ausubel et al. 1987; Miller y Nickoloff, 1997). Posteriormente se realizó una segunda-transformación, utilizando 50 μL de células electrocompetentes de *E. coli* BL21-pCas, la electroporación se realizó a 1900 volts, con una alícuota con 100 ng de pTarget: gRNA y 400 ng del ADN donador (HI-T7-HD) (Figura 6b). Las células electroporadas se recuperaron en medio SOC, a un volumen final de 1 mL, incubándose a 30 °C y 300 rpm por dos horas. Este medio otorga las condiciones necesarias para que la bacteria se recupere de forma rápida, y tenga una mayor eficiencia. Como control negativo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21-pCas con 100 ng de pTarget. Las células electrotransformadas se sembraron en cajas con medio LB con Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Spe (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubaron a 30°C por una noche para obtener colonias aisladas. Las colonias candidatas se comprobaron por PCR y las colonias positivas se refrigeraron a -70 °C.

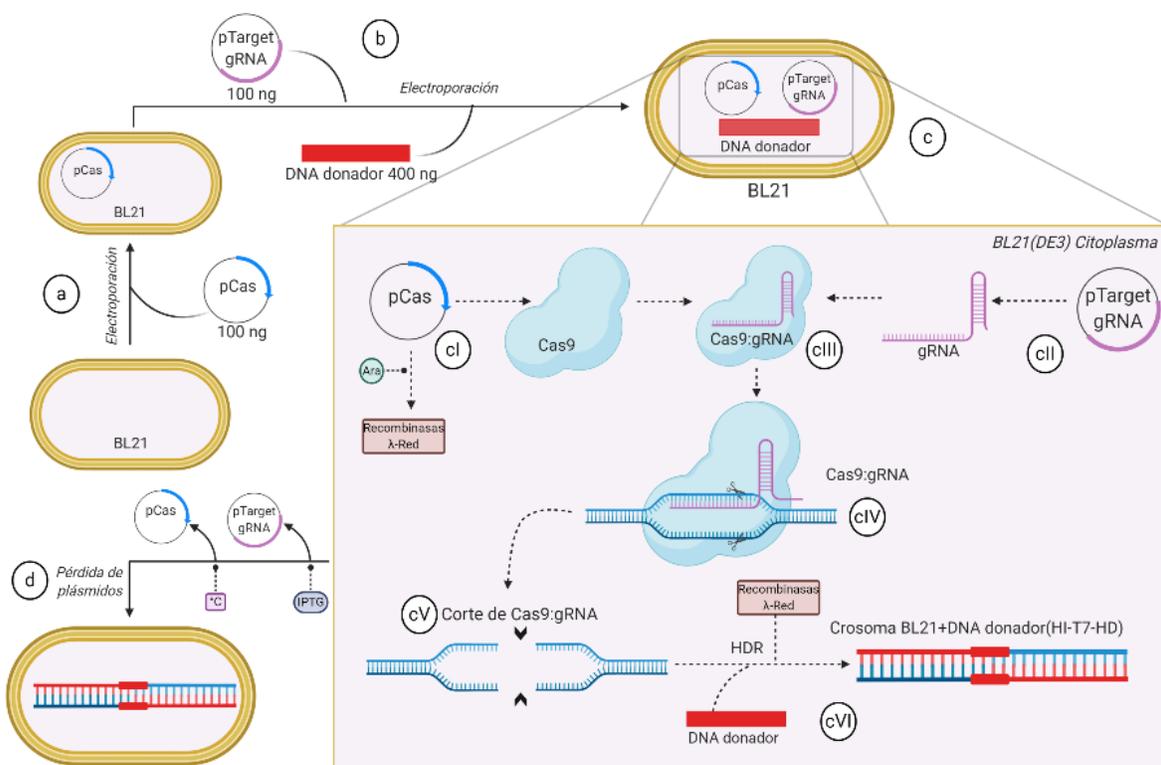
Curación de las colonias candidatas para eliminación de plásmidos.

Las colonias positivas se inocularon en medio LB con Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG a 0.5 mM, y se dejaron crecer por una noche a 30°C con agitación a 300 rpm. Posteriormente se estrió, en cajas de LB+Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dejando crecer a 30°C por una noche, con la finalidad de obtener colonias aisladas resistentes a Km. Las colonias seleccionadas se sembraron en cajas de LB+Spe (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y LB+Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para mostrar que las colonias son sensibles a Spe. Finalmente las colonias seleccionadas, resistentes a Km, se inocularon en 4 mL de LB sin antibiótico, a 42 °C por una

noche, esto para curar pCas por su origen sensible a temperatura y al día siguiente se sembraron en placas de: LB, LB+Km (30 µg/mL) y LB+Spe (30 µg/mL). Las células que estén curadas de ambos plásmidos deberán crecer a altas temperaturas (42°C) en placas con LB sin antibiótico.

Descripción del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9.

Finalmente se obtienen células que contienen los plásmidos pCas y pTarget: gRNA, incluyendo el ADN donador (HI-T7-HD) (Figura 6c). El plásmido pCas presenta un promotor inducible por arabinosa (*araBp*), para expresar el sistema de recominasas y también expresar a la endonucleasa Cas9 (Figura 6cI); mientras que el plásmido pTarget expresa el ARN guía (gRNA) (Figura 6cII). El ADN (HI-T7-HD) donador se ubica en el citoplasma de la célula. Al expresarse la enzima Cas9 se une al gRNA formando un complejo que se conoce como Cas9: gRNA (Figura 6cIII), en este paso el ARN guía (gRNA) buscará una región complementaria en el ADN de la célula (Figura 6cIV). En otras palabras, la complementariedad de las bases entre gRNA y el ADN del cromosoma de la célula representa la identificación del locus que se quiere editar. Al unirse el complejo, al ADN blanco, se generará un DSB que se reparará mediante el sistema de recominasas inducido por arabinosa (Figura 6cV). Las recominasas realizarán recombinación homóloga entre el ADN donador (HI-T7-HD), el cual contiene regiones homologas (HI y HD), y el ADN de la bacteria. De esta forma el ADN donador quedará integrado en el cromosoma de la bacteria (Figura 6cVI). Después de la recombinación genética, se debe curar la cepa, para eliminar los plásmidos transformados (pCas y pTarget: gRNA). Para curar y eliminar el plásmido, pTarget: gRNA, se induce con IPTG el promotor que regula la transcripción del gRNA. Este procedimiento permite la eliminación del plásmido (pTarget: gRNA) en la bacteria. Posteriormente se eleva la temperatura a más de 30°C para curar y eliminar el plásmido pCas, el origen de replicación de este plásmido es sensible a temperatura (Figura 6d).



Crosoma BL21+DNA donador(HI-T7-HD)

Figura 6. Sistema CRISPR-Cas9 en la cepa BL21. a) Transformación por electroporación de E. coli con 100 ng de pCas. b) Transformación por electroporación de E. coli/pCas con 100 ng de pTarget: gRNA y 400 ng de DNA donador (HI-T7-HD). c) Cepa BL21 con pCas, gRNA y HI-T7-HD. cI) El plásmido pCas transcribe la enzima Cas9 y el sistema de Recombinasas λ-red; cII) El plásmido pTarget transcribe gRNA; cIII) En el citoplasma Cas9 se une al gRNA, formando el complejo Cas9:gRNA; cIV) El complejo Cas9:gRNA corta la cadena complementaria de ADN; cV) Inducción con arabinosa para activar el sistema de Recombinasas λ-red, las recominasas utilizarán el ADN donador para realizar recombinación homóloga y finalmente obtener la integración de este fragmento en el cromosoma de BL21 (Molina-Vázquez, 2019). Imagen creada con BioRender.com

Conclusiones

Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 en E. coli

E. coli ha sido considerada como un microorganismo, de gran importancia a nivel industrial, para la obtención de diversos metabolitos de interés. Durante la última década se ha considerado como un organismo modelo para desarrollar nuevas herramientas de edición genética con una eficiencia de transformación alrededor de casi el 100% (Cho et al., 2018). De esta forma, el sistema CRISPR/Cas9 ha resultado ser una herramienta muy importante para su aplicación, en *E. coli*, implementado diferentes estrategias para el uso del sistema CRISPR/Cas9: i) interferencia en la expresión genética (CRISPRi); ii) activación o represión genética y iii) edición genética. En *E. coli* las diferentes estrategias, basadas en la implementación de la tecnología de CRISPR/Cas9, difieren en el uso de sus dos componentes: CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) y Cas9 (nucleasa 9 asociada a CRISPR). En este sentido, se han desarrollado plásmidos que contienen a los dos componentes plásmidos que contienen a cada uno de los componentes por separado.

Manipulación metabólica mediada por la interferencia de CRISPRi en E. coli:

La interferencia mediada por CRISPR (CRISPRi) es causada por la desactivación de la proteína Cas9 (dCas), lograda mediante mutaciones en los residuos catalíticos (D10A y H840A) (Cho et al., 2018). La pérdida de la función de ambos dominios, conduce a la inactivación de la nucleasa generando una dCas9, utilizada en la técnica conocida como CRISPRi. Durante esta variante de la técnica, un ARN guía (sgRNA por sus siglas en inglés "single-guide RNA") se une a la región de ADN de interés, interfiriendo con la ARN polimerasa (RNAP), y en consecuencia disminuye la transcripción del gen.

CRISPRi se ha implementado en *E. coli* utilizando dos plásmidos diferentes, el plásmido pdCas9 para sobreexpresar la nucleasa, mientras que el plásmido psgRNA sobreexpresa el ARN guía (Zuberi et al., 2017; Sander et al., 2019). En 2019 Sander y colaboradores utilizaron esta variante para interferir con la expresión transcripcional del gen *argR*, el cual codifica para el represor de arginina (Sander, 2019). Con la finalidad de sobreexpresar arginina, los autores diseñaron 10 ARNs guía que se unieron en diferentes posiciones de la región reguladora y la región codificadora de *argR*. Otro estudio que implementó esta variante, utilizó el sistema CRISPRi para inhibir la formación de biopelículas en *E. coli*, al interferir la expresión del gen *luxS*. Este gen codifica una enzima involucrada en la síntesis del autoinductor 2 (AI-2), el cual desencadena los primeros pasos de la formación de biofilm, obteniendo una reducción significativa en la formación de biopelículas (Zuberi et al., 2017).

Otra variante de la implementación de CRISPRi en *E. coli*, se presenta al clonar ambos elementos en el mismo plásmido, esto significa que la proteína dCas9 y las secuencias blanco sgRNA se expresan a partir del mismo plásmido (pdCas9-sgRNA) (Seong., et al., 2017; Qingyang, et al., 2020; Wan-Wen y I-Son, 2020). En este sentido, en 2017 Kim y colaboradores desarrollaron un sistema de interferencia CRISPRi para reprimir varios genes (*pta*, *frdA*, *ldhA* y *adhE*) involucrados en el redireccionamiento del flujo metabólico en *E. coli* (Seong, et al., 2017). Durante el estudio se evaluaron combinaciones simples, dobles, triples y cuádruples que permitieron evaluar el redireccionamiento del flujo metabólico. Un estudio similar se realizó para incrementar la producción de cadaverina en *E. coli* (Wan-Wen & I-Song, 2020). Durante el análisis se evaluó la interferencia individual en la transcripción de los genes *ygiG*, *speE*, *puuA*, y *speG*, así como la evaluación de combinaciones dobles, triples y cuádruples. Li y colaboradores, en 2020, implementaron esta variante para sobreproducir ácido aconítico en *E. coli* (Qingyang, et al., 2020). Implementando el sistema, dCas9-sgRNA, para interferir con la transcripción de genes glucolíticos (*pykA* y *pykF*) y del Ciclo de Krebs (*iclA*).

Manipulación metabólica mediante la activación o represión genética, mediada por CRISPR/Cas9 en E. coli.

En *E. coli* también se ha utilizado el sistema CRISPR/Cas9 para bloquear completamente la transcripción genética o activarla. En 2019 Zhang y colaboradores, utilizaron los plásmidos pCas y pTarget para sobreexpresar la enzima Cas9 activa y el ARN guía respectivamente, con la finalidad de reemplazar los promotores de los genes *panB*, *panC*, *panE* e *ilvC* de *E. coli*, por un promotor más fuerte (*trcp*) (Bo, et al., 2019). El cambio de promotor permitió el incremento en la transcripción de los genes antes mencionados, de esta forma incrementó la producción de ácido pantoténico. En este mismo estudio también se utilizó CRISPRi para identificar genes involucrados en la biosíntesis de ácido pantoténico.

Para la activación genética mediada por CRISPR en *E. coli*, se ha diseñado una variante muy compleja, en la que dCas9 se une a un ARN guía modificado (ARNc). Este ARN modificado funge como ensamble o puente entre dCas9 y una proteína híbrida que contiene al regulador transcripcional, en este caso MCP-SoxS (Dong, et al., 2018). El ARN modificado, o ARNc, reconoce en un extremo al sitio de unión de SoxS, ubicado en el DNA, mientras que en el extremo contrario presenta una horquilla de reconocimiento a la proteína MCP. De esta forma, los ARNc que reclutan activadores que pueden activar la transcripción genética (CRISPRa). En *E. coli* se ha implementado la activación

genética mediada por CRISPRa, para aumentar la producción de una vía de biosíntesis de etanol heteróloga. Con esta finalidad, se añadió un casete genético heterólogo, de *Zymomonas mobilis* con la piruvato descarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) en una cepa *E. coli*. La vía heteróloga convierte el piruvato en etanol, mientras que los genes clonados presentan un promotor débil. Durante la implementación del sistema, el complejo CRISPRa-SoxS se dirige río arriba del promotor y la producción de etanol aumenta ~ 3 veces (Dong et al., 2018).

El caso contrario se presentó durante la implementación del sistema CRISPR/Cas9 para la delección genética. La sobreproducción de L-tirosina en *E. coli* se logró utilizando los plásmidos, pCas y pTarget, con la finalidad de deletar los genes involucrados en las vías de L-fenilalanina (*pheA*), L-triptófano (*trpD*) y el gen del regulador *tyrR* (Sha, et al., 2020). En 2020, Su y colaboradores implementaron este mismo sistema para bloquear la expresión de varios genes, con la finalidad de incrementar la producción de ácido D-glucárico (Hui-Hui, et al., 2020). Este compuesto es ampliamente utilizado en la industria alimenticia, inhibidores de la corrosión y materiales biodegradables, entre otros. En este mismo sentido, Ma y colaboradores en 2019, inactivaron los genes *nuo* y *ndh* mediante la implementación del sistema CRISPR-Cas9. La eliminación de los genes favoreció el incremento de L-malato en *E. coli* (Ma, et al., 2019).

La producción de metabolitos en muchas ocasiones es difícil o mínima, por lo tanto es importante redirigir el flujo metabólico de manera que se obtenga una mayor concentración, esto se logra eliminando enzimas claves de la vía metabólica (Fokum et al., 2019). Jung y colaboradores han estudiado el uso del polihidroxialcanoato (PHA) como un sustituto potencial de los plásticos a base de petróleo que se puede producir en *E. coli* recombinante. Para generar la conversión completa de sustratos y una máxima producción eliminaron cuatro genes (*pflb*, *ldhA*, *adhE* y *fnr*), mediante el sistema CRISPR/Cas9. La cepa mutante (HR002) mostró acumulación de acetil-CoA y niveles disminuidos de subproductos, lo que resultó en incremento en el crecimiento celular y el contenido de PHA, demostrando la viabilidad para redirigir el flujo de carbono hacia la producción de PHA (Jung et al., 2019).

Manipulación metabólica mediante edición genética, mediada por CRISPR/Cas9 en E. coli.

E. coli ha sido ampliamente utilizada para la sobreproducción de metabolitos secundarios del Ciclo de Krebs y mediante la edición genética se logró reemplazar el gen de la malato deshidrogenada (*mdh*) de *E. coli* por el gen ortólogo de *Rhodospirillum rubrum* ATCC 17100 (RvMdh) y de la cepa *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 (RcMdh) (Faying, et al., 2020). Los resultados mostraron que en condiciones aeróbicas RvMdh fue mejor que RcMdh. En 2020, Gu y colaboradores implementaron el sistema CRISPR/Cas9 para integrar tres genes, de *Pseudomonas putida* ATCC 33015, en un plásmido. La sobre expresión de la xileno monooxigenasa (XMO), alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y benzaldehído deshidrogenasa (BZDH) de *Pseudomonas putida*, en *E. coli* favoreció la sobreproducción del ácido 5-metilpirazina-2-carboxílico (Liuyan, et al., 2020). Este compuesto es un intermediario farmacéutico muy importante, ampliamente utilizado en la producción de agentes hipoglucemiantes y fármacos hipolipemiantes.

Comentarios Finales

Los resultados demuestran que el ADN donador se integró en el cromosoma de la cepa de *E. coli* BL21. El diseño y construcción de los elementos de la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9 se realizaron de manera exitosa, permitiendo así la estandarización del protocolo y de las técnicas de Biología Molecular (extracción de plásmidos, digestión con enzimas de restricción, PCR, OE-PCR, CPEC, etc.). Se espera tener un gran impacto para su futura implementación en la obtención de cepas recombinantes que generen productos de interés industrial.

Limitaciones

La principal limitación del sistema CRISPR/Cas9 esta relacionada con el diseño del ARN guía (gRNA), debido a que dirige el funcionamiento de la endonucleasa Cas9 a la región blanco en el genoma. El diseño del ARN guía debe ser muy específico para asegurar la formación de un complejo funcional Cas9-sgRNA. Por otra parte, la clonación circular mediante extensión de la polimerasa, representa otro punto de control crítico debido a que permite el cambio de gRNA a partir del vector pTarget. Y por último mecanismo de solapamiento (verlapping) representa otro paso crucial de la técnica.

Recomendaciones

En la última década, el sistema CRISPR/Cas9 ha tenido una gran gama de aplicaciones, sin embargo, muchas de estas no se han establecido en una metodología estandarizada que permita la implementación in silico. Por lo tanto, se recomienda que el sistema CRISPR/Cas9 se implemente en cepas de *E. coli*, y posteriormente poder desarrollarse en diversos organismos ortólogos u organismos más alejados filogenéticamente. Por otra parte, se recomienda utilizar algoritmos computacionales, tales como: SNAPgene. El cual permite simular los resultados de las técnicas de PCR,

así como del diseño del ADN donador y diferentes páginas que permiten diseñar el gRNA donde se calculan los valores de on-target y off-target, para una mejor precisión.

Referencias

- Bo, Z., Xiao-Ming, Z., Wei, W., Zhi-Qiang, L. & Yu-Guo, Z. (2019). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for d-pantothenic acid production. *Food Chem.* 294:267-275. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.044
- Brito-Alarcón, E. (2016). *Modificación genética de Escherichia coli mediante el Sistema CRISPR-Cas9 [Tesis de licenciatura]*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cho, S., Shin, J., & Cho, B. K. (2018). Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041089>
- Dong, C., Fontana, J., Patel, A., Carothers, J. M., & Zalatan, J. G. (2018). Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04901-6>
- Doudna, J. and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346 (6213), pp.1258096-1258096.
- Fayin, Z., Ka-Yiu, S. & Bennett, G. N. (2020). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for malate production with a temperature sensitive malate dehydrogenase. *Biochemical Engineering Journal*. 164, 107762, 1-8. doi.org/10.1016/j.bej.2020.107762
- Fokum, E., Zabed, H. M., Guo, Q., Yun, J., Yang, M., Pang, H., An, Y., Li, W., & Qi, X. (2019). Metabolic engineering of bacterial strains using CRISPR/Cas9 systems for biosynthesis of value-added products. *Food Bioscience*, 28, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.003>
- Haft, D., Selengut, J., Mongodin, E. and Nelson, K. (2005). A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*, 1(6), p.e60.
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Hui-Hui, S., Fei, P., Xiao-Yang, O., Ying-Jie, Z., Min-Hua, Z. & Wen-Yong, L. (2020). Combinatorial synthetic pathway fine-tuning and cofactor regeneration for metabolic engineering of *Escherichia coli* significantly improve production of D-glucaric acid. *N Biotechnol.* 59:51-58. doi: 10.1016/j.nbt.2020.03.004.
- Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., & Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>
- Jung, H. R., Yang, S. Y., Moon, Y. M., Choi, T. R., Song, H. S., Bhatia, S. K., Gurav, R., Kim, E. J., Kim, B. G., & Yang, Y. H. (2019). Construction of efficient platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway. *Polymers*, 11(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym11030509>
- Jung, H. R., Yang, S. Y., Moon, Y. M., Choi, T. R., Song, H. S., Bhatia, S. K., Gurav, R., Kim, E. J., Kim, B. G., & Yang, Y. H. (2019). Construction of efficient platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway. *Polymers*, 11(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym11030509>
- Liuyan, G., Haibo, Y., Xueqin, L., Guangsheng, L., Rigang, C. & Jianghua, L. (2020). High-yield and plasmid-free biocatalytic production of 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid by combinatorial genetic elements engineering and genome engineering of *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 134, 109488, 1-8.
- Ma, J., Hui, Q., Tianwen, Z. et al. (2019). Novel biosynthesis of L-malate based on overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 149:107255, 1-8. doi: 10.1016/j.bej.2019.107255
- Makarova, K., Wolf, Y., Al Khanbashi, O., Costa, F., Shah, S., Saunders, ST., Barrangou, R., Brouns, S., Charpentier, E., Haft, D., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Terns, R., Terns, M., White, M., Yakunin, A., Garrett, R., van der Oost, J., Backofen, R. and Koonin, E. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (11), pp.722-736.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Molina-Vázquez, E. R. (2019). *Ingeniería metabólica de Escherichia coli para la producción de 2,3-butanodiol a partir de glucosa mediante un sistema de expresión inducible por temperatura [Tesis de maestría]*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Qingyang, L., Peng, Z., Hang, Y., Zhaonan, L., Haifeng, Z. & Pingfang, T. (2020). CRISPR interference-guided modulation of glucose pathways to boost aconitic acid production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 19(1):174. doi: 10.1186/s12934-020-01435-9.
- Reisch, C. R., & Prather, K. L. J. (2015). The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 5(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep15096>
- Sander, T., Wang, C. Y., Glatter, T. & Link H. (2019). CRISPRi-Based Downregulation of Transcriptional Feedback Improves Growth and Metabolism of Arginine Overproducing *E. coli*. *ACS Synth Biol.* 8(9):1983-1990. doi: 10.1021/acssynbio.9b00183.
- Seong, K. K., Wonjae, S., Gui, H. H., Dae-Hee L., Seung-Goo L. (2017). CRISPR interference-guided multiplex repression of

- endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 16(1):188. doi: 10.1186/s12934-017-0802-x.
- Sha, X., Qin, W., Weizhu, Z., Youran, L., Guiyang, S. & Jingwen, Z. (2020). Construction of a heat-inducible *Escherichia coli* strain for efficient de novo biosynthesis of l-tyrosine. *Process Biochemistry.* 92, 85-92.
- Sternberg, S., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. and Doudna, J. (2014). DNA Interrogation by the CRISPR RNA-Guided Endonuclease Cas9. *Biophysical Journal*, 106(2), p.695a.ing in bacteria. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04901-6>
- Wan-Wen, T. & I-Son N. (2020). Metabolic manipulation through CRISPRi and gene deletion to enhance cadaverine production in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* 130(6):553-562. doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.07.013.
- Zhao, J., & Zhang, D. (2020). Expanding application of CRISPR-Cas9 system in microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.001>
- Zuberi, A., Misba, L., & Khan, A. U. (2017). CRISPR interference (CRISPRi) inhibition of luxS gene expression in *E. coli*: An approach to inhibit biofilm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00214>

Notas Biográficas

La alumna Luz Teresa Reyes González es estudiante de la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias de la Escuela superior de Apan (ESAp) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Actualmente realiza su tesis de Licenciatura en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Los Maestros en Ciencias Eliseo Ronay Molina Vázquez y Eduardo Brito Alarcón actualmente son estudiantes de doctorado del posgrado en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología - UNAM. Los Maestros en Ciencias son los pioneros en la implementación de la Tecnología de CRISPR/Cas9 en el laboratorio del Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

El Dr. Alfredo Martínez Jiménez es Líder Académico en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología – UNAM, y pertenece al Sistema Nacional de Investigadores, nivel III.

El Dr. Martin Peralta Gil es profesor investigador en la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias de la Escuela Superior de Apan de la UAEH, y pertenece al Cuerpo Académico Biociencias Moleculares.

Agradecimientos

A la Maestra en Narrativa Annett Marianne Peralta Arteaga por la revisión del manuscrito. La Maestra es egresada de la Escuela de Escritores de Madrid, España.