



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

DESARROLLO DE UN SISTEMA MODULAR DE REGULACIÓN DE PROCESOS GENÉTICOS Y METABÓLICOS VÍA CRISPRi PARA EL CONTROL DEL COMPORTAMIENTO CELULAR

TAMARA FRANCISCA MATUTE TORRES

Tesis para optar al grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
FERNÁN FEDERICI
TIMOTHY RUDGE

Santiago de Chile, Junio, 2017

© 2017, Tamara Matute



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

DESARROLLO DE UN SISTEMA MODULAR DE REGULACIÓN DE PROCESOS GENÉTICOS Y METABÓLICOS VÍA CRISPRi PARA EL CONTROL DEL COMPORTAMIENTO CELULAR

TAMARA FRANCISCA MATUTE TORRES

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

FERNAN FEDERICI NOE

TIMOTHY JAMES RUDGE

DANIEL GARRIDO CORTES

JUAN EDUARDO KEYMER VERGARA

JUAN CARLOS HERRERA MALDONADO

Para completar las exigencias del grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, Junio, 2017

*Dedicado a Isaac, mi familia y
amigos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a mi tutor, Fernán Federici, por motivarme profundamente en el desarrollo de tecnología y conocimiento científico al servicio de la comunidad. Agradezco también su guía, apoyo y enseñanzas durante todo este proceso.

Quiero agradecer a mi tutor, Timothy Rudge, por toda su ayuda, apoyo y buena disposición ante todas mis consultas en el desarrollo de esta tesis. Agradezco sus enseñanzas, correcciones y reflexiones.

Agradezco al profesor, Ricardo Pérez, por todo su apoyo y ayuda al inicio de este magister.

A Isaac Núñez por el trabajo desarrollado en su tesis que, mediante la colaboración con un objetivo común, dio origen a la publicación adjunta.

A Ilenne Del Valle, Anton Kan, Atri Choksi, Drew Endy y Jim Haseloff por su colaboración en la publicación del artículo adjunto.

Al profesor, Rodrigo Gutiérrez, por facilitarnos siempre apoyo incondicional en nuestra investigación.

Al apoyo financiero de los proyectos CONICYT-PAI/Concurso Nacional de Apoyo al Retorno de Investigadores/as desde el Extranjero Folio 82130027 y Fondecyt Iniciación 11140776.

A Bernardo Pollak, por introducirnos al mundo de la investigación y mostrarnos lo entretenida que puede llegar a ser.

Agradezco a Isaac por su apoyo incondicional, confianza y ser siempre un magnifico equipo.

Finalmente, agradezco a toda mi familia por ser un ejemplo de esfuerzo y perseverancia cada día.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Enfoques de la Biología Sintética	1
1.2 Fabricación de ADN	2
1.3 Sistema CRISPR	4
1.3.1 CRISPR para edición de genomas	4
1.3.2 CRISPRi para regulación de genes.....	5
1.4 Violaceína	6
1.5 Auxotrofia	7
1.6 Regulación de procesos biológicos a la escala de sistemas multicelulares	10
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
2.1 Hipótesis.....	11
2.2 Objetivo General	11
2.3 Objetivos específicos	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 Vectores y partes genéticas	12
3.2 Condiciones de crecimiento	13
3.3 Selección y diseño de sgRNAs	16
3.4 Transformaciones simples y Co-transformaciones	16

3.5	Segregación de plásmidos en colonias.....	17
3.6	Microscopía y fluorescencia	18
4.	RESULTADOS	19
4.1	Sistema de construcción modular y combinatorial de vectores	19
4.2	Regulación de genes mediante sistema CRISPRi/dCas9	20
4.3	Regulación de genes en subdominio específico mediante sistema CRISPRi/dCas9.....	22
4.4	Regulación de la vía metabólica de metionina mediante CRISPRi/dCas9.....	23
4.5	Auxotrofía inducible a metionina a través de CRISPRi/dCas9	27
4.6	Regulación del crecimiento en espacio y tiempo de poblaciones bacterianas.....	31
5.	CONCLUSIONES.....	38
	BIBLIOGRAFIA	41
	A N E X O S	46
	Anexo A: Artículo ISI.....	47
	Anexo B: Primers utilizados	58

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1: Medio LB	14
Tabla 3.2: Medio M9-glucosa	14
Tabla 3.3: Soluciones <i>Stock</i>	15

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Ensamblaje Gibson basado en secuencias UNSes	3
Figura 1-2: Vía general de biosíntesis del pigmento Violaceína	7
Figura 1-3: Vía general de biosíntesis del aminoácido metionina en <i>E. coli</i>	9
Figura 4-1: Esquema representativo de los tipos de vectores desarrollados en esta tesis conteniendo sitios UNSes	19
Figura 4-2: Estructura de los vectores utilizados en la comparación del efecto de diferentes sgRNAs sobre el operón de violaceína.....	20
Figura 4-3: Regulación CRISPRi/dCas9 de la producción del pigmento violaceína.....	21
Figura 4-4: Regulación de la vía de síntesis de violaceína en espacio y tiempo	22
Figura 4-5: Estructura de los vectores pCh-met utilizados en la regulación del gen metA.....	24
Figura 4-6: Colonias <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con cuatro plásmidos pCh-met conteniendo los cuatro sgRNAs con secuencia destino en el gen metA.....	24
Figura 4-7: Expresión de sfGFP luego de 24 horas de tratamiento con IPTG.....	25
Figura 4-8: Regulación del crecimiento (OD600) mediante la inhibición de la expresión del gen metA en respuesta a la inducción por IPTG del sistema CRISPRi/dCas9.....	27
Figura 4-9: Regulación espacial y temporal del sistema CRISPRi.....	28
Figura 4-10: Crecimiento celular (OD600) de las cuatro co-transformaciones de plásmidos SEG con pAct6.	30
Figura 4-11: Regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas.	32
Figura 4-12: Regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas.	34

Figura 4-13: Ensayo temporal de la regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas conteniendo S11Ma/SEG8	35
Figura 4-14: Ensayo temporal del efecto del patrón inicial en la regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas conteniendo SEG11/S8Ma.....	36

RESUMEN

TALEN y CRISPR/Cas9 han revolucionado la ingeniería genética, permitiendo la regulación de cualquier gen de interés en el genoma de organismos. CRISPR interferencia (CRISPRi) es un método desarrollado a partir de CRISPR/Cas9 que permite controlar la expresión de genes, mediante la generación de un complejo que reconoce un sitio específico del ADN e interfiere con la unión de la ARN polimerasa y/o la elongación transcripcional (Larson et al., 2013). El sistema CRISPRi se compone de una proteína Cas9 sin actividad endonucleasa, llamada *dead* Cas9 “dCas9”, y un ARN guía (sgRNA) que tiene la función de asociar el complejo formado con el sitio específico que se desea regular. El sgRNA se compone de un esqueleto invariable al 3', que interactúa con dCas9, y una zona de 20 nucleótidos al 5' que interactúa con el ADN y puede ser diseñada de manera arbitraria por el usuario.

En este trabajo se exploró la modularización y caracterización del sistema CRISPRi para ser utilizado en la regulación temporal y espacial de procesos biológicos en poblaciones bacterianas. A través del diseño de diversos sgRNAs y elementos funcionales de ADN modulares, se logró la regulación del comportamiento celular tanto en cultivos líquidos como en cultivos sólidos. Posteriormente, se exploró la regulación de procesos celulares en subdominios espaciales en el interior de colonias bacterianas. Finalmente, se utilizó el sistema CRISPRi para la regulación del crecimiento de células localizadas en un grupo definido y controlado en el interior de colonias bacterianas. Estos resultados en conjunto mostraron la exitosa implementación modular y combinatorial del sistema CRISPRi para la regulación espacial y temporal de procesos biológicos en un sistema multicelular.

Palabras Claves: Biología Sintética, CRISPRi, sgRNA, dCas9.

ABSTRACT

TALEN and CRISPR/Cas9 have revolutionized genetic engineering, allowing the regulation of any genomic sequence of interest. CRISPR interference (CRISPRi) is a method developed from CRISPR/Cas9 for the reversible disruption of gene expression through the generation of a complex that recognizes a specific DNA site and interferes with the binding of RNA polymerase and/or transcriptional elongation (Larson et al., 2013). The CRISPRi system is composed of a Cas9 with no endonuclease activity, called dead Cas9 “dCas9”, and a guide RNA (sgRNA), which has the role of associating the complex to the specific site to regulate. The sgRNA is composed of an invariable sequence at the 3′ end, which interacts with dCas9, and a zone of 20 nucleotides at the 5′ end that interacts directly with the target DNA and can be designed arbitrarily by the user.

This work explores the modularization and characterization of the CRISPRi system to be used in the temporal and spatial regulation of biological processes in bacterial populations. Regulation of cellular behavior in liquid and solid culture was achieved through the design of diverse sgRNAs and functional elements of modular DNA. Next, the regulation of cellular processes was explored in spatial domains within bacterial colonies. The CRISPRi system was used for the regulation of growth in well defined cell groups located inside bacterial colonies. Together, these results showed the successful implementation of a modular and combinatorial CRISPRi system for the spatial and temporal control of biological processes in multicellular systems.

Keywords: Synthetic biology, CRISPRi, sgRNA, dCas9.

1. INTRODUCCION

1.1 Enfoques de la Biología Sintética

La biología sintética es una nueva disciplina que emerge entre la ingeniería y las ciencias de la vida tratando de formular nuevas reglas, modelos y abstracciones de ingeniería de sistemas biológicos. Así, esta disciplina combina enfoques de diferentes ramas de la ingeniería, la física y la biología para la construcción de sistemas sintéticos (Andrianantoandro, Basu, Karig, & Weiss, 2006). Gran parte de la comunidad de biología sintética propone disminuir la complejidad biológica con enfoques de estandarización, desacoplamiento y abstracción con el fin de tratar a la materia viviente como un sustrato de ingeniería predecible (Endy, 2005). La estandarización se refiere a encontrar especificaciones de diseño que simplifiquen el modelamiento y la construcción de sistemas de escala mayor. Se ha intentado, por ejemplo, encontrar valores de medición *standard* para diferentes parámetros, tales como la tasa de transcripción, que ayuden en la caracterización de partes y posterior ensamblaje en implementaciones de mayor escala (Kelly et al., 2009). La abstracción se refiere a abstraer procesos biológicos elementales en reglas y funciones que puedan ser utilizados en modelos matemáticos y simulaciones computacionales (Andrianantoandro et al., 2006; Nielsen et al., 2016).

La modularidad se refiere a encontrar estructuras y funciones definidas que actúen como “*building blocks*” de sistemas más complejos. Algunos trabajos buscan definir esta modularidad al nivel de piezas individuales (e.g. promotores, RBS), mientras que otros grupos han intentado encontrar un límite superior a estos módulos, tales como *invertidores* de señal (Nielsen et al., 2016). Este último trabajo demostró el diseño automatizado de 60 circuitos de 3 *inputs* (hasta 55 partes y 880,000 pares de bases) con un 92% de funcionamiento correcto (Nielsen

et al., 2016). Esto se basó en la caracterización previa un gran número de *invertidores* de señal, cuyos parámetros fueron informados a la herramienta computacional *Cello* para que ésta definiera la secuencia de ADN (sin intervención humana) de diferentes circuitos abstractos requeridos por el usuario. Este trabajo demostró por primera vez una correspondencia entre la modularidad funcional y la modularidad física (i.e. fragmentos de ADN) para ensamblar sistemas vía compilación de funciones básicas.

Una nueva rama de la Biología Sintética propone nuevas abstracciones que buscan incorporar formalmente la complejidad biológica en el proceso de diseño (Doursat, Sayama, & Michel, 2013; Lim, 2010; Macia & Sole, 2014). Este nuevo enfoque busca entender y utilizar la autoorganización y los fenómenos colectivos indagando pistas en la física de sistemas complejos y mecánica estadística, que es usada por la biofísica para entender los procesos biológicos (Phillips et al., 2012).

1.2 Fabricación de ADN

La fabricación de instrucciones genéticas es una herramienta fundamental para la biología sintética. Ésta se basa en nuevos métodos de ensamblaje de fragmentos de ADN y gramáticas estandarizadas para la construcción, así también como en la síntesis comercial de grandes fragmentos de ADN. Entre los métodos de ensamblaje, se destaca el método de *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009), originalmente desarrollado para la síntesis del genoma de *Micoplasma micoides* (Gibson et al., 2010). Este método permite el ensamblaje de largas piezas de ADN en una reacción simple a partir de los fragmentos individuales que se desea ensamblar. Estos fragmentos son generalmente creados por PCR o síntesis comercial. Las zonas de unión entre fragmentos dependen de la homología de secuencia de 20-40 pares de bases del final del primer fragmento y el principio del siguiente. Así, estas secuencias se definen arbitrariamente por el usuario de

acuerdo con la naturaleza de los fragmentos a ensamblar, sin restricciones de secuencia y sin dejar nucleótidos no deseados entre fragmentos (i.e. *seamless assembly*, a diferencia de los métodos tradicionales basados en enzimas de restricción). Una desventaja de este método es que se requiere la síntesis de nuevos partidores para amplificar los fragmentos por PCR previo a cada ensamblaje nuevo. Esto impone restricciones de costo y tiempo, ya que cada unión nueva entre fragmentos requiere de nuevos partidores y reacciones de PCR. Una solución a este problema es el uso de secuencias de nucleótidos únicos (UNSeS) flanqueando los fragmentos de interés para utilizar los mismos partidores para cualquier ensamblaje nuevo entre piezas (Torella et al., 2014). Este método se basa en una lista de secuencias de 40 pares de bases, denominados UNSeS, que flanquean las unidades transcripcionales utilizadas (Promotor - Sitio de unión al ribosoma (RBS) – Secuencia de ADN codificante (CDS) - Terminador) y facilitan el montaje ordenado y rápido de vectores con múltiples genes (Figura 1-1).

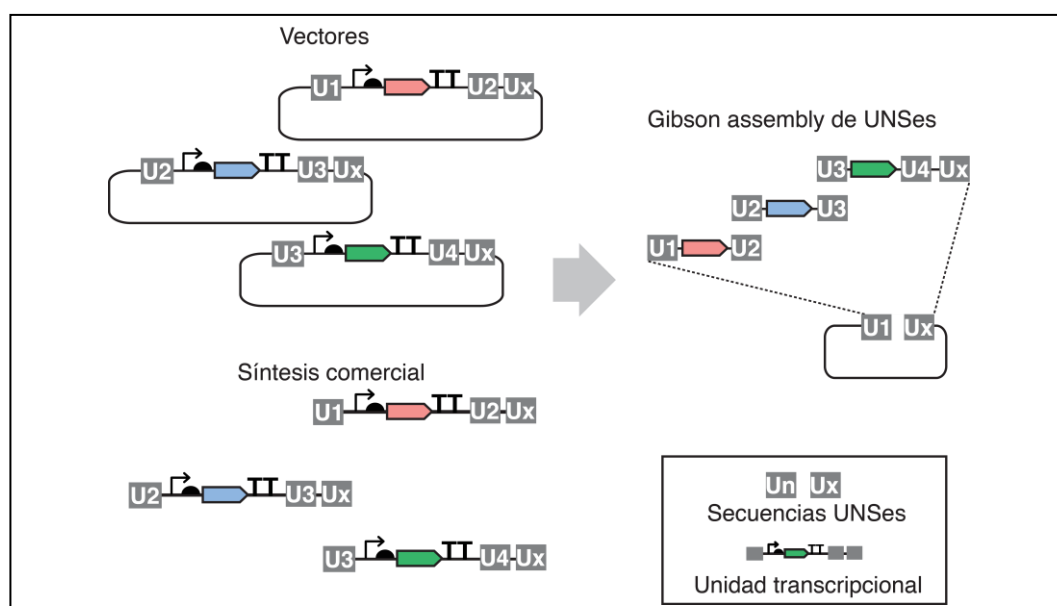


Figura 1-1: Ensamblaje Gibson basado en secuencias UNSeS. Las unidades transcripcionales (promotor-RBS-CDS-terminador) pueden ser amplificadas por PCR con *primers standards* que se unen a las secuencias UNSeS, o bien, usadas directamente desde fragmentos sintetizados comercialmente.

Las secuencias biológicamente inactivas del sistema UNSes, no tienen problemas de homología con secuencias propias del genoma de *E.coli*, por lo que se evitan los problemas de amplificación o ensamblaje inespecífico. Dentro de los sitios UNSes es posible poner una unidad transcripcional (TU) completa (promotor-RBS-CDS-terminador) y trasladarla a cualquier otro *backbone* que utilice esta nomenclatura, pudiendo ensamblar múltiples plásmidos con diferentes TU de manera simple, rápida y económica.

1.3 Sistema CRISPR

1.3.1 CRISPR para edición de genomas

La edición de genomas, i.e. excisión, inserción o cambio arbitrario de bases puntuales, es un área de gran actividad dentro de la biología sintética (Haimovich, Muir, & Isaacs, 2015). Tres técnicas han sido creadas para la regulación de secuencias de interés dentro de genomas completos de organismos: las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), activadores de transcripción TALENs y las nucleasas de secuencias palindrómicas repetidas inversas (CRISPR/Cas). ZFNs involucra la fusión de proteínas dedos de zinc con dominios de excisión de ADN no específico de la endonucleasa FokI, mientras que TALENs se refiere a la fusión del dominio de escisión FokI con dominios de unión a ADN derivados de las proteínas TALE, las cuales contienen múltiples dominios de repetición de aminoácidos que reconocen a un par de bases único (Gaj, Gersbach, & Iii, 2013). Por su parte, el sistema CRISPR/Cas es parte del sistema inmune de bacterias y arqueas, el cual les confiere inmunidad adquirida mediante la incorporación de fragmentos de ADN viral o plásmido en los *loci* CRISPR, cuyos crRNA transcritos son utilizados para guiar la degradación de las secuencias homólogas (Esvelt et al., 2013). Existen diferentes tipos de sistema CRISPR, específicamente en el sistema tipo II, de

Streptococcus pyogenes, que funciona mediante la formación del complejo entre la nucleasa Cas9, el crRNA y el ARN de trans-activación (tracrRNA), que al juntarse son capaces de unir el complejo a la secuencia destino en el ADN foráneo y mutarlo por la actividad nucleasa de Cas (Larson et al., 2013). Durante el año 2012, Jinek et al. demostró que crRNA y tracrRNA forman una estructura de ARN que se asocia directamente con la proteína Cas9, la cual podía ser reemplazada por un único ARN sintético que conserva la función de ambos, llamado ARN guía (sgRNA). Este trabajo ayudó a simplificar el sistema y otorgarle un potencial a CRISPR/Cas9 como herramienta de edición de genomas. El sgRNA, se compone de un esqueleto invariable al 3', que interactúa con Cas9 y una zona de 20 nucleótidos en el 5' que alberga la secuencia que interactúa con el ADN destino. Esta secuencia puede ser diseñada de manera arbitraria por el usuario para definir la secuencia destino a regular dentro del genoma. La secuencia destino se localiza junto a una secuencia PAM (*Protospacer adjacent motif*), compuesta de tres nucleótidos en el caso de Cas9, que es necesaria para la unión del complejo sgRNA/Cas9 a la secuencia de ADN destino.

1.3.2 CRISPRi para regulación de genes

Una modificación de la herramienta CRISPR/Cas, ha dado lugar al sistema CRISPR interferencia (CRISPRi). CRISPRi es un método que permite controlar la expresión de genes, mediante la generación de un complejo que reconoce un sitio de ADN e interfiere con la unión de la ARN polimerasa y la elongación transcripcional sin mutar el ADN destino (Larson et al., 2013). La principal diferencia con el sistema de edición de genes CRISPR es la modificación de la proteína Cas9, a la cual se inactivó su capacidad endonucleasa, tomando en nombre de “*dead Cas9*” o dCas9. El sistema CRISPRi se basa entonces en la co-expresión de la proteína dCas9 y un ARN guía (sgRNA), que tiene la función de

asociar al complejo con el sitio destino a bloquear. Lo anterior permite la regulación de genes de manera reversible y sin perder la capacidad del sistema CRISPR de permitir la regulación secuencia-específica de genomas. Dadas las características reversibles del sistema, CRISPRi permite crear fácilmente fenotipos condicionales (e.g. auxótrofos inducibles).

A diferencia de los sistemas artificiales de regulación génica basados en factores de transcripción proteicos, el funcionamiento de CRISPRi está basado en fenómenos de apareamiento de bases Watson-Crick entre sgRNA y ADN destino, lo cual brinda ortogonalidad, especificidad y baja carga metabólica debido a la ausencia de traducción de sgRNAs (Nielsen & Voigt, 2014). Todas estas características hacen de CRISPRi un sistema simple, modulable y con mayor versatilidad para su aplicación en biología sintética.

1.4 Violaceína

En este trabajo, se propuso utilizar la vía de síntesis de violaceína como modelo de vía metabólica a regular mediante CRISPRi dado su fenotipo visual significativo. La violaceína es un pigmento antibacteriano de amplio espectro producido por varias bacterias Gram-negativas como *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, y *Pseudoalteromonas tunicata* D2, entre otras (Hoshino, 2011). Posee una estructura dimérica compuesta por tres subunidades 5-hidroxiindol, oxindol y 2-piironidona, las cuales se forman mediante la condensación de dos moléculas de triptófano modificadas (August et al., 2000). El *cluster* genético de la biosíntesis de violaceína está compuesto por cinco genes, VioABCDE, que sintetizan las proteínas encargadas de la catalización enzimática del proceso (Hoshino, 2011). La ruta biosintética de la violaceína sigue el siguiente orden: VioA→VioB→VioE→VioD→VioC, donde la interrupción de los genes VioA, VioB o VioE anula completamente la biosíntesis de violaceína

(Hoshino, 2011), mientras que la disrupción de los genes VioC o VioD da como resultado la producción de alguno de sus precursores (August et al., 2000). Específicamente, la delección de los genes VioC y VioD resulta en la formación de un pigmento verde (Balibar & Walsh, 2006).

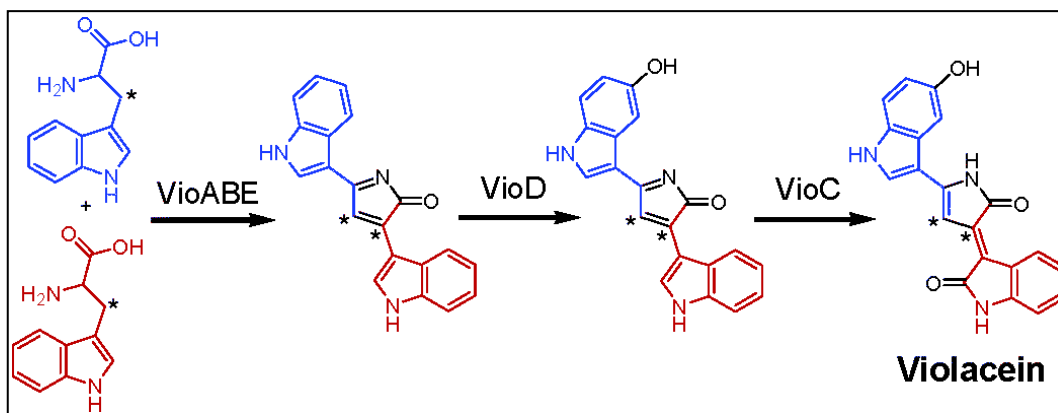


Figura 1-2: Vía general de biosíntesis del pigmento Violaceína. El pigmento se forma por la condensación de dos moléculas de triptófano modificadas (a la izquierda en azul y rojo), que dan origen a las tres subunidades que componen la violaceína: 5-hidroxiindol, oxindol y 2-piironidona (a la derecha en azul, negro y rojo, respectivamente). Vio A, B, C, D, E: Enzimas catalizadoras del proceso. Fuente: Balibar & Walsh, 2006.

1.5 Auxotrofia

La auxotrofia es la incapacidad de un organismo de sintetizar un compuesto para su crecimiento normal, viéndose obligado a tomar éste desde el medio de cultivo para su proliferación (Griffiths et al., 2002). Generalmente, esto ocurre como resultado de una mutación o defecto en una vía síntesis, que hace al organismo incapaz de producir una enzima particular que llegue a ser funcional (Curtis et al., 2004).

En este trabajo, se propone crear una cepa de *Escherichia coli* auxótrofa reversible del aminoácido metionina a través del uso del sistema CRISPRi sobre el gen *metA* de su vía de biosíntesis. La metionina es un aminoácido esencial en todos los organismos, comúnmente conocido por su rol en el inicio de la traducción. Es un aminoácido proteinogénico y un componente del cofactor S-adenosil metionina (Ferla & Patrick, 2014).

En *Escherichia coli*, la vía de síntesis de metionina es a partir de homoserina (Figura 1-3), que a su vez se deriva del aspartato a través de dos reducciones consecutivas del grupo carboxilo terminal. La homoserina es activada por la transferencia de un grupo succinilo desde succinil-CoA, reacción que es catalizada por la enzima O-succiniltransferasa de homoserina, codificada por el gen *metA*. Una vez activa la homoserina, se produce trans-sulfurilación, es decir la transferencia de un grupo tiol desde la cisteína a la homoserina formando homocisteína. Esta reacción es catalizada en dos etapas por las enzimas cistationina c-sintasa (codificada por el gen *metB*) y cistationina b-liasa (codificada por *metC*). Finalmente, se produce una S-metilación de la homocisteína, la cual puede ser llevada a cabo por cualquiera de las enzimas metionina sintasa codificadas por los genes *metH* y *metE*, respectivamente (Ferla & Patrick, 2014).

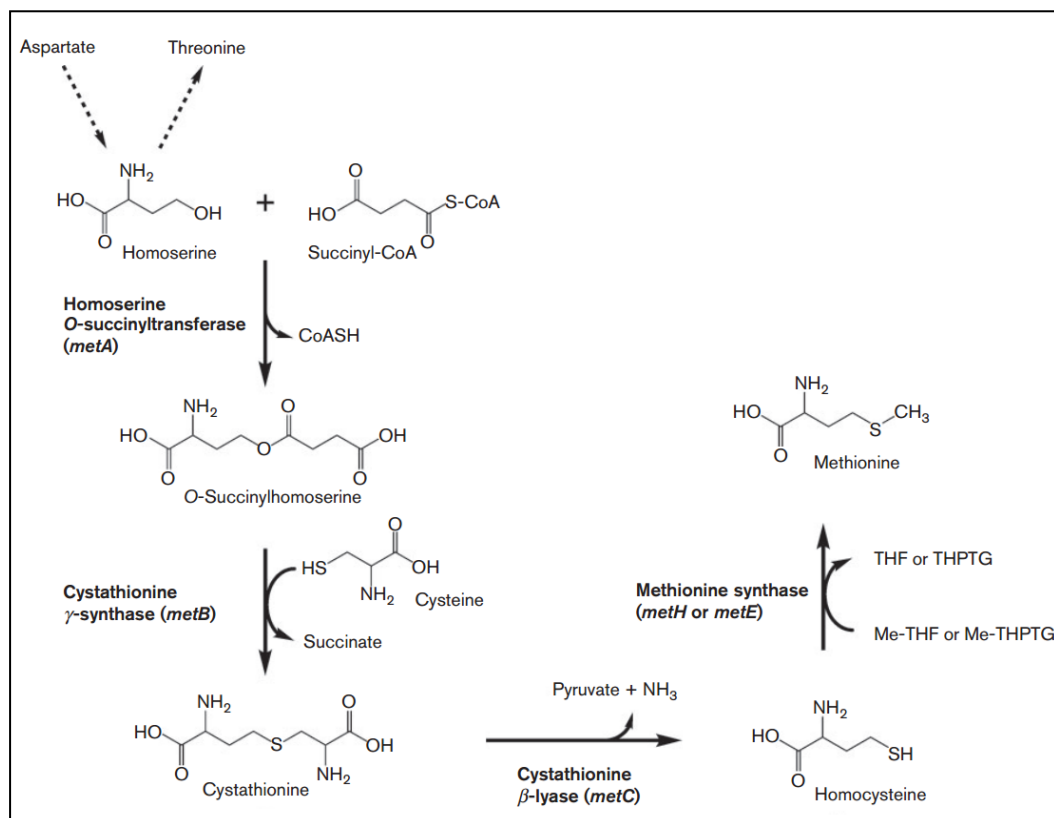


Figura 1-3: Vía general de biosíntesis del aminoácido metionina en *E. coli*.

Dos reducciones consecutivas grupo carboxilo terminal del aspartato, dan como resultado homoserina, la cual es activada por la transferencia de un grupo succinilo desde succinil-CoA. La reacción de activación de homoserina es catalizada por la enzima O-succiniltransferasa de homoserina, codificada por el gen *metA*. La homoserina activa es trans-sulfurada formando homocisteína, reacción llevada a cabo por las enzimas cistationina c-sintasa y b-liasa (codificadas por los genes *metB* y *metC*, respectivamente). Finalmente, la homocisteína es S-metilada por la enzima metionina sintetasa (codificada por el gen *metH* o *metE*) generando el aminoácido metionina. La inhibición en la producción de la enzima O-succiniltransferasa de homoserina no permite la activación de la homoserina, lo que da como resultado el bloqueo de la vía de síntesis y la consecuente formación de una cepa auxótrofa en metionina. Fuente: Ferla & Patrick, 2014.

1.6 Regulación de procesos biológicos a la escala de sistemas multicelulares

Durante la primera etapa, la biología sintética se ha enfocado en la ingeniería de procesos biológicos en sistemas unicelulares (Endy, 2005) e *in vitro* (Garamella, Marshall, Rustad, & Noireaux, 2016; Qian, Winfree, & Bruck, 2011). Una segunda etapa de este campo se ha enfocado en la ingeniería de procesos multicelulares como respuesta a las restricciones impuestas en el contexto unicelular, tales como carga metabólica (Carbonell-Ballester, Garcia-Ramallo, Montañez, Rodriguez-Caso, & Macía, 2016) y la estabilidad de grandes construcciones genéticas (Sleight & Sauro, 2013). La ingeniería de procesos multicelulares involucra procesos de dinámica espacial que requieren necesariamente de modelos y abstracciones provenientes principalmente de la biología teórica, biofísica, biología del desarrollo, teoría de la computación, ecología y biología de sistemas. Esta exploración está abriendo nuevos horizontes para la biología sintética y permitiendo desarrollar nuevos modelos que complementen los enfoques basados en paradigmas de la ingeniería eléctrica y teoría de control que han dominado gran parte de la primera etapa de este joven campo (e.g. ingeniería de consorcios bacterianos (Brenner, You, & Arnold, 2008; Kong, Celik, Liao, Hua, & Lu, 2014), ingeniería de tejidos (Cachat et al., 2016; Davies & Cachat, 2016) y dinámica espacial (Basu, Gerchman, & Collins, 2005).

La ingeniería a escala multicelular, e.g. órganos o consorcios bacterianos artificiales, requiere de funciones tanto para establecer y mantener patrones como para regular procesos biológicos en dominios definidos (pudiendo estos ser parte de un solo mecanismo). En esta tesis se explora el control de procesos biológicos tales como vías de síntesis de pigmentos y crecimiento celular diferencial en poblaciones bacterianas (Nuñez et al., 2016).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El diseño y caracterización de funciones CRISPRi modulares permite la regulación predecible de propiedades celulares en cultivo líquido, sólido y en subdominios de colonias bacterianas.

2.2 Objetivo General

Desarrollar un sistema modular de regulación de proteínas, vías metabólicas y crecimiento celular vía CRISPRi en bacterias.

2.3 Objetivos específicos

Con el fin de cumplir con lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Diseñar elementos de ADN modulares CRISPRi para la regulación proteínas, vías metabólicas y crecimiento celular en bacterias.
- b) Establecer funciones modulares basadas en CRISPRi para la regulación del comportamiento celular en cultivos líquidos y sólidos bacterianos.
- c) Utilizar estas funciones para la regulación de procesos celulares en subdominios de colonias bacterianas.
- d) Diseño de funciones modulares CRISPRi para efectuar cambios de manera predecible en el crecimiento de grupos celulares específicos de colonias bacterianas.

3. METODOLOGIA

3.1 Vectores y partes genéticas

La construcción de los diversos vectores fue llevada a cabo mediante *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009) y sistema UNS (Torella et al., 2014).

Los plásmidos SEG y vectores utilizados fueron contruidos a partir de los *backbones* pDestBAC y la serie pJT170/2/4/6 del laboratorio de Pam Silver (Torella et al., 2014). Los plásmidos pAct fueron contruidos desde el *backbone* pSB4K5 del Registro de Partes Biológicas del MIT. La vía metabólica de síntesis de violaceína se construyó a partir del operón sintético VioABCDE que se obtuvo del equipo iGEM Cambridge 2009 (<http://2009.igem.org/Team:Cambridge/Project/Violacein>).

Los vectores conteniendo dCas9 se construyeron a partir del gen dCas9 obtenido de Luciano Marrafini vía Addgene. Los genes de las proteínas fluorescentes aquí utilizadas fueron clonados a partir de templados obtenidos del Registro de Partes Biológicas del MIT.

Los fragmentos de PCR para el ensamblaje fueron amplificados usando *Phusion® High-Fidelity ADN Polymerase* (NEB) y visualizados usando *SYBR® Safe* (Thermofisher) en transiluminador LED azul (iorodeo.com). La purificación de los plásmidos y fragmentos de PCR fueron hechos usando los kits *Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification System* y *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Los *primers* (Anexo B) fueron comprados en IDT (idtADN.com).

Todos los vectores ensamblados fueron chequeados mediante PCR de colonia y posteriormente secuenciados en MacroGen (<http://ADN.macrogen.com>). Todos los vectores se encuentran disponibles en Addgene y en el registro de partes de SynBio lab UC.

3.2 Condiciones de crecimiento

Todos los testeos fueron llevados a cabo en *E.coli* Top10 (Invitrogen) crecidas a 37°C en medio LB, o M9-glucosa para los ensayos con metionina. Para ensayos en medio sólido se suplementaron los medios con 1,5% m/v de agar.

En los ensayos de auxotrofia en metionina, las células se crecieron en M9-glucosa (sin casaminoácidos) suplementada con L-leucina (30 mg/L) y/o metionina (12 mg/L).

Para las inducciones realizadas se preparó una solución de *stock* de 0.1 M de IPTG y 1M de L-Arabinosa, ambas esterilizadas mediante filtración por trompo de 0,22mm. Las concentraciones de uso utilizadas fueron de 1mM de IPTG (0.2mM para medio sólido) y 1mM de L-Arabinosa para una inducción completa.

Las concentraciones de uso de los antibióticos utilizados fueron: kanamicina (50 µg/ml), carbenicilina (100 µg/ml), tetraciclina (10µg/ml) y cloramfenicol (10µg/ml).

Las células quimiocompetentes utilizadas para todas las transformaciones fueron hechas mediante el método de CCMB80 en *E.coli* Top10 (Invitrogen) (“TOP10 chemically competent cells”. 2013).

Tabla 3.1: Medio LB

Componente	Concentración
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar *	15 g/L

Los componentes son disueltos en agua destilada y autoclavados.

*Solo suplementado para medio sólido.

Tabla 3.2: Medio M9-glucosa

Componente	Concentración
5X Sales M9	200 ml/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Glucosa	0,4 g/L
Casaminoácidos	0,2 g/L
Agar 3% *	500 ml /L

Los componentes (ya estériles) se agregaron en orden descendente desde su solución de stock. *Solo suplementado para medio sólido.

Tabla 3.3: Soluciones *Stock*

Solución	Componente	Método de esterilizado
5X Sales M9	64 g/L Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 15 g/L KH ₂ PO ₄ 2.5 g/L NaCl 5 g/L NH ₄ Cl Disueltos en agua destilada	Autoclave
Agar 3%	30 g/L agar Disuelto en agua destilada	Autoclave
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1M)	1 mol MgSO ₄ ·7H ₂ O Disuelto en agua destilada	Autoclave
CaCl ₂ (1M)	1 mol CaCl ₂ Disuelto en agua destilada	Autoclave
Glucosa 20% p/v	200 g /L Glucosa Disuelto en agua destilada	Filtro en trompo 0,22 µm
Metionina (1000X)	12 g/L Disuelto en agua de cromatografía (Merck)	Filtro en trompo 0,22 µm
L-leucina (500 X)	15 g/L Disuelto en agua de cromatografía (Merck)	Filtro en trompo 0,22 µm
IPTG (0,1 M)	0,1 mol IPTG Disuelto en agua de cromatografía (Merck)	Filtro en trompo 0,22 µm
L-Arabinosa (1M)	1 mol L-Arabinosa Disuelto en agua de cromatografía (Merck)	Filtro en trompo 0,22 µm

3.3 Selección y diseño de sgRNAs

La selección y diseño de los sgRNAs se realizó mediante el método descrito por (Larson et al., 2013) para tener una asociación dirigida a la hebra no templado. Dentro de la secuencia nucleotídica del gen de interés se marcaron todos los sitios PAM disponibles de 5' a 3' (sitios CCN), identificando los sitios contiguos como candidatos a secuencia destino. Se analizaron y seleccionaron los candidatos a destino como las 18-22 bp contiguas a la secuencia PAM que se encontraban dentro de los primeros ~156nt del CDS (i.e. contando desde el ATG). De estas secuencias, se eligieron solo aquellas que terminaban con una C o una T con el fin de que el sgRNA comience con la A o G (correspondiente al nucleótido +1 de la transcripción del sgRNA) dado que aumenta la transcripción desde el promotor usado (Qi et al., 2013). Cabe destacar que, la secuencia del sgRNA es la reversa complementaria de la secuencia destino escogida.

3.4 Transformaciones simples y Co-transformaciones

Las células ya competentes y almacenadas a -80°C fueron dejadas en hielo durante 20 minutos, tiempo necesario para su descongelación. Para transformaciones simples, se agregó un volumen de 1 µl de plásmido (concentración ~1ng/µl) a los 50 µl de *E.coli* Top10 (Invitrogen) quimiocompetentes revolviendo muy suavemente. En el caso de co-transformaciones, se tomaron 100 ng totales de cada plásmido, se mezcló y se completó con agua de cromatografía (Merck) hasta obtener un volumen final de 6 µl, los que se agregaron en su totalidad a los 50 µl de *E.coli* Top10 (Invitrogen) quimiocompetentes revolviendo muy suavemente. Las células se incubaron en hielo durante 25 minutos y se realizó un *heat-shock* a 42°C por 1 minuto, luego del cual se volvieron a incubar en hielo aproximadamente 2 minutos más. Se agregó un volumen de 250 µl de medio LB a cada transformación e incubó con agitación a 37°C y 250 rpm. El tiempo de

incubación para la transformación simple fue de 1 hora, luego del cual se *plaqueó* un volumen de 25 μ l de células transformadas en medio LB sólido suplementado con antibiótico. En el caso de las co-transformaciones, el tiempo de incubación fue de 1,5 horas, luego del cual se *plaqueó* un volumen de 150 μ l de células transformadas en medio LB sólido suplementado con antibióticos. Cabe destacar que se agregó 5mM de arabinosa al medio de recuperación y placas al co-transformar con más de un plásmido segregante (SEG), con el fin de aumentar el número máximo de copias del plásmido dentro de las células. Las placas se incubaron a 37°C *overnight* (~12-16 horas), tiempo necesario para la formación de colonias.

3.5 Segregación de plásmidos en colonias

La segregación de plásmidos para la creación de subdominios en colonias bacterianas, se realizó mediante el método descrito por Nuñez et al. (2016), adjunto a esta tesis. El proceso de segregación consiste en la formación de linajes diferenciados, en dominios bien definidos de colonias bacterianas en crecimiento, que se definen por la expresión de funciones diferentes en cada linaje celular. La segregación se basa en la presencia inicial de dos variantes de un plásmido en la célula fundadora, la cual a medida que se multiplica se ve obligada a conservar solo una de estas variantes, produciendo un proceso de segregación aleatoria en diferentes subsectores de la colonia a medida que ésta crece.

Se co-transformó con dos plásmidos segregantes (SEG) y se incubó a 37°C *overnight* (~12-16 horas) hasta la formación de colonias. Se comprobó mediante microscopía de fluorescencia que las colonias expresaran las proteínas fluorescentes usadas como marcador para cada plásmido SEG. Se seleccionó una colonia co-transformada y se incubó durante 5 horas a 37°C con agitación (250 rpm) en medio LB líquido suplementado con arabinosa y los antibióticos

correspondientes a cada plásmido. Una vez incubadas las células, se obtuvo un *pellet* mediante centrifugación a 3000 RPM por 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de LB fresco con un solo antibiótico, común a ambos plásmidos SEG. Se diluyó 1:5000 con el mismo medio, y se *plaqueó* 10µl por placa de medio sólido suplementado con el antibiótico común. Se incubó a 37°C *overnight* (~12-16 horas) hasta la formación de colonias.

Cabe destacar, que en el caso de co-transformaciones de más de un plásmido SEG y un plásmido no segregante accesorio, el medio se suplementó con los antibióticos correspondientes.

3.6 Microscopía y fluorescencia

La observación de colonias y sus subdominios específicos fue realizada mediante técnicas de microscopía de epifluorescencia en un microscopio Nikon Ni con objetivo 4X y 2X. Los filtros usados para la observación de las proteínas de fluorescencia fueron: mTurquoise2 (ex: 425-445 nm; dichroic: 455 nm, em: 465-495 nm), GFP (ex: 465-495 nm; dichroic: 505 nm, em.: 515-555 nm), mVenus (ex: 490-510 nm; dichroic: 515 nm, em 520-550 nm), mCherry (ex: 540-580 nm; dichroic 600 nm, em: 605-695 nm).

4. RESULTADOS

4.1 Sistema de construcción modular y combinatorial de vectores

Con el fin de realizar ensamblajes rápidos, combinatoriales y simples de diferentes unidades transcripcionales (TUs), se crearon vectores conteniendo el sistema UNSes (Torella et al., 2014). Todas las TUs utilizadas en el desarrollo de este trabajo fueron ensambladas entre sitios de UNSes. Específicamente, se ocuparon los sitios UNS1, UNS2, UNS3, UNS4 y UNSX (Torella et al., 2014) como secuencias separadoras de las TU utilizadas. Los *primers* ocupados para la amplificación de las TU y posterior ensamblaje vía *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009), fueron los correspondientes a los sitios UNSes y se encuentran detallados en el Anexo B. Lo anterior permitió el intercambio rápido y económico de las TUs, sin la necesidad de pedir nuevos *primers* para cada ensamblaje.

Las secuencias de los vectores construidos en el desarrollo de esta tesis se encuentran en Drive:

<https://drive.google.com/open?id=0BywLtx0puhLid3Nxa1dYT0Q3Z1E>

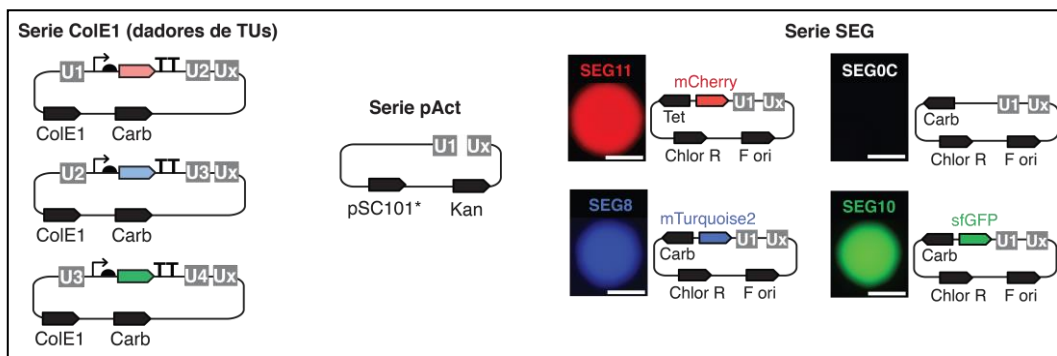


Figura 4-1: Esquema representativo de los tipos de vectores desarrollados. Izquierda, serie de vectores ColE1 utilizados para caracterización y ensamblar TUs; Centro, serie pAct utilizados para ensamblar vías multigénicas; Derecha, serie de vectores SEG utilizados para expresión de múltiples genes en grupos celulares definidos dentro de colonias.

4.2 Regulación de genes mediante sistema CRISPRi/dCas9

Con el fin de regular vías metabólicas con el sistema CRISPRi localizado en los vectores de ensamblaje modular desarrollados en esta tesis, se diseñaron diferentes sgRNAs para regular la síntesis de violaceína a partir de un operón de 5 genes (Vio A, B, C, D y E) (August et al., 2000) localizados en otro vector llamado VioABCDE. Se eligió este ensayo dado que la producción de violaceína produce una pigmentación violeta en las colonias que es fácil de observar.

Específicamente, se diseñaron cinco plásmidos: dos expresando sgRNAs con secuencia de destino al gen VioA (sgRNA-VioAa y sgRNA-VioAb), dos expresando sgRNAs con secuencia de destino al gen VioC (sgRNA-VioCa y sgRNA-VioCb) y un control sin sgRNA. Los cinco vectores se ensamblaron como plásmidos segregantes (SEG) con sfGFP, el sgRNA correspondiente bajo promotor constitutivo y dCas9 bajo promotor inducible por IPTG (pLac) (Figura 4-2).

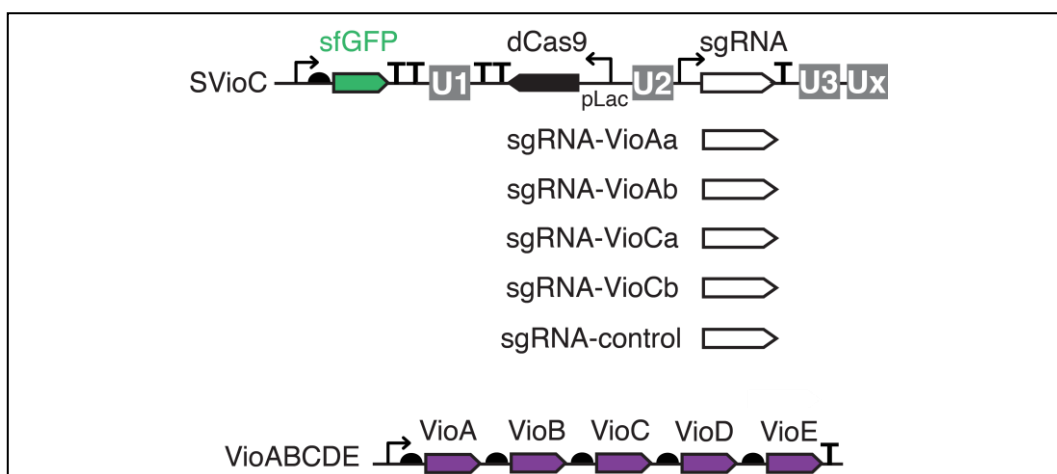


Figura 4-2: Estructura de los vectores utilizados en la comparación del efecto de diferentes sgRNAs sobre el operón de violaceína. Arriba, vector SVioC conteniendo sfGFP, sgRNA y dCas9 en una copia por célula; abajo, vector VioABCDE conteniendo el operón policistrónico de los cinco genes involucrados en la síntesis de violaceína.

Una vez ensamblados y secuenciados, los vectores se cotransformaron con el plásmido VioABCDE que contiene el operón de violaceína. Las colonias resultantes se plaquearon en placas con IPTG y se comparó su coloración para elegir el sgRNA con mejor efecto.

De los cuatro sgRNAs con secuencia destino en el operón de violaceína, solo tres tuvieron efecto sobre la coloración de las colonias cuando fueron co-transformados con el plásmido VioABCDE (Figura 4-3). Ambos sgRNAs con secuencia destino en el gen VioA (sgRNA-VioAa y sgRNA-VioAb) y solo uno de los sgRNAs con secuencia destino en el gen VioC (sgRNA-VioCa) lograron bloquear efectivamente la producción del pigmento, mientras que el segundo sgRNA con secuencia destino en el gen VioC (sgRNA-VioCb) no produjo efecto alguno en la pigmentación de la colonia. Las colonias co-transformadas con el plásmido control (sin sgRNA) no tuvieron efecto en la pigmentación. Estos resultados demostraron no solo que el sistema CRISPRi en los plásmidos modulares desarrollados funciona de manera correcta sino también que este es capaz de regular vías metabólicas localizadas en otros plásmidos.

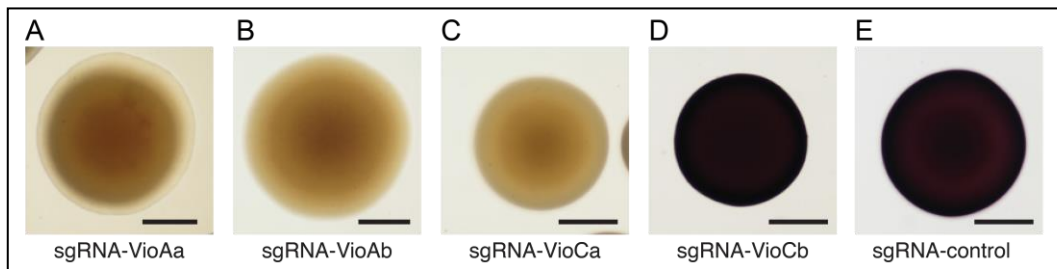


Figura 4-3: Regulación CRISPRi/dCas9 de la producción del pigmento violaceína. Colonias de *E.coli* TOP10 co-transformadas con plásmido VioABCDE y SEG con diferentes sgRNAs: A, VioAa; B, VioAb; C, VioCa; D, VioCb; y E, control. Escala 500 μ m.

4.3 Regulación de genes en subdominio específico mediante sistema CRISPRi/dCas9

Con el fin de testear la regulación de genes de manera temporal y espacial, se co-transformaron colonias con los plásmidos VioABCDE, SEG0C (SEG vacío) y SVioC (sgRNA-VioCa), cuyo efecto se comprobó en la sección 4.2 (Figura 4-3). Las colonias co-transformadas con SVioC, SEG0C y VioABCDE fueron sometidas a un ensayo de segregación (descrito en sección 3.5) que permite crear dominios celulares definidos en el interior de colonias bacterianas (ver artículo Nuñez et al., 2016 adjunto al final de esta tesis por mayor información). Se utilizó IPTG para regular temporalmente la transcripción de dCas9 y así bloquear la síntesis de violaceína desde el operón localizado en el plásmido VioABCDE (Figura 4-4 A). Los efectos sobre la coloración de las colonias fueron observados mediante microscopía de campo claro, mientras que la localización espacial del plásmido SVioC fue observada mediante fluorescencia asociada a la expresión de la proteína sfGFP.

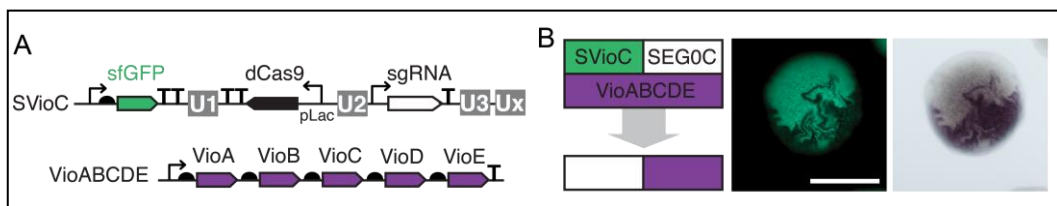


Figura 4-4: Regulación de la vía de síntesis de violaceína en espacio y tiempo. A, Estructura de los vectores SVioC y VioABCDE. B, esquema de la organización espacial de los vectores y la regulación en subdominios específicos (imagen de microscopía de fluorescencia y campo claro). Escala 200 µm.

La microscopía de campo claro mostró la segregación efectiva de los plásmidos sVioC y SEG0C en cada subdominio de la colonia, pudiéndose observar claramente pigmentación de VioABCDE solo en el sector del plásmido SEG0C (Figura 4-4 B). En el subdominio perteneciente a la presencia del plásmido sVioC,

se observó el bloqueo de la producción del pigmento violaceína, acusado por la falta de coloración.

Por su parte, la microscopía de fluorescencia evidenció la presencia de la proteína sfGFP (plásmido sVioC) en el subdominio de la colonia con decoloración (Figura 4-4 B). Estos resultados demostraron que el sistema CRISPRi modular aquí desarrollado, es capaz de regular la expresión génica de manera temporal y espacial en el contexto de un sistema multicelular.

4.4 Regulación de la vía metabólica de metionina mediante CRISPRi/dCas9

Con el objetivo de evaluar la eficacia del sistema CRISPRi modular (para la regulación de vías metabólicas localizadas en el genoma) se diseñaron sgRNAs con secuencia destino en cuatro partes diferentes del gen codificante para la enzima encargada de la producción de metionina (metA).

Primero, se evaluó la eficacia de distintos sgRNAs en la regulación de metA a través de un ensayo de fluorescencia. Específicamente se diseñaron cuatro plásmidos con dCas9 bajo un promotor inducible por IPTG (pLac), el sgRNA correspondiente bajo promotor constitutivo y una proteína de fusión metA-sfGFP bajo promotor constitutivo. La proteína de fusión fue fabricada con un fragmento de 156bp de metA fusionado a sfGFP con el objetivo de caracterizar la eficiencia de los cuatro candidatos de sgRNA diseñados para bloquear su transcripción (Figura 4-5).

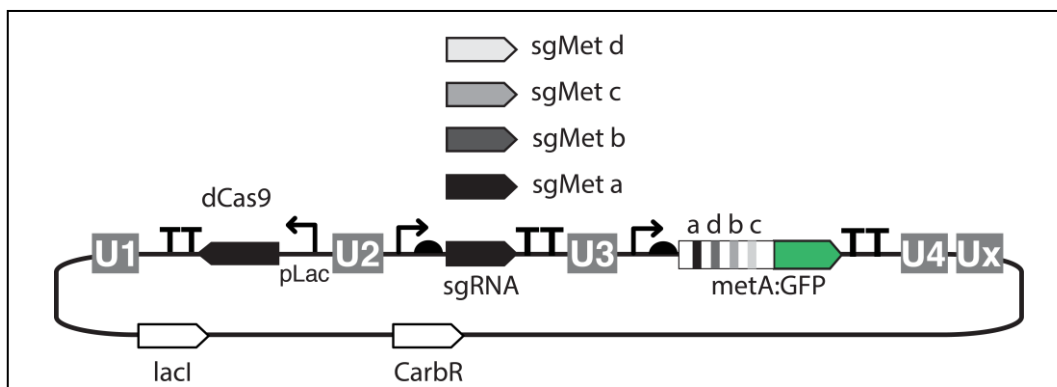


Figura 4-5: Estructura de los vectores pCh-met utilizados en la regulación del gen metA.

Se seleccionaron colonias con los vectores clonados y se crecieron en medio sólido M9-glucosa (sin casaminoácidos y suplementado con metionina) con y sin IPTG. Se observó mediante microscopía de fluorescencia la expresión de la proteína sfGFP en colonias para caracterizar la eficiencia de cada sgRNA diseñado, evidenciándose la disminución de la expresión de la proteína sfGFP con la inducción de dCas9 (por IPTG) en todas las colonias con los vectores testeados (figura 4-6).

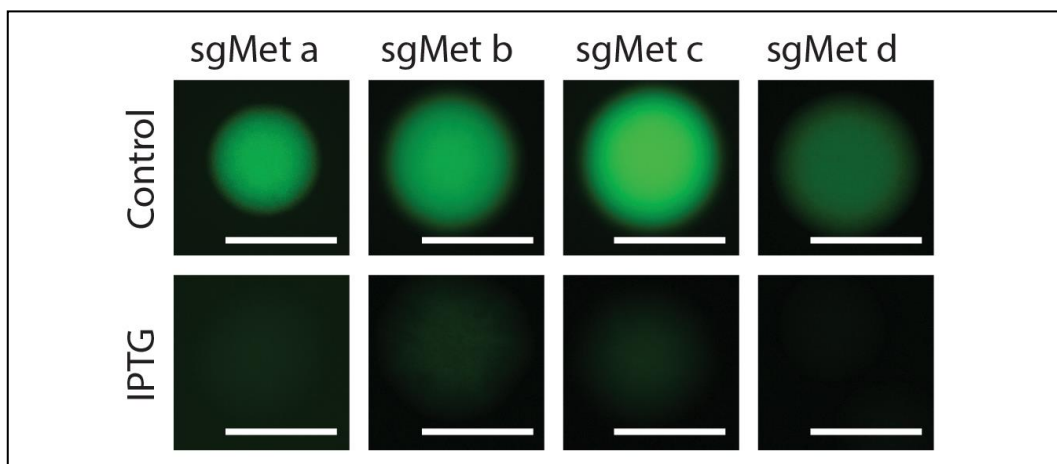


Figura 4-6: Colonias *E. coli* TOP10 transformadas con cuatro plásmidos pCh-met conteniendo los cuatro sgRNAs con secuencia destino en el gen metA: sgMet-a, sgMet-b, sgMet-c y sgMet-d. Arriba, colonias en ensayo control (sin IPTG); abajo, colonias tratadas con IPTG. Escala, 500 μ m.

Posteriormente, se inocularon diez colonias transformadas con cada vector (dilución 1:1000) y fueron crecidas por 24 horas en medio líquido M9-glucosa (sin casaminoácidos y suplementado con metionina) con y sin IPTG para su caracterización en lector de placa. Se cargaron en placas de 96 pocillos 200 μ L de medio inoculado y se midió la expresión de la proteína sfGFP mediante fluorescencia en un lector de placas Synergy HTX (Biotek).

El análisis de fluorescencia corroboró los resultados mostrados mediante microscopía. Se observó disminución de la expresión de la proteína sfGFP con la inducción por IPTG de dCas9 en todos los vectores testeados (Figura 4-7).

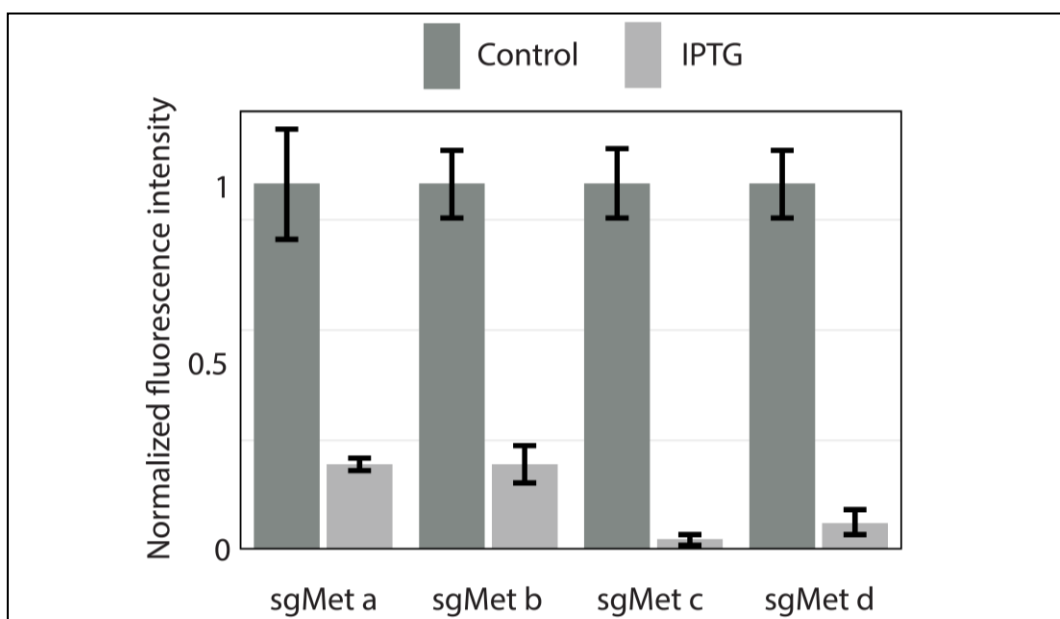


Figura 4-7: Expresión de sfGFP luego de 24 horas de tratamiento con IPTG. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra. Se midieron 10 colonias por muestra.

El análisis de fluorescencia mostró que los cuatro sgRNAs diseñados fueron efectivos al bloquear la expresión de la proteína de fusión metA-sfGFP fabricada, por lo que se eligió arbitrariamente el vector sgMet-a para el trabajo en ensayos posteriores. Estos resultados demostraron que el sistema CRISPRi era capaz de regular la expresión de un gen deseado, metA. Posteriormente, se testeó si la regulación de la copia del gen metA localizada en el genoma era suficiente para regular el crecimiento celular.

Primero, se creció *overnight* una colonia transformada con el vector sgMet-a y se inoculó (dilución 1:1000) en medio líquido M9-glucosa sin casaminoácidos. El medio inoculado se dividió en 18 tubos bacterianos con 5ml cada uno y se suplementó la mitad de ellos con metionina, añadiendo a cada par de tubos +/-Met una concentración distinta de IPTG. Se incubó por 40 horas a 37°C con agitación y se tomaron cuatro réplicas de 200 µL por cada tubo para su caracterización en lector de placa. Se midió el efecto de un gradiente de inducción de dCas9 en el crecimiento celular en cultivos con y sin metionina.

Las muestras sin suplementación del aminoácido exhibieron decaimiento en OD600 con la inducción de dCas9. Particularmente, se pudo observar un decaimiento abrupto de la OD cercano a los 0.01M IPTG, luego del cual no existe crecimiento bacteriano significativo (Figura 4-8). Estos resultados demostraron la eficacia del sistema CRISPRi modular en el control de crecimiento celular a través de la regulación de la vía de síntesis del aminoácido metionina.

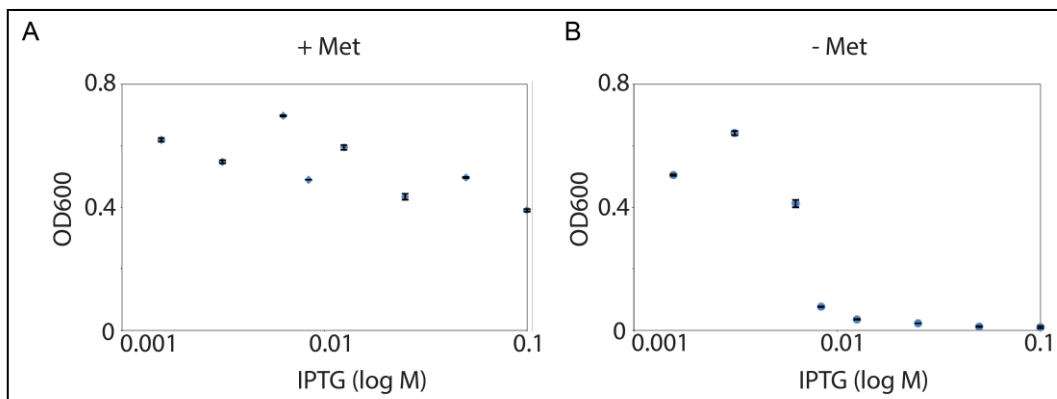


Figura 4-8: Regulación del crecimiento (OD600) mediante la inhibición de la expresión del gen *metA* en respuesta a la inducción por IPTG del sistema CRISPRi/dCas9. A, medio suplementado con metionina; B, medio sin metionina. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra.

El análisis de la absorbancia (OD600) mostró que la inducción de la proteína dCas9 en presencia de medio suplementado con metionina no tiene efectos significativos en el crecimiento de las bacterias transformadas. Estos resultados demostraron que los efectos en el crecimiento (OD600) son producto de la regulación del gen *metA* vía CRISPRi/dCas9, y no a la presencia de la proteína dCas9 o IPTG en el medio.

4.5 Auxotrofía inducible a metionina a través de CRISPRi/dCas9

La construcción de un regulador CRISPRi de la síntesis de metionina es equivalente a un fenotipo auxótrofo a metionina, pero reversible y controlable. Aprovechando las ventajas de este fenotipo, se testeó la regulación del crecimiento celular con control temporal y espacial. Para ello, primero se construyeron y testearon cuatro plásmidos segregantes con proteínas fluorescentes como marcadores: dos con mCherry (con y sin sgRNA) y dos con mTurquoise (con y sin sgRNA). La secuencia destino de estos sgRNAs corresponde en ambos casos a

metA. Además, se construyó un plásmido actuador (pAct6) que contiene el gen LacI bajo promotor constitutivo y dCas9 bajo promotor inducible (pLac) para tener regulación temporal de CRISPRi vía IPTG (Figura 4-9).

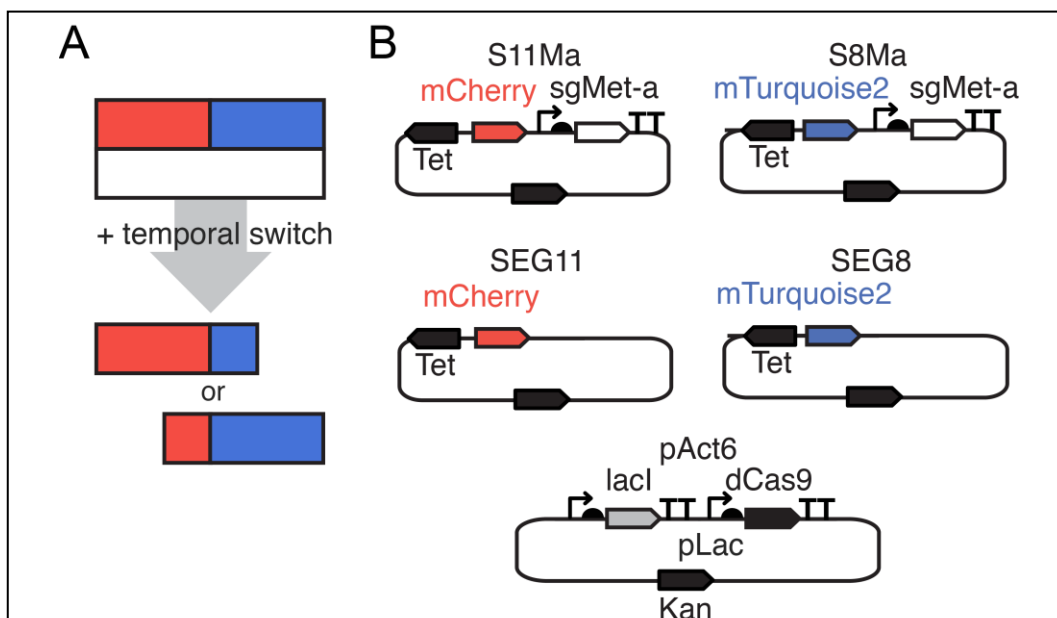


Figura 4-9: Regulación espacial y temporal del sistema CRISPRi. A, esquema de la organización de los vectores. B, estructura de los vectores utilizados en los ensayos de regulación CRISPRi de la síntesis de metionina.

Cabe destacar que los plásmidos segregantes SEG8 y S8Ma, al igual que SEG11 y S11Ma, solo se diferencian en la presencia de sgMet-a.

Se co-transformó el plásmido pAct6 con cada uno de los plásmidos segregantes construidos (SEG11, S11Ma, SEG8, S8Ma) con el fin de cuantificar el efecto de los sgRNAs en la síntesis de metionina bajo diferentes condiciones. Dos colonias por co-transformación fueron tomadas y crecidas *overnight* a 37°C y en agitación en LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol. Luego, cada cultivo fue inoculado (dilución 1:1000) en 8 ml de medio M9-glucosa (sin casaminoácidos)

con ambos antibióticos, y se suplementó la mitad de éstos con metionina. Todos los cultivos líquidos se dividieron en dos cultivos de 4ml cada uno, y se indujo la mitad de estos con IPTG, obteniendo cuatro combinaciones para cada co-transformación (+met/+IPTG, +met/-IPTG, -met/+IPTG, -met/-IPTG). Se incubó 24 horas a 37°C con agitación, y 200µl por cada tubo fueron cargados en placa de 96 pocillos por duplicado. Se midió OD600 en lector de placas Synergy HTX (Biotek).

El análisis de la absorbancia (OD600) de las cuatro co-transformaciones de plásmidos segregantes con pAct6 no mostró alteraciones significativas en el crecimiento para las condiciones testeadas a excepción del medio suplementado solamente con IPTG, donde solo las bacterias transformadas con plásmidos que contenían los sgRNAs con secuencia destino en el gen *metA* mostraron una inhibición de su crecimiento (Figura 4-10).

Se observó que en el control (medio sin suplementación de IPTG ni metionina) todas las co-transformaciones tuvieron un crecimiento hasta aproximadamente OD600 0,7. En el medio con suplementado únicamente con metionina (Figura 4-10 C) y suplementado con metionina e IPTG (Figura 4-10 D), se observó un comportamiento similar al del control, en el que todas las co-transformaciones alcanzaron un crecimiento superior a los 0,6 de OD600. Por su parte, en el medio suplementado únicamente con IPTG (Figura 4-10 B) se pudo observar una inhibición significativa del crecimiento para las bacterias co-transformadas con S8Ma y S11Ma, y un crecimiento normal para las co-transformadas S8 y S11.

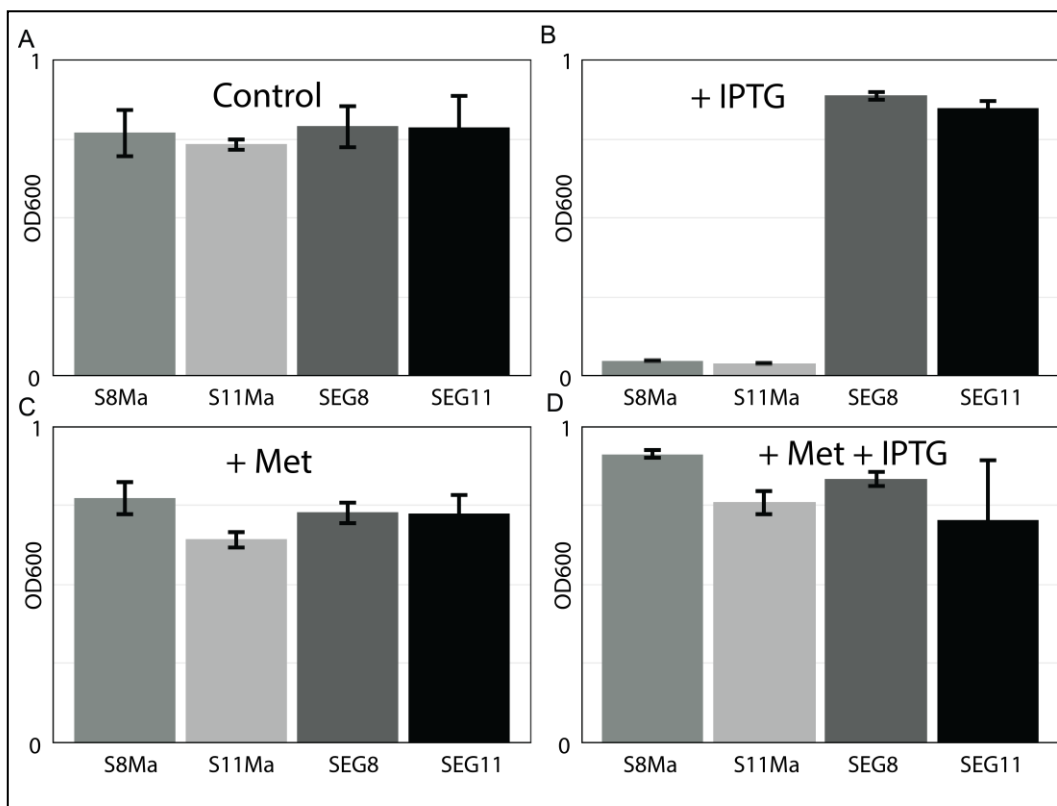


Figura 4-10: Crecimiento celular (OD600) de las cuatro co-transformaciones de plásmidos SEG (SEG11, S11Ma, SEG8, S8Ma) con pAct6. A, control, medio M9-glucosa sin suplementación de IPTG ni metionina. B, medio suplementado con IPTG. C, medio suplementado con metionina. D, medio suplementado con IPTG y metionina. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra.

Se mostró que los efectos en el crecimiento (OD600) en la condición B, se deben directamente a la presencia de los sgRNAs con secuencia destino en el gen *metA* en combinación con dCas9 (inducida por IPTG). Efecto que es superado en otras condiciones por la falta de dCas9 (no suplementación de IPTG: condición A y C), o por la suplementación externa de metionina en el medio (que suple la incapacidad de las células de producción de metionina: condición D).

Además, es posible observar que la suplementación externa de metionina en el medio (condición C) no afecta de manera significativa al crecimiento celular. Estos resultados demostraron que la auxotrofía inducible vía CRISPRi se mantenía en los nuevos vectores segregantes.

4.6 Regulación del crecimiento en espacio y tiempo de poblaciones bacterianas

A modo de prueba de concepto de la regulación de procesos con control temporal y espacial en el contexto de sistemas multicelulares, se utilizó este sistema CRISPRi localizado en plásmidos segregantes para la regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas. Para ello, se siguió el protocolo para la segregación de plásmidos en colonias bacterianas de la sección 3.5.

Se co-transformó con los plásmidos pAct6, SEG8 y S11Ma, donde los dos últimos corresponden a los plásmidos segregantes. Una colonia co-transformada se creció a 37°C con agitación en LB líquido suplementado con kanamicina, tetraciclina, carbenicilina y arabinosa. Luego de 5 horas de incubación, se hizo un *pellet* con las células mediante centrifugación a 3000 RPM por 10 minutos. Las células fueron re-suspendidas en 5 ml de LB fresco con cloranfenicol y kanamicina. Se diluyó 1:5000 con el mismo medio, y se plaquearon 10µl por placa de M9-glucosa sólido sin casaminoácidos y con los antibióticos cloranfenicol y kanamicina.

Las placas se dividieron en cuatro grupos para su tratamiento:

- Suplementadas con metionina e IPTG.
- Suplementadas con IPTG antes de plaquear.
- Suplementadas con IPTG luego de 8 horas de incubación.

- No suplementadas (control).

Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se reforzó con IPTG los grupos ya suplementados. Tanto el refuerzo de IPTG como la inducción a las 8 horas fueron llevados a cabo mediante la adición de 10µl de 0.1M IPTG alrededor de la colonia. Las colonias resultantes se fotografiaron 48 horas después de su inoculación en las placas mediante microscopía de fluorescencia, según lo descrito en la sección 3.6. Tanto las colonias suplementadas con metionina e IPTG como las no suplementadas (Figura 4-11: condición A y D) exhibieron un crecimiento normal luego de 48 horas de incubación a 37°C. En ellas, fue posible observar los dos subdominios de plásmidos segregantes, SEG8 y S11Ma, marcados con la presencia de las proteínas mTurquoise2 y mCherry, respectivamente (ver Figura 4-9).

Por su parte, los grupos de colonias suplementadas con IPTG antes de plaquear y a las 8 horas de incubación (Figura 4-11: condición B y C) mostraron una disminución del crecimiento en el subdominio del plásmido segregante S11Ma, lo que dio como resultado colonias de morfología no circular luego de 48 horas de incubación.

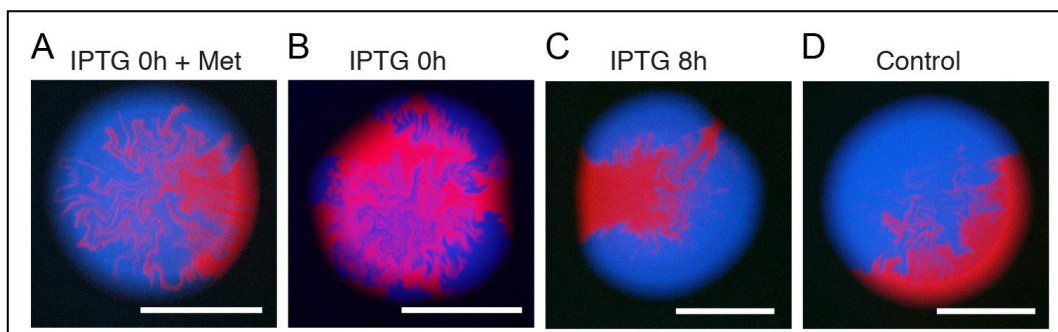


Figura 4-11: Regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas. A, suplementadas con metionina e IPTG, B, suplementadas con IPTG antes de plaquear. C, suplementadas con IPTG luego de 8 horas de incubación. D, no suplementadas (control). Escala 500 µm.

Se observa que el cambio del crecimiento normal de la colonia se presenta únicamente en las condiciones de inducción con IPTG, es decir cuando se activa la producción de la proteína dCas9, permitiendo que se junte con el otro elemento regulador CRISPRi: sgMet-a. Efecto no observable al suplementar el medio con metionina externa (Figura 4-11: condición A), ya que a pesar de existir el bloqueo en la vía de producción de metionina por el sistema CRISPRi/dCas9, las células logran crecer normalmente gracias al consumo de ésta directamente desde el medio.

Por otro lado, con el objetivo de demostrar que la inhibición del crecimiento en uno de los subdominios obedece a una respuesta asociada directamente a la presencia de los elementos reguladores modulares CRISPRi y no a la acción de alguna proteína fluorescente específica, se repitió el procedimiento para la co-transformación de pAct6, S8Ma y SEG11. En ella, el elemento modular del sistema CRISPRi (sgMet-a) ubicado dentro de uno de los plásmidos SEG en la primera parte descrita (S8Ma), fue transferido al otro plásmido segregante (S11Ma), con el fin de que ambas proteínas marcadoras, de forma paralela, estuvieran asociadas al plásmido con sgMet-a.

Es importante recordar que los plásmidos segregantes SEG8 y S8Ma, al igual que SEG11 y S11Ma, solo se diferencian en la presencia de sgMet-a.

Los resultados de este experimento mostraron ser muy similares a los obtenidos en la primera parte, tanto en controles (Figura 4-12 A, B y C) como en las colonias inducidas por IPTG (Figura 4-12 D y E).

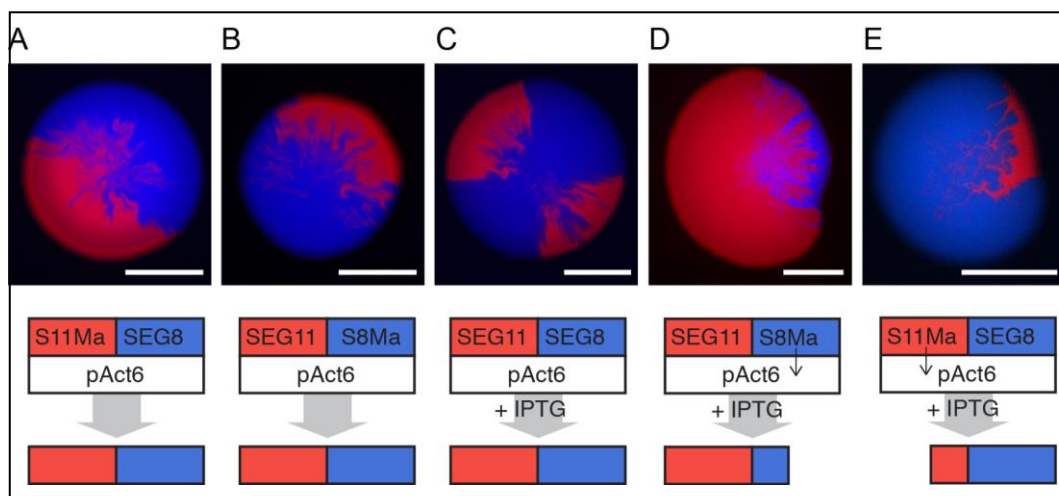


Figura 4-12: Regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas. A y B, control sin IPTG; C, control SEG11 y SEG8 (sin sgRNAs) con IPTG; D y E, efecto de la inducción vía IPTG del sistema CRISPRi en células expresando mTurquoise2 y mCherry, respectivamente. Escala 500 μm .

La inhibición del crecimiento por el plásmido S11Ma en las figuras 4-11 y 4-12 se debe a la producción de sgMet-a en el subdominio del plásmido y no a la presencia de la proteína mCherry expresada en el mismo sector. Al igual como la disminución del crecimiento por el plásmido S8Ma en la figura 4-12 se debe a la presencia del elemento modular sgMet-a en el grupo celular específico y no a la expresión de la proteína mTurquoise2 en el mismo subdominio.

Finalmente, y con el fin de caracterizar la regulación temporal del comportamiento celular en subdominios de las colonias, se hizo un seguimiento de algunas colonias tratadas con IPTG a las 8 horas. Para ello se fotografiaron colonias no suplementadas luego de 8 horas de incubación e inmediatamente después se suplementó el medio con IPTG. Se incubó durante 24 horas más y se repitió el proceso, es decir, al cabo de 32 horas desde su inoculación en el medio, las colonias fueron fotografías y se realizó un refuerzo de estas con el inductor IPTG.

Se incubó a 37°C por 24 horas más y se tomó una última fotografía de las colonias luego de un total de 48 horas desde la primera inducción con IPTG (Figuras 4-13 y 4-14).

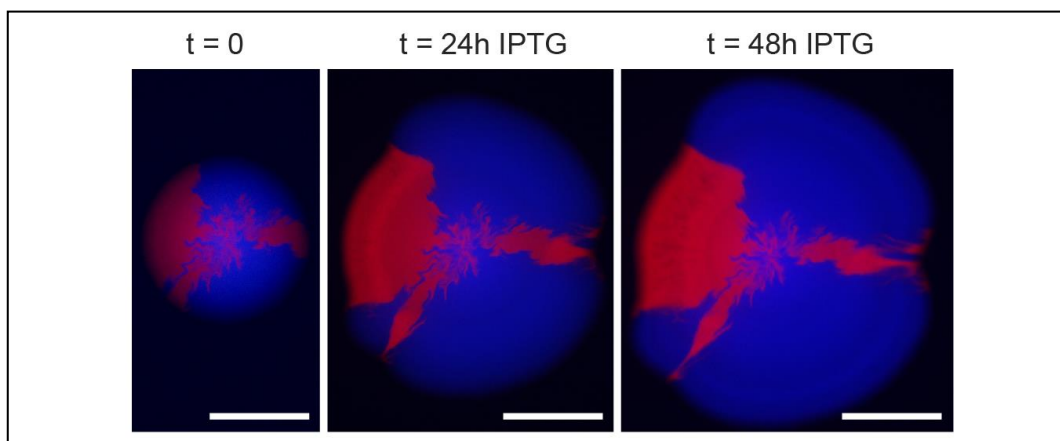


Figura 4-13: Ensayo temporal de la regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas conteniendo S11Ma/SEG8. t=0 corresponden a 8 horas de incubación y el momento de adición de IPTG, t=24 corresponde a 24 horas de tratamiento con IPTG y t=48 corresponde a 48 horas de tratamiento con IPTG. Escala 500 μ m.

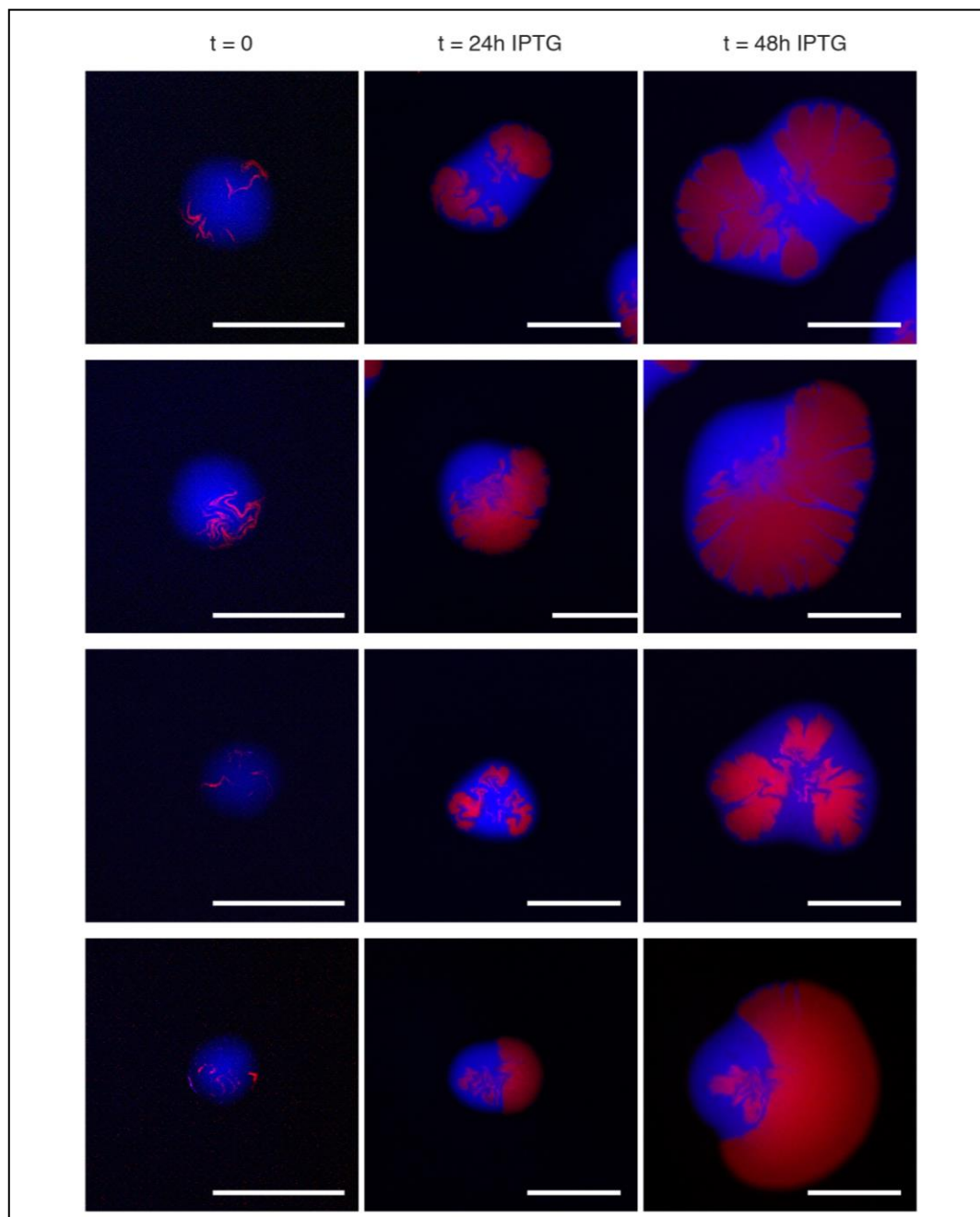


Figura 4-14: Ensayo temporal del efecto del patrón inicial en la regulación del crecimiento en grupos de células definidos al interior de colonias bacterianas conteniendo SEG11/S8Ma. $t=0$ corresponden a 8 horas de incubación y el momento de adición de IPTG, $t=24$ corresponde a 24 horas de tratamiento con IPTG y $t=48$ corresponde a 48 horas de tratamiento con IPTG. Escala 500 μm .

Estos resultados demostraron que el cambio de la tasa de crecimiento celular en el grupo de células definido al interior de colonia por la presencia del plásmido S11Ma (/S8Ma) comienza a producirse solo una vez realizada la inducción por IPTG de la proteína dCas9. Cabe destacar, que el efecto de dicha proteína es significativo solo en el sector de la colonia con el plásmido S11Ma (/S8Ma) a pesar de su presencia en la colonia completa (recordar que pAct6 no corresponde a un plásmido segregante), lo que comprueba la necesidad de la presencia de todos los elementos modulares del sistema en un mismo sector para lograr el efecto en cualquier regulación vía CRISPRi/dCas9.

Estos resultados en conjunto demuestran que el diseño modular de las funciones CRISPRi permiten la rápida implementación de funciones de regulación temporal y espacial de procesos biológicos, pudiendo efectuar cambios de manera predecible en el crecimiento de grupos celulares específicos de sistemas multicelulares.

5. CONCLUSIONES

La biología sintética propone una visión de la biología como sustrato programable a través de funciones que sean abstraíbles computacionalmente con el fin de ganar trazabilidad, predictibilidad y escalabilidad en el diseño de sistemas biológicos. Este enfoque propone a la biología como un sustrato biológico programable a diferentes escalas. Un ejemplo de esto es el interés por regular procesos biológicos con efectos a escala multicelular (Doursat et al., 2013; Macia & Sole, 2014). La regulación de procesos multicelulares abriría nuevos horizontes para la bioingeniería de, por ejemplo, consorcios bacterianos, órganos y biopelículas. Este desafío requiere, por un lado, de herramientas para controlar la formación de patrones, estructuras y arreglos artificiales de células; y por otro lado, de mecanismos para la regulación precisa de procesos biológicos al interior de las células. Aunque este campo aspira a generar diversas capas regulatorias y mecanismos de control, esta tesis buscó explorar la regulación directa de procesos celulares al interior de cada célula y su efecto a nivel global en el contexto de un sistema multicelular no modificado. Para ello, se desarrolló un sistema modular de regulación de procesos celulares basado en CRISPRi y se utilizó en conjunto a un método generador de estructuras espaciales descrito en Nuñez et al., (2016). Este sistema permitió la regulación de una serie de procesos en poblaciones bacterianas.

Se incorporó una tecnología de ensamblaje basada en *Gibson assembly* y UNSeqs que permitió el ensamblaje rápido y de bajo costo de las instrucciones temporales y espaciales CRISPRi. Este diseño fue exitoso en la regulación de genes y vías metabólicas tanto en cultivos sólidos como líquidos. Los elementos genéticos modulares CRISPRi mostraron un funcionamiento adecuado tanto en la regulación de genes individuales y operones a cargo de vías metabólicas de producción de pigmentos y aminoácidos. La expresión de la proteína de fusión metA-sfGFP fue controlada con precisión tanto en cultivo sólido como líquido (sección 4.4). La

regulación de vías multigénicas y operones son de vital importancia para la ingeniería metabólica y de bioprocesos.

Los ensayos de auxotrofia inducible sirvieron para estudiar la regulación de un proceso biológico en particular, crecimiento celular, en función de los niveles de inducción del sistema CRISPRi regulando el gen *metA* y en consecuencia la síntesis de metionina (secciones 4.4 y 4.5). La regulación precisa del crecimiento celular vía CRISPRi inducible son de vital importancia para la ingeniería de dinámicas poblacionales basadas en la regulación no-lineal del crecimiento en grupos celulares definidos (e.g. interacciones dinámicas WUSCHEL-CLV en la regulación del número de células madres en el meristema apical de plantas; Jönsson et al., 2005). En línea con estas ideas, CRISPRi mostró ser efectivo para la regulación de genes en subdominios específicos de colonias. Lo anterior puede observarse en la sección 4.3, donde se logra bloquear la producción del pigmento violaceína de manera específica en solo uno de los subdominios de la colonia como la regulación del crecimiento en grupos de células específicas en colonias bacterianas de la sección 4.5. El crecimiento en cohortes de células bien definidas dentro del contexto de un sistema celular completo permitió generar cambios en colonias bacterianas de manera predecible, a través de su combinación con técnicas de segregación para la formación de subdominios en colonias bacterianas (Nuñez et al., 2016). Estos resultados demostraron que CRISPRi puede ser utilizado como método de regulación de grupos celulares en el contexto de un sistema multicelular, con gran importancia en la ingeniería de biopelículas, tejidos artificiales y consorcios bacterianos artificiales en el que diferentes bioprocesos quedarían asociados a distintos grupos celulares.

En conjunto, estos resultados permitieron verificar la hipótesis de este trabajo, la cual establece que el diseño y caracterización de funciones CRISPRi modulares

permite la regulación predecible del comportamiento celular tanto en cultivo líquido como en subdominios de colonias bacterianas.

BIBLIOGRAFIA

Andrianantoandro, E., Basu, S., Karig, D. K., & Weiss, R. (2006). Synthetic biology : new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/msb4100073>

August, P. R., Grossman, T. H., Minor, C., Draper, M. P., MacNeil, I. a, Pemberton, J. M., ... Osburne, M. S. (2000). Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 513–519. <https://doi.org/11075927>

Balibar, C. J., & Walsh, C. T. (2006). In Vitro Biosynthesis of Violacein from L - Tryptophan by the Enzymes VioA - E from *Chromobacterium V iolaceum* †. *Biochemistry*, 45(51), 15444–15457.

Basu, S., Gerchman, Y., & Collins, C. H. (2005). A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 434(7037), 1130–1134.

Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia : a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>

Cachat, E., Liu, W., Martin, K. C., Yuan, X., Yin, H., Hohenstein, P., & Davies, J. A. (2016). 2- and 3-dimensional synthetic large-scale de novo patterning by mammalian cells through phase separation. *Scientific Reports*, 6(2), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep20664>

Carbonell-Ballester, M., Garcia-Ramallo, E., Montañez, R., Rodriguez-Caso, C., & Macía, J. (2016). Dealing with the genetic load in bacterial synthetic biology circuits : convergences with the Ohm ' s law. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 496–507. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1280>

Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Flores, G. (2000). *Biología*. (6ª edición). Médica Panamericana.

Davies, J. A., & Cachat, E. (2016). Synthetic biology meets tissue engineering. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 696–701. <https://doi.org/10.1042/BST20150289>

Doursat, H., Sayama, O., & Michel, O. (2013). A review of morphogenetic engineering. *Natural Computing*, 12(4), 517–535. <https://doi.org/10.1007/s11047-013-9398-1>

Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067), 449–453. <https://doi.org/10.1038/nature04342>

Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., & Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nature Methods*, 10(11), 1116–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2681>

Ferla, M. P., & Patrick, W. M. (2014). Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology*, 160(8), 1571–1584. <https://doi.org/10.1099/mic.0.077826-0>

Gaj, T., Gersbach, C. A., & Iii, C. F. B. (2013). ZFN , TALEN , and CRISPR / Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>

Garamella, J., Marshall, R., Rustad, M., & Noireaux, V. (2016). The all E . coli TX-TL Toolbox 2 . 0 : a platform for cell-free synthetic biology. *ACS Synthetic Biology*, 5(4), 344–355. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00296>

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>

Gibson, D., Glass, J., Lartigue, C., Noskov, V., Chuang, R., Algire, M., & Merryman, C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5987), 52–56.

Griffiths, A., Suzuki, D., Miller, J., Lawontin, R., & Gelbart, W. (2002). *Genética*. (7ª edición). España: McGraw-Hill, Interamericana.

Haimovich, A., Muir, P., & Isaacs, F. (2015). Genomes by design. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 501–516.

Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum* : biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core, 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*, 337(6096), 816–822.

Jönsson, H., Heisler, M., Reddy, G. V., Agrawal, V., Gor, V., Shapiro, B. E., ... Meyerowitz, E. M. (2005). Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics*, 21(Suppl.1), i232–i240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1036>

Kelly, J. R., Rubin, A. J., Davis, J. H., Ajo-franklin, C. M., Cumbers, J., Czar, M. J., ... Endy, D. (2009). Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *Journal of Biological Engineering*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-4>

Kong, W., Celik, V., Liao, C., Hua, Q., & Lu, T. (2014). Programming the group behaviors of bacterial communities with synthetic cellular communication. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1), 24.

Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*, 8(11), 2180–2196. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>

Lim, W. A. (2010). Designing customized cell signalling circuits. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(6), 393–403. <https://doi.org/10.1038/nrm2904>

Macia, J., & Sole, R. (2014). How to make a synthetic multicellular computer. *PLoS ONE*, 9(2), e81248.

Nielsen, A. A. K., & Voigt, C. A. (2014). Multi-input CRISPR / Cas genetic circuits that interface host regulatory networks. *Molecular Systems Biology*, 10(11), 763.

Nielsen, A. K., Der, B. S., Shin, J., Vaidyanathan, P., Densmore, D., & Voigt, C. A. (2016). Genetic circuit design automation. *Science*, 352(6281), aac7341. <https://doi.org/10.1126/science.aac7341>

Nuñez, I., Matute, T., Del Valle, I., Kan, A., Choksi, A., Endy, D., ... Federici, F. (2016). Artificial symmetry-breaking for morphogenetic engineering bacterial colonies. *ACS Synthetic Biology*.

Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., & Garcia, H. (2012). *Physical Biology of the Cell*. (2^a

edición). Garland Scienc.

Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>

Qian, L., Winfree, E., & Bruck, J. (2011). Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature*, 475(7356), 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature10262>

Sleight, S. C., & Sauro, H. M. (2013). Visualization of Evolutionary Stability Dynamics and Competitive Fitness of Escherichia coli Engineered with Randomized Multigene Circuits. *ACS Synthetic Biology*, 2(9), 519–528.

Torella, J. P., Boehm, C. R., Lienert, F., Chen, J. H., Way, J. C., & Silver, P. a. (2014). Rapid construction of insulated genetic circuits via synthetic sequence-guided isothermal assembly. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 681–689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt860>

ANEXOS

ANEXO A: ARTÍCULO ISI

Artificial Symmetry-Breaking for Morphogenetic Engineering Bacterial Colonies

Isaac N. Nuñez,^{#,†,⊥} Tamara F. Matute,^{#,†,⊥} Ilene D. Del Valle,^{#,‡} Anton Kan,[§] Atri Choksi,^{||} Drew Endy,^{||}
Jim Haseloff,[§] Timothy J. Rudge,[†] and Fernan Federici^{*,‡,§,⊥}

[†]Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, 7820436, Santiago, Chile

*Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, 8331150, Santiago, Chile

[§]Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, CB2 3EA, United Kingdom

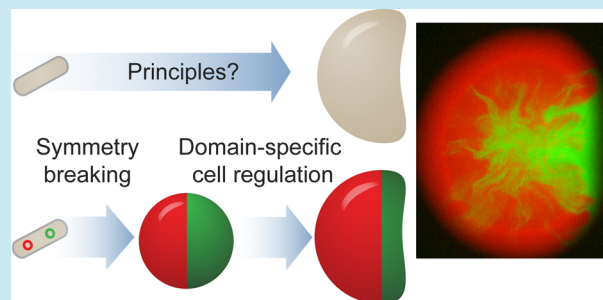
^{||}Department of Bioengineering, Stanford University, Stanford, California 94305, United States,

⁴Fondo de Desarrollo de Areas Prioritarias Center for Genome Regulation, Millennium Nucleus Center for Plant Systems and Synthetic Biology, Pontificia Universidad Católica de Chile, 7820436, Santiago, Chile

S Supporting Information

ABSTRACT: Morphogenetic engineering is an emerging field that explores the design and implementation of self-organized patterns, morphologies, and architectures in systems composed of multiple agents such as cells and swarm robots. Synthetic biology, on the other hand, aims to develop tools and formalisms that increase reproducibility, tractability, and efficiency in the engineering of biological systems. We seek to apply synthetic biology approaches to the engineering of morphologies in multicellular systems. Here, we describe the engineering of two mechanisms, symmetry-breaking and domain-specific cell regulation, as elementary functions for the prototyping of morphogenetic instructions in bacterial colonies. The former represents an artificial patterning mechanism based on plasmid segregation while the latter plays the role of artificial cell differentiation by spatial colocalization of ubiquitous and segregated components. This separation of patterning from actuation facilitates the design-build-test-improve engineering cycle. We created computational modules for CellModeller representing these basic functions and used it to guide the design process and explore the design space *in silico*. We applied these tools to encode spatially structured functions such as metabolic complementation, RNAPT7 gene expression, and CRISPRi/Cas9 regulation. Finally, as a proof of concept, we used CRISPRi/Cas technology to regulate cell growth by controlling methionine synthesis. These mechanisms start from single cells enabling the study of morphogenetic principles and the engineering of novel population scale structures from the bottom up.

KEYWORDS: morphogenetic engineering, synthetic biology, morphogenesis, CRISPR, modeling



Synthetic biology is changing our perception of biological systems as a mere source of raw material to a vision of biology as a programmable substrate for material fabrication, chemical production, and computing.^{1–11} The use of design specifications, computer-assisted mathematical modeling, and novel DNA fabrication methods have made possible the engineering of biological functions and systems of increasing reliability, scale and complexity.^{7,8,12–18} However, the scalability of circuit size within single cells has been limited by metabolic burden effects, cross-talk interactions, and genetic instability, a limitation reflected in the number of engineered components per cell.¹⁹ Engineering at the multicellular scale has emerged as a solution to the limitations encountered at the single cell level. The engineering of multicellular functions has been successfully used to engineer artificial consortia, patterning, and distributed computing in microbial systems.^{6,20–27} Defining elementary functions for morphogenetic engineering could complement

these developments by providing mechanisms for the establishment and maintenance of higher order structures. Morphogenetic engineering, is an emergent field founded by Doursat et al.^{28,29} that explores the artificial design of autonomous systems capable of developing complex morphologies. Its emphasis is on the programmability and controllability of self-organization toward the reproducible emergence of collective architectures. Morphogenetic engineering will be critical for engineering tissues, microbial consortia, and living functional materials.³⁰

Engineering morphogenetic mechanisms in biological systems is a challenge that requires the formulation of new approaches and tools. Morphogenesis involves multiparallel, collective and emergent processes across different spatial and temporal scales,^{31,32} which makes the process intractable from

Received: May 21, 2016

Published: October 30, 2016

the engineering perspective. Engineering practices rely on design specifications and elementary functions that are easy to abstract, simulate and implement with predictable core components. This provides tractability for the design-build-test iterative cycle, making the process more informative and reproducible. Aircraft engineering, for instance, relies on principles of flight: lift, propulsion and control; whereas birds integrate these three elementary functions as a whole in their flapping wings (reviewed in^{33,34}). Although the use of fixed wings and the decoupling of lift, propulsion and control seem unnatural and almost contradictory from the avian flight perspective, it provides the mechanistic abstractions that makes the engineering process more tractable. This approach is in line with the synthetic biology mantra of abstraction, modular design and principle-based engineering that allows implementation from characterized core components that fit into the design specifications of the system. Abstracting the complexity of biological processes into well-defined elementary functions has already facilitated the engineering of multicellular patterns.^{21,23,25,35,36} Computational methods for *in silico* engineering of shapes from fundamental collective phenomena have been developed.³⁸ However, the development of tools and resources for prototyping morphogenetic mechanisms remains less explored.^{29,39,40}

Here, we describe the development of computational models and genetic tools for prototyping morphogenetic mechanisms in bacterial colonies. With the aim of gaining tractability, debugging capabilities, and scalability in the process, we have defined two elementary functions: symmetry-breaking and domain-specific cell regulation. These are inspired by two natural process: (i) symmetry-breaking in developing embryos and (ii) domain-specific organogenesis during flower development, a process guided by the colocalization of transcriptional regulators.⁴¹ We implemented these two functions as a system of ubiquitous and segregating plasmids that facilitates modular and combinatorial prototyping of instructions. We also defined these elementary functions as explicit computational modules in CellModeller,^{42,43} which helped to define important properties of the system. CellModeller is an individual-based biofilm modeling platform that computes the growth of colonies of rod-shaped bacteria from a single initial cell. It uses a growing rigid-body method to compute the non-overlapping positions and orientations of elongating cells subject to minimizing work done in overcoming viscous drag. This leads to dominant growth at the colony margin. It also allows simulation of internal cell states such as plasmid content and effects of plasmid gene expression. We applied these methods and resources to the programming of bacterial colony shapes using CRISPRi/Cas9 regulation of cell growth.

RESULTS AND DISCUSSION

Overview of the Platform: A Two-Step Mechanism for Morphogenetic Programming. The goal of this work was to develop a simple system for prototyping morphogenetic engineering mechanisms. This system would allow starting from a single cell and controlling shape at the multicellular level using growing bacterial colonies as simple systems (Figure 1A). With the aim of having more tractability during the design-build-test process, we defined two abstract elementary functions: (i) symmetry-breaking and (ii) domain-specific cell regulation (Figure 1B). The first step was intended to establish polarity and domains of cells in the colony; while the second was intended to regulate cells differentially within these

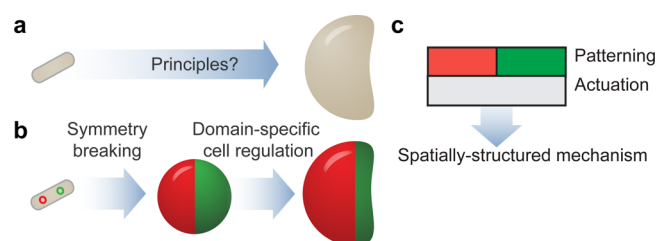


Figure 1. Abstract elementary functions for morphogenetic programming. (a) Schematic representation of a morphogenetic engineering challenge. (b) Adoption of two elementary functions to address this task: symmetry-breaking and domain-specific cell regulation. (c) Schematic representation of the two-tier organization of genetic layers that implement these elementary functions.

domains (Figure 1B). To implement these two steps, we sketched a two-tier organization model inspired by the ABC model of flower development that exploits the spatial coexistence of transcriptional regulators to instruct organogenesis⁴¹ (Figure 1C). This design would allow the implementation of instructions by interchanging plasmid combinations.

Patterning Layer: Symmetry Breaking Function for the Establishment of up to Four Different Domains Per Colony. Symmetry-breaking phenomena, as the process of reducing homogeneity to generate more structured systems,⁴⁴ have been intensively studied in chemical, physical, and biological systems.^{32,45–50} From an engineering point of view, symmetry breaking is key in establishing the first coordinates within an otherwise homogeneous system from where higher order structures and dynamics can be built in search for increasing functional specialization at different scales.

We implemented a symmetry-breaking step, the first elementary function, as a system of segregating plasmids (Figure 2A). This mechanism is based on an artificial tool created to label multiple cell lineages in growing bacterial colonies.⁴³ These plasmids create domains of cells in colonies by segregating from a single cell acting as a colony founder (Figure 2B). This process relies on the segregation of two plasmid variants containing different antibiotic resistance genes (e.g., A1 or A2), spectrally distinct fluorescent proteins but a common plasmid backbone with a third antibiotic resistance gene (e.g., A3) (Figure 2B). When cotransformed and grown in the presence of antibiotics A1 and A2, both plasmid variants are maintained in the same cell. When transferred to a growth media containing antibiotic A3 only, cells are unable to distinguish between the two plasmid variants, leading to a stochastic segregation of these two into different daughter cells. This creates cell lineages harboring only one of the two plasmid variants and its corresponding fluorescent protein (Figure 2C). This system relies on the mechanical properties of bacterial colony growth⁴³ to create radial domains of cells as colonies grow from a single cell. From a morphogenetic engineering perspective, we were interested in the establishment of two to six domains per colony. Colonies composed of two domains only (i.e., bipartite) were of particular interest due to their simplicity and resemblance to the process of polarity establishment in developing embryos.⁵⁰

We created biophysical models of these processes to guide the engineering of these patterned colonies (Figure 2C) (see Supporting Information Movie S1, S2, and S3). We designed a CellModeller plasmid segregation module to explore the effects of copy number on the formation of sectors within colonies.

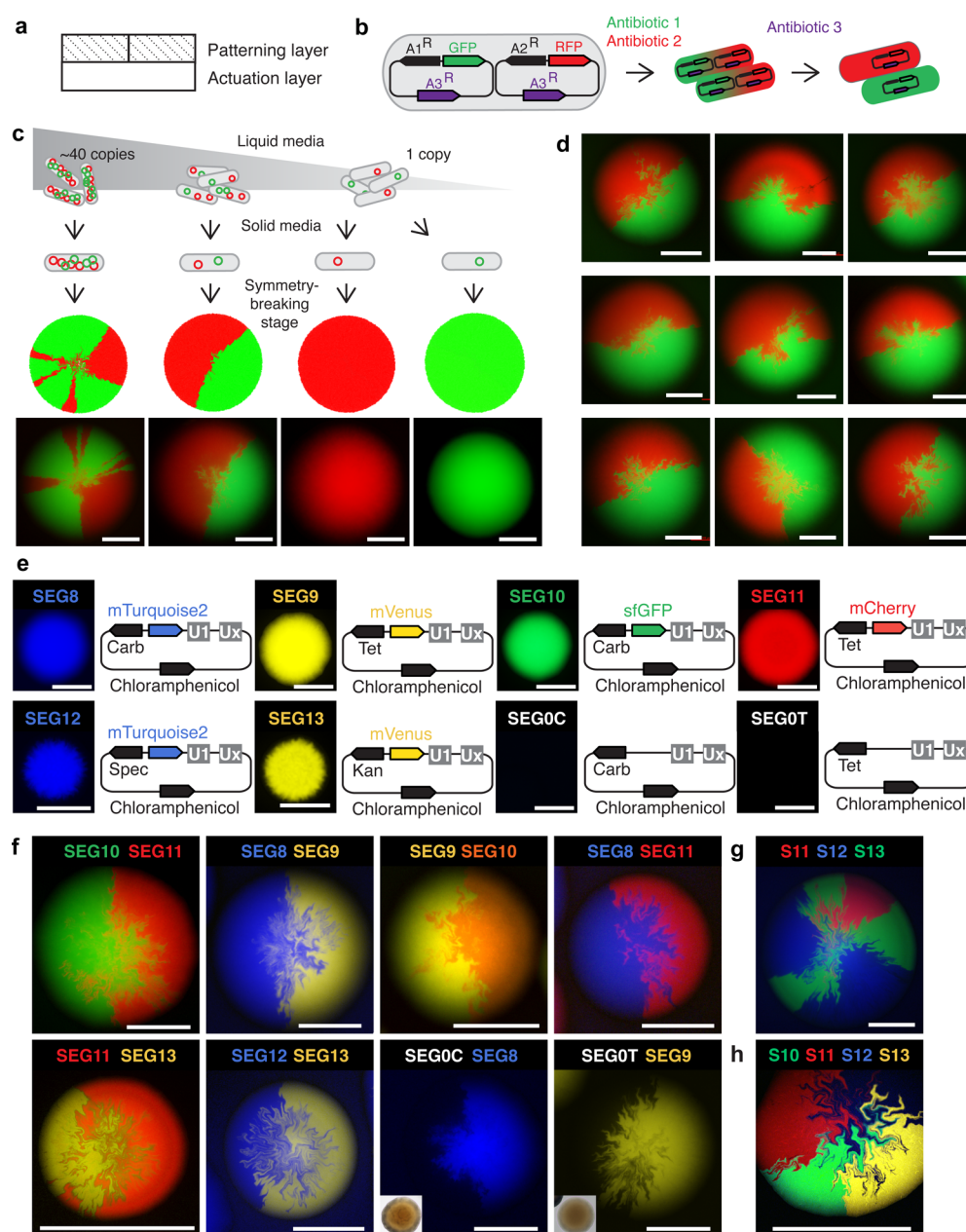


Figure 2. Genetic implementation of the patterning layer. (a) Schematic representation of the two-tier plasmid organization highlighting the patterning layer. (b) Schematic representation of the antibiotic-based regulation of plasmid maintenance within cells. Growing cells in the presence of A1 and A2 antibiotics maintains the two plasmid variants (red and green) within cells. These variants segregate in the presence of antibiotic A3 cells due to the presence of an antibiotic resistance gene located in the backbone that is common to both plasmid variants. Thus, cells maintain plasmids without any preferences for the two variants (either red or green) giving rise to cells containing one or the other (shown as red and green cells). (c) Schematic representation of copy number effect on the formation of bipartite and multisector colonies. The protocol starts with cells growing in liquid media containing arabinose, the high copy number inducer. Plating cells (i.e. colony forming units) at different points after removing arabinose from liquid culture permits starting colonies with different amounts of the two plasmid variants. Plating at later stages, when cells are close to maintain only two copies/cell of the plasmid, increases the likelihood of creating bipartite colonies as shown by CellModeller simulations and experimental data (bottom). (d) Representative bipartite colonies obtained with this protocol. (e) Epifluorescence image of colonies bearing different variants of SEG plasmids: SEG8 (blue), SEG9 (yellow), SEG10 (green), SEG11 (red), SEG12 (blue), SEG13 (yellow), and SEG0C/SEG0T, which do not carry a fluorescent marker in their backbone. (e–g) Colonies showing the segregation of different combinations of two (f), three (g), and four (h) SEG plasmids. Scale bar, 500 μm.

Biophysical parameters of growth were chosen based on a previous work to reproduce the growth of colonies in high resolution confocal microscopy. Growth was restricted to 2-dimensions for simplicity. Simulations were initiated with a single cell containing equal numbers (N) of each of two types of plasmid ($2N$ plasmids in total). On cell division each plasmid

replicated and each daughter cell inherited $2N$ randomly selected plasmids with equal probability of each type. Simulations starting with cells containing 10 (see [Supporting Information Figure S1A](#)) and 4 copies (see [Supporting Information Figure S1B](#)) only produced colonies with multiple domains. To test this further, we engineered segregation

plasmids bearing the low copy origin of replication pSC101*,¹⁶ considered to maintain 4–10 copies per cell. As suggested by simulations, these plasmids created colonies of multiple domains and failed to show the formation of bipartite colonies (see Supporting Information Figure S1C).

According to our model, we needed to reduce the copy number to an ideal state of 2 copies per cell (one copy of each of the two plasmid variants) in order to favor the formation of bipartite colonies with a possibility of 33% (see Supporting Information Figure S1D–F). We used a backbone from the pDestBAC plasmid,⁵¹ whose copy number can be controlled with arabinose from 1 to ~40 (see Supporting Information Figure S2A–C). This system allowed us to maintain the two plasmids in the same cell at medium copy while grown in liquid culture supplemented with A1, A2, and arabinose (i.e., “plasmid propagation stage”) and decrease to single copy when transferred to liquid culture without the arabinose (i.e., “plasmid copy decay stage”) (Figure 2C). Thus, we could grow single cells as colony-forming units in solid media at the point when they contained 2 copies per cell, favoring the formation of bipartite colonies (i.e., “symmetry-breaking stage”).

We used tetracycline and ampicillin resistance cassettes for A1–A2 coselection during the plasmid propagation stage; and a chloramphenicol resistance marker in the backbone as the common antibiotic resistance for the plasmid copy decay stage and the symmetry-breaking stage (Figure 2C, see Supporting Information Figure S2A). We developed a protocol to increase the probability of generating bipartite colonies by changing the length of time that cells were maintained in the plasmid decay stage before being plated onto solid media for symmetry-breaking (Figure 2C). Two independent experiments indicated that 180 min of growth at the plasmid decay stage produced the maximum ratio of bipartite colonies (see Supporting Information Figure S2D–E). Following this protocol, we were able to create bipartite colonies reliably (Figure 2C, see Supporting Information Figure S2F), demonstrating the implementation of the symmetry-breaking elementary function. Unexpectedly, we also observed bipartite colonies at earlier stages when cells were supposed to be in high copy state (see Supporting Information Figure S2F). This could be due to the variability on copy number per cell and unbalanced proportion of plasmid variants in cells grown in liquid cultures. This will inevitably cause a wider distribution of states at the moment of plating cells on solid media.

Being able to program a single cell (colony founder) to trigger morphogenetic changes taking place at the colony level was essential for our aim of prototyping morphologies from the bottom up. It was therefore essential to avoid false bipartite colonies, products of colonies “crashing” into each other during growth in close proximity. For this, we performed controls to identify cell dilutions that increase the chances of getting those unwanted colonies. We found that having a density above 7 colonies/cm² always produced false colonies. We therefore work with densities below 1–3 colonies/cm², which we control by diluting cells accordingly before plating (see Supporting Information Figure S3).

Next, we created a series of SEG# plasmids carrying different fluorescent protein genes in their backbone (sfGFP, mTurquoise2, mVenus, and mCherry) and no fluorescent markers (Figure 2D). The use of four different antibiotic resistance cassettes (kanamycin, spectinomycin, tetracycline, and ampicillin) allowed us to segregate different combinations of two, three, and up to four plasmids (Figure 2E–G). These plasmids

showed no significant effect on cell growth (see Supporting Information Figure S4). These vectors were also engineered to contain unique nucleotide sequences “UNS”⁴⁹ that facilitate combinatorial assembly of instructions from a library of transcriptional units. We created a library of UNS-flanked transcriptional units containing terminators from a list of synthetic strong terminators⁵² (see Supporting Information Figure S5). These results demonstrate that we could use this system to control symmetry-breaking of growing bacterial colonies and establish up to four different cellular states reliably.

Actuation Layer: An Ubiquitously Distributed Plasmid to Encode Domain-Responsive Functions. Following the organizational strategies describe in Figure 1, we created vectors of ubiquitous localization across the colony (Figure 3).

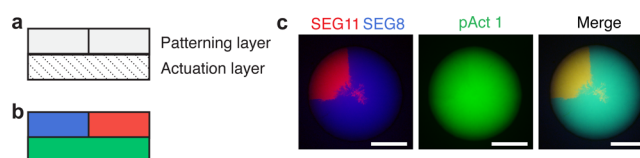


Figure 3. Genetic implementation of the actuation layer. (a) Schematic representation of the two-tier plasmid organization highlighting the actuation layer. (b) Schematic representation of the genetic implementation by the colocalization of the patterning layer composed of SEG vectors (in blue and red), and actuator layer composed of pAct ubiquitous vector (in green). (c) Genetic implementation of this organization by SEG plasmids SEG8 and SEG11, and actuation plasmid pAct1 expressing mVenus (in green). A merged image is shown to highlight the colocalization of plasmids. Scale bar, 500 μ m.

These pAct vectors contained actuator genes that regulate different cellular processes in response to or in combination with other regulators being expressed from the patterning layer (SEG plasmids). This process corresponds to the second step in our approach, the domain-specific regulation of cellular processes (Figure 1B). pAct# vectors were designed as low copy plasmids (pSC101*,¹⁶) containing UNS sites to facilitate the combinatorial assembly of transcriptional units. To demonstrate the ubiquitous and sectorized localization of genes from pAct and SEG plasmids, respectively, we expressed mVenus from pAct1, mTurquoise2 from SEG8, and mCherry from SEG11 (Figure 3B,C). These results show how this two-tier organization can be used to superimpose spatial rules over ubiquitous functions.

Domain-Specific Regulation of Colonies: Metabolic Complementation, RNAP7 Activation and CRISPR-Regulation of Gene Expression. To validate the utility of this two-tier organization, we used it to control a series of different cellular functions within the created domains. The concept of domains, along with the maintenance of their boundaries, has been central to the understanding of biological morphogenesis (see a review, ref 53). We propose the use of these domains to assign artificial states and functions to a different part of the colony. First, we applied it to the domain-specific complementation of an incomplete metabolic pathway. We used the five-enzyme metabolic pathway from *Chromobacterium violaceum* controlling the production of violacein.⁵⁴ A synthetic operon containing the five enzymes VioA, VioB, VioC, VioD, and VioE, was used in these experiments (Figure 4A). We constructed pAct2 carrying genes vioA, B, and E that catalyze the conversion of tryptophan to prodeoxyviolacein, which spontaneously become deoxychromoviridans, a green-

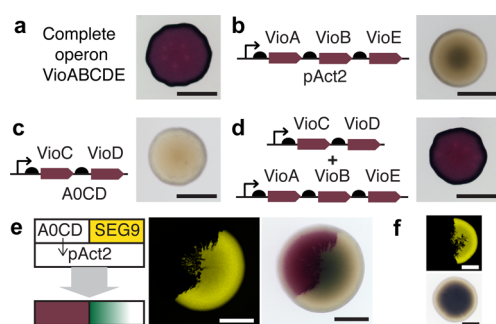


Figure 4. Domain-specific metabolic pathway complementation. (a) Colony showing violacein production from complete VioABCDE violacein operon. (b) Colony expressing *vioC* and *vioD* genes from vector A0CD. (c) Colony showing deoxychromoviridans production from vector pAct2 containing genes *vioA*, *vioB*, and *vioE*. (d) Colony showing violacein production from the cotransformation of vectors A0CD and pAct2. (e) Domain-specific metabolic complementation of violacein synthesis pathway. SEG9 was used as a segregation partner of A0CD. (f) Segregating control SEG9 and SEG0C on top of pAct2 showed no violacein synthesis. Scale bar, 500 μm .

colored compound⁵¹ (Figure 4B). This plasmid was expressed ubiquitously across the colony producing a faint green color in cells located in the center of the colony (Figure 4B). Next, we constructed the segregating plasmid A0CD carrying the genes *vioC* and *vioD*, which was unable to produce any visible pigment on its own (Figure 4C) but produced a purple pigment in combination with *vioABE* due to the conversion of prodeoxyviolacein to violacein (Figure 4D). When segregated with SEG9 on top of ubiquitously located pAct2, A0CD produced violacein in a domain-specific manner as expected from the complementation of ABE pathway with CD genes (Figure 4E). No violacein synthesis was observed when SEG9 and pAct2 were combined with control SEG0C (Figure 4F), a colorless segregating plasmid (Figure 4D).

Next, we explored the segregation of transcriptional controllers acting on target genes located on pAct vectors. We created S8T7 segregation plasmid, carrying the RNA polymerase from phage T7, and pAct3, carrying *mCherry* gene downstream of T7 promoter. The T7 RNAP was expressed from a pLac promoter in order to regulate its expression with a *lacI* repressor constitutively expressed from pAct3. We used IPTG to regulate the expression of *mCherry* from pAct3 in the presence of S8T7 (see Supporting Information Figure S6A). The segregation of S8T7 and SEG9 plasmids on top of pAct3, located ubiquitously across the colony, showed domain-specific activation of *mCherry* upon IPTG induction (Figure 5A). Conversely, control experiment segregating SEG9 and SEG8

failed to induce *mCherry* from pAct3 (see Supporting Information Figure S6B). Next, we used split T7 RNAP⁵⁵ to reduce background expression in the absence of IPTG. We created a segregating plasmid S8BST7 and ubiquitous plasmid pAct4 carrying the $\beta\sigma$ and α fragment of T7 RNAP, respectively (Figure 5B). The segregation of S8BST7 with SEG11 led to domain-specific spatial regulation while IPTG provided temporal control of *mVenus* expression (Figure 5B). This system was shown to activate two target genes simultaneously (see Supporting Information Figure S6C).

To further explore the utility of our system, we performed CRISPRi/Cas9 regulation of gene expression in a domain-specific manner. We targeted VioABCDE synthetic operon to repress the production of the visible pigment violacein. First, we made constructs to test different sgRNAs targeting *VioA* and *VioC* genes (see Supporting Information Figure S7), and selected sgRNA-*VioC*. Next, we created the segregation vector SVioC containing constitutively expressed sgRNA-*VioC* and dCas9. This construct shut down violacein production in a domain-specific manner when segregated with SEG0C on top of the ubiquitously expressed VioABCDE operon (Figure 6A). All these experiments together demonstrated the versatility of our system for the spatial and temporal regulation of cellular functions in bacterial colonies.

Prototyping Morphogenetic Instructions by Symmetry-Breaking and Domain-Specific Cell Growth Regulation. We applied this toolkit to the creation of a tractable morphogenetic mechanism in bacterial colonies. We used CRISPRi/Cas9 regulation of *MetA* gene expression as a mechanism to regulate colony growth via induced methionine auxotrophic cells. First, we designed a series of vectors containing a *LacI*-regulated dCas9 and the constitutive expression of one of four sgRNAs (sgMet-a, -b, -c, -d) targeting the *metA* gene in the genome. These plasmids also included a 5' fusion of the first 156 nt of *MetA* to sfGFP as a fluorescent reporter of *MetA* expression inhibition (see Supporting Information Figure S8A). After comparing the inhibition strength of the four sgRNAs (see Supporting Information Figure S8B), sgMet-a was selected for CRISPRi-induced cell growth regulation (see Supporting Information Figure S8C and D). We added methionine to demonstrate that the effects were due to *MetA* regulation and not by dCas9 expression (see Supporting Information Figure S8D). Following the two-tier approach, we created S11Ma and S8Ma vectors to segregate sgMet-a as red and blue domains, respectively, and pAct6 to ubiquitously express dCas9 under IPTG regulation (Figure 7A and B). This system was proven successful in the regulation of cell growth in liquid culture (see Supporting Information

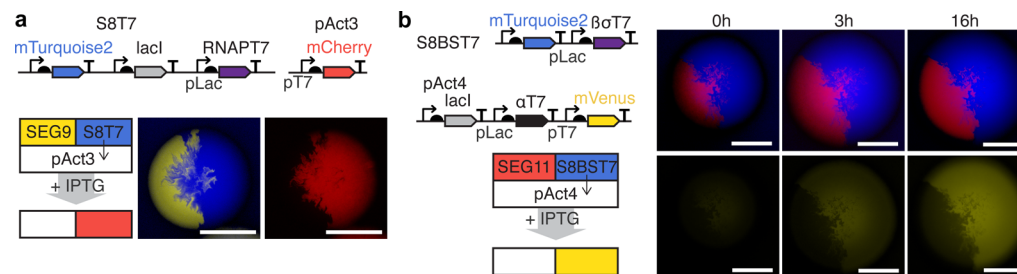


Figure 5. Domain-specific activation of gene expression. (a) Segregation of RNAP T7 from S8T7 (in combination with SEG9) showing the induction of *mCherry* from pAct3 upon IPTG treatment. (b) Temporal and spatial regulation of *mVenus* induction in colonies segregating SEG11 and S8BST7 in combination with pAct4. IPTG induced α and $\beta\sigma$ RNAP T7 fragments from pAct4 and S8BST7, respectively. Scale bar, 500 μm .

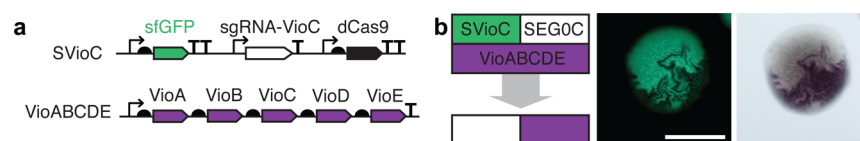


Figure 6. Domain-specific CRISPRi/Cas9 regulation of gene expression. (a) Schematic representation of spatial regulation of violacein production from VioABCDE by SVioC segregating plasmid. (b) Scale bar, 200 μm .

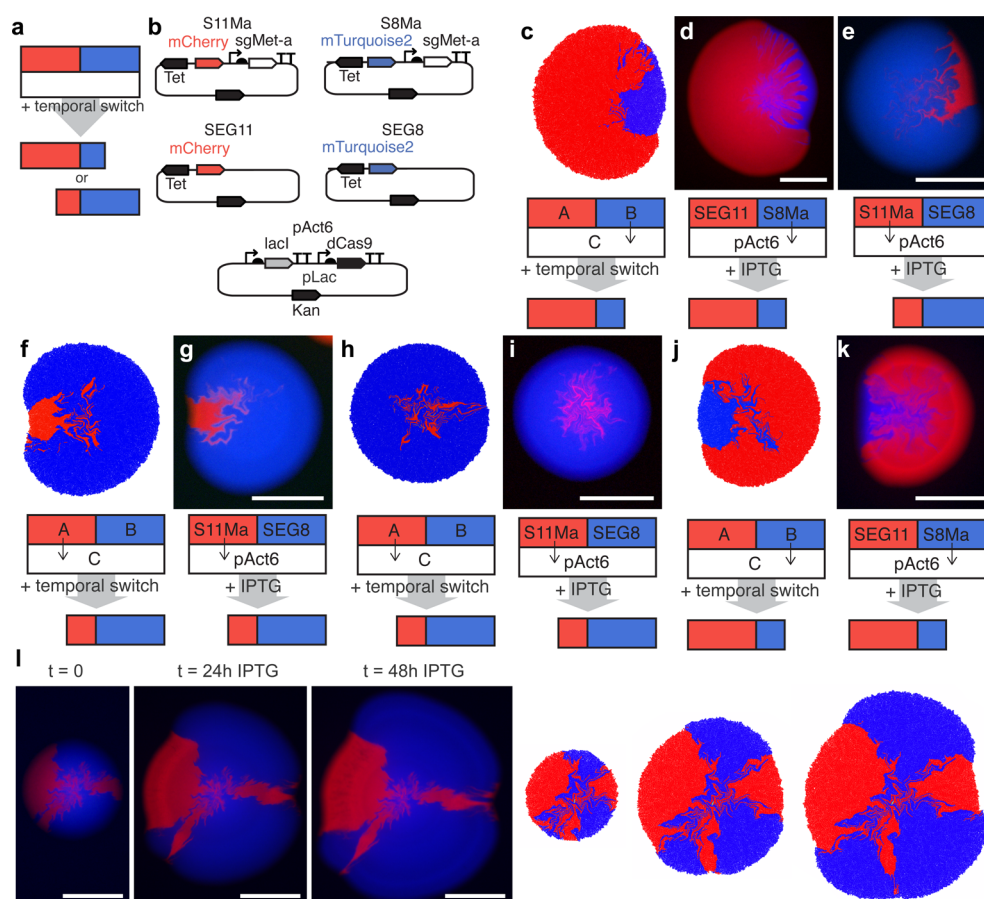


Figure 7. Morphological changes in bacterial colonies induced by symmetry-breaking and domain-specific cell growth regulation. (a) Two tier organization for morphogenetic regulation. (b) Organization of S11Ma and S8Ma plasmids containing *sgMet-a* and *pAct6* plasmid containing IPTG-regulated *dCas9* ubiquitously. (c–k) Representative images and simulations capturing the most frequent morphologies from three independent experiments. (l) Time lapse sequence of a representative colony showing the effect of initial patterns on the evolution of the morphology in both data and simulations. Scale bar, 500 μm .

Figure S9), suggesting that it could be used to induce morphological mechanism in colonies grown on solid media. Following the protocol described in previous sections, we segregated S11Ma/SEG8 or S8Ma/SEG11 in cells containing *pAct6* (Figure 7A,B), and subsequently treated them with IPTG, IPTG + methionine, or control solution. We found striking morphological features that were not obtained in control treatments (see Supporting Information Figure S10A–E). We found that the initial pattern of domains significantly influenced the final morphologies (see Supporting Information Figure S10F).

To better understand these effects, we created a CellModeller module that simulates domain-dependent cell growth in a modular organization followed from the modular design of elementary functions. We studied the whole process by simulating the same cell growth regulation step starting from different colony patterns such as bipartite (see Supporting Information Movie S4) and multisectorial (see Supporting

Information Movie S5) colonies. This facilitates the implementation and debugging of new mechanisms without affecting the rest of the components. We used CellModeller to explore *in silico* different parameters such as initial sector pattern (i.e., bipartite or multisectorial colony) and onset time for cell growth inhibition, such as triggering differential growth rates in different domains at stage 0, 1000, 5000, and 10000 cells of the simulations (see Supporting Information Movie S6 to S13). Growth rates were determined from plasmid copy numbers to range linearly between 1 (all plasmids promote growth) and 0.5 (no plasmids promote growth). We found that our models captured remarkably most of the observed morphologies in our data (Figure 7C–L). We also identified basic structural features that were over-represented in live and digital colonies (see Supporting Information Figure S10G). Together these data demonstrated that our system allows the implementation of morphogenetic instructions that give rise to reproducible features through tractable mechanisms. This system could act

as a platform to compile spatial instructions from elementary functions and features that would act as building blocks of morphogenesis.^{37,56} These could be also used to control concatenated events that can be tuned externally, similarly to the hierarchical strategies of nanofabrication inspired by biomineralization principles.⁵⁷ Ultimately, the process could be completely self-regulated by feedback signals from global emergent states. We aim to introduce cell–cell signaling to implement this global-to-local bidirectional reinforcing and feedback mechanisms with the aim of engineering self-organized morphologies and higher order dynamics.

CONCLUSIONS

Engineering morphogenesis and self-organization is increasingly gaining attention across different fields from biological sciences to robotics.^{28,37–39,58} Programming morphogenesis in biological systems is essential for constructing living functional materials,^{2,30} engineering microbial consortia with distributed functions,²⁷ and implementing distributed computation schemes.^{6,24,26} Although artificial patterning mechanisms have been already developed with remarkable results,^{21,23,25,35,36} the engineering of morphogenetic mechanisms has remained less explored.³⁸

Morphogenetic engineers face the challenge of designing functioning setups in systems with daunting complexity. The use of tractable instructions and structures could facilitate this process. We seek to apply synthetic biology tools and biophysical modeling to identify elementary functions for programming morphogenesis in simple biological systems such as bacterial colonies. Here, we created artificial mechanisms for patterning and cell differentiation that allowed the regulation of cellular states within the limits of well-defined areas of the colony. The two-tier organization to design and characterize controllers and actuators separately along with the use of modular functions abstracted into computational models in CellModeller, will be critical for gaining tractability in the future implementation of high-level designs from low-level specifications. These tools could also be combined with evolutionary computing approaches and directed evolution to explore emergent behavior and phenotype-to-genotype mappings.

Our system could also be used to benchmark models that integrate different temporal and spatial scales, a challenge for multiscale modeling. These tools could be combined with recent developments^{25,36,59} to set morphological instructions from a single cell recapitulating synthetically what developmental programs do in embryos. This will increase tractability in the process of reverse engineering emergent shapes, providing mechanistic understanding of fundamental processes underlying natural morphogenesis and development. Our platform could also be used in microbial ecology studies, for which spatial organization plays a crucial role in population dynamics.^{60–66} In turn, this could inform the implementation of new morphogenetic metaphors based on ecological functions. Starting from single cells offers the possibility of studying and engineering these phenomena from the bottom up as truly self-organized processes.

METHODS

Extended experimental procedures can be found in the Supporting Information Appendix.

DNA construction. All plasmids were constructed by Gibson assembly.⁶⁷ SEG plasmids and vectors containing each

transcriptional unit flanked with UNses were constructed from backbones pDestBAC and pJT170/2/4/6 series from Pam Silver's lab.⁵¹ pAct plasmids were constructed from backbone pSB4K5 from the Registry of Biological Parts (MIT). The VioABCDE synthetic operon was obtained from the 2009 Cambridge iGEM team (<http://2009.igem.org/Team:Cambridge/Project/Violacein>). RNAPT7, promoters and fluorescent proteins were obtained from the Registry of Parts (MIT). dCas9 was obtained from Luciano Marrafini via Addgene. All the sequences and plasmids can be found at Addgene. PCR fragments were amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) and visualized using SYBR Safe (ThermoFisher) on a blue LED transilluminator (iorodeo.com). Purification of plasmids and PCR fragments was performed using Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System and Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (both of Promega), respectively. Primers were supplied by IDT ([idtdna.com](http://www.idtdna.com)). We used the following primers for combinatorial assemblies of UNS-flanked genes:

U1F: CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG and U2R: GCTTGGATTCTGCGTTTGTTCGTC for genes flanked between UNS1 and UNS2, U2F: GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAAC and U3R: CGACCTTGATGTTTCCAGTGCGATTG for genes flanked between UNS2 and UNS3, U3F: GCACTGAAGGTCCTCAATCGCAC and U4R: GACTTTGCGTGTGTCTTACTATTGCTGG for genes flanked between UNS3 and UNS4, U4F: CTGACCTCCTGCCAGCAATAGTAAG and UXR: GGTGGAAGGGCTCGGAGTTGTGG for genes flanked between UNS4 and UNS5-UNSX.

SEG vectors for assemblies were amplified with 1XCF: GTCCTGTCTGTGACAAATTGC and U1R: GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG; and UXF: CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCG and 1XCR: GAGGGCAATTGTGCACAGGGTTAAG. pAct vectors for assemblies were amplified with KAGF: TAATTACTaGTCCTTTTCCcggGAGaTcTGGGTATCTGTAAATTCTGCTAGACC and U1R: GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG; and UXF: CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCG and KAGR: TACCCAGAtCTCccgGGAAGGACTaGTAATTATCATTGACTAGCCCATCTCAATTG.

Growth condition. All transformations were performed on *E. coli* Top10 (Invitrogen) made competent by the CCMB80 method (http://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells). DH5Z1 cells were used for the segregation of three and four plasmids. Cells were grown on LB (10g of tryptone, 5g of yeast extract, and 5 g of NaCl dissolved in deionized water to a final volume of 1 L) or M9-glucose (1 × M9 salts supplemented with 2 mM MgSO₄·7H₂O, 0.1 mM CaCl₂, 0.4% glucose, and 0.2% casamino acids; 5× M9 salts contains 64 g of Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g of KH₂PO₄, 2.5 g of NaCl, and 5 g of NH₄Cl dissolved in deionized water to a final volume of 1 L), where 1.5% w/v agar were used for solid culture. For methionine auxotrophy experiments, cells were grown in M9-glucose supplemented with L-leucine (30 mg/L). For methionine and inducer applications, we prepared a 1000× stock solution (12 g/L) of methionine, 0.1 M of IPTG, and 1 M of L-arabinose and filter sterilized them. Antibiotics were prepared as stock solutions of kanamycin (50 µg/µL), carbenicillin (100 µg/µL), tetracycline (10 µg/µL), or chloramphenicol (10 µg/µL).

Fluorescence Quantification Using Fluorometry. Fluorescence and absorbance were measured in a Clariostar plate

reader (BMG LABTECH), with GFP excited at 470–15 nm and measured at 515–20 nm, RFP excited at 570–15 nm, and measured at 620–20 nm, and absorbance measured at 600 nm.

Microscopy and Image Analysis. A Nikon Ni microscope was used for all experiments except for 4-plasmid segregation experiments. The following filter sets were used for the four fluorescent proteins used in this study: mTurquoise2 (excitation at 425–445 nm; dichroic 455 nm, emission 465–495 nm), GFP (excitation at 465–495 nm; dichroic 505 nm, emission 515–555 nm), mVenus (excitation at 490–510 nm; dichroic 515 nm, emission 520–550 nm), mCherry (excitation at 540–580 nm; dichroic 600 nm, emission 605–695 nm).

4-Plasmid segregation images were obtained using an inverted Zeiss LSM 780 multiphoton laser scanning confocal microscope. Images were taken using a 10× air objective. sfGFP was excited at 488 nm (argon ion laser), RFP was excited at 561 (HeNe laser), mTurquoise2 was excited at 458 (argon ion laser), and mVenus was excited at 488 (argon ion laser). Fluorescence was detected using a 32 anode Hybrid-GaAsP and two standard photomultiplier tubes. sfGFP emission was detected between 499 and 580 nm, RFP emission was detected between 599 and 697 nm, mTurquoise2 emission was detected between 463 and 581 nm, and mVenus emission was detected between 526 and 598 nm. The multichannel images were processed using the spectral unmixing plugin in ImageJ and then merged.⁶⁸

Image levels and brightness were applied to the whole image in Adobe Photoshop (CS6), except for those images that were used for intensity measurements.

Computational Modeling. All symmetry-breaking and domain-specific growth regulation modules were created as python scripts and run in CellModeller (<http://haselofflab.github.io/CellModeller/>). All these Python modules and MATLAB scripts used for data analysis are available at <https://github.com/timrudge/MorphoEngineering>.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssynbio.6b00149.

Extended materials and methods, as well as oligonucleotide Figures S1–S10 (PDF)
CellModeller simulations (ZIP)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: ffederici@bio.puc.cl.

Author Contributions

#I.N.N., T.F.M., and I.D.D.V. contributed equally to this work

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

T.J.R., A.K., and J.H. were supported by the UK Biotechnological and Biological Sciences Research Council (BBSRC) Synthetic Biology Research Centre “OpenPlant” award (BB/L014130/1), F.F. was supported by CONICYT-PAI/Concurso Nacional de Apoyo al Retorno de Investigadores/as desde el Extranjero Folio 82130027, Fondo de Desarrollo de Areas Prioritarias (FONDAP) Center for Genome Regulation (15090007), Millennium Nucleus Center for Plant Systems and Synthetic Biology (NC130030) and Fondecyt Iniciación

11140776. A.K. was also supported by BBSRC CASE studentship in partnership with Microsoft Research. A.C. and D.E. were supported by NSF GRFP fellowship and Stanford University. This material is based upon work supported by the National Science Foundation Graduate Research Fellowship Program under Grant No. DGE-114747 and additional support was provided by Stanford University. The authors would like to thank Rodrigo Gutierrez and his group (PUC, Chile) for support and useful comments, Joseph Torella and Pam Silver for UNSES vectors, Cambridge 2009 iGEM team for violacein operon, Registry of Biological Parts (MIT) for RNAPT7, fluorescent proteins, and pSB4K5 vector. pdCas9 was a gift from Luciano Marraffini (Addgene plasmid # 46569).

■ REFERENCES

- (1) Benenson, Y. (2012) Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. *Nat. Rev. Genet.* 13, 455–468.
- (2) Chen, A. Y., Deng, Z., Billings, A. N., Seker, U. O., Lu, M. Y., Citorik, R. J., Zakeri, B., and Lu, T. K. (2014) Synthesis and patterning of tunable multiscale materials with engineered cells. *Nat. Mater.* 13, 515–523.
- (3) Didovyyk, A., Kanakov, O. I., Ivanchenko, M. V., Hasty, J., Huerta, R., and Tsimring, L. (2015) Distributed classifier based on genetically engineered bacterial cell cultures. *ACS Synth. Biol.* 4, 72–82.
- (4) Douglas, S. M., Bachelet, I., and Church, G. M. (2012) A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* 335, 831–834.
- (5) Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., and Smolke, C. D. (2015) Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science* 349, 1095–1100.
- (6) Macia, J., and Sole, R. (2014) How to make a synthetic multicellular computer. *PLoS One* 9, e81248.
- (7) Nielsen, A. A., Der, B. S., Shin, J., Vaidyanathan, P., Paralanov, V., Strychalski, E. A., and Voigt, C. A. (2016) Genetic circuit design automation. *Science* 352 (6281), aac7341.
- (8) Qian, L., Winfree, E., and Bruck, J. (2011) Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature* 475, 368–372.
- (9) Siuti, P., Yazbek, J., and Lu, T. K. (2013) Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 448–452.
- (10) Xie, Z., Wroblewska, L., Prochazka, L., Weiss, R., and Benenson, Y. (2011) Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science* 333, 1307.
- (11) Ausländer, S., Ausländer, D., Müller, M., Wieland, M., and Fussenegger, M. (2012) Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature* 487, 123–127.
- (12) Danino, T., Mondragón-Palomino, O., Tsimring, L., and Hasty, J. (2010) A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature* 463, 326–330.
- (13) Del Vecchio, D. (2015) Modularity, context-dependence, and insulation in engineered biological circuits. *Trends Biotechnol.* 33, 111–119.
- (14) Kosuri, S., Goodman, D. B., Cambray, G., Mutalik, V. K., Gao, Y., Arkin, A. P., Endy, D., and Church, G. M. (2013) Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14024–14029.
- (15) Liu, C. C., Qi, L., Lucks, J. B., Segall-Shapiro, T. H., Wang, D., Mutalik, V. K., and Arkin, A. P. (2012) An adaptor from translational to transcriptional control enables predictable assembly of complex regulation. *Nat. Methods* 9, 1088–1094.
- (16) Lou, C., Stanton, B., Chen, Y. J., Munskey, B., and Voigt, C. A. (2012) Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context. *Nat. Biotechnol.* 30, 1137–1142.
- (17) Mutalik, V. K., Guimaraes, J. C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M. J., Mai, Q. A., Tran, A. B., Paull, M., Keasling, J. D., Arkin, A. P., and Endy, D. (2013) Precise and reliable gene expression

via standard transcription and translation initiation elements. *Nat. Methods* 10, 354–360.

(18) Qi, L., Haurwitz, R. E., Shao, W., Doudna, J. A., and Arkin, A. P. (2012) RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nat. Biotechnol.* 30, 1002–1006.

(19) Purnick, P. E., and Weiss, R. (2009) The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 410–422.

(20) Balagaddé, F. K., Song, H., Ozaki, J., Collins, C. H., Barnet, M., Arnold, F. H., Quake, S. R., and You, L. (2008) A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol. Syst. Biol.* 4, 187.

(21) Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C. H., Arnold, F. H., and Weiss, R. (2005) A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* 434, 1130–1134.

(22) Ji, W., Shi, H., Zhang, H., Sun, R., Xi, J., Wen, D., Feng, J., Chen, Y., Qin, X., Ma, Y., Luo, W., Deng, L., Lin, H., Yu, R., and Ouyang, Q. (2013) A formalized design process for bacterial consortia that perform logic computing. *PLoS One* 8, e57482.

(23) Liu, C., Fu, X., Liu, L., Ren, X., Chau, C. K. L., Li, S., Xiang, L., Zeng, H., Chen, G., and Tang, L. H. (2011) Sequential establishment of stripe patterns in an expanding cell population. *Science Signalling* 334, 238.

(24) Regot, S., Macia, J., Conde, N., Furukawa, K., Kjellén, J., Peeters, T., Hohmann, S., de Nadal, E., Posas, F., and Solé, R. (2011) Distributed biological computation with multicellular engineered networks. *Nature* 469, 207–211.

(25) Schaeferli, Y., Munteanu, A., Gili, M., Cotterell, J., Sharpe, J., and Isalan, M. (2014) A unified design space of synthetic stripe-forming networks. *Nat. Commun.* 5, No. 4905.

(26) Tamsir, A., Tabor, J. J., and Voigt, C. A. (2011) Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical/wires/. *Nature* 469, 212–215.

(27) Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S., and Stephanopoulos, G. (2015) Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat. Biotechnol.* 33, 377–383.

(28) Doursat, R., Sayama, H., and Michel, O. (2013) A review of morphogenetic engineering. *Nat. Comput.* 12, 517–535.

(29) Doursat, R., Sayama, H., and Michel, O. (2012) *Morphogenetic Engineering: Toward Programmable Complex Systems*, Springer.

(30) Chen, A. Y., Zhong, C., and Lu, T. K. (2015) Engineering living functional materials. *ACS Synth. Biol.* 4, 8–11.

(31) Ball, P., and Borley, N. R. (1999) *The self-made tapestry: pattern formation in nature*, Oxford University Press, Oxford.

(32) Goodwin, B. C., Kauffman, S., and Murray, J. D. (1993) Is morphogenesis an intrinsically robust process? *J. Theor. Biol.* 163, 135–144.

(33) Bashor, C. J., Horwitz, A. A., Peisajovich, S. G., and Lim, W. A. (2010) Rewiring cells: synthetic biology as a tool to interrogate the organizational principles of living systems. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 515.

(34) Holland, J. H. (2012) *Signals and boundaries: Building blocks for complex adaptive systems*, Mit Press.

(35) Grant, P. K., Dalchau, N., Brown, J. R., Federici, F., Rudge, T. J., Yordanov, B., Patange, O., Phillips, A., and Haseloff, J. (2016) Orthogonal intercellular signaling for programmed spatial behavior. *Mol. Syst. Biol.* 12, 849.

(36) Payne, S., Li, B., Cao, Y., Schaeffer, D., Ryser, M. D., and You, L. (2013) Temporal control of self-organized pattern formation without morphogen gradients in bacteria. *Mol. Syst. Biol.* 9, 697.

(37) Cachat, E., Liu, W., Hohenstein, P., and Davies, J. A. (2014) A library of mammalian effector modules for synthetic morphology. *J. Biol. Eng.* 8, 1.

(38) Pascualie, J., Potier, M., Kowaliw, T., Giavitto, J.-L., Michel, O., Spicher, A., and Doursat, R. (2016) Developmental design of synthetic bacterial architectures by morphogenetic engineering. *ACS Synth. Biol.* 5, 842–61.

(39) Davies, J. A. (2008) Synthetic morphology: prospects for engineered, self-constructing anatomies. *J. Anat.* 212, 707–719.

(40) Foty, R. A., and Steinberg, M. S. (2005) The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev. Biol.* 278, 255–263.

(41) Bowman, J. L., Smyth, D. R., and Meyerowitz, E. M. (2012) The ABC model of flower development: then and now. *Development* 139, 4095–4098.

(42) Rudge, T. J., Steiner, P. J., Phillips, A., and Haseloff, J. (2012) Computational modeling of synthetic microbial biofilms. *ACS Synth. Biol.* 1, 345–352.

(43) Rudge, T. J., Federici, F., Steiner, P. J., Kan, A., and Haseloff, J. (2013) Cell Polarity-Driven Instability Generates Self-Organized, Fractal Patterning of Cell Layers. *ACS Synth. Biol.* 2, 705–714.

(44) Anderson, P. W. (1972) More is different. *Science* 177, 393–396.

(45) Gierer, A., and Meinhardt, H. (1972) A theory of biological pattern formation. *Biological Cybernetics* 12, 30–39.

(46) Munro, E., and Bowerman, B. (2009) Cellular symmetry breaking during *Caenorhabditis elegans* development. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 1, a003400.

(47) Tompkins, N., Li, N., Girabawe, C., Heymann, M., Ermentrout, G. B., Epstein, I. R., and Fraden, S. (2014) Testing Turing's theory of morphogenesis in chemical cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4397–4402.

(48) Turing, A. M. (1952) The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc., B* 237, 37–72.

(49) van der Gucht, J., and Sykes, C. (2009) Physical model of cellular symmetry breaking. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 1, a001909.

(50) Wennekamp, S., Mesecke, S., Nédélec, F., and Hiragi, T. (2013) A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 452–459.

(51) Torella, J. P., Boehm, C. R., Lienert, F., Chen, J. H., Way, J. C., and Silver, P. A. (2014) Rapid construction of insulated genetic circuits via synthetic sequence-guided isothermal assembly. *Nucleic Acids Res.* 42, 681–689.

(52) Chen, Y. J., Liu, P., Nielsen, A. A., Brophy, J. A., Clancy, K., Peterson, T., and Voigt, C. A. (2013) Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat. Methods* 10, 659–664.

(53) Dahmann, C., Oates, A. C., and Brand, M. (2011) Boundary formation and maintenance in tissue development. *Nat. Rev. Genet.* 12, 43–55.

(54) August, P. R., Grossman, T. H., Minor, C., Draper, M. P., MacNeil, I. A., Pemberton, J. M., Call, K. M., Holt, D., and Osburne, M. S. (2000) Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 513–519.

(55) Segall-Shapiro, T. H., Meyer, A. J., Ellington, A. D., Sontag, E. D., and Voigt, C. A. (2014) A 'resource allocator' for transcription based on a highly fragmented T7 RNA polymerase. *Mol. Syst. Biol.* 10, 742.

(56) Newman, S. A., and Bhat, R. (2009) Dynamical patterning modules: a "pattern language" for development and evolution of multicellular form. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 693–705.

(57) Noorduyn, W. L., Grinthal, A., Mahadevan, L., and Aizenberg, J. (2013) Rationally designed complex, hierarchical microarchitectures. *Science* 340, 832–837.

(58) Werfel, J., Petersen, K., and Nagpal, R. (2014) Designing collective behavior in a termite-inspired robot construction team. *Science* 343, 754–758.

(59) Isalan, M., Lemerle, C., and Serrano, L. (2005) Engineering gene networks to emulate *Drosophila* embryonic pattern formation. *PLoS Biol.* 3, e64.

(60) Korolev, K. S., Müller, M. J., Karahan, N., Murray, A. W., Hallatschek, O., and Nelson, D. R. (2012) Selective sweeps in growing microbial colonies. *Phys. Biol.* 9, 026008.

(61) Blanchard, A. E., and Lu, T. (2015) Bacterial social interactions drive the emergence of differential spatial colony structures. *BMC Syst. Biol.* 9, 59.

- (62) Brenner, K., and Arnold, F. H. (2011) Self-organization, layered structure, and aggregation enhance persistence of a synthetic biofilm consortium. *PLoS One* 6, e16791.
- (63) Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S., and Nelson, D. R. (2007) Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19926–19930.
- (64) Hauert, C., and Doebeli, M. (2004) Spatial structure often inhibits the evolution of cooperation in the snowdrift game. *Nat. Mater.* 428, 643–646.
- (65) Kovács, T. (2014) Impact of spatial distribution on the development of mutualism in microbes. *Front Microbiol.* 5, 649.
- (66) Hol, F. J., Galajda, P., Woolthuis, R. G., Dekker, C., and Keymer, J. E. (2015) The idiosyncrasy of spatial structure in bacterial competition. *BMC Res. Notes* 8, 245.
- (67) Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., and Smith, H. O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345.
- (68) Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

ANEXO B: PRIMERS UTILIZADOS

Se utilizaron los siguientes *primers* para realizar ensamblaje mediante el sistema UNSeq:

U1F: CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG

U2R: GCTTGGATTCTGCGTTTGTTCCTGTC

U2F: GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAAC

U3R: CGACCTTGATGTTTCCAGTGCGATTG

U3F: GCACTGAAGGTCCTCAATCGCAC

U4R: GACTTTGCGTGTTGTCTTACTATTGCTGG

U4F: CTGACCTCCTGCCAGCAATAGTAAG

UXR: GGTGGAAGGGCTCGGAGTTGTGG

Los plásmidos segregantes (SEG) fueron amplificados mediante los *primers*:

1XCF: GTCCTGTCTGTGACAAATTGC

U1R: GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG

UXF: CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCG

1XCR: GAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAG

Los vectores pAct fueron amplificados mediante los *primers*:

KAGF:TAATTACtaGTCCTTTTCCcgGAGaTcTGGGTATCTGTAAATTCTGCTAG
ACC

U1R: GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG

UXF: CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCG

KAGR:TACCCAgAtCTCccgGAAAAAGGACtaGTAATTATCATTGACTAGCCCAT
CTCAATTG

Los *primers* específicos para ensamblaje mediante *Gibson* fueron:

SEG9R: taatacctaggactgagctagctgtaaactGTTAGTTAGCCCTTAGTGACTCGAATTCCG

SEG9F: tacagctagctcagtcctaggtattatgctagctactagagaaaggagaaatactag

SMetbR: tctaaacCTTAAGGTTCTGATCCTTactagtattatacctaggactgagctagctg

SMetbF: ctagtAAGGATCAGAACCTTAAGgttttagagctagaaatagcaagttaaataaggc
SMetcR: aaacGATGCCGAAGAAGATTGAAACTactagtattatacctaggactgagctagctgtc
SMetcF: gtAGTTTCAATCTTCTTCGGCATCgttttagagctagaaatagcaagttaaataaggc
SMetdR: ctaaaacGCCGTCAATTTCTTGCGTactagtattatacctaggactgagctagctgtc
SMetdF: ctagtACGCAAGAAATTGACGGCgttttagagctagaaatagcaagttaaataaggc
2U3R: tgcTCTAGAAgcgccgcGAATTCCGGCTTGGAATTCTGCGTTTGTTTCC
2U3F: ACGCAGAATCCAAGCCGGAATTCgcgccgctTCTAGAgc
SEG6R: tgcagcgccgctactagtaTATAAACGCAGAAAGGCCACCCG
SEG6F: GTGGGCCTTTCTGCGTTTATAactagtagcgccgctgcagg
1U2R: CACGCAAACCTGTGGTCGCC
1U2F: TTATTAGGCGACCACAGGTTTGCGTG
19stR: taggactgagctagctgtaaactgtgggtccgaattccg
19stF: cggaattcgaccacaagtttacagctagctcagtcctaggtattatgctagc
2C3R2: gtgcgattgaggaccttcagtgcccgtactagtataaacgcagaaaggc
2C3F2: tctgcgtttatactagtagcgggcactgaaggtcctcaatcgactgg