



Reprogramación y ortogonalización de rutas metabólicas en *Escherichia coli*

Belén Calles y Víctor de Lorenzo

Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología, Madrid (España)

Desde un punto de vista biotecnológico, redirigir y aislar rutas metabólicas bacterianas de su contexto celular global tiene una extraordinaria utilidad, particularmente para la producción de compuestos de interés, tales como fármacos e intermediarios de alto valor añadido. Con este fin, hemos desarrollado una nueva herramienta molecular, denominada *interruptor proteómico*, que permite independizar módulos metabólicos funcionales del resto del metabolismo celular en *Escherichia coli* (y en el futuro, también en otras bacterias). La idea central de tal interruptor proteómico consiste en introducir la secuencia de reconocimiento de la proteasa NIa, de origen viral, en los genes que codifican proteínas cuya actividad debe ser eliminada. Se obtienen así mutantes nulos condicionales en los que la actividad de la proteína correspondiente depende de la presencia o ausencia de la proteasa viral, que reconoce específicamente las proteínas producto de los genes marcados con la diana de reconocimiento, sin afectar al resto de proteínas celulares.

Para validar de este concepto hemos examinado la estructura del gen *tpiA*, que codifica el enzima Triosa Fosfato Isomerasa (TpiA), mediante ensayos de *linker scanning mutagenesis*, con la finalidad de localizar sitios permisivos donde insertar posteriormente la secuencia de reconocimiento de la proteasa NIa. Se construyó mediante este abordaje una genoteca de 10^5 clones, que codificaba variantes de la proteína TpiA con pequeñas inserciones peptídicas localizadas al azar. La funcionalidad de estas proteínas insertadas se comprobó mediante ensayos de complementación de la correspondiente cepa mutante nula. Posteriormente, se analizó la actividad enzimática de las variantes que eran capaces de complementar y por tanto conservaban una funcionalidad significativa. Tras localizar las regiones de la proteína que aceptaban inserciones sin una disminución importante de la actividad, se comprobó que estaban repartidas a lo largo de la estructura de la proteína y, en su mayor parte, expuestas. Luego, se utilizó esta información como referencia para la inserción del péptido de reconocimiento de la proteasa. Se comprobó posteriormente la funcionalidad de la proteína TpiA modificada con la secuencia NIa de reconocimiento, así como su sensibilidad a proteólisis. Por último, el gen *tpiA* cromosómico fue sustituido por su variante proteolizable para examinar los cambios en el fenotipo metabólico que se producen en función de la expresión condicional de la proteasa.

Este trabajo sustancia el valor biotecnológico de esta nueva herramienta genética, no solo para el diseño de factorías celulares dedicadas a la producción robusta y económica de precursores de fármacos y otras moléculas de interés, sino para otras aplicaciones tales como el estudio funcional de proteínas esenciales.