**Генериране на мутаторен щам *E. coli* посредством CRISPRi редукция на генната експресия**

CRISPR технологията претърпява бурно развитие през последните три години и доведе до революция в генното инженерство при множество видове.[[1](#_ENREF_1)] Освен класическата CRISPR система, използвана за генериране на генетични модификации посредством ендонуклеазната си активност, съществува и специфично видоизменен вариант, при който каталитично активните аминокиселинни остатъци са мутирани. Подобен каталитично инактивиран комплекс позволява прикрепване към региони, важни за инициацията и елонгацията на транскрипцията и следователно редуциране на експресията на множество различни гени едновременно в микроорганизми.[[2](#_ENREF_2)] Такава CRISPR система предоставя принципно нов начин за подтискане на гените в *E. coli*. Целта на iGEM 2017 Team е да използва описаната тук CRISPRi технология, за да се подтисне експресията на избран списък от гени, включващ *mutM, mutY, mutS, mutT, emrR, ndk, mutL и uvrD*. Всеки един от тези гени е с експериментално доказана роля в поддържането на висока точност при ДНК репликацията.[[3](#_ENREF_3)] Подтискането им ще доведе до високо ниво на спонтанни мутации. По този начин всеки един лабораторен щам *E. coli* с лекота би могъл да бъде превърнат в мутаторен щам, който да предоставя многократно увеличени честоти на мутиране на ДНК. Такива повишени нива на вариации биха улеснили и значително ускорили еволюцията на ДНК секвенции в генерираните микроорганизми, представяйки евтина и ефикасна алтернатива на комерсиално достъпния щам XL1-Red (Agilent Genomics). CRISPRi системата ще бъде интегрирана мястоспецифично в бактериалната хромозома, под контрола на индуцируем промотор. Посредством така придобития контрол над активността ѝ, предложеният от нас вариант ще премахне и основните проблеми на комерсиалния си аналог XL1-Red – ниската трансформационна ефективност и невъзможността за продължително култивиране.

По този начин, ние ще създадем бактериален щам, който ще бъде способен да еволюира много бързо в избрана от нас посока, но същевременно ще запази жизненост близка до тази на живите щамове. Освен че такъв щам ще бъде изключително полезен за приложение в индустриалните биотехнологии, той създава и алтернатива на ГМО с целеви свойства, заменяйки ги с естествения процес на еволюция и селкция.

1. Ledford, H., *CRISPR: gene editing is just the beginning.* Nature, 2016. **531**(7593): p. 156-9.

2. Cress, B.F., et al., *CRISPathBrick: Modular Combinatorial Assembly of Type II-A CRISPR Arrays for dCas9-Mediated Multiplex Transcriptional Repression in E. coli.* ACS Synth Biol, 2015. **4**(9): p. 987-1000.

3. Horst, J.P., T.H. Wu, and M.G. Marinus, *Escherichia coli mutator genes.* Trends Microbiol, 1999. **7**(1): p. 29-36.