

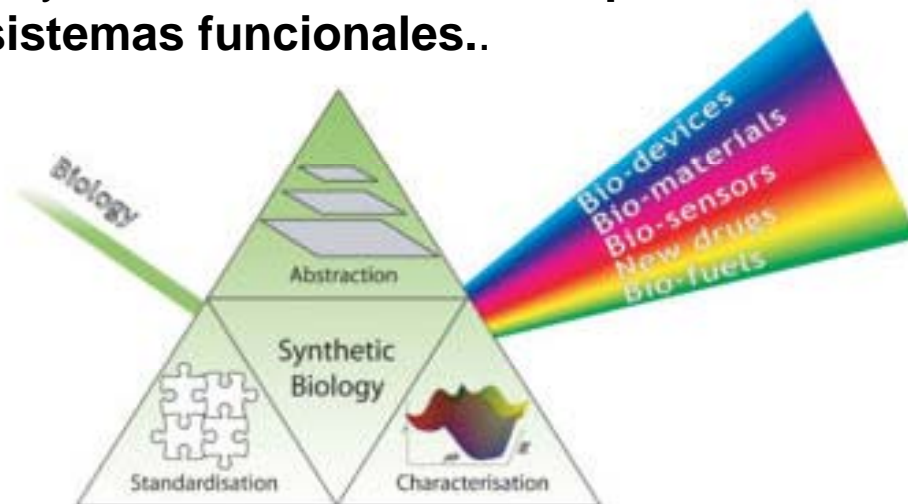
Ingeniería Genética II

Unidad XV (parte 1)

Biología sintética

Biología sintética

- La **biología sintética** es un **nuevo campo científico** que involucra a la *biología*, la *biotecnología*, la *química*, la *ingeniería* y las *ciencias de la computación*, entre otras disciplinas.
- Sus **objetivos** comprenden **el diseño y construcción de dispositivos y sistemas biológicos**, o **el rediseño de sistemas biológicos naturales**, persiguiendo **propósitos útiles** para el ser humano.
- Para la **aplicación** de la **biología sintética** es necesaria la **estandarización y abstracción de componentes biológicos** para **definir nuevos sistemas funcionales**..



¿Cómo podemos entender a esta nueva área del conocimiento que incluye a la biotecnología?

Biología sintética

Algunas **definiciones** sobre este nuevo campo



“La biología sintética incluye a) el diseño y construcción de nuevas partes, dispositivos y sistemas biológicos y b) el rediseño de sistemas biológicos naturales existentes para propósitos útiles”.

Synthetic biology.org

“La biología sintética es un área emergente de investigación que en términos generales se puede describir como el diseño y construcción de nuevas vías biológicas artificiales, organismos o dispositivos, o el rediseño de sistemas biológicos naturales existentes”.

UK Royal Society

Biología sintética

Algunas **definiciones** sobre este nuevo campo



La biología sintética es la ingeniería de la biología: la síntesis de sistemas complejos basados (o inspirados) en la biología, los cuales presentarán funciones que no existen en la naturaleza. Esta perspectiva ingenieril puede ser aplicada a todos los niveles de la jerarquía de las estructuras biológicas – desde las moléculas individuales a las células, tejidos y organismos. En esencia, la biología sintética permitirá el diseño de ‘sistemas biológicos’ de una manera racional y sistémica”

High-level Expert Group European Commission

Biología sintética

Algunas **definiciones** sobre este nuevo campo



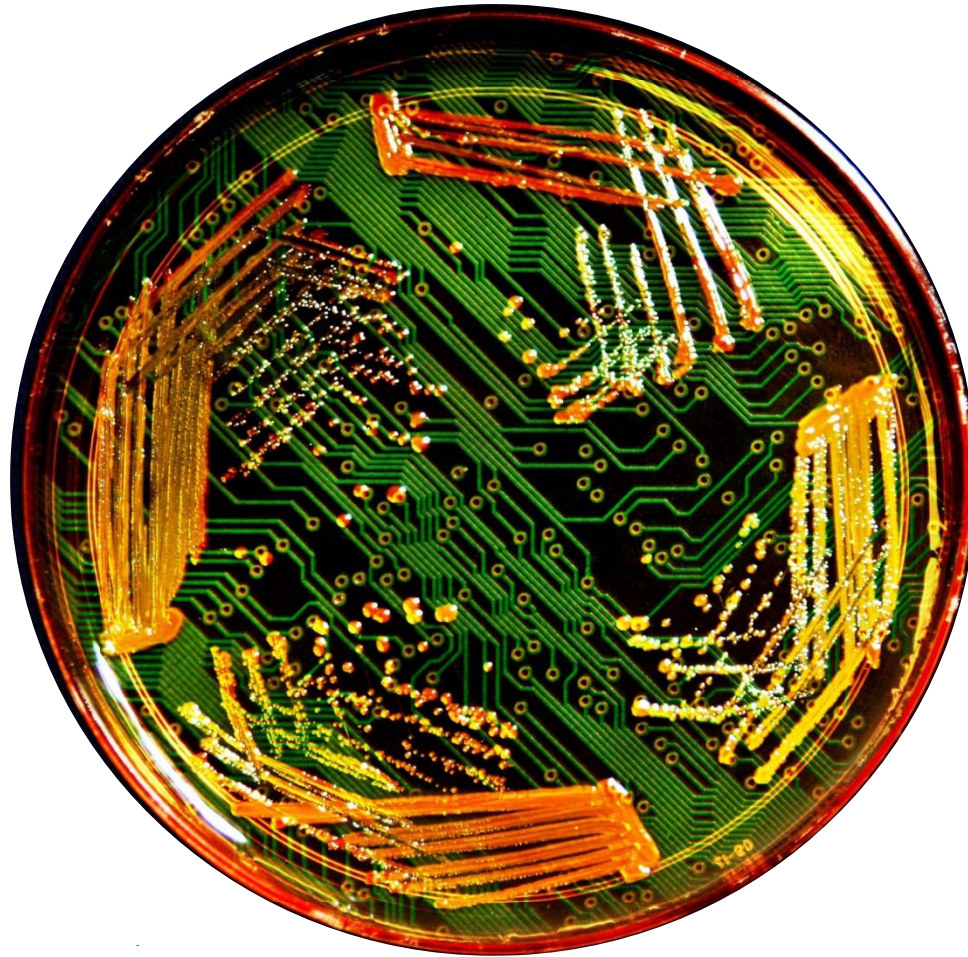
“La biología sintética es la ingeniería de los componentes y sistemas biológicos que no existen en la naturaleza y la re-ingeniería de elementos biológicos existentes; está determinada por el diseño intencional de sistemas biológicos artificiales, en preferencia que la comprensión de la biología natural”.

Synbiology Project

“La biología sintética es una forma emergente de ciencia e ingeniería que tiene como objetivo el diseño y construcción de (nuevos) sistemas biológicos”

3rd International Conference on synthetic biology

Biología sintética



Biología sintética

- La **biología sintética**, en consecuencia, **no busca describir procesos naturales, sino más bien crear nuevos sistemas con fines aplicados.**
- Esto puede **abordar** todos los **diferentes niveles** de los **sistemas biológicos**, tales como:
 - *Desarrollar sistemas vivientes de diseño cuyas características sean mantenidos en sucesivos ciclos de vida.*
 - *Ensamblar circuitos artificiales para generar funciones estructurales o catalíticas definidas.*
 - *Producir macromoléculas biológicas como productos génicos primarios o secundarios en respuesta a diferentes estímulos.*
 - *Construir bloques para ensamblados subcelulares complejos para nano-estructuras.*

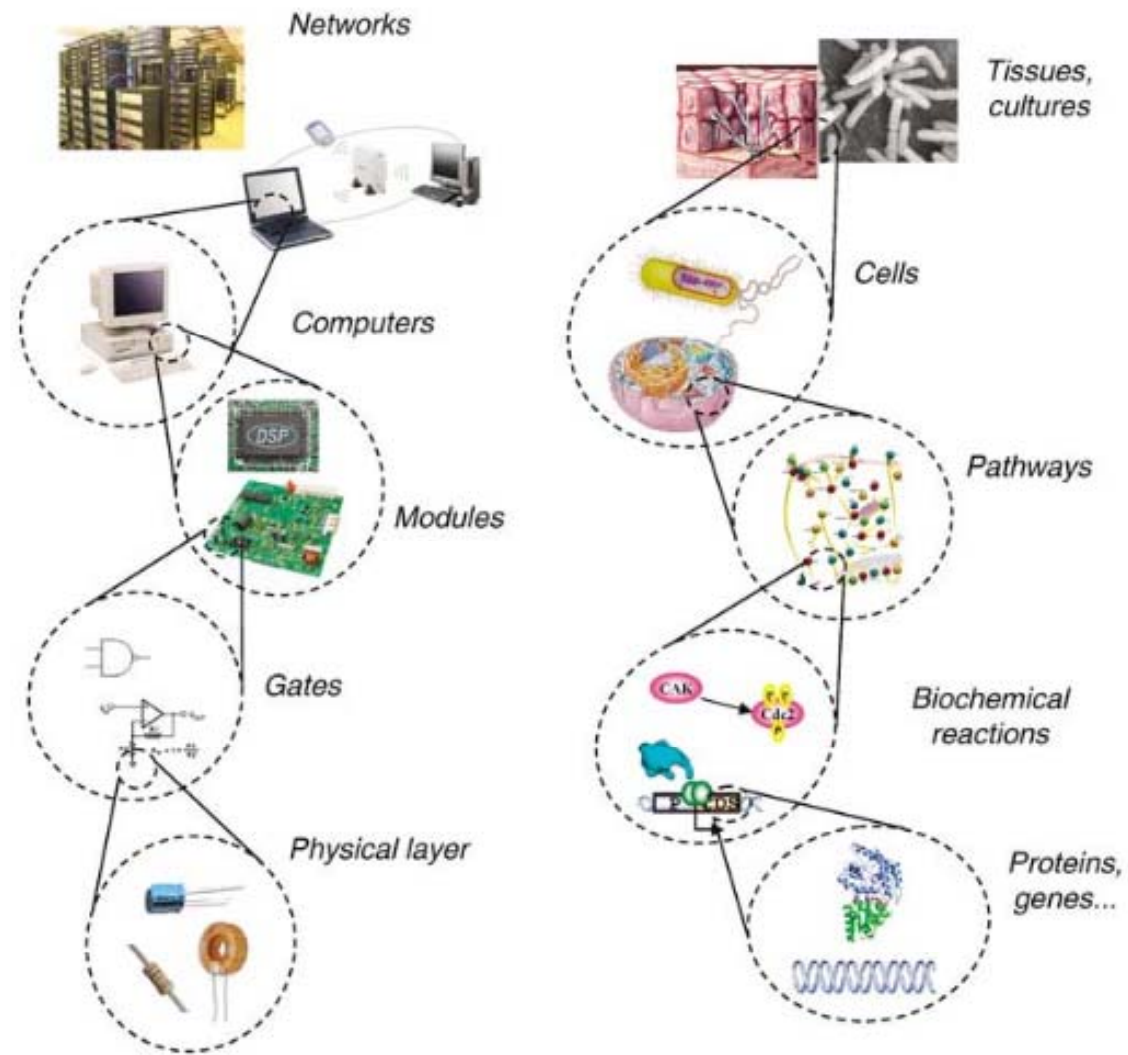
Biología sintética



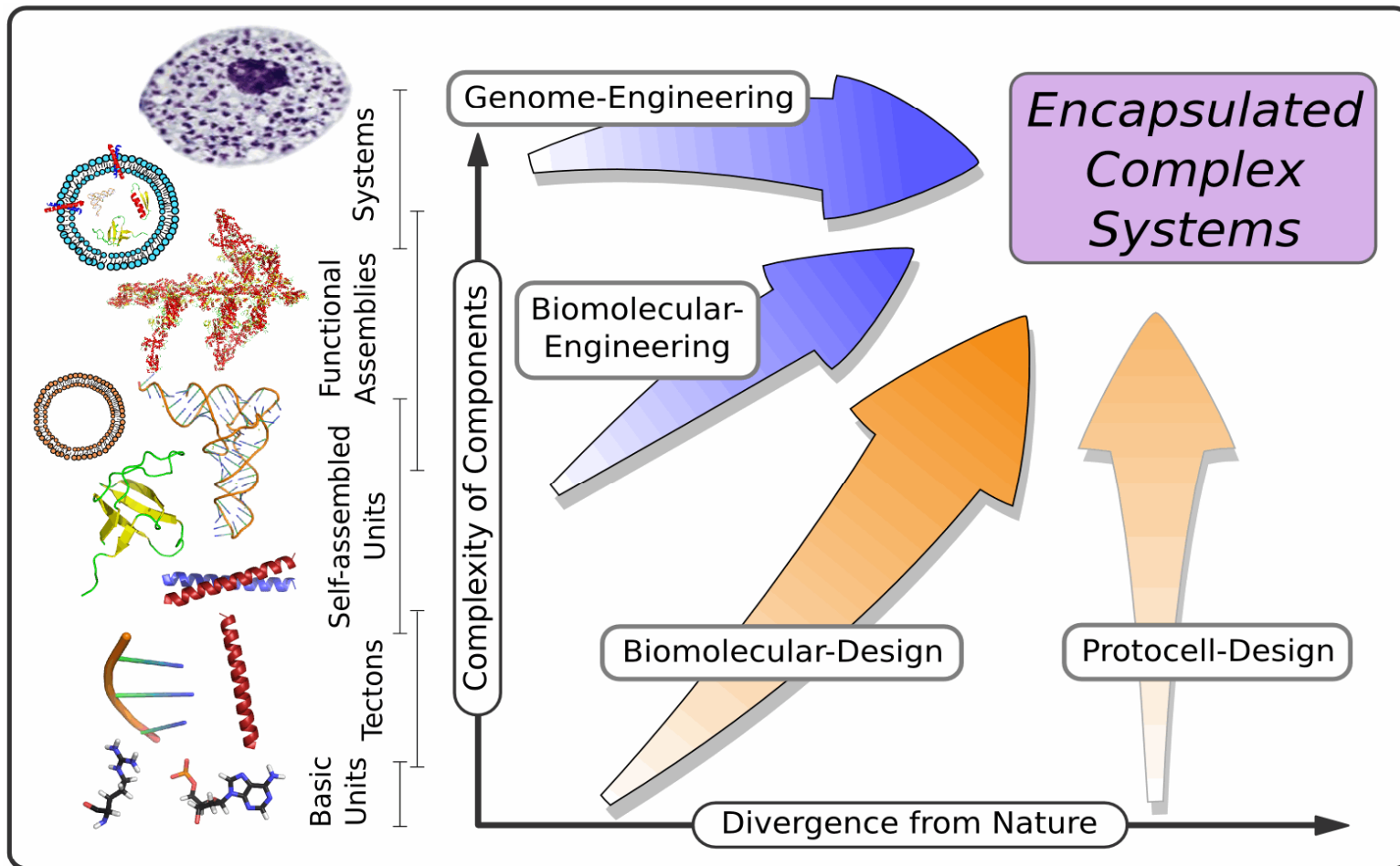
“Aquello que no puedo crear, no lo puedo comprender”

Feynman

Biología sintética



Biología sintética



***¿Cuáles son los componentes
estructurales que definen a la
biología sintética?***

Biología sintética

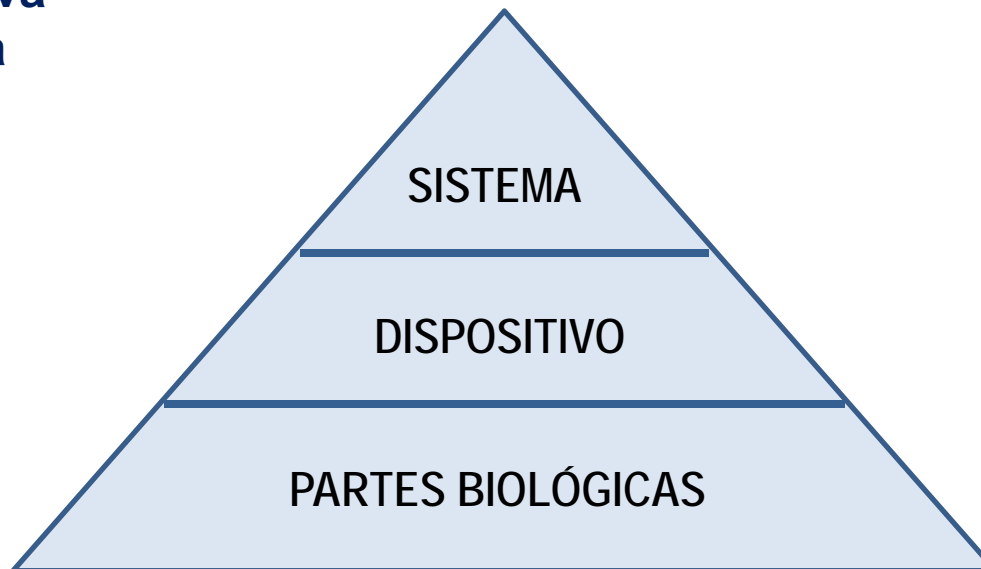
Componentes

La **biología sintética** se constituye con el siguiente orden de **componentes**:

**Materia viva
sintética**



Diseño



***¿Cuáles son los componentes
estructurales que definen a la
biología sintética?***

BIOBRICKs



Biología sintética

Partes biológicas

- Las *partes biológicas* (**BioBricks**) se clasifican según su funcionamiento en:
 - *Específicas de hospedador* (sólo funcionan en un organismo)
 - *Facultativas* (funcionan en varios organismos)
 - *Universales* (funcionan en cualquier organismo)
- Los *partes biológicas* (**BioBricks**) se clasifican según su rol como:
 - *Sensores* (detector de señales ambientales –*inputs*-)
 - *Reguladores* (controlador de cantidades –interface entre *input* y *output*-)
 - *Actuadores* (generador de respuestas –*outputs*-)
 - *Adaptadores* (conector de componentes individuales)



Biología sintética

Partes biológicas

Sensores



- **Detactan señales ambientales o celulares, y las convierten en actividades reguladoras** de genes o cambios conformacionales.
- Según la **naturaleza** de las **señales** se clasifican en: ***físicas*** y ***químicas***.
- Las **señales físicas modifican estados conformacionales** de una manera dependiente de energía (por ejemplo la temperatura).
- Las **señales químicas** (metales pesados, toxinas, hormonas, nutrientes) **modifican la distribución conformacional**.

Biología sintética

Partes biológicas

B) Sensors

Mechanism		Example	Material	Host-specificity	References
physical signals	light	phytochrome	protein	can be universal	(149, 150)
		histidine kinase	protein	specific	(151)
		rhodopsins	protein	universal	(152)
	temperature	thermosensor	RNA	universal	(153, 154)
	osmotic pressure	osmosensor	protein	specific	(155)
chemical signals	genetic signals	protein aptamer	RNA	universal	(156)
		antisense RNA	RNA	universal	(78, 157)
		DNA damage sensor	protein	specific	(158)
	physiological chemicals/secondary metabolites	nutrient sensor	protein	specific	(88, 159)
		hormone receptor	protein	universal	(160, 161)
		small molecule aptamer	RNA	universal	(7, 97, 98, 162)
		Ions	intracellular ion sensor	protein (163) or RNA (164)	can be universal
	heavy metal sensor		protein	can be universal	(165)
	pH (hydrogen) sensor		protein	can be universal	(163, 166)
	environmental contaminants/toxins	arsenite sensor	protein	can be universal	(65)
		antibiotics sensor	protein	specific	(167)
		PCB sensor	protein	can be universal	(168)
		gas	H ₂ O ₂ sensor	protein	can be universal
	acetaldehyde sensor		protein	universal	(170)

Biología sintética

Partes biológicas

Reguladores



- **Controlan la cantidad** de productos de **expresión génica** activos por medio de **diferentes procesos**, tales como...
 - *Epigenética* (alteración de patrones de metilación)
 - *Edición de genomas* (deleciones, inversiones)
 - *Control de la transcripción* (factores proteicos de unión a DNA y operadores).
 - *Estabilidad de transcripto* (*splicing*, interferencia, degradación)
 - *Eficiencia de traducción* (impedimento a maquinaria de traducción)
 - *Modificaciones postraduccionales* (fosforilación, ubiquitinación, degradación)

Biología sintética

Partes biológicas

A) Regulators					
Mechanism		Example	Material	Host-specificity	References
pre-transcriptional	epigenetic regulation	synthetic TF recognizing DNA methylation	DNA & protein	facultative	(125)
		sequence orientation	integrase/excisionase (w/BP, LR sites)	DNA & protein	universal
	control	Cre recombinase (w/LoxP site)	DNA & protein	universal	(1)
		Hin recombinase and Fim recombinase	DNA & protein	universal	(16)
	genome editing	synthetic retrotransposon	DNA	specific	(16, 17, 126)
		synthetic TALE nuclease	DNA & protein	can be universal	(127)
DNA replication	origin of replication	DNA	specific	(128, 129)	
transcriptional	initiation	natural constitutive promoters	DNA	specific	(27, 62, 104)
		T7 promoter	DNA & protein	specific (bacteria)	(130)
		synthetic promoter with zinc finger-based TF	DNA & protein	can be universal	(9, 131–133)
		synthetic TALE-based TF	DNA & protein	can be universal	(134, 135)
	termination	terminator	DNA	specific	(130)
co-transcriptional	exon rearrangement	alternative RNA splicing	RNA	specific (eukaryotes)	(93)
		synthetic intron	RNA	specific (eukaryotes)	(136, 137)
post-transcriptional	mRNA stability	RntI _p cleavage site	RNA	specific (yeast)	(110, 138)
		microRNA	RNA	specific (eukaryotes)	(56)
		cis-regulating ribozyme	RNA	facultative	(6, 7, 139)
		CRISPR-based RNA	RNA & protein	specific (bacteria)	(140)
	mRNA availability	microRNA sponge as decoy	RNA	specific (eukaryotes)	(141)
co-translational	initiation	ribosome binding site	RNA	specific (bacteria)	(103)
		internal ribosome entry site	RNA	specific (eukaryotes)	(142, 143)
		Kozac sequence	RNA	specific (eukaryotes)	(144)
	termination	supD amber suppressor	RNA	specific (bacteria)	(111)
	ribosome specificity	16S rRNA/SD sequence pair	RNA	specific (bacteria)	(114)
post-translational	protein stability	degradation tag	protein	specific	(11, 53)

Biología sintética

Partes biológicas

Actuadores



- Los **actuadores** son los **encargados** de **producir salidas** (*outputs*) **medibles** o **cambios fenotipos** notorios.
- Por ejemplo, las **proteínas indicadoras** son un **output** de muchos dispositivos (fluorescencia directa o producida por reacciones enzimáticas).
- Los **actuadores** pueden también **modificar** la **morfología** o **fisiología** de la célula.
- Estos **cambios fenotípicos** pueden **condicionar** el **destino** de la **célula** que posee el dispositivo.

Biología sintética

Partes biológicas

C) Actuators					
Mechanism		Example	Material	Host-specificity	References
reporters	fluorescence	fluorescent protein	protein	universal	(171, 172)
		fluorescent RNA	RNA	universal	(173)
	luminescence colorimetric	luciferase	protein	universal	(174)
		carotenoid synthesis enzyme	protein	can be universal	(175, 176)
		β -galactosidase	protein	can be universal	(176)
phenotypic actuators	cell fate	apoptosis regulator	protein	specific	(157)
		MAPK (mating)	protein	specific	(155)
		CDK (cell cycle)	protein	specific	(177)
	cell morphology	WASP (cell shape)	protein	specific	(63)
		CheZ (motility)	protein	specific	(67)
		EPS-degrading enzyme (biofilm)	protein	specific	(178)
	metabolism	secondary metabolite enzyme	protein	can be universal	(43)
		resistance or auxotrophic selection marker	protein	specific	(43)
	transportation	nutrient importer	protein	specific	(35)

Biología sintética

Partes biológicas

A guide to choosing fluorescent proteins

Nathan C Shaner^{1,2}, Paul A Steinbach^{1,3} & Roger Y Tsien^{1,3,4}

The recent explosion in the diversity of available fluorescent proteins (FPs)^{1–16} promises a wide variety of new tools for biological imaging. With no unified standard for assessing these tools, however, a researcher is faced with difficult questions. Which FPs are best for general use? Which are the brightest? What additional factors determine which are best for a given experiment? Although in many cases, a trial-and-error approach may still be necessary in determining the answers to these questions, a unified characterization of the best available FPs provides a useful guide in narrowing down the options.

Biología sintética

Partes biológicas



Adaptadores

- Los **adaptadores** son usualmente **secuencias nucleotídicas no codificantes** o **péptidos no estructurados**.
- **Proveen** el **aislamiento físico** o **funcional** requerido para la **conexión** de otras **partes biológicas**.
- **Otra función** de los adaptadores es **colaborar** en el **establecimiento** de **efectos sinérgicos** de funciones biológicas (colocalización subcelular, anclajes).

Biología sintética

Partes biológicas

D) Adapters

Mechanism		Example	Material	Host-specificity	References
anchoring	membrane tags	ER tag	protein	mostly specific	(179)
		mitochondrion tag	protein	mostly specific	(180)
		nuclear-localization signal	protein	mostly specific	(181)
		vacuole tag	protein	mostly specific	(182)
	secretion tags	secretory sequence motif	protein	mostly specific	(183)
molecular linker	static linker (spacer)	DNA insulator	DNA	mostly specific	(184)
		RNA spacer/transmitter	RNA	universal	(7, 185)
		peptide linker	protein	universal	(23, 186)
	scissile linker	mRNA cleavage signal	RNA	mostly specific	(105, 187)
		protein cleavage signal	protein	mostly specific	(188)

Biología sintética

Partes biológicas

- La **disponibilidad** de *biobricks* es el principal limitante de la biología sintética.
- Su **adquisición involucra** el siguiente flujo de trabajo...



Biología sintética

Partes biológicas

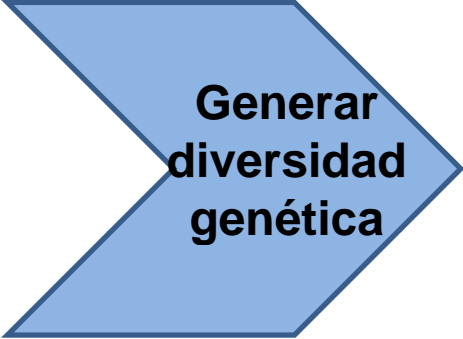
Identificar
candidatos



- **Identificada** una **función** para el **biobrick** (sensor, regulador, actuador, adaptador) es necesario **buscar** en **bibliografía** potenciales candidatos.
- La enorme **disponibilidad** de **secuencias**, el avance en la **bioinformática** y los estudios de **genómica funcional** y **biología de sistemas** son una fuente importante para la selección.
- Si no se conoce nada natural, es **posible** partir de **candidatos diseñados *ad hoc*** en función de las necesidades y del conocimiento disponible.

Biología sintética

Partes biológicas



Generar
diversidad
genética

- A partir de **cada candidato** es necesario generar un **espacio de secuencias diversas**.
- Esto porque **será necesario ajustar y afinar su función**.
- Esto se puede realizar por una combinación de **mutagénesis al azar** (por *Error Prone PCR*, *DNA shuffling*) y **dirigida**.
- Este **conjunto de secuencias** deben luego conformar una **biblioteca alélica**.



Biología sintética

Partes biológicas

Selección
de
biobrick

- Luego, es **necesario un proceso de selección** a partir de la colección de secuencias generadas.
- Para ello, debe **medirse la actividad buscada** (*in vitro* o *in vivo*) y así **rescatar las secuencias** que **mejor se comporten** según lo planteado.
- El **proceso de evolución** puede **continuarse** con el fin de mejorar aún más el rol deseado.



Biología sintética

Partes biológicas

Phage-assisted continuous evolution (PACE)

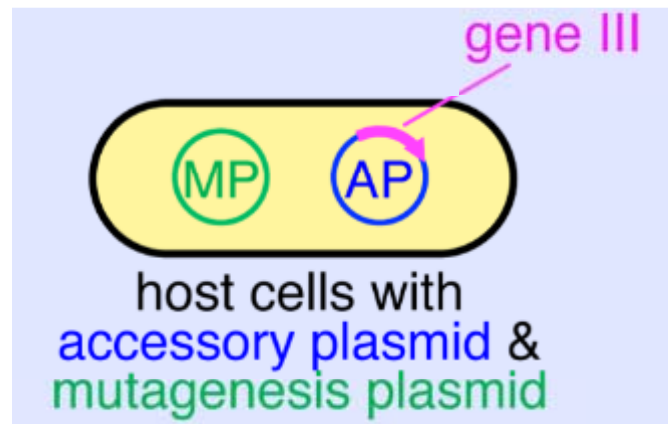


- Sistema de **evolución *in vitro*** para secuencias definidas.
- Se pueden realizar **docenas de rondas de evolución por día** sin intervención humana.
- Se utiliza un **recipiente de volumen fijo** donde fluye un **cultivo de *Escherichia coli***, llamado “**laguna**”, que también contiene una **población de fago filamentoso** (*selection phage* o **SP**) **conteniendo la secuencia a evolucionar**.
- El **tiempo de permanencia** de las **bacterias** en la laguna es **menor** a su **tiempo de duplicación** (~20 min), por lo que **solo se genera progenie del fago** (~10 min).
- El **éxito de la multiplicación del fago se condiciona** por la **secuencia** que se desea **evolucionar**.

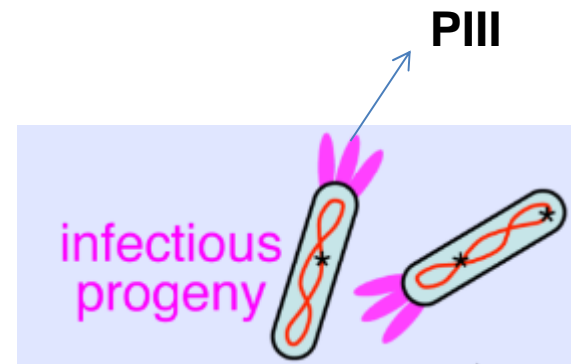
Biología sintética

Partes biológicas

Phage-assisted continuous evolution (PACE)



Escherichia coli conteniendo dos plásmidos:
MP (*mutagenesis plasmid*; aumentan la tasa de error de la polimerasa)
y **AP** (*accessory plasmid*; expresa PIII)



Fago filamentoso sin gen *pIII*, portando la secuencia que se desea evolucionar.

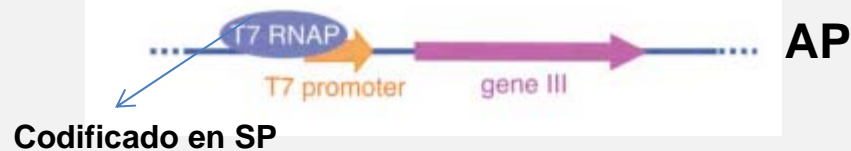
La producción de PIII depende de la interacción entre la secuencia a evolucionar y el plásmido accesorio

Biología sintética

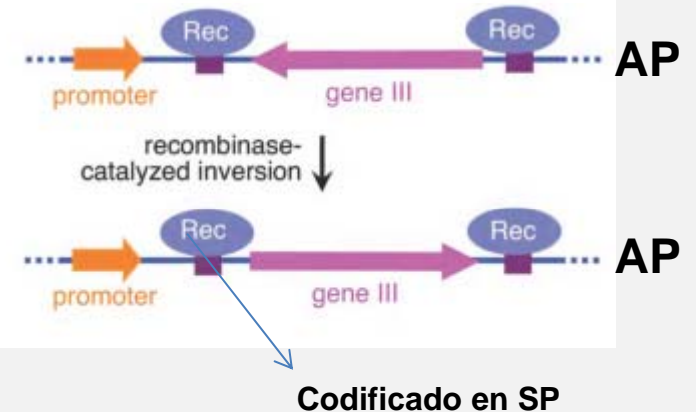
Partes biológicas

Phage-assisted continuous evolution (PACE)

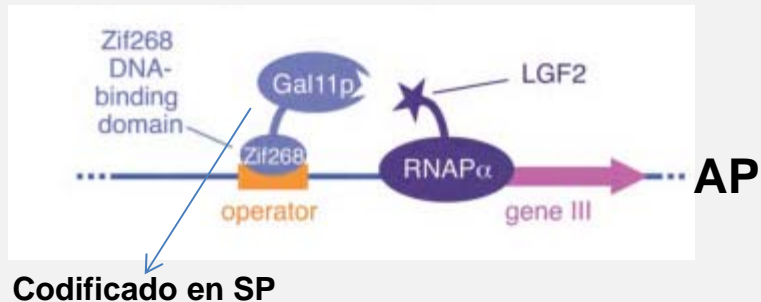
Evolución de actividad polimerasa



Evolución de actividad recombinasa



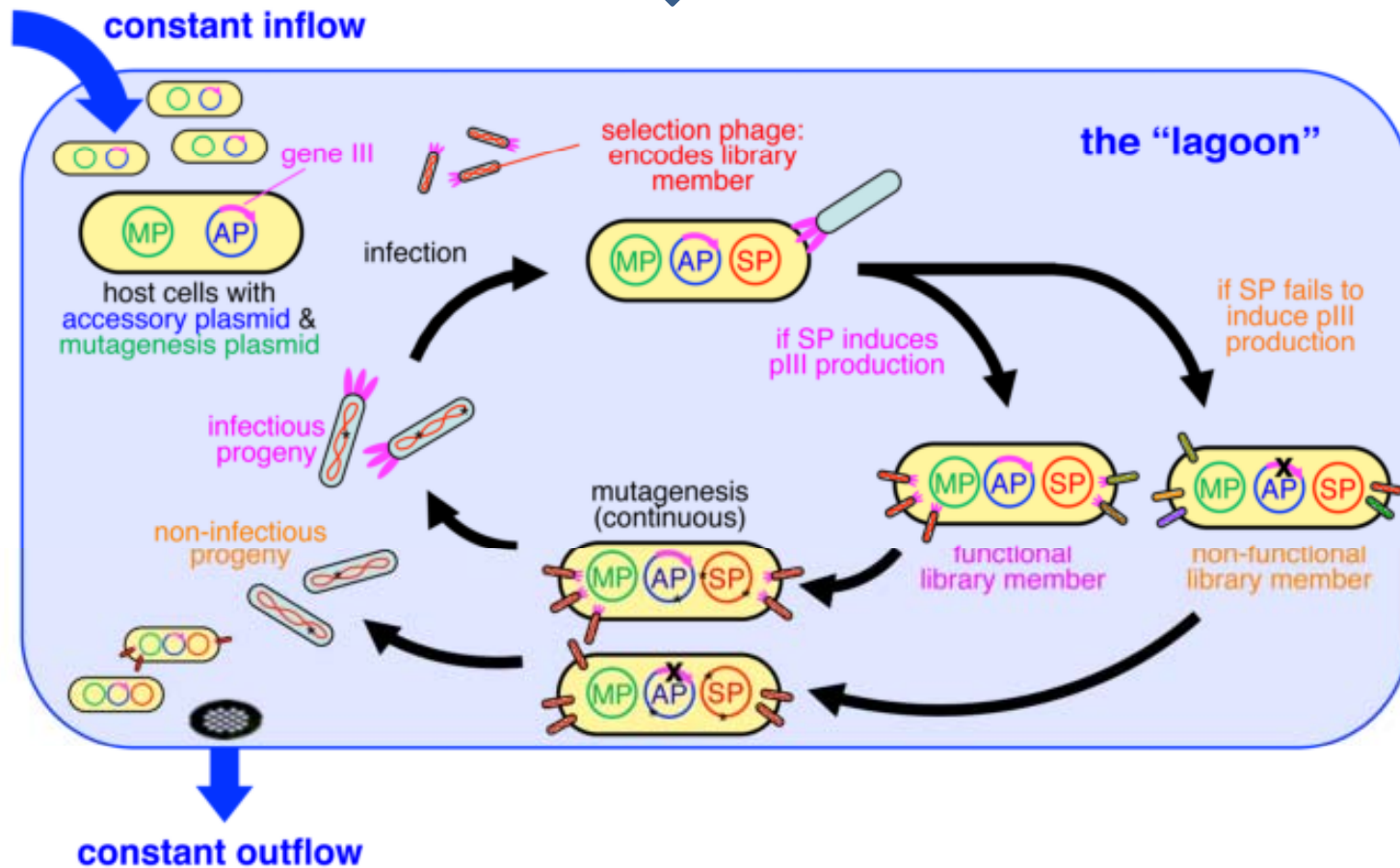
Evolución de péptido de unión a una proteína



Biología sintética

Partes biológicas

Phage-assisted continuous evolution (PACE)



Biología sintética

Partes biológicas

- En muchos **sistemas de biología sintética** se utilizan los **aptámeros**.
- Los **aptámeros** son **moléculas de ácidos nucleicos o peptídicas** que se **unen a una molécula diana específica**.
- En general, **se producen** luego de su **selección** a partir de **conjuntos de secuencias al azar** en un proceso *in vitro*.
- La **tecnología de producción de aptámeros de ácidos nucleicos** fue simultáneamente **desarrollada por dos grupos en 1990**.
- El **procedimiento SELEX** (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) **permite desarrollar pequeñas moléculas de ácidos nucleicos** específicamente **afines** por pequeños **metabolitos**, otros **ácidos nucleicos**, **proteínas**, e incluso **células**.
- Por estas razones, los **aptámeros** **compiten** con los **anticuerpos** en sus **aplicaciones biotecnológicas**, aunque **poseyendo ventajas** respecto de su **producción, estabilidad y seguridad**.

Biología sintética

Partes biológicas

ARTICLES

NATURE · VOL 346 · 30 AUGUST 1990

***In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands**

Andrew D. Ellington & Jack W. Szostak*

Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114, USA

Research Articles

Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase

CRAIG TUERK AND LARRY GOLD

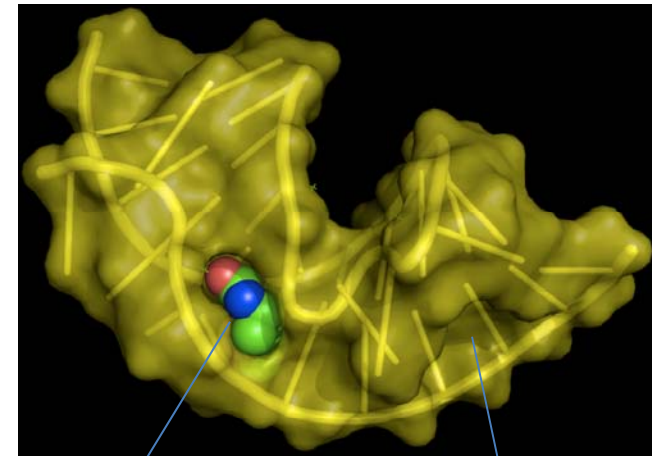
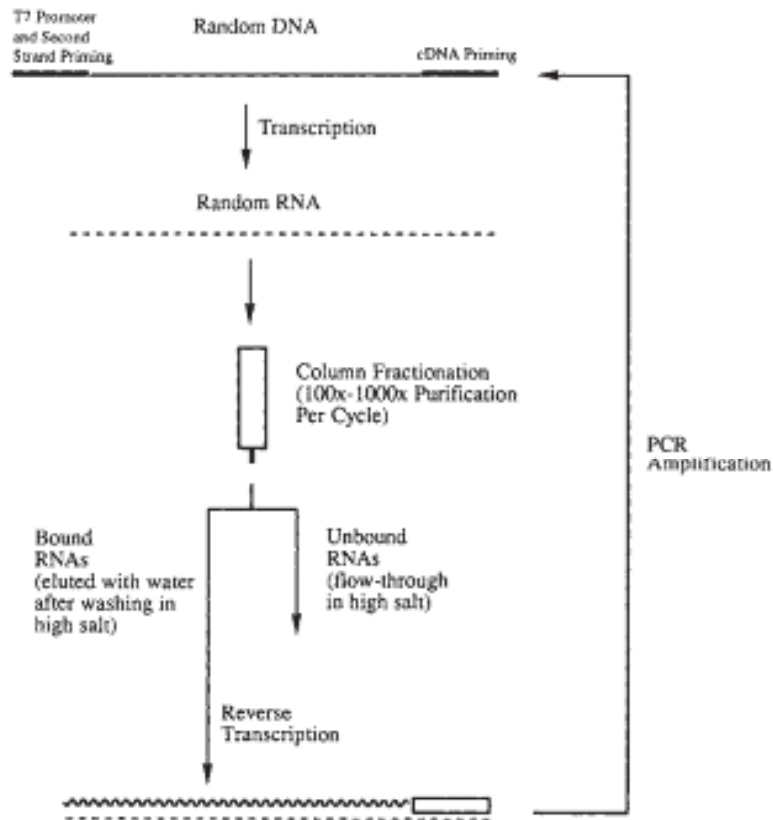
Science, New Series, Vol. 249, No. 4968 (Aug. 3, 1990), pp. 505-510

Biología sintética

Partes biológicas

Procedimiento general para generar aptámeros:

Ejemplo de un aptámero para la biotina:



biotina

Aptámero de RNA

***¿Cuáles son los componentes
estructurales que definen a la
biología sintética?***

DISPOSITIVOS

Biología sintética

Dispositivos

- La **biología sintética** requiere de la **descomposición** de los **componentes básicos de un sistema**, y de su **correcta interrelación** para el diseño de dispositivos funcionales.
- Esta **abstracción** requiere luego un **proceso de ensamblado y estandarización**.
- Finalmente, este ensamblado o “**circuito**” puede **introducirse** en un **organismo natural**, o bien, **diseñar organismos desde cero** que lo incluyan.
- A cada uno de estos **circuitos funcionales** dentro de **materia viva** se los **denomina dispositivos**.

Biología sintética

Dispositivos

- Un **dispositivo genético** es un **ensamblado** de **partes biológicas** que **codifican y ejecutan una función** definida por el **ser humano**.
- La detección del **input** lo realiza el **sensor**, mientras que los **outputs** son generados por el **actuador**.
- En tanto, varios **reguladores** y **adaptadores** son los **componentes** que **conectan** el **sensor** y el **actuador**.
- Existen **dispositivos** tipo **interruptores** (*switches*), **puertas lógicas** (*logic gates*), **osciladores** (*oscillators*), **módulos de comunicación célula-célula** (*cell-cell communication model*), y **memorias** (*memories*), entre otros.

Biología sintética

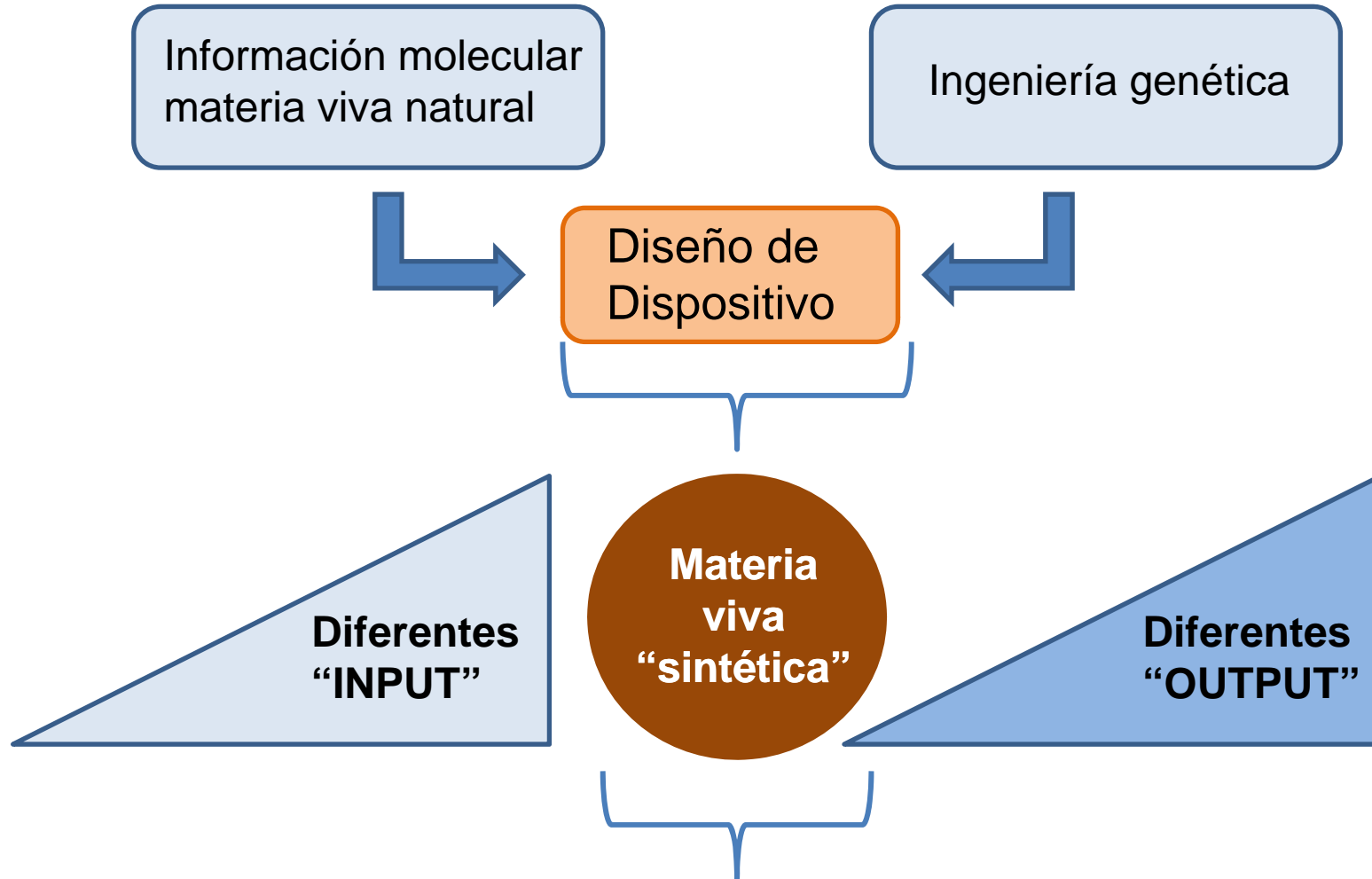
Dispositivos

Genetic device	Key mechanism	Host organism (for the given examples)	Implemented functions	Addressed design considerations	References
switch/logic gates	transcription initiation with natural TF	bacteria	switch, logic gates, combinatorial logic gates (189), concentration band-pass filter (190)	device performance, noise propagation (70), device crosstalk	(70, 189–191)
	transcription initiation with synthetic TF	yeast (9), higher eukaryotes (132)	switch, logic gates (132)	device performance, device crosstalk (9)	(9, 132)
	exon arrangement by RNA splicing	higher eukaryotes	switch	device performance	(93)
	mRNA stability mediated by <i>cis</i> -ribozyme	bacteria (6), yeast (7, 185), higher eukaryotes (139)	switch, logic gates (185), concentration band-pass filter (7)	device performance, device crosstalk	(6, 7, 139, 185)
	mRNA stability mediated by RNAi	higher eukaryotes	switch, combinatorial logic gates	device performance, device crosstalk, evolutionary robustness (56)	(56, 162, 192, 193)
	mRNA stability mediated by Rnt1p	yeast	switch	device performance	(57)
	mRNA availability mediated by antisense RNA	bacteria	switch, inverter & NOR gate, combinatorial logic gates	device performance, device crosstalk (78, 140)	(78, 108, 140)
	translation initiation by RBS availability	bacteria	switch	device performance	(97, 98)
	translation repression by RNA-binding protein	higher eukaryotes	switch	device performance	(156)
translation termination by amber suppression	bacteria	switch, AND gate	device performance	(111)	
cell-cell communication	chemical-based signaling	bacteria (194), yeast (161), higher eukaryotes (195)	single channel communication module	device performance, device crosstalk	(161, 194, 195)
	phage-based signaling	bacteria	multiple genetic cassette communication module	device performance, device crosstalk	(196)
oscillator	ring oscillator	bacteria	static oscillator	device performance	(197)
	relaxation oscillator	bacteria(198), higher eukaryotes(76, 77)	static and tunable oscillator	device performance	(76, 77, 198)
	metabolite-mediated oscillator	bacteria	static oscillator	device performance	(199)
memory	DNA orienting by recombinase	bacteria	SR latch (18), counter (200)	device performance, evolutionary robustness (18)	(16, 18, 200)

Abbreviations: TF: transcription factor. RBS: ribosome binding site. RNAi: RNA interference.

Biología sintética

Dispositivos

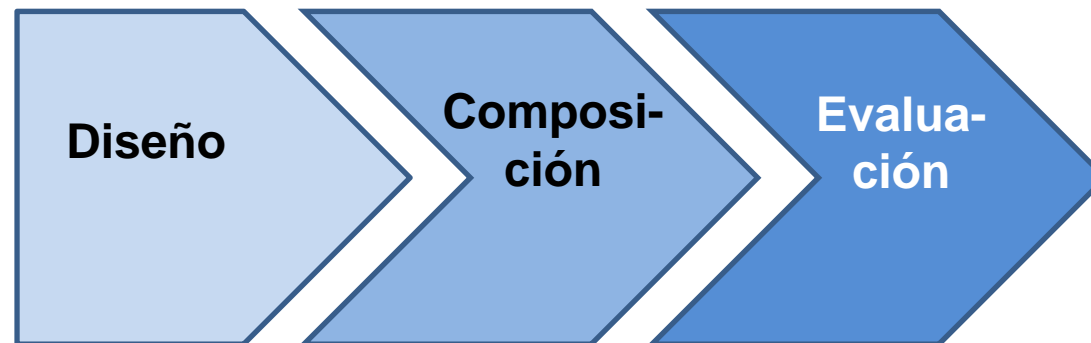


Flujo de información regulada, involucrando procesos de transcripción, traducción, modificación de proteínas, regulación alostérica, unión de receptor-ligando y reacciones enzimáticas

Biología sintética

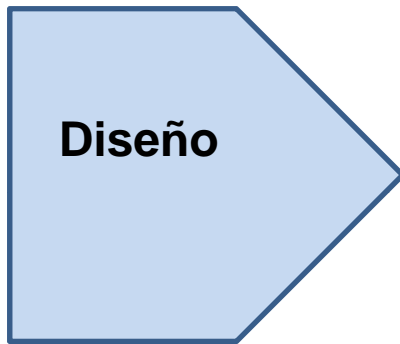
Dispositivos

- El armado de dispositivos biológicos sigue el siguiente flujo de trabajo:



Biología sintética

Dispositivos

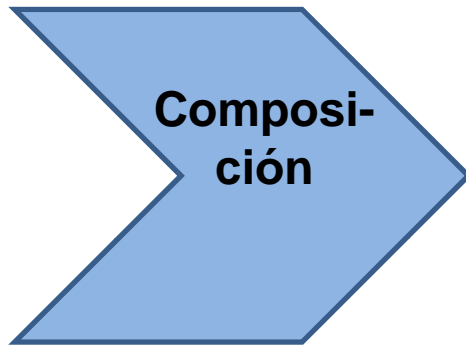


- Determinada la **función requerida**, se **diseña** el **dispositivo** en función de los estímulos (*inputs*) y respuestas deseadas (*outputs*).
- Es necesario **determinar** la **descripción técnica** (*datasheet*), describiendo la arquitectura y restricciones del dispositivo diseñado.
- Así, es importante **incluir** todo lo relativo a las **condiciones de cultivo** del organismo, los **métodos de caracterización** y **todo lo relativo al funcionamiento del dispositivo**.

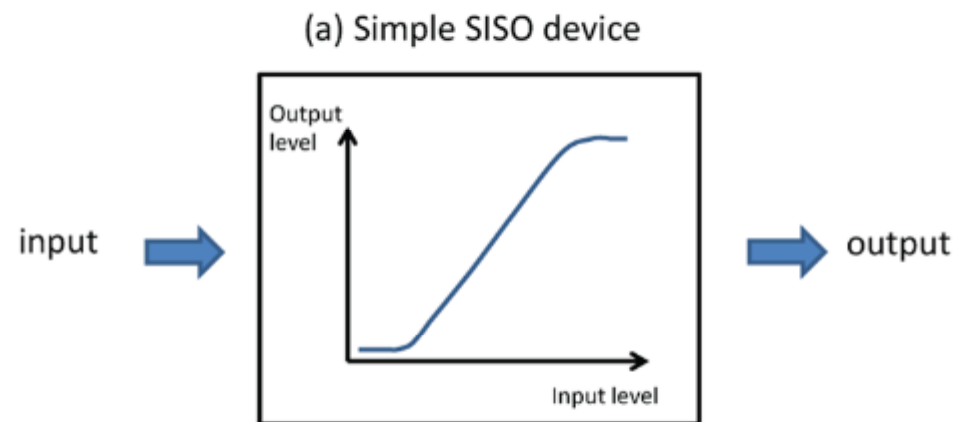


Biología sintética

Dispositivos

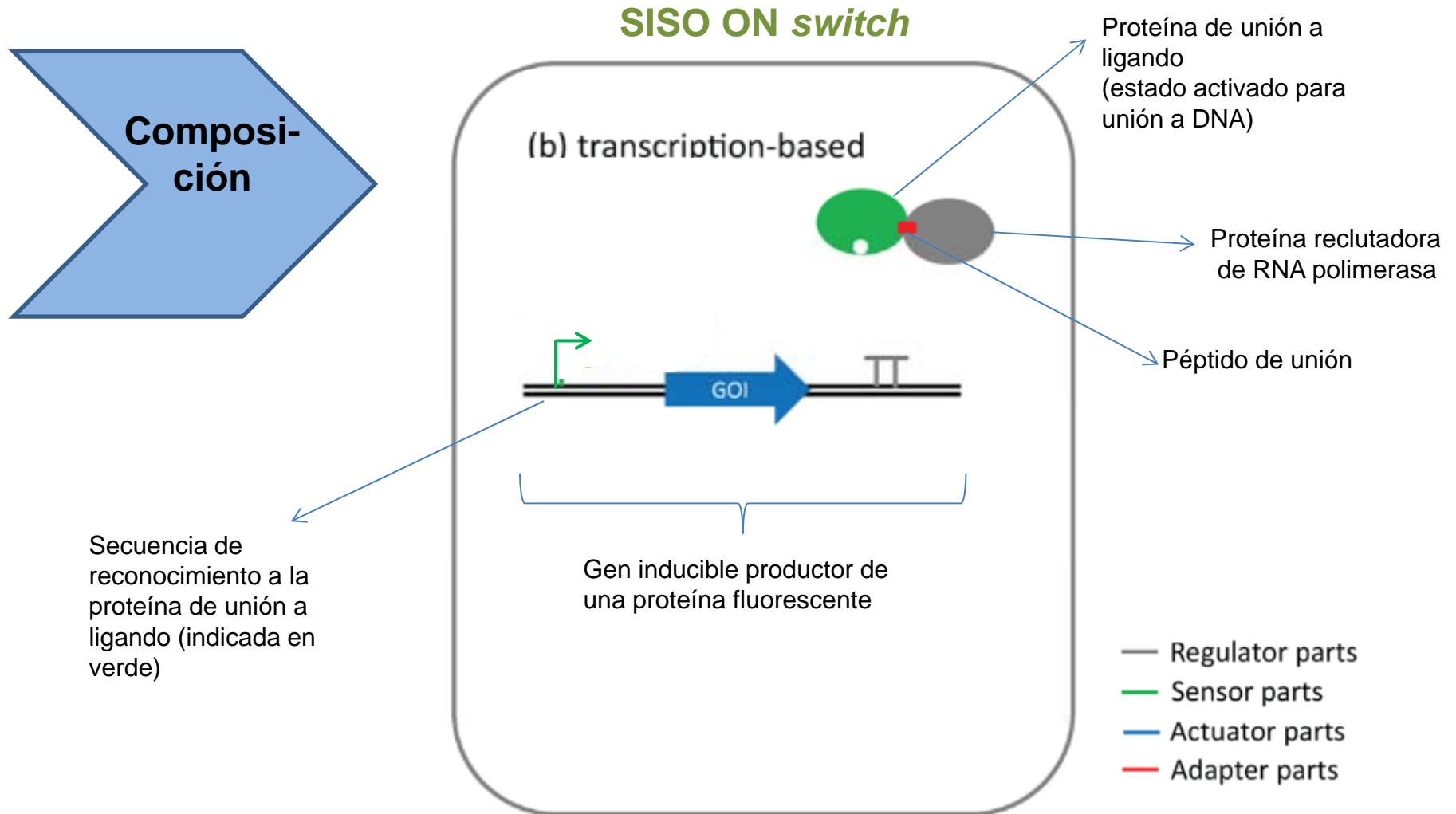


- La definición de la **composición** involucra **determinar** las *partes biológicas* y la *materia viva* dónde se implantará el dispositivo.
- Los **dispositivos más simples** son los **SISO** (*Single Input Single Output*) **ON switch**, que dan como **respuesta una señal fluorescente**.



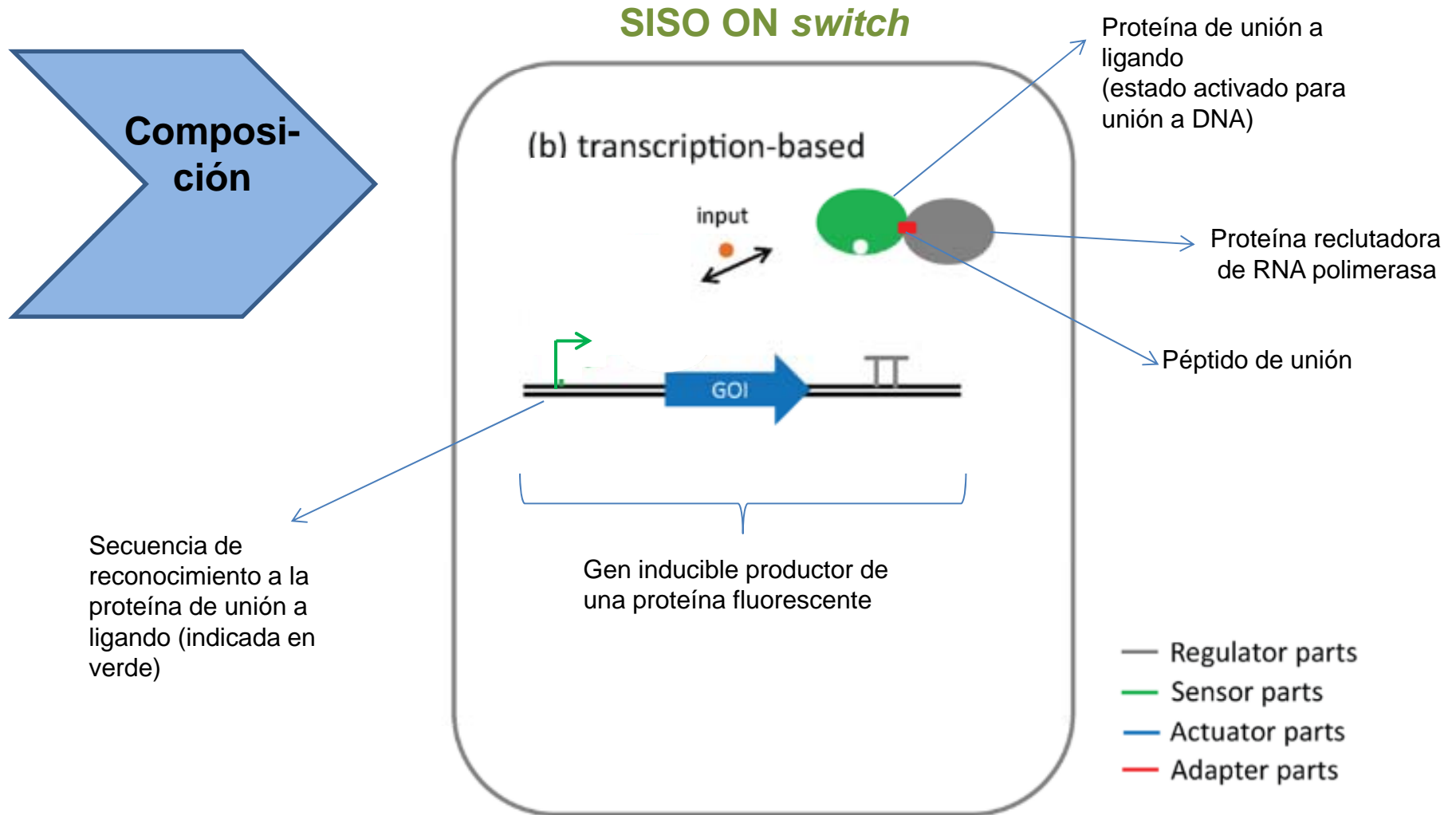
Biología sintética

Dispositivos



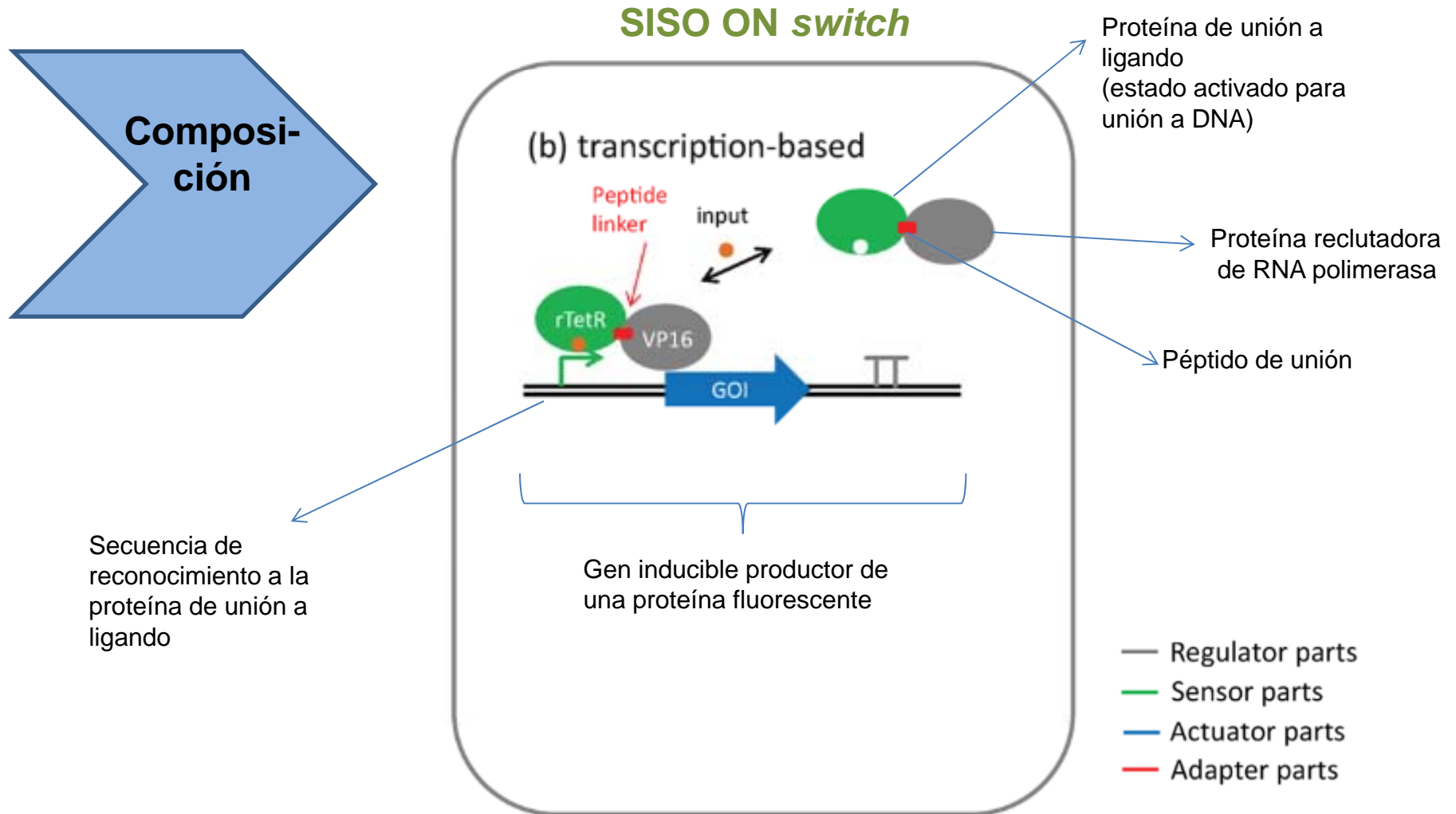
Biología sintética

Dispositivos



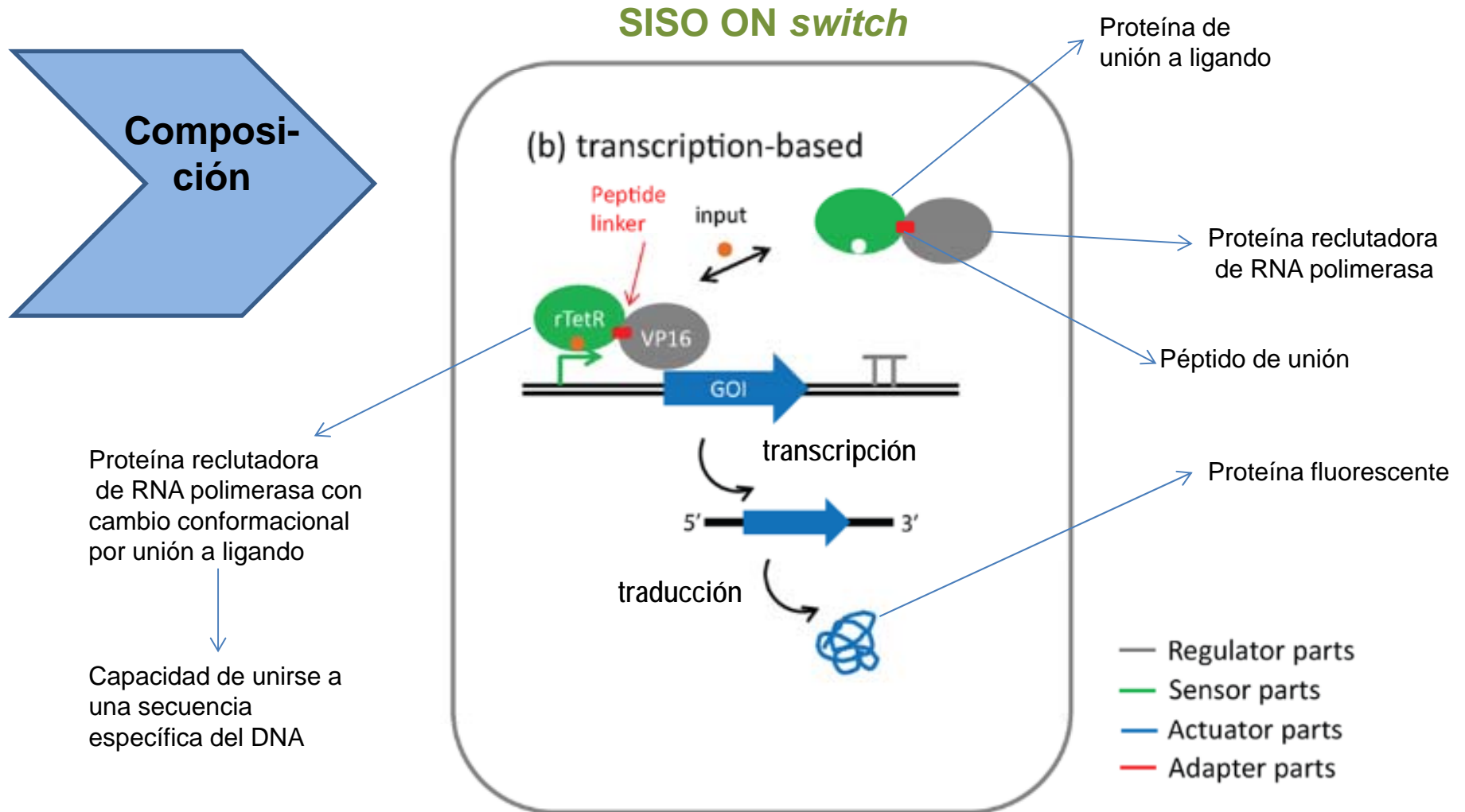
Biología sintética

Dispositivos



Biología sintética

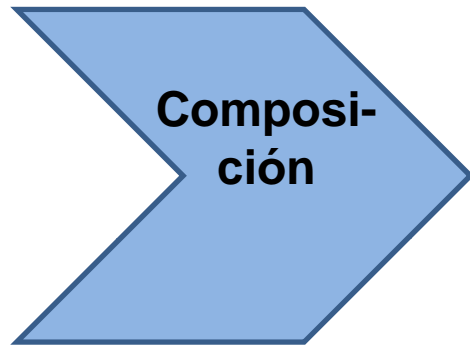
Dispositivos



Biología sintética

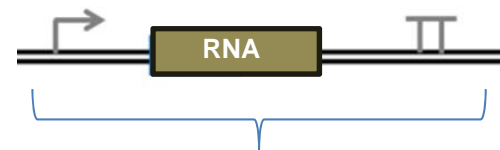
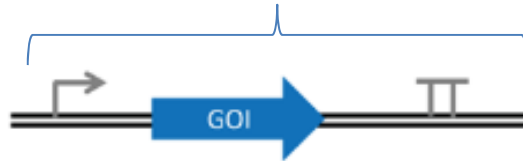
Dispositivos

SISO ON switch



(c) posttranscription-based

Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente



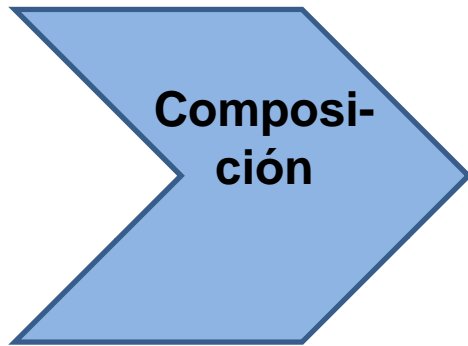
Gen constitutivo que expresa un RNA regulador

- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

Biología sintética

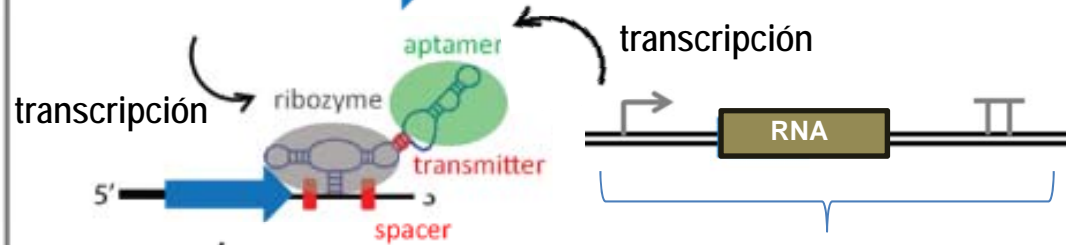
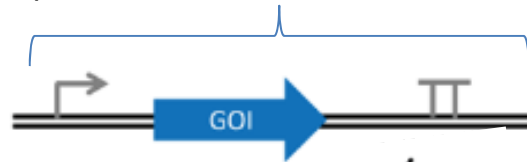
Dispositivos

SISO ON switch



(c) posttranscription-based

Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente



Gen constitutivo que expresa un RNA regulador

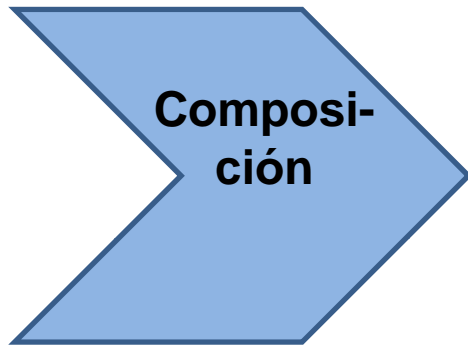
- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts



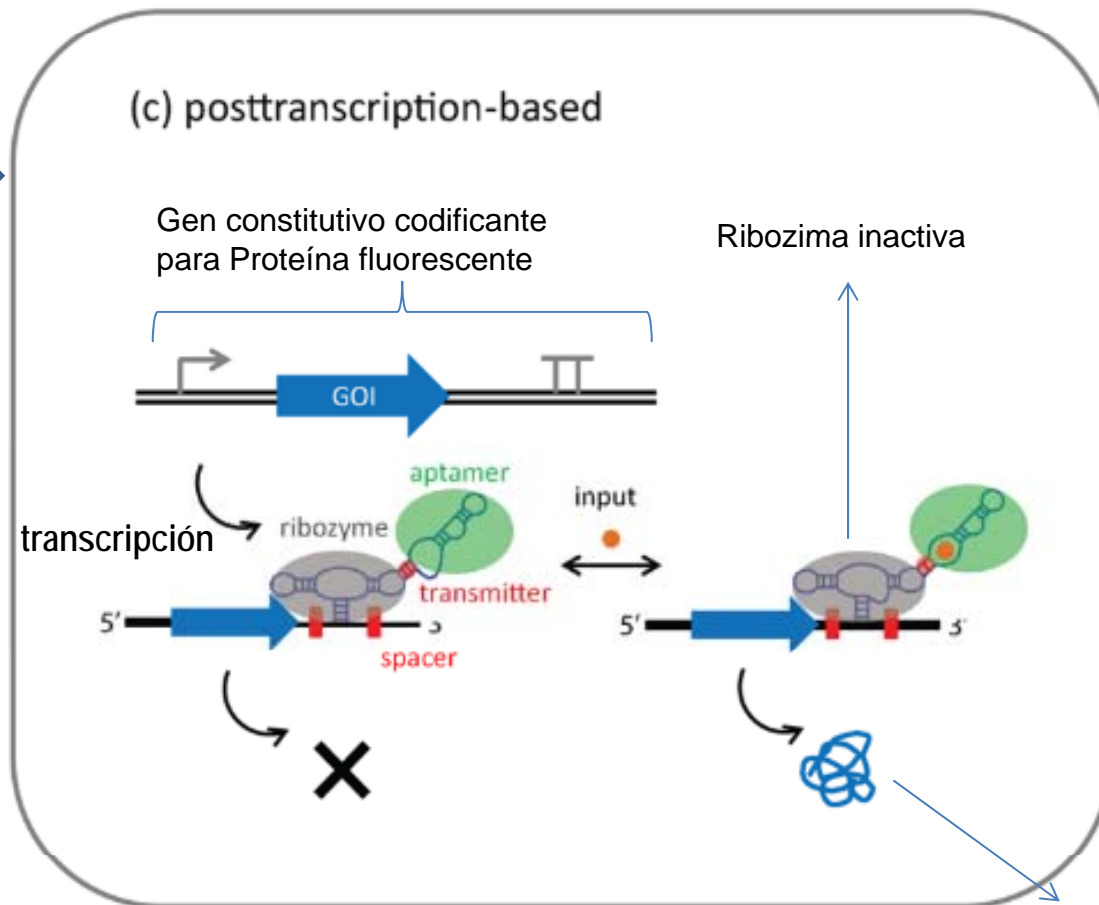
Biología sintética

Dispositivos

SISO ON switch



- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

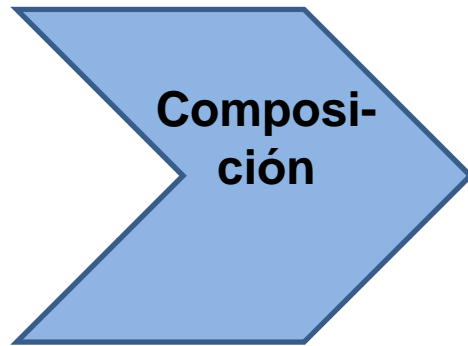


Proteína fluorescente

Biología sintética

Dispositivos

SISO ON switch



(d) posttranslation-based

Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente unida a un dominio de desestabilización (reconocimiento a maquinaria proteolítica)



Dominio de reconocimiento para maquinaria proteolítica (*estado alterable por unión a ligando*)

Dominio fluorescente

Péptido linker

- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

Biología sintética

Dispositivos

SISO ON switch

Composi-
ción

(d) posttranslation-based

Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente unida a un dominio de desestabilización (reconocimiento a maquinaria proteolítica)



transcripción



traducción

Región de unión a ligando

DD domain

Dominio fluorescente



Peptide linker

- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

Biología sintética

Dispositivos

SISO ON switch

Composi-
ción

(d) posttranslation-based

Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente unida a un dominio de desestabilización (reconocimiento a maquinaria proteolítica)



transcripción



traducción

proteólisis



Dominio fluorescente



Peptide linker

- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

Biología sintética

Dispositivos

SISO ON switch

Composi-
ción

(d) posttranslation-based

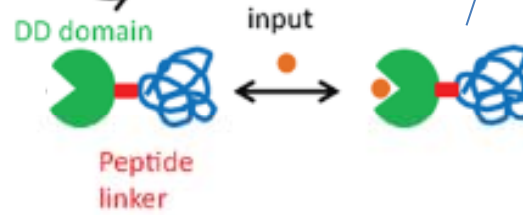
Gen constitutivo codificante para Proteína fluorescente unida a un dominio de desestabilización (reconocimiento a maquinaria proteolítica)



transcripción



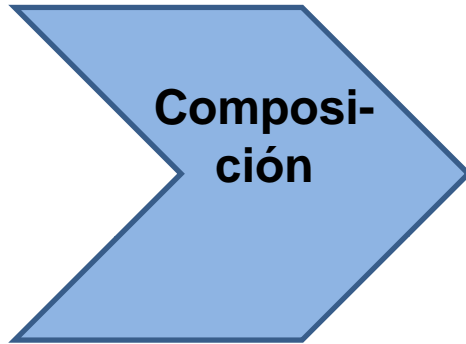
traducción



- Regulator parts
- Sensor parts
- Actuator parts
- Adapter parts

Biología sintética

Dispositivos



- Los **dispositivos** que están basados en **control transcripcional** presentan el mejor **rango dinámico**.
- En tanto, los **dispositivos** de **control postraduccional** son los de **respuesta más rápida**.
- Los **dispositivos** de **control postranscripcional** presentan propiedades dinámicas y temporales intermedias, pero **exhiben alta modularidad** en el diseño **y programabilidad**.

Biología sintética

Dispositivos



Evaluación

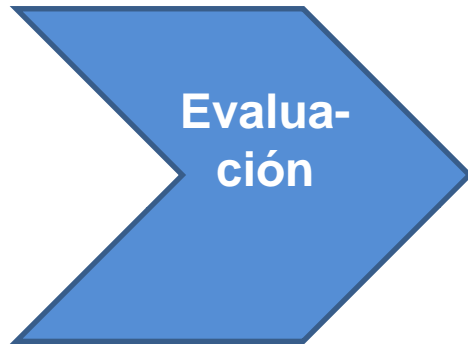
- Las **evaluaciones** del dispositivo **comprenden** las siguientes **dimensiones**:

- 1) *Performance*
- 2) *Ruido*
- 3) *Robustez evolutiva*
- 4) *Actividad cruzada*



Biología sintética

Dispositivos



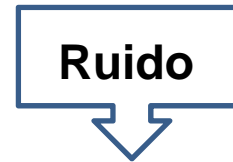
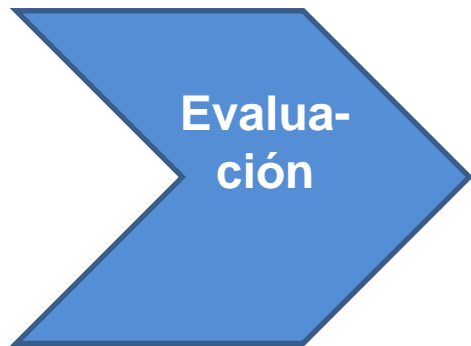
Incluye determinar:

- *la actividad basal del actuador,*
- *el rango dinámico de funcionamiento del sistema,*
- *la sensibilidad al input,*
- *y la respuesta temporal.*



Biología sintética

Dispositivos

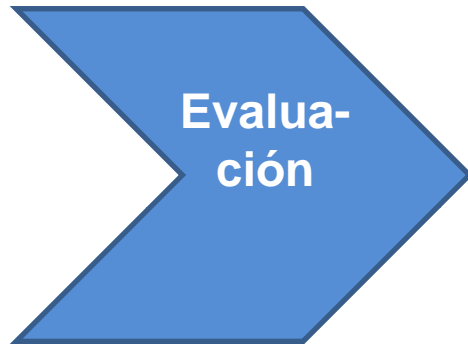


- El **ruido** es una **perturbación** del funcionamiento del **dispositivo**.
- Una de las **principales fuentes**, es la **variabilidad** en el **número de copias** de los **plásmidos**, siendo **mejor** establecer el **dispositivo en el genoma**.
- Otra fuente de ruido es la **desincronización celular**.
- Por ello, es importante **sumar dispositivos** de **comunicación célula-célula** para que toda la población actúe sincronizada.



Biología sintética

Dispositivos



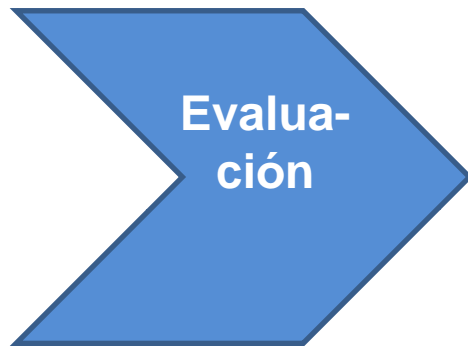
Robustez evolutiva

- El **dispositivo** diseñado se **introduce** en **materia viva**.
- Es posible que luego de **sucesivos ciclos de división celular** se **acumulen mutaciones** que **afecten la actividad del dispositivo**.
- **Para evitar** esto, conviene **asociar** la carga genética del dispositivo a una **presión de selección** que siempre debe estar presente.



Biología sintética

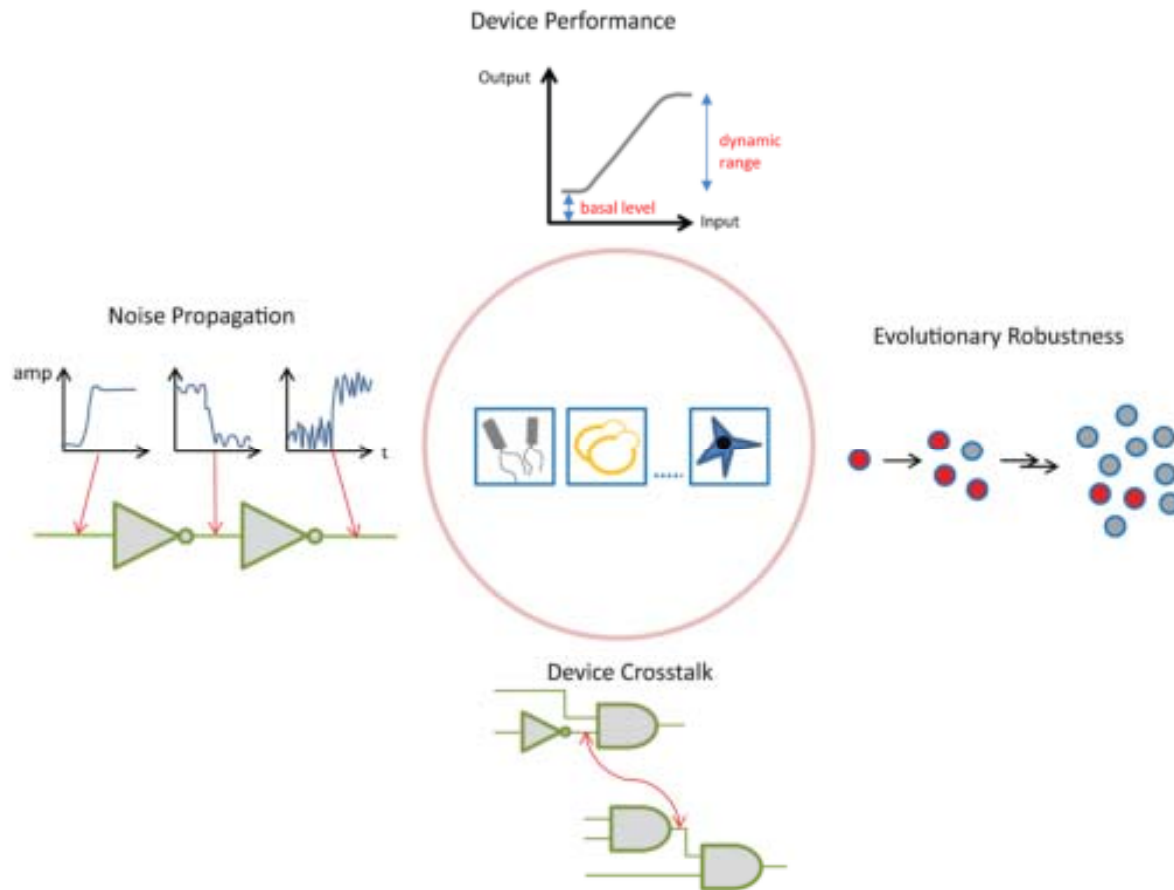
Dispositivos



- La **actividad cruzada** puede entenderse como la **obtención de *Outputs*** por **acción de otras vías celulares** no contempladas.
- **También**, la actividad cruzada puede ser un **proceso no deseado de dispositivos MIMO** (*Multiple Inputs Multiple Outputs*).
- Por estos motivos, las **partes biológicas** involucradas en un dispositivo biológico **deberían ser sólo funcionales entre sí**.

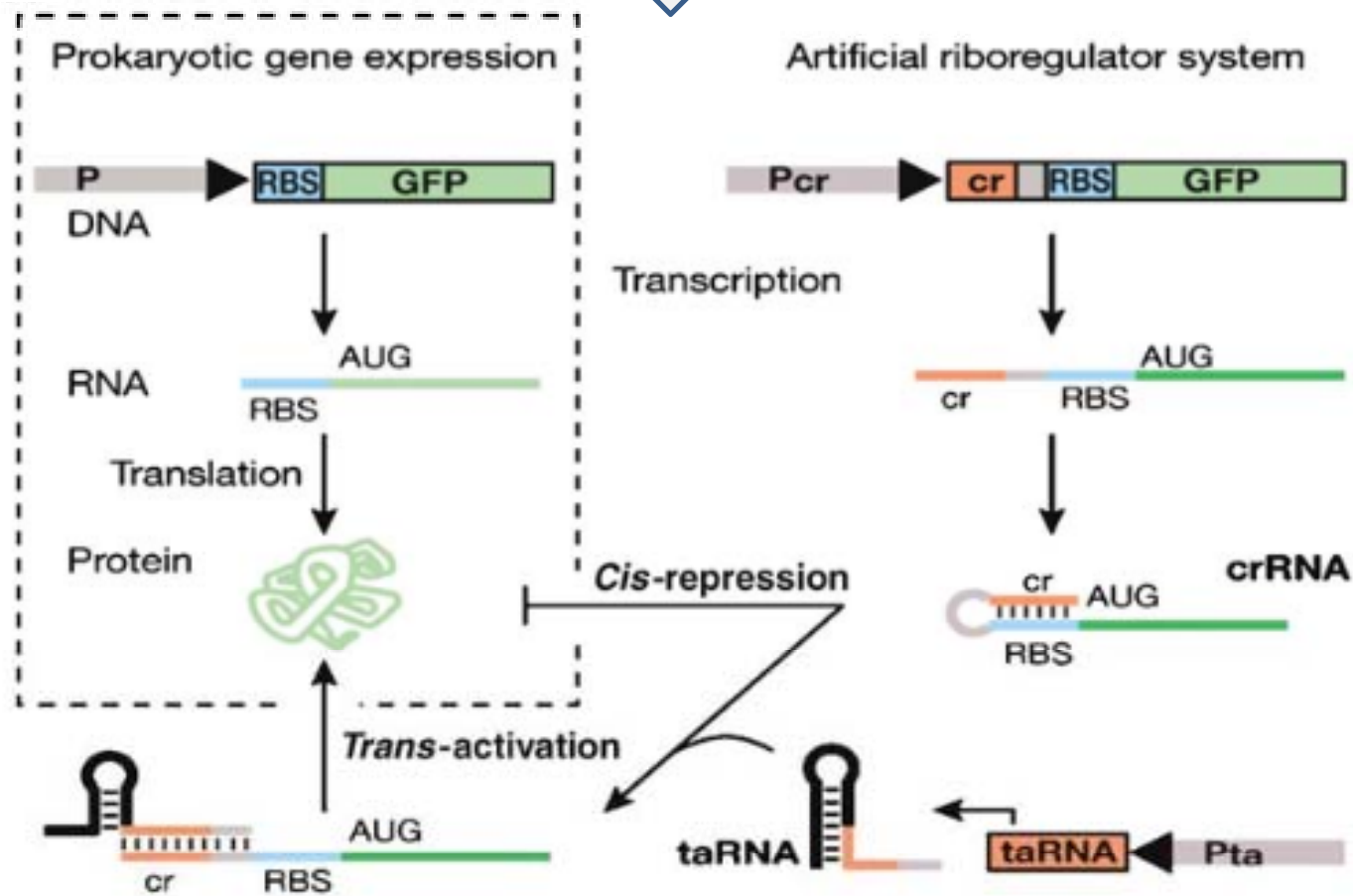
Biología sintética

Dispositivos

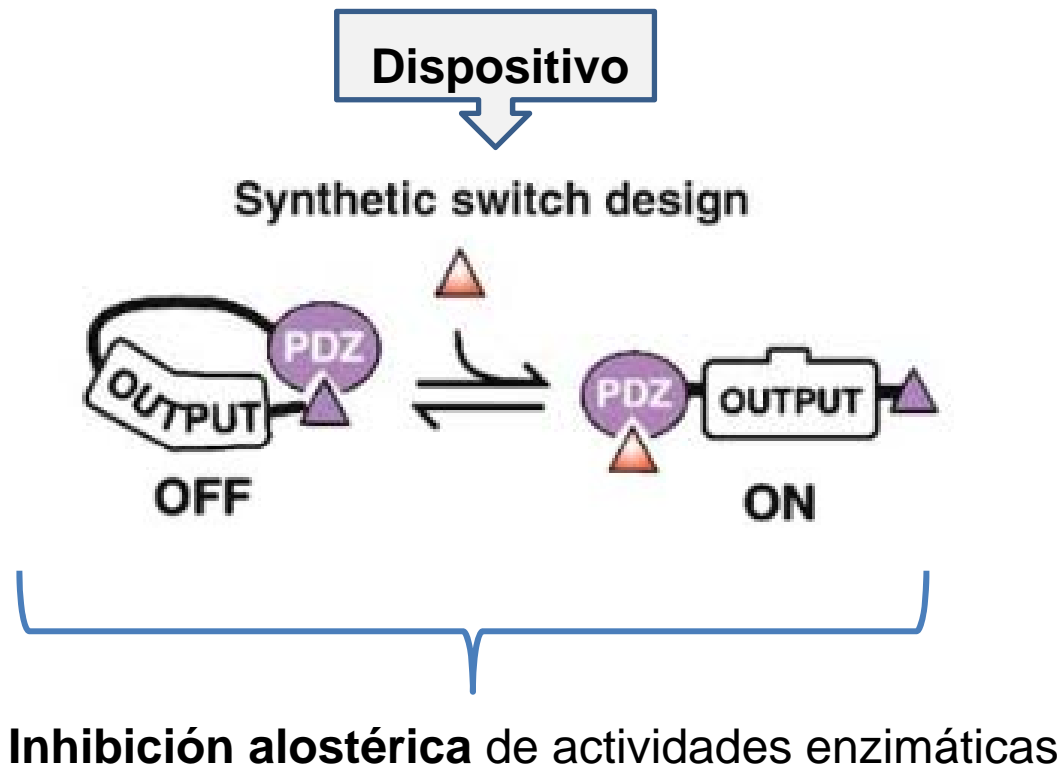


Biología sintética

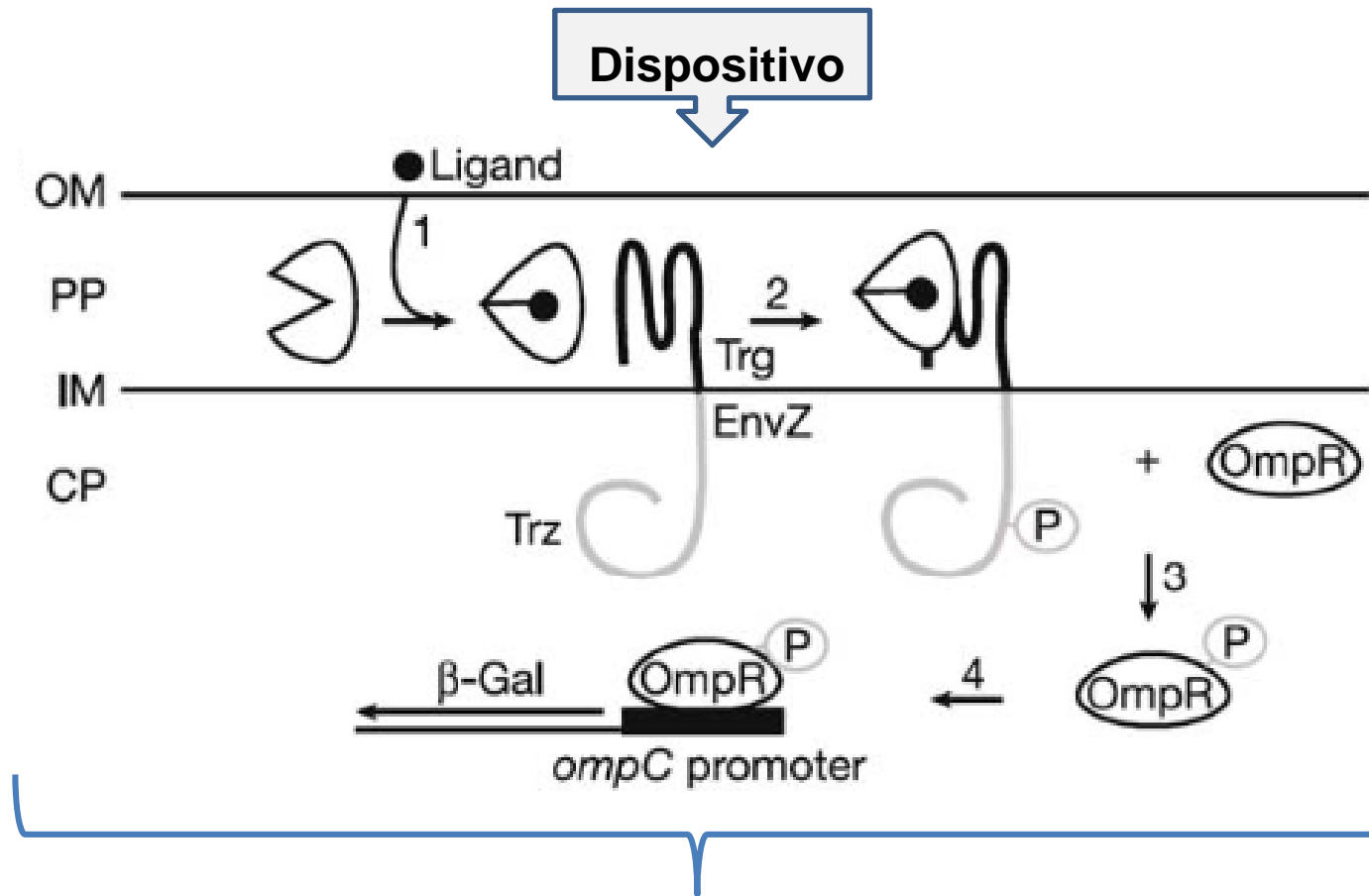
Dispositivo



Biología sintética



Biología sintética



Sistema de dos componentes para sensor moléculas

***¿Cuáles son los componentes
estructurales que definen a la
biología sintética?***

SISTEMA

Biología sintética

Sistemas

- El **conjunto de dispositivos** con **funciones interconectadas** que ejecuta tareas complejas con fines útiles se **denominan *sistemas* o *módulos***.
- Estos son **sistemas biológicos de diseño** que **comprenden vías metabólicas y/o de transducción de señales** para ejecutar funciones útiles.
- Para ello, es **necesario conocer cómo la función de un módulo** puede ser **derivada** de la **función** de sus **dispositivos componentes**.
- Este **conocimiento** permite **inferir “*reglas de composición*”** de **dispositivos** para conformar módulos.

Biología sintética

Sistemas

Clasificación general de *sistemas biológicos sintéticos*

- *Sistemas sintetizadores (synthesizer)*
- *Sistemas sensores (sensor)*
- *Sistemas buscadores (seeker)*
- *Sistemas bateadores (striker)*

Biología sintética

Sistemas sintetizadores

Clasificación general de *sistemas biológicos sintéticos*

- ***Sistemas sintetizadores***
- *Sistemas sensores*
- *Sistemas buscadores*
- *Sistemas striker*

Biología sintética

Sistemas sintetizadores

- Los **sistemas sintetizadores** son **módulos** construidos para **producir** una **molécula de interés** utilizando un organismo apropiado.
- La **diferencia** con la **biotecnología** es que el **organismo se modifica** de modo tal de **mejorar la robustez y producción** de la **biomolécula**, **alterando flujos metabólicos** en pos de tal objetivo.

Ejemplos

Producción de licopeno en Escherichia coli en respuesta a acetil fosfato.

Producción de glucagón secretado en células HEK293 por estímulo a la luz.

Producción de urato oxidasa en respuesta a exceso de ácido úrico.

Biología sintética

Sistemas sintetizadores

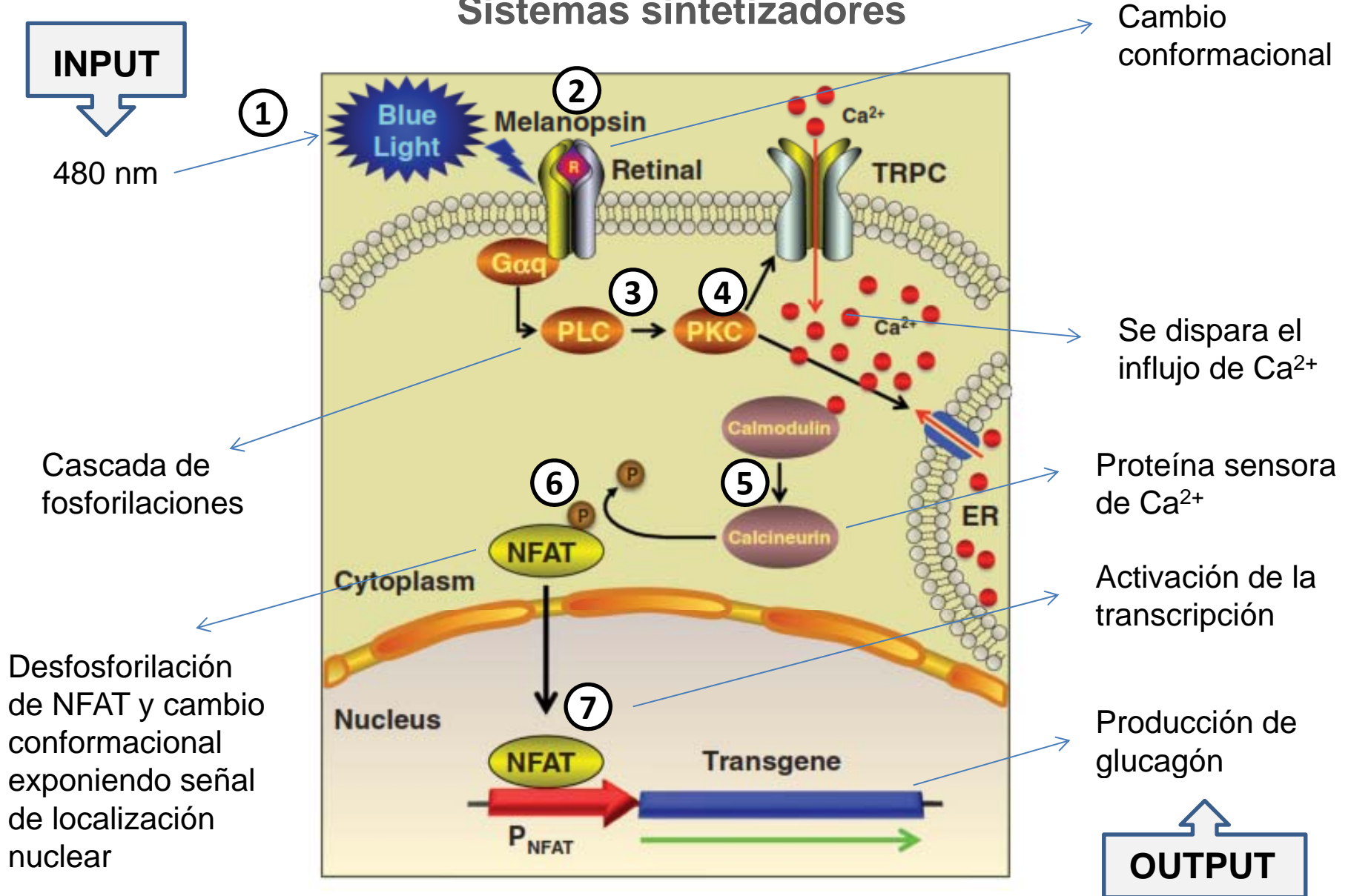
A Synthetic Optogenetic Transcription Device Enhances Blood-Glucose Homeostasis in Mice

Haifeng Ye,¹ Marie Daoud-El Baba,² Ren-Wang Peng,¹ Martin Fussenegger^{1,3*}

Synthetic biology has advanced the design of genetic devices that can be used to reprogram metabolic activities in mammalian cells. By functionally linking the signal transduction of melanopsin to the control circuit of the nuclear factor of activated T cells, we have designed a synthetic signaling cascade enabling light-inducible transgene expression in different cell lines grown in culture or bioreactors or implanted into mice. In animals harboring intraperitoneal hollow-fiber or subcutaneous implants containing light-inducible transgenic cells, the serum levels of the human glycoprotein secreted alkaline phosphatase could be remote-controlled with fiber optics or transdermally regulated through direct illumination. Light-controlled expression of the glucagon-like peptide 1 was able to attenuate glycemic excursions in type II diabetic mice. Synthetic light-pulse–transcription converters may have applications in therapeutics and protein expression technology.

Biología sintética

Sistemas sintetizadores



Biología sintética

Sistemas sensores

Clasificación general de *sistemas biológicos sintéticos*

- *Sistemas sintetizadores*
- **Sistemas sensores**
- *Sistemas buscadores*
- *Sistemas striker*

Biología sintética

Sistemas sensores

- Los **sistemas sensores** son **módulos** construidos para **procesar información** y **transformarla** en **lecturas de salida** genéticamente codificadas.
- Los **dispositivos** que **detectan** el **estímulo** puede ser muy **complejos** para **filtrar señales erróneas**, y los **dispositivos de salida** pueden ser **programados** para **exhibir diferentes** modos de **lectura** (*lineales, de frecuencia, de tipo umbral*).
- Los **sensores lineales** son aquellos donde la **intensidad** del **output** es **proporcional** al **input**.
- Los **sensores de frecuencia** son aquellos donde la **señal output** **oscila** en **función** del **input**.
- Los **sensores de tipo umbral** son aquellos que dan una **respuesta** del tipo **Sí/No** cuando el **input** **alcanza un nivel determinado**.

Biología sintética

Sistemas sensores

Sensor de frecuencia:

ARTICLE

doi:10.1038/nature10722

A sensing array of radically coupled genetic 'biopixels'

Arthur Prindle^{1*}, Phillip Samayoa^{2*}, Ivan Razinkov¹, Tal Danino¹, Lev S. Tsimring³ & Jeff Hasty^{1,2,3,4}

Although there has been considerable progress in the development of engineering principles for synthetic biology, a substantial challenge is the construction of robust circuits in a noisy cellular environment. Such an environment leads to considerable intercellular variability in circuit behaviour, which can hinder functionality at the colony level. Here we engineer the synchronization of thousands of oscillating colony 'biopixels' over centimetre-length scales through the use of synergistic intercellular coupling involving quorum sensing within a colony and gas-phase redox signalling between colonies. We use this platform to construct a liquid crystal display (LCD)-like macroscopic clock that can be used to sense arsenic via modulation of the oscillatory period. Given the repertoire of sensing capabilities of bacteria such as *Escherichia coli*, the ability to coordinate their behaviour over large length scales sets the stage for the construction of low cost genetic biosensors that are capable of detecting heavy metals and pathogens in the field.

Nature. ; 481(7379): 39–44. doi:10.1038/nature10722. (2011)

Biología sintética

Sistemas sensores

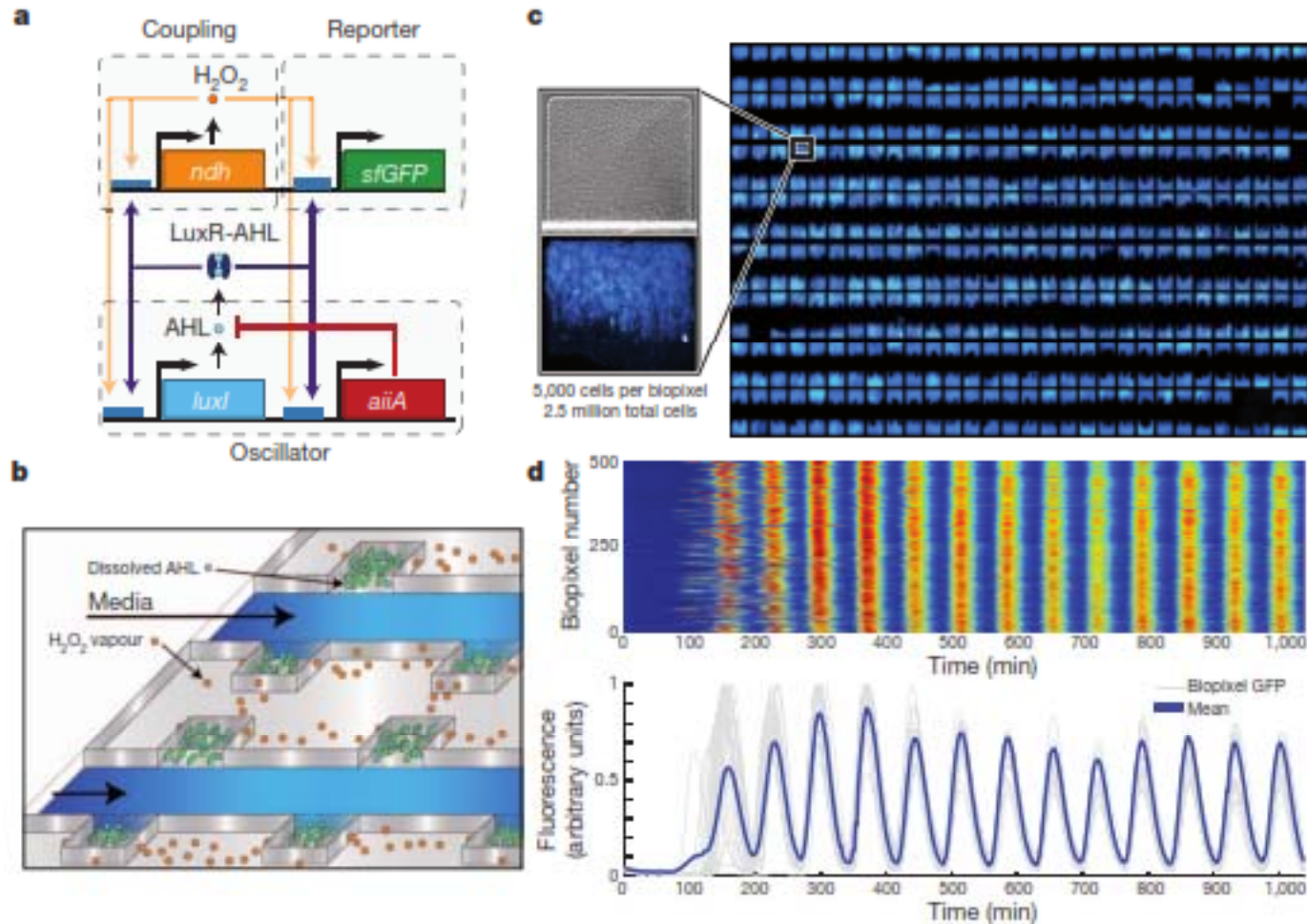
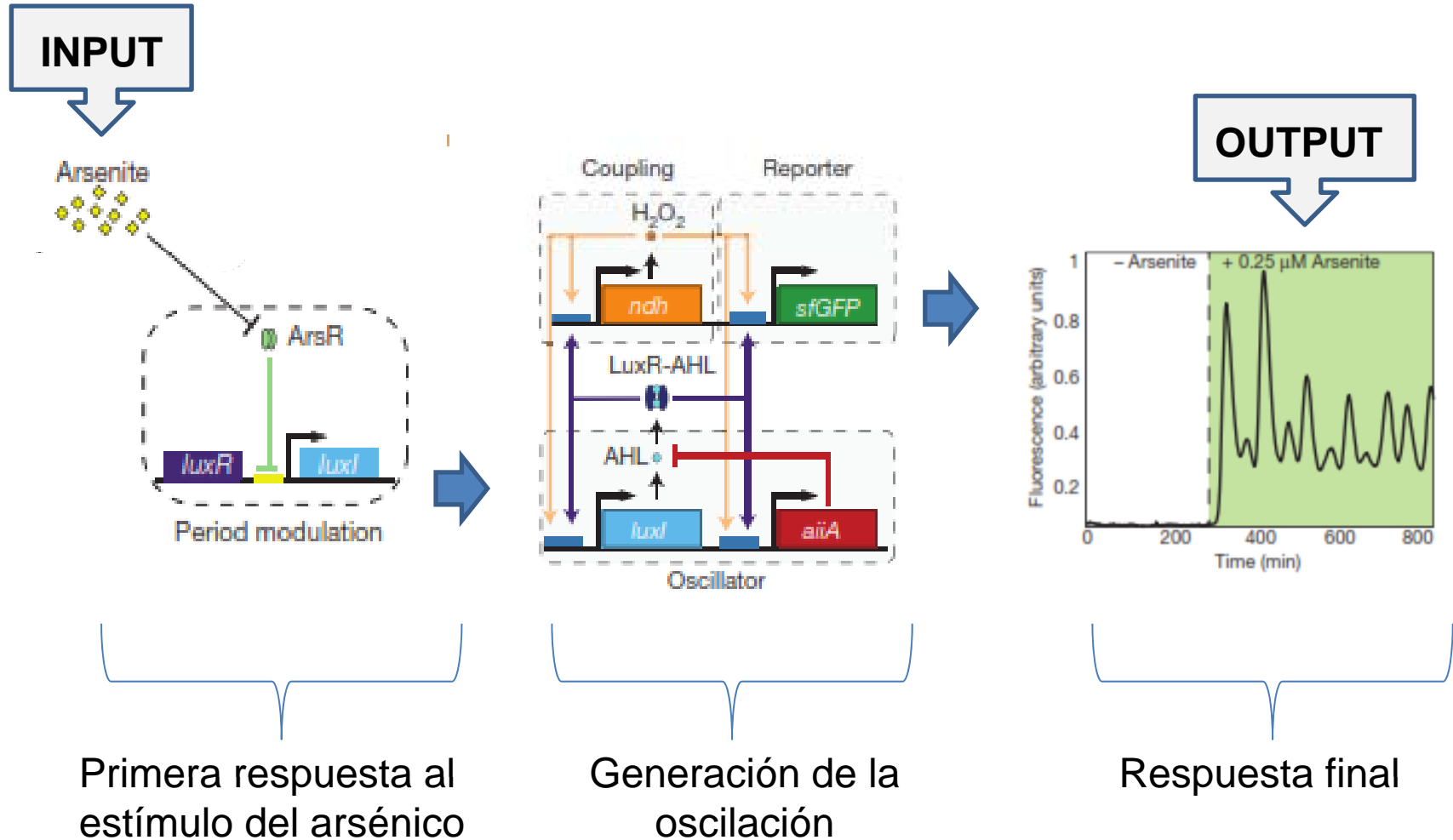


Figure 1 | Sensing array of radically coupled genetic biopixels. **a**, Network diagram. The *luxI* promoter drives expression of *luxI*, *ahhA*, *ndh* and *sfGFP* (superfolder variant of GFP) in four identical transcription modules. The quorum-sensing genes *luxI* and *ahhA* generate synchronized oscillations within a colony via AHL. The *ndh* gene codes for NDH-2, an enzyme that generates H_2O_2 vapour, which is an additional activator of the *luxI* promoter. H_2O_2 is capable of migrating between colonies and synchronizing them. **b**, Conceptual

design of the sensing array. AHL diffuses within colonies while H_2O_2 migrates between adjacent colonies through the PDMS. Arsenite-containing media is passed in through the parallel feeding channels. **c**, Fluorescent image of an array of 500 *E. coli* biopixels containing about 2.5 million cells. Inset, bright-field and fluorescent images display a biopixel of 5,000 cells. **d**, Heat map and trajectories depicting time-lapse output of 500 individual biopixels undergoing rapid synchronization. Sampling time is 2 min.

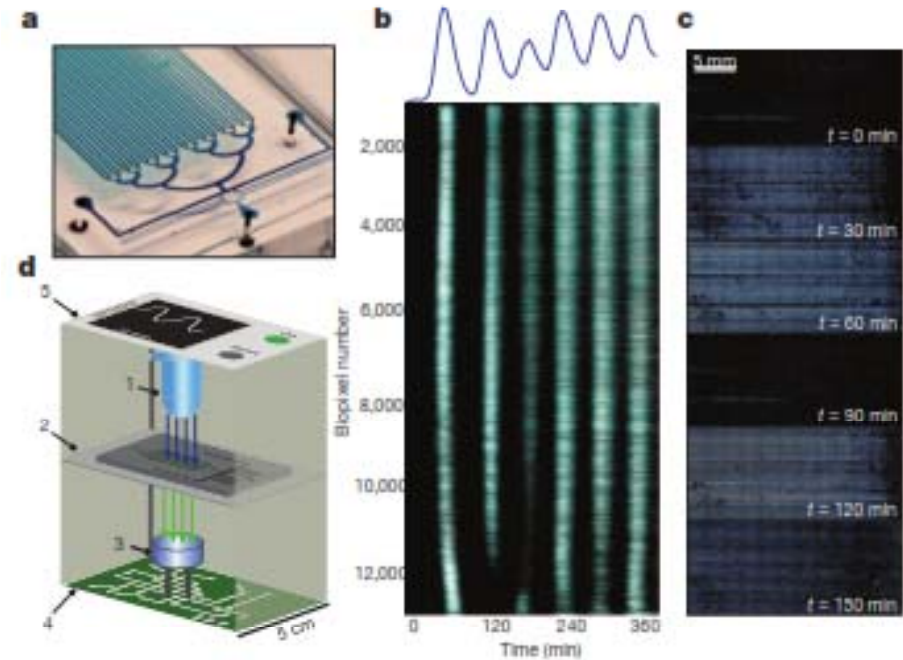
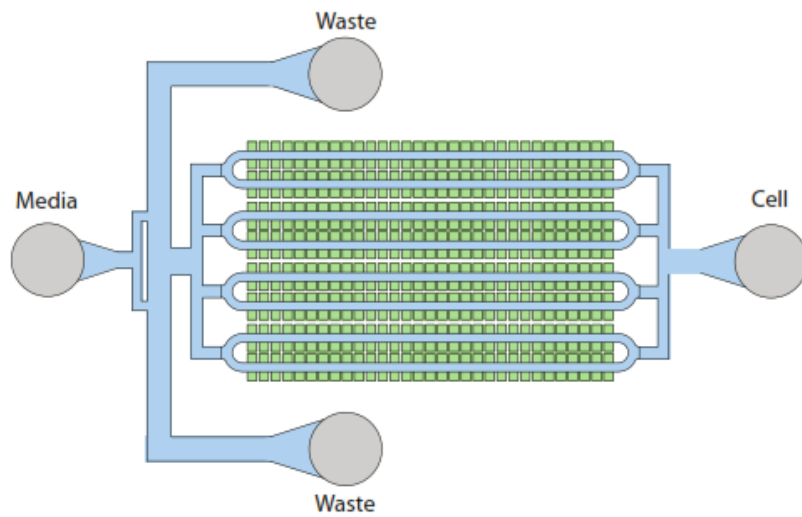
Biología sintética

Sistemas sensores



Biología sintética

Sistemas sensores



Diseño del biochip

Biología sintética

Sistemas sensores

Sensor de tipo umbral:

A Synthetic Genetic Edge Detection Program

Jeffrey J. Tabor¹, Howard Sallis¹, Zachary B. Simpson², Aaron A. Chevallier², Anselm Levskaya¹, Edward M. Marcotte^{2,3}, Christopher A. Voigt^{1,*}, and Andrew D. Ellington^{2,3}

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA, 94158

² Center for Systems and Synthetic Biology and Institute for Cell and Molecular Biology, University of Texas, Austin, TX, USA, 78712

³ Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas, Austin, TX, USA, 78712

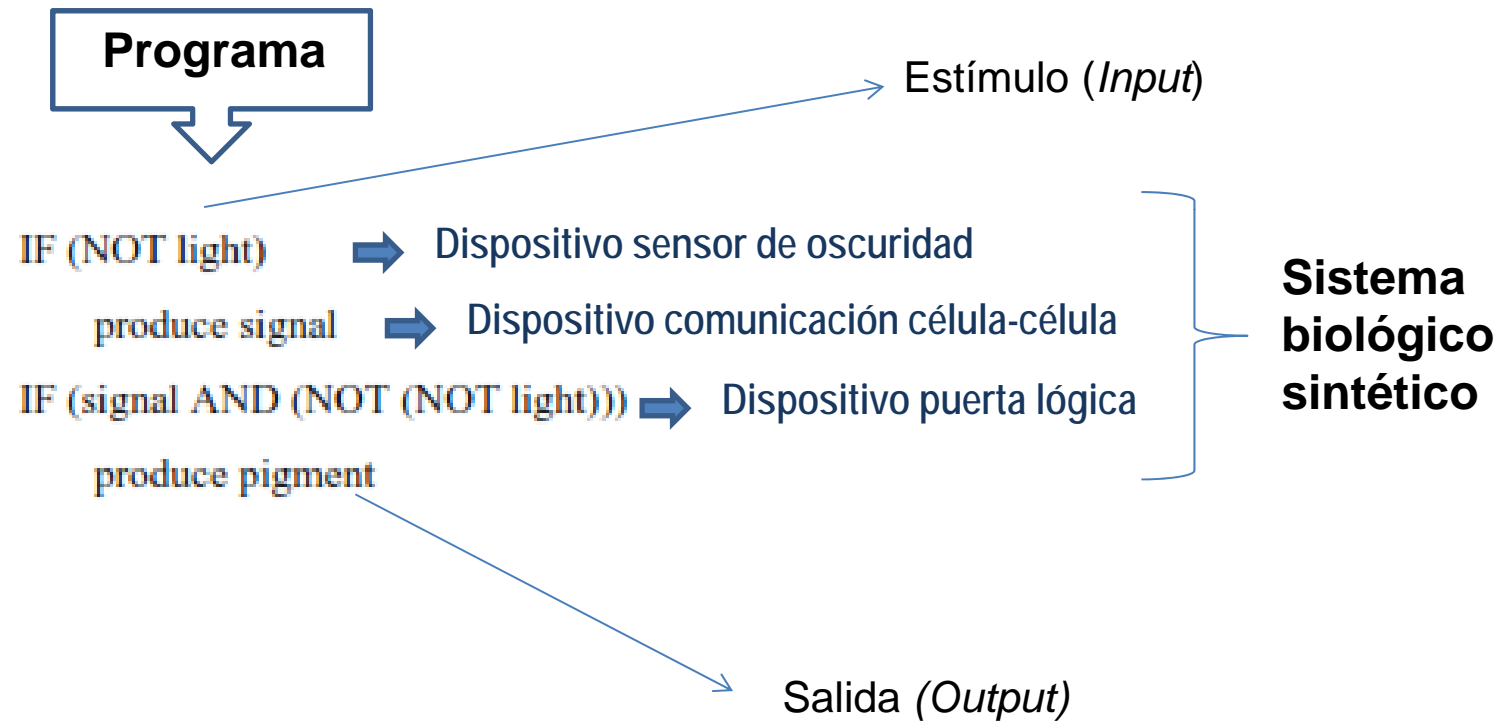
Summary

Edge detection is a signal processing algorithm common in artificial intelligence and image recognition programs. We have constructed a genetically encoded edge detection algorithm that programs an isogenic community of *E.coli* to sense an image of light, communicate to identify the light-dark edges, and visually present the result of the computation. The algorithm is implemented using multiple genetic circuits. An engineered light sensor enables cells to distinguish between light and dark regions. In the dark, cells produce a diffusible chemical signal that diffuses into light regions. Genetic logic gates are used so that only cells that sense light and the diffusible signal produce a positive output. A mathematical model constructed from first principles and parameterized with experimental measurements of the component circuits predicts the performance of the complete program. Quantitatively accurate models will facilitate the engineering of more complex biological behaviors and inform bottom-up studies of natural genetic regulatory networks.

Cell. 2009 June 26; 137(7): 1272–1281. doi:10.1016/j.cell.2009.04.048.

Biología sintética

Sistemas sensores

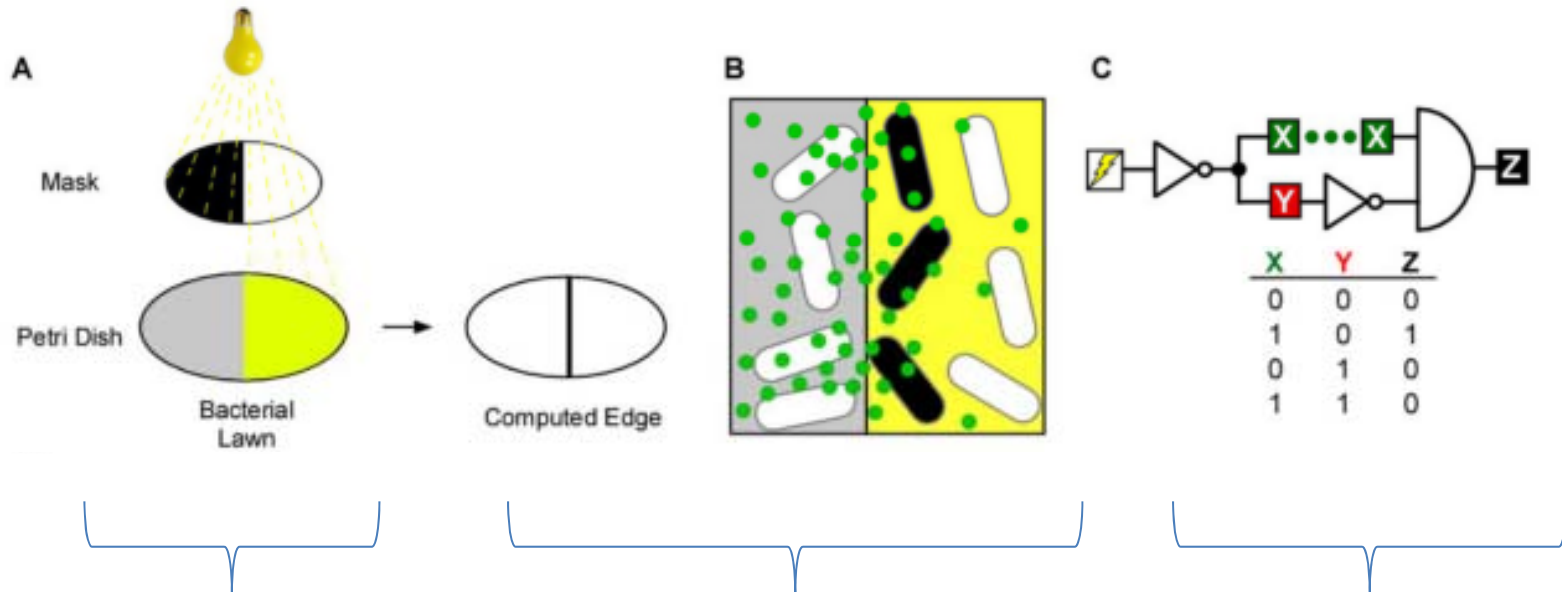


Hospedador: *Escherichia coli* creciendo en medio sólido.

Función: Generar bacterias pigmentadas cuando se encuentran en el límite entre una zona iluminada y otra oscura.

Biología sintética

Sistemas sensores



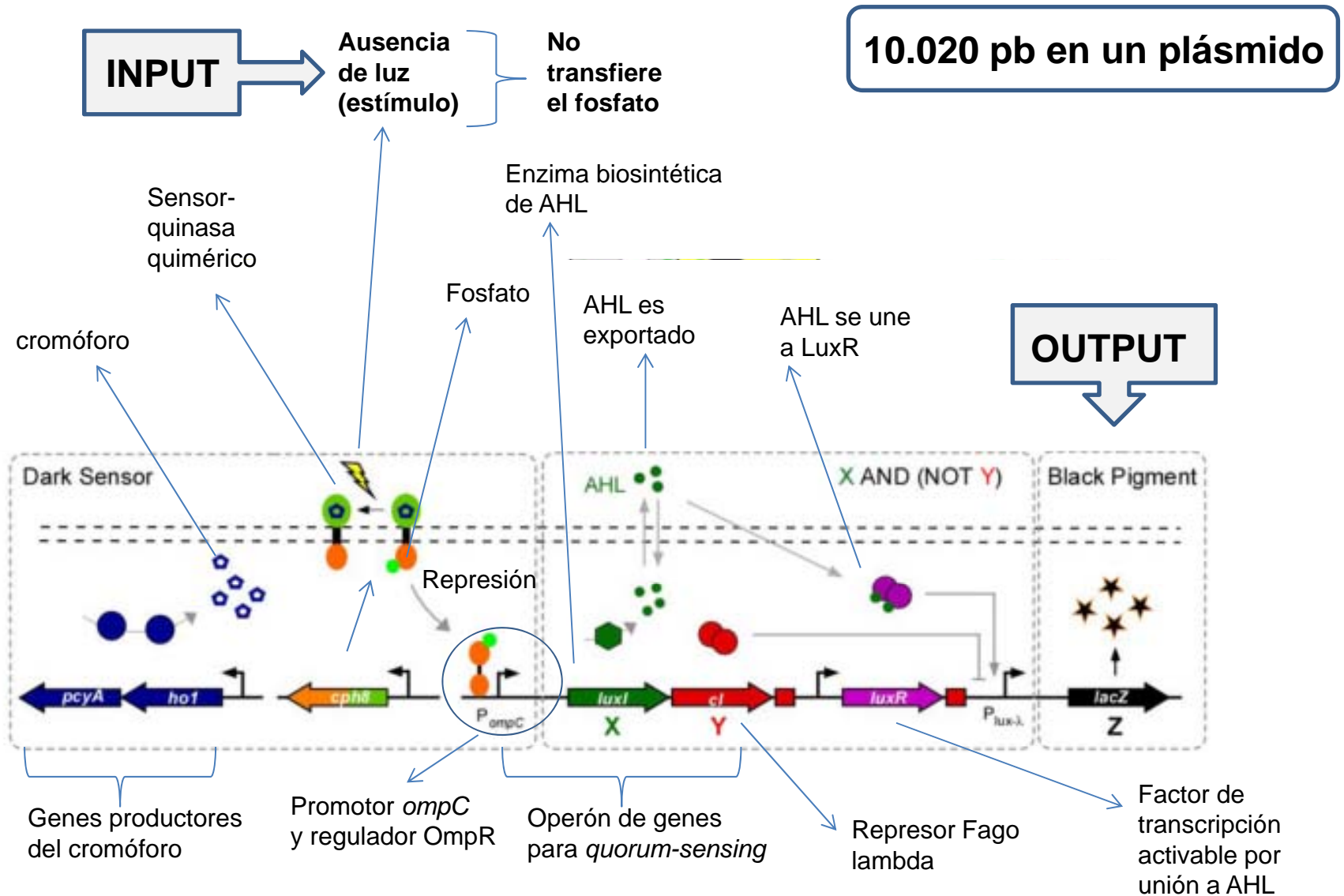
El césped de bacterias es iluminado de manera enmascarada

La respuesta es la pigmentación de las bacterias que se encuentran en el borde entre la luz y la oscuridad

Representación del sistema biológico desarrollado

Biología sintética

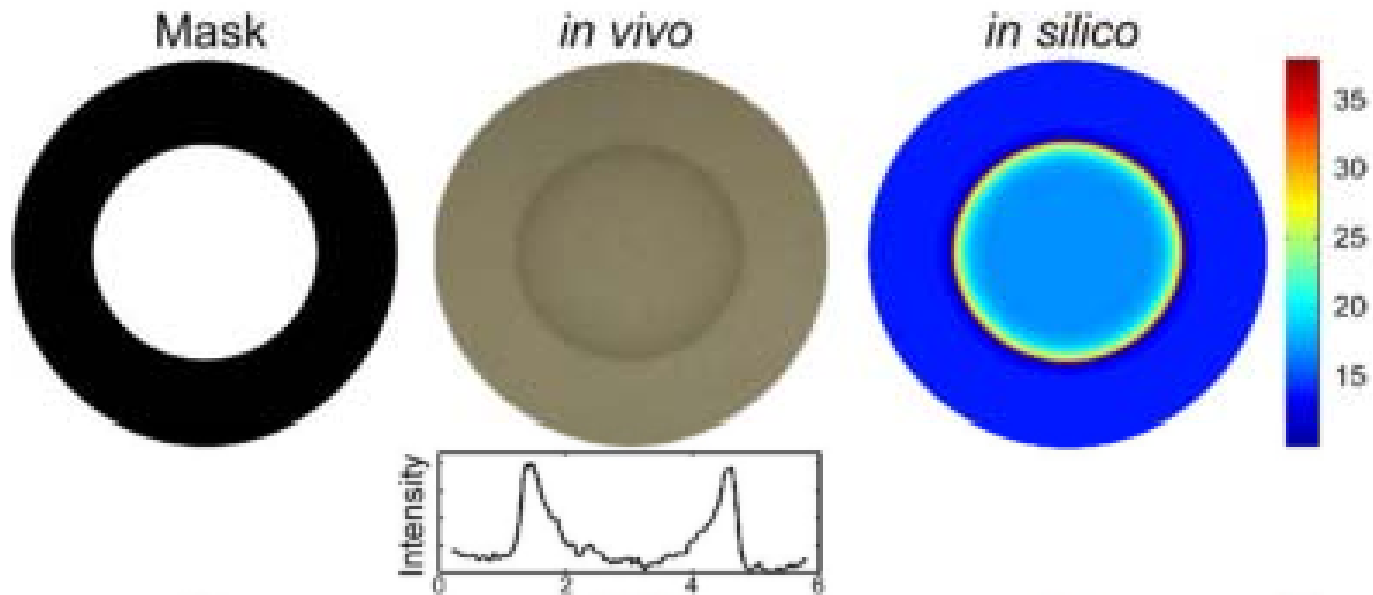
Sistemas sensores



Biología sintética

Sistemas sensores

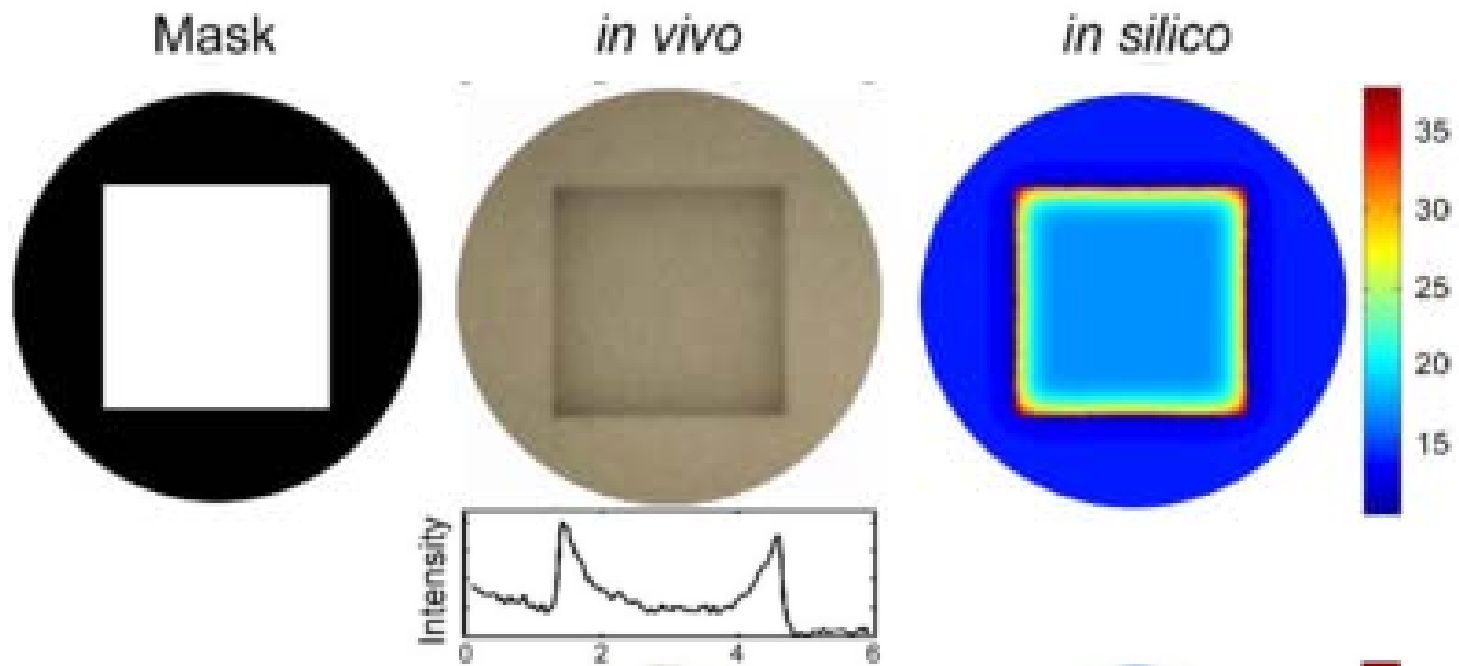
- Ejemplos de cómo funciona el sistema...



Biología sintética

Sistemas sensores

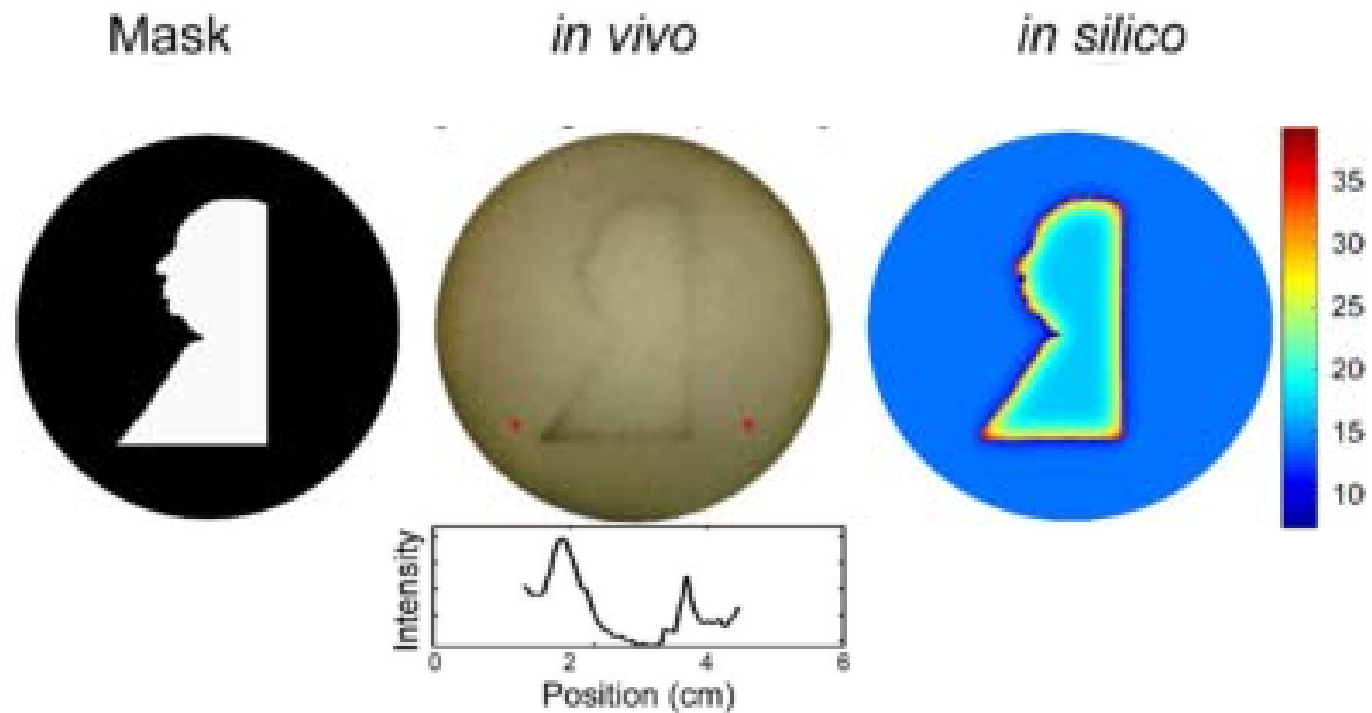
- Ejemplos de cómo funciona el sistema...



Biología sintética

Sistemas sensores

- Ejemplos de cómo funciona el sistema...



Biología sintética

Sistemas sensores

- Otros sistemas similares, pero de pintado de áreas...



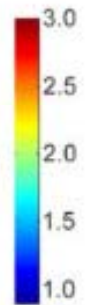
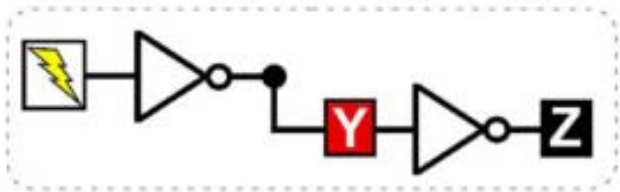
Biología sintética

Sistemas sensores

- Otros sistemas similares, pero de pintado de áreas...

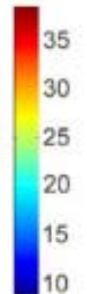
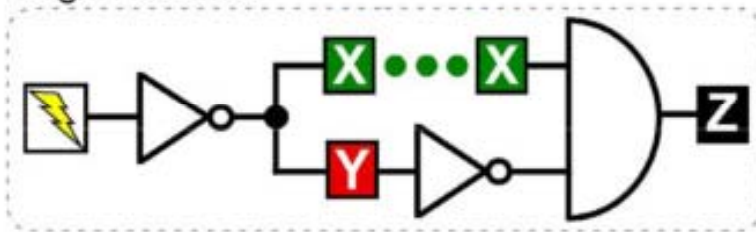
C

Inverter



D

Edge Detector



Biología sintética

Sistemas buscadores

Clasificación general de *sistemas biológicos sintéticos*

- *Sistemas sintetizadores*
- *Sistemas sensores*
- ***Sistemas buscadores***
- *Sistemas striker*

Biología sintética

Sistemas buscadores

- Los *sistemas buscadores* son **módulos** construidos para **funcionar** en **determinados ambientes dando** una **respuesta definida**, que por ejemplo, consiste en el procesamiento de una molécula presente en el entorno.
- De este modo, los **sistemas buscadores** pueden ser **utilizados** para **eliminar un tóxico ambiental**.
- Por otro lado, los **sistemas buscadores más complejos** también presentan la **cualidad de moverse hacia el estímulo** particular (por ejemplo, una sustancia que se desea eliminar) y allí luego son **capaces de ejecutar su procesamiento** (por ejemplo, la degradación).

Biología sintética

Sistemas buscadores

Published in final edited form as:

Nat Chem Biol. 2010 June ; 6(6): 464–470. doi:10.1038/nchembio.369.

Reprogramming Bacteria to Seek and Destroy a Herbicide

Joy Sinha, Samuel J. Reyes, and Justin P. Gallivan*

Department of Chemistry and Center for Fundamental and Applied Molecular Evolution, Emory University, 1515 Dickey Drive, Atlanta, GA 30322

Abstract

A major goal of synthetic biology is to reprogram cells to perform complex tasks. Here we show how a combination of in vitro and in vivo selection rapidly identifies a synthetic riboswitch that activates protein translation in response to the herbicide atrazine. We further demonstrate that this riboswitch can reprogram bacteria to migrate in the presence of atrazine. Finally, we show that incorporating a gene from an atrazine catabolic pathway allows these cells to seek and destroy atrazine.

Biología sintética

Sistemas buscadores

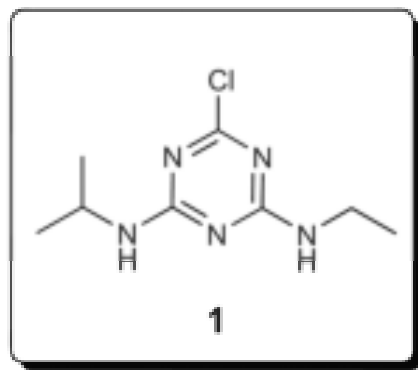
Hospedador: *Escherichia coli* creciendo en medio semi-sólido.

Función: Bacterias que se movilizan hacia un ambiente con atrazina y catalicen su degradación a moléculas no-tóxicas.

- En **primer lugar** este grupo de investigación seleccionó **aptámeros específicos para el herbicida atrazina**.
- **Luego asociaron** los **aptámeros** al **sistema** que controla la **quimiotaxis** de *Escherichia coli*.
- Por **último**, seleccionaron una **enzima** que **degrada** a la **atrazina** y generaron un gen que la codifique en *Escherichia coli*.

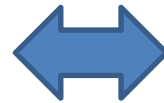
Biología sintética

Sistemas buscadores



Atrazina

Compuesto ambiental
de alta toxicidad



Aptámeros

Generación de
moléculas de RNA de
unión específica para
el compuesto
ambiental



Gen quimiotaxis

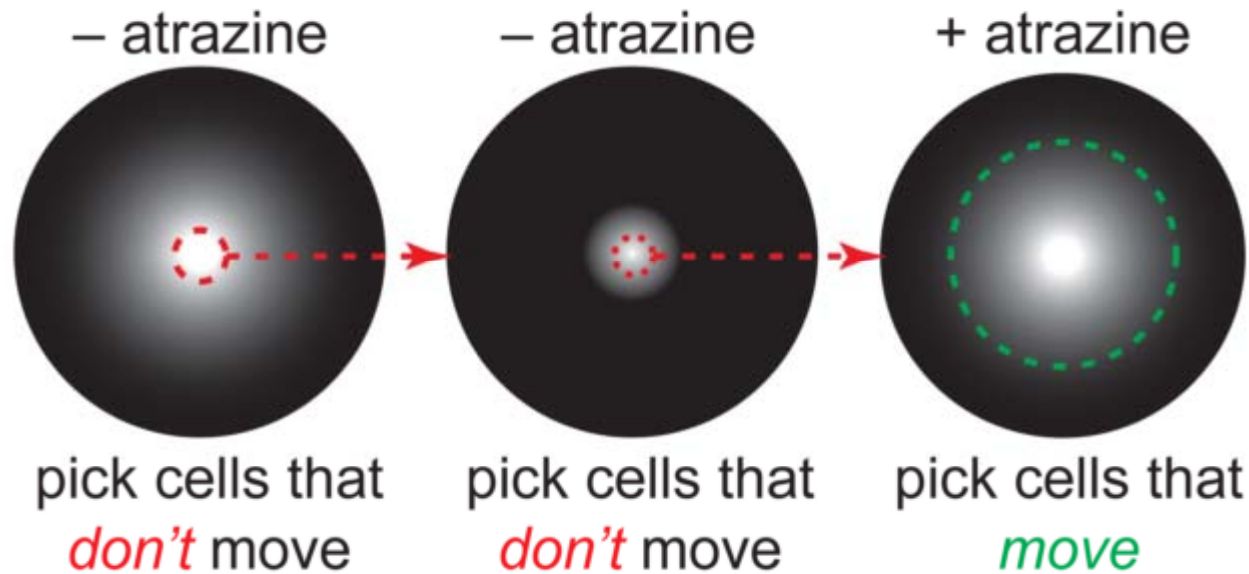
Fusión de la
secuencia del mejor
aptámero a la región
UTR 5' del gen *cheZ*
(miembro de los sistemas de
dos componentes asociados
a la movilidad flagelar)

Biología sintética

Sistemas buscadores

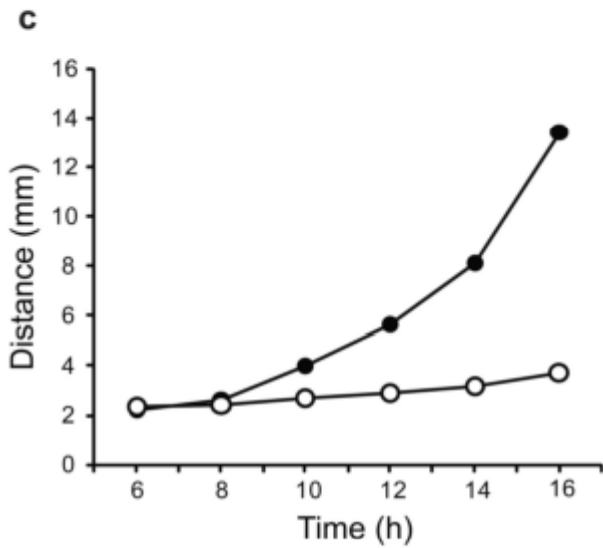
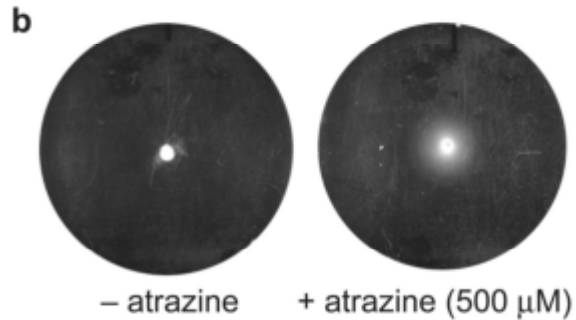
- Plásmidos con los genes *cheZ* conteniendo los aptámeros fueron transferidos a bacterias *Escherichia coli* deficientes en *cheZ*.

Proceso de selección de bacterias

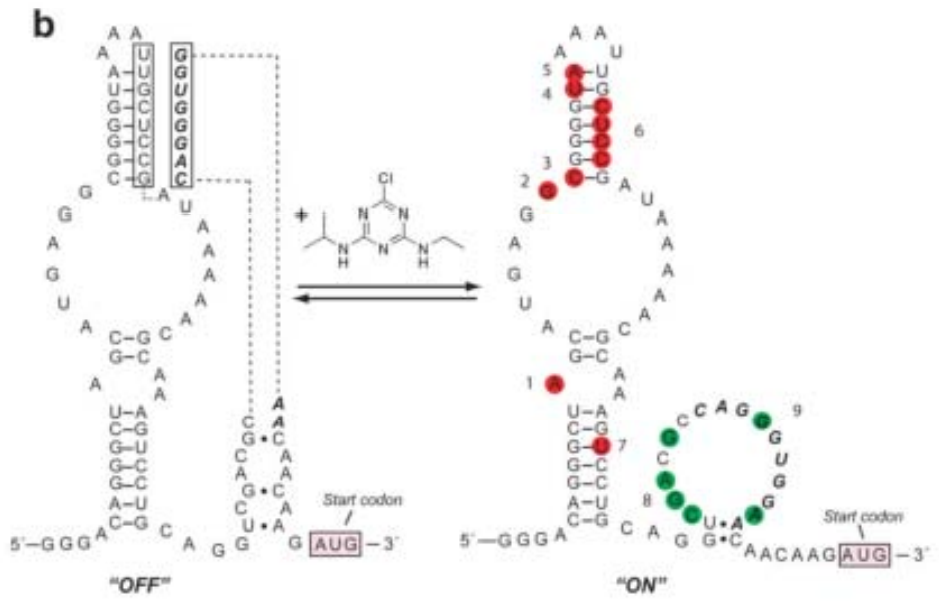


Biología sintética

Sistemas buscadores



Mecanismo *Riboswitch*



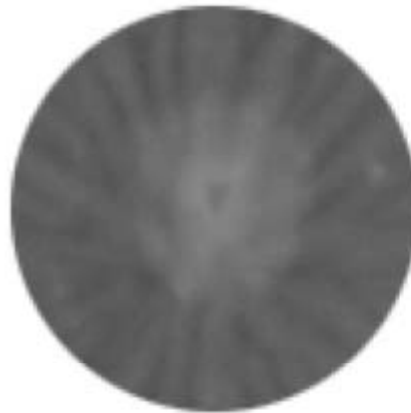
Biología sintética

Sistemas buscadores

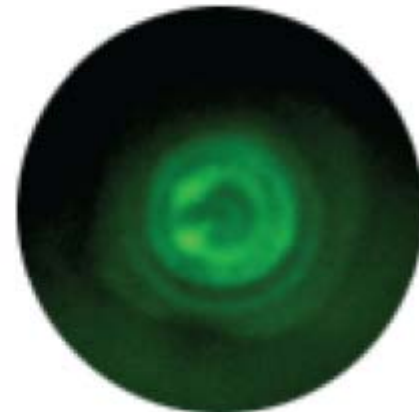
Luz blanca

UV

Bact. **GFP(+)** con gen *Riboswitch-cheZ*
(sin atrazina)



Bact. **GFP(+)** con gen *Riboswitch-cheZ*
(con atrazina)



Biología sintética

Sistemas striker

Clasificación general de *sistemas biológicos sintéticos*

- *Sistemas sintetizadores*
- *Sistemas sensores*
- *Sistemas buscadores*
- ***Sistemas striker***

Biología sintética

Sistemas *striker*

- Los **sistemas *striker*** son **módulos** construidos para **programar** una **célula** para que **específicamente mate, re programe** o **afecte** de algún modo a una **célula diana**.
- La **mayoría** de los **sistemas *striker*** han sido **diseñados** para responder a problemas de **salud humana**.
- Por ejemplo, estos sistemas **permiten que** una **célula o virus invada** a **otra célula**, dejándole una “carga explosiva” para su **eliminación**.
- Así, se **han modificado bacteriofagos** para que invadan **bacterias resistentes a múltiples antibióticos**.
- También, se han **generado *Escherichia coli* programadas** para **invadir células tumorales** y alterar su fenotipo.

Biología sintética

Sistemas *striker*

Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy

Timothy K. Lu^{a,b} and James J. Collins^{b,1}

^aHarvard-Massachusetts Institute of Technology Division of Health Sciences and Technology, Cambridge, MA 02139; and ^bHoward Hughes Medical Institute, Center for BioDynamics and Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, MA 02215

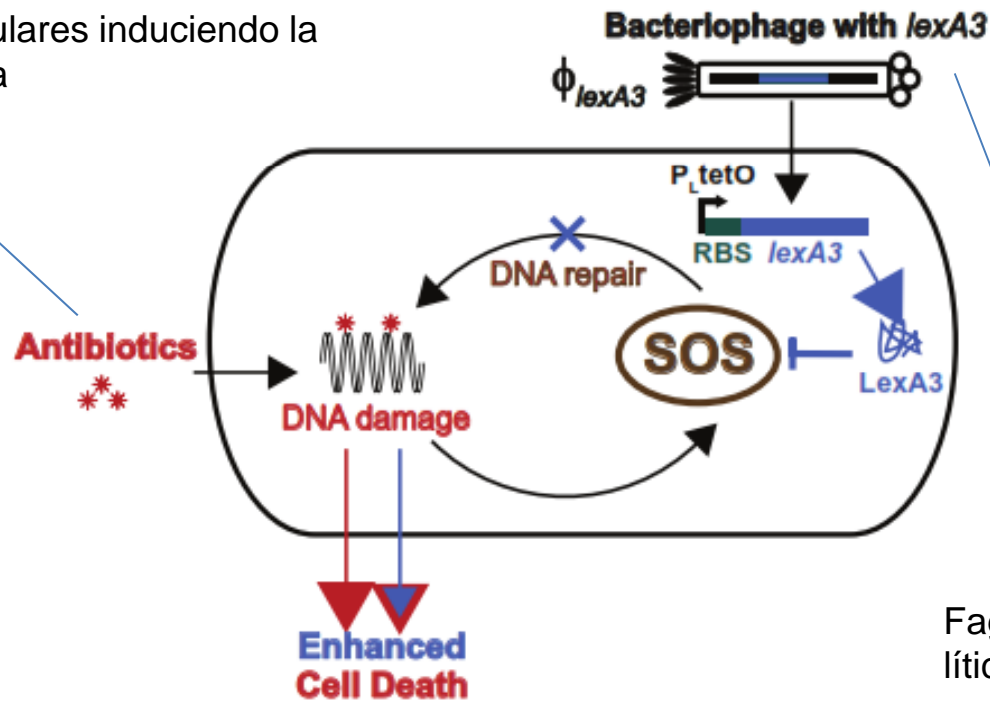
Edited by Arnold L. Demain, Drew University, Madison, NJ, and approved February 3, 2009 (received for review January 16, 2008)

Antimicrobial drug development is increasingly lagging behind the evolution of antibiotic resistance, and as a result, there is a pressing need for new antibacterial therapies that can be readily designed and implemented. In this work, we engineered bacteriophage to overexpress proteins and attack gene networks that are not directly targeted by antibiotics. We show that suppressing the SOS network in *Escherichia coli* with engineered bacteriophage enhances killing by quinolones by several orders of magnitude in vitro and significantly increases survival of infected mice in vivo. In addition, we demonstrate that engineered bacteriophage can enhance the killing of antibiotic-resistant bacteria, persister cells, and biofilm cells, reduce the number of antibiotic-resistant bacteria that arise from an antibiotic-treated population, and act as a strong adjuvant for other bactericidal antibiotics (e.g., aminoglycosides and β -lactams). Furthermore, we show that engineering bacteriophage to target non-SOS gene networks and to overexpress multiple factors also can produce effective antibiotic adjuvants. This work establishes a synthetic biology platform for the rapid translation and integration of identified targets into effective antibiotic adjuvants.

Biología sintética

Sistemas *striker*

Del tipo de las *quinolonas* generan radicales libres que dañan a las macromoléculas celulares induciendo la muerte de la bacteria

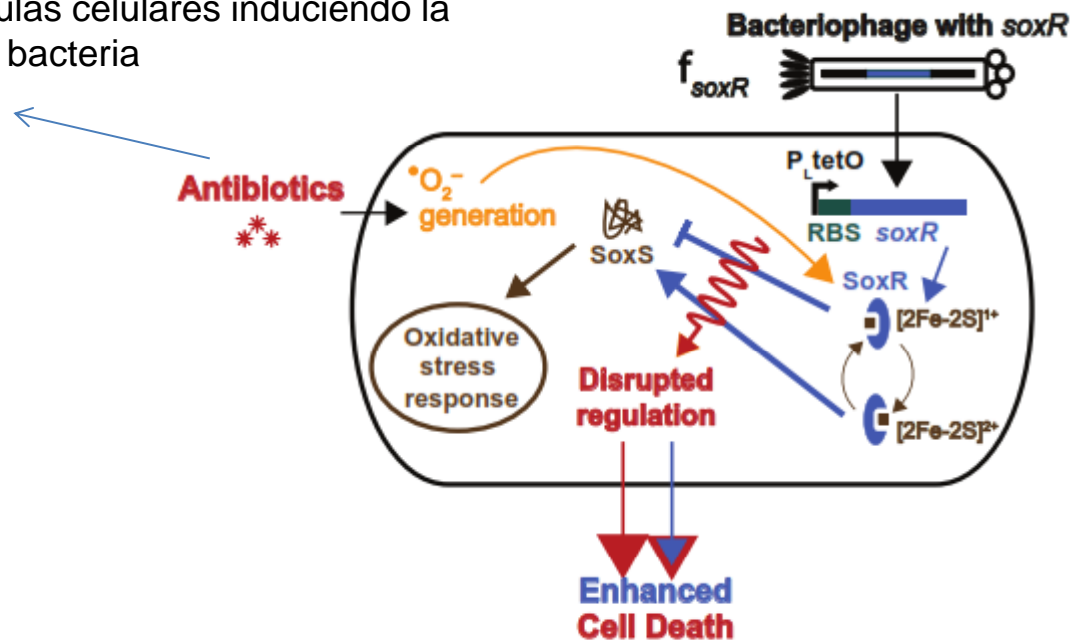


Fago filamentososo no lítico que sobre-expresa un represor de la respuesta SOS bacteriana, controlado bajo el sistema Tet ON/OFF

Biología sintética

Sistemas *striker*

Del tipo de las *quinolonas* generan radicales libres que dañan a las macromoléculas celulares induciendo la muerte de la bacteria



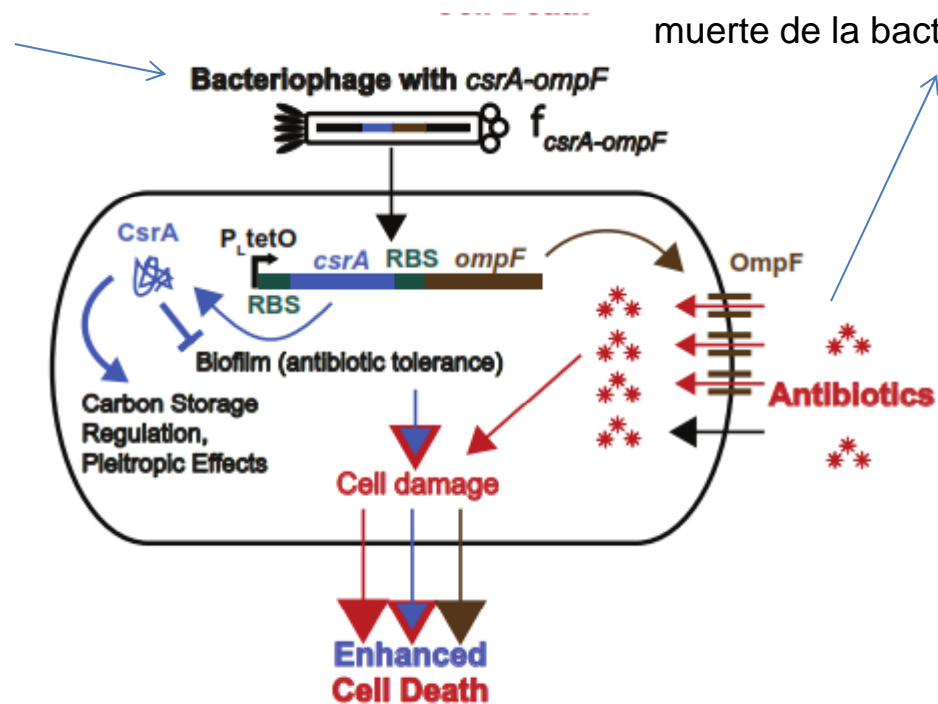
Fago filamentososo no lítico que sobre-expresa un represor de la respuesta al estrés oxidativo bajo el sistema Tet ON/OFF

Biología sintética

Sistemas *striker*

Fago filamentoso no lítico que sobre-expresa una porina (puerta de entrada de los antibióticos) y una proteína represora de la formación de biofilms bajo el sistema Tet ON/OFF

Del tipo de las *quinolonas* generan radicales libres que dañan a las macromoléculas celulares induciendo la muerte de la bacteria



Biología sintética

Sistemas *striker*

LETTERS

nature
biotechnology

Short hairpin RNA–expressing bacteria elicit RNA interference in mammals

Shuanglin Xiang^{1,2}, Johannes Fruehauf^{1,2} & Chiang J Li¹

RNA-interference (RNAi) is a potent mechanism, conserved from plants to humans for specific silencing of genes, which holds promise for functional genomics and gene-targeted therapies. Here we show that bacteria engineered to produce a short hairpin RNA (shRNA) targeting a mammalian gene induce trans-kingdom RNAi *in vitro* and *in vivo*. Nonpathogenic *Escherichia coli* were engineered to transcribe shRNAs from a plasmid containing the invasin gene *Inv* and the listeriolysin O gene *HlyA*, which encode two bacterial factors needed for successful transfer of the shRNAs into mammalian cells. Upon oral or intravenous administration, *E. coli* encoding shRNA against *CTNNB1* (catenin β -1) induce significant gene silencing in the intestinal epithelium and in human colon cancer xenografts in mice. These results provide an example of trans-kingdom RNAi in higher organisms and suggest the potential of bacteria-mediated RNAi for functional genomics, therapeutic target validation and development of clinically compatible RNAi-based therapies.