



**La Biologia Sintetica:
dai batteri ingegnerizzati alle cellule minime**

Giordano Rampioni

Departimento di Scienze, Università Roma Tre

La Sapienza, 12 Dicembre 2023

What's in a name?

Defining an emerging field can be challenging. *Nature Biotechnology* asked 20 experts for their views on the term 'synthetic biology'.

Arkin *et al.*, 2009. *Nat. Biotechnol.* 27:1071-1073.

“Chiedendo a cinque studiosi di Biologia Sintetica cos'è la Biologia Sintetica otterrete sei risposte differenti.”

Kristala L. Jones Prather, Prof.ssa di Ingegneria Genetica e Biologia Sintetica al MIT

Le molte sfumature di interpretazione portano alcuni scienziati a giudicare un ceppo di *E. coli* che esprime un gene eterologo come un organismo sintetico (sfruttano la capacità attrattiva del termine biologia sintetica), ed altri a considerare non sintetico tutto ciò che si basa su molecole naturali (estremisti della biologia sintetica).

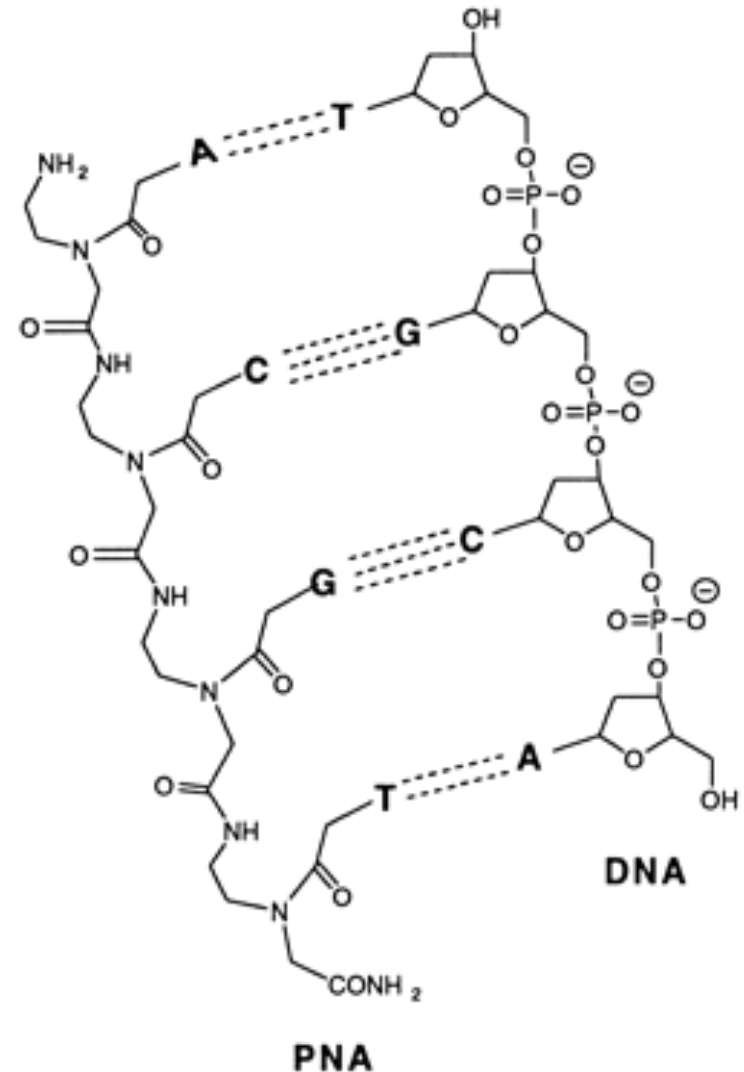
Ad esempio, alcuni scienziati ritengono che un approccio veramente sintetico alla biologia non possa basarsi su molecole non sintetizzate, o addirittura su molecole sintetiche come il DNA e gli aminoacidi convenzionali (molecole esistenti in natura), ma debba essere incentrato su PNA e su aminoacidi non canonici.

Gli acidi peptidonucleici (PNA)

Il PNA (Peptide Nucleic Acid) è una molecola simile al DNA, ma lo scheletro di zucchero fosfato è sostituito da uno scheletro peptidico.

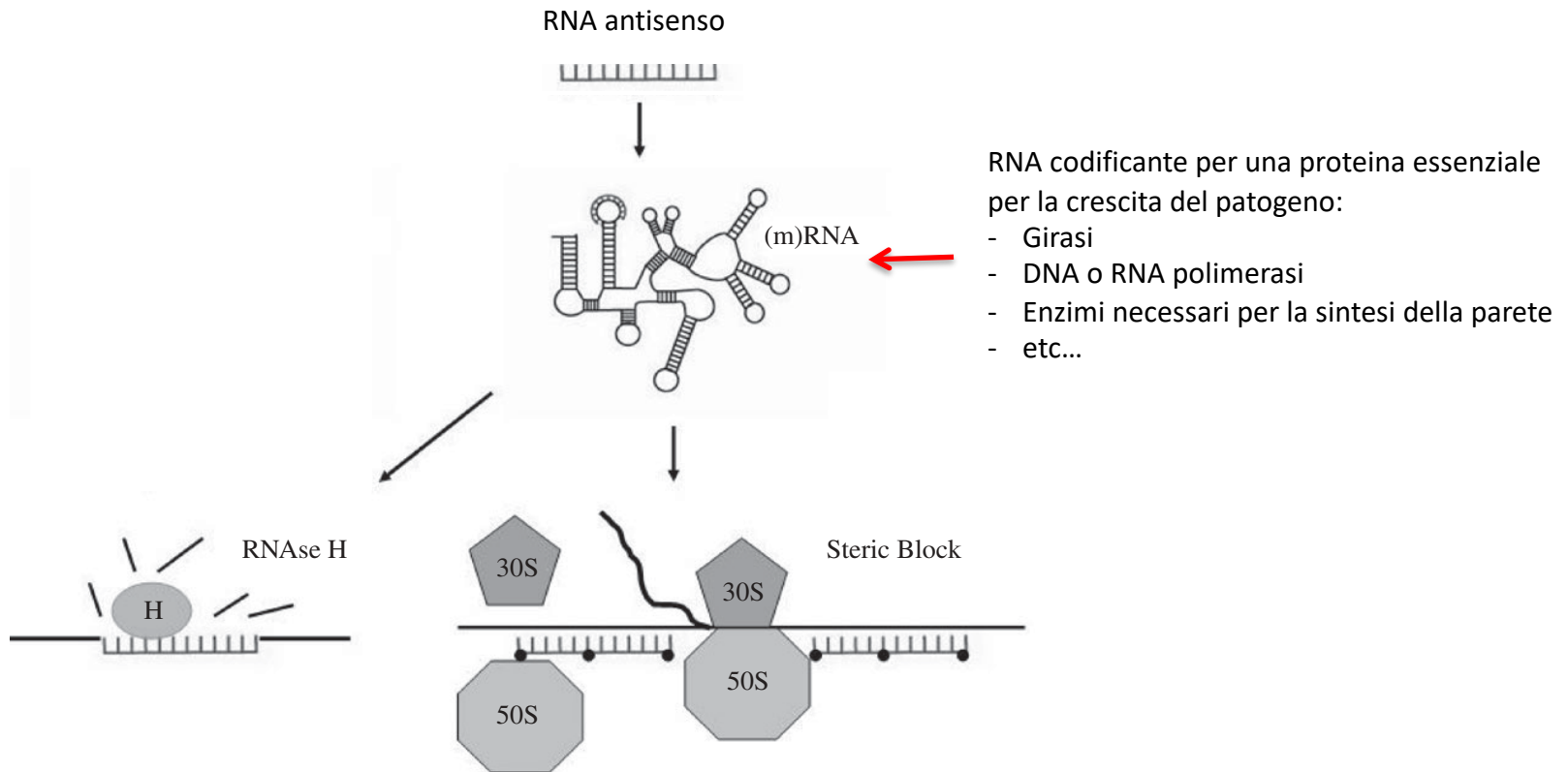
Il PNA non è degradato da nucleasi e proteasi, e l'appaiamento PNA-DNA o PNA-RNA è molto più stabile (legame più forte) rispetto all'appaiamento DNA-DNA o RNA-RNA. Ciò è dovuto al fatto che lo scheletro proteico del PNA non è carico, mentre gli scheletri zucchero-fosfato del DNA e dell'RNA sono carichi negativamente, pertanto soggetti a repulsione elettrostatica.

Il PNA è utilizzato per la generazione di sonde che si ibridizzano con il DNA, ad esempio nella FISH, ma è anche molto promettente per terapie antisenso.



PNA per la terapia antisenso

Sulla base del funzionamento degli RNA antisenso, che quando si appaiano ad un frammento di RNA *target* ne inducono la degradazione o ne impediscono la traduzione da parte del ribosoma, si possono disegnare degli RNA che, in base alla loro sequenza, si appaiano con RNA codificanti per proteine essenziali alla crescita di un microrganismo, magari di un batterio patogeno. In questo caso l'RNA antisenso dovrebbe bloccare la crescita del patogeno. Il problema è che lo stesso RNA antisenso può essere facilmente e velocemente degradato dalle nucleasi prodotte dal patogeno e da quelle extracellulari.



PNA per la terapia antisenso

Poiché i PNA possono formare duplex molto stabili con molecole di RNA, e poiché **non possono essere degradati da nucleasi e proteasi**, questi costituiscono promettenti molecole per la terapia antisenso. Inoltre i PNA sono **molecole xenobiotiche**, che non esistono in natura, per questo i microrganismi non hanno evoluto nessun meccanismo di resistenza contro di esse! Ad esempio, non vengono esportati da pompe di efflusso.

Ma come possiamo veicolare dei PNA antisenso nei microrganismi? Esistono dei piccoli peptidi, noti come *Cell Penetrating Peptides* (CCP), che quando vengono coniugati ai PNA possono veicolarne l'ingresso all'interno delle cellule.

Importante: i PNA, anche quando coniugati ai CCP, **non sono tossici per le cellule superiori**. Se i *target* verso cui si appaiano i PNA sono specifici per il microrganismo patogeno, i PNA non avranno attività antisenso verso le cellule superiori, in cui non è presente il *target*.

Si può sviluppare resistenza verso i PNA antisenso? Ovviamente è possibile, anche se non dimostrato, ma se la regione dell'RNA *target* è conservata in vari microrganismi perché importante dal punto di vista funzionale, è meno probabile che possa sopportare delle mutazioni.

Esempio di PNA-antisenso
coniugato al CCP (KFF)₃K



catagctgtttc-lysNH₂

H-KFFKFFKFFK

H-KFFKFFKFFK-eg1-catagctgtttc

PNA #1834

permeating peptide

peptide-PNA #1900

Strategie antisenso basate su PNA sono state utilizzate con successo per inibire la crescita di una vasta gamma di batteri patogeni

| | Microrganismi | Gene bersaglio | Proteina codificata | Referenze |
|---------------|---|----------------|--|---|
| Gram-negativi | <i>Acinetobacter baumannii</i> | <i>rpoD</i> | RNA polimerasi, subunità σ^{70} | Bai <i>et al.</i> (2012) <i>Biomaterials</i> 33:659-667. |
| | <i>Brucella suis</i> | <i>polA</i> | DNA polimerasi I, necessaria per la replicazione del DNA | Rajasekaran <i>et al.</i> (2013) <i>Int J Antimicrob Agents</i> 41:358-362. |
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>folA</i> | Diidrofolato reduttasi, sintesi dell'acido folico | Dryselius <i>et al.</i> (2005) <i>J Antimicrob Chemother</i> 56:97-103. |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>murA</i> | Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano | Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8. |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>acpP</i> | Proteina trasportatrice di gruppi acili, essenziale per la biosintesi degli acidi grassi | Ghosal e Nielsen (2012) <i>Nucleic Acid Ther</i> 22:323-334. |
| | <i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i> | <i>murA</i> | Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano | Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8. |
| | <i>Shigella flexneri</i> | <i>rpoD</i> | RNA polimerasi, subunità σ^{70} | Bai <i>et al.</i> (2012) <i>Biomaterials</i> 33:659-667. |
| Gram-positivi | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>ftsZ</i> | Proteina coinvolta nella divisione cellulare | Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8. |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>rpoA</i> | RNA polimerasi, subunità α | Alajlouni e Seleem (2013) <i>Nucleic Acid Ther</i> 23:363-367. |
| | <i>Mycobacterium smegmatis</i> | <i>inhA</i> | Reduttasi coinvolta nell'allungamento degli acidi grassi | Kulyté <i>et al.</i> (2005) <i>J Mol Microbiol Biotech</i> 9:101-109. |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>fmhB</i> | Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano | Nekhotiaeva <i>et al.</i> (2004) <i>Mol Ther</i> 10:652-659. |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | <i>gyrA</i> | DNA girasi, subunità A, parte del processo replicativo del DNA | Patenge <i>et al.</i> (2013) <i>Mol Ther Nucleic Acids</i> 2:1-9. |

PNA specie-specifici o ad ampio spettro

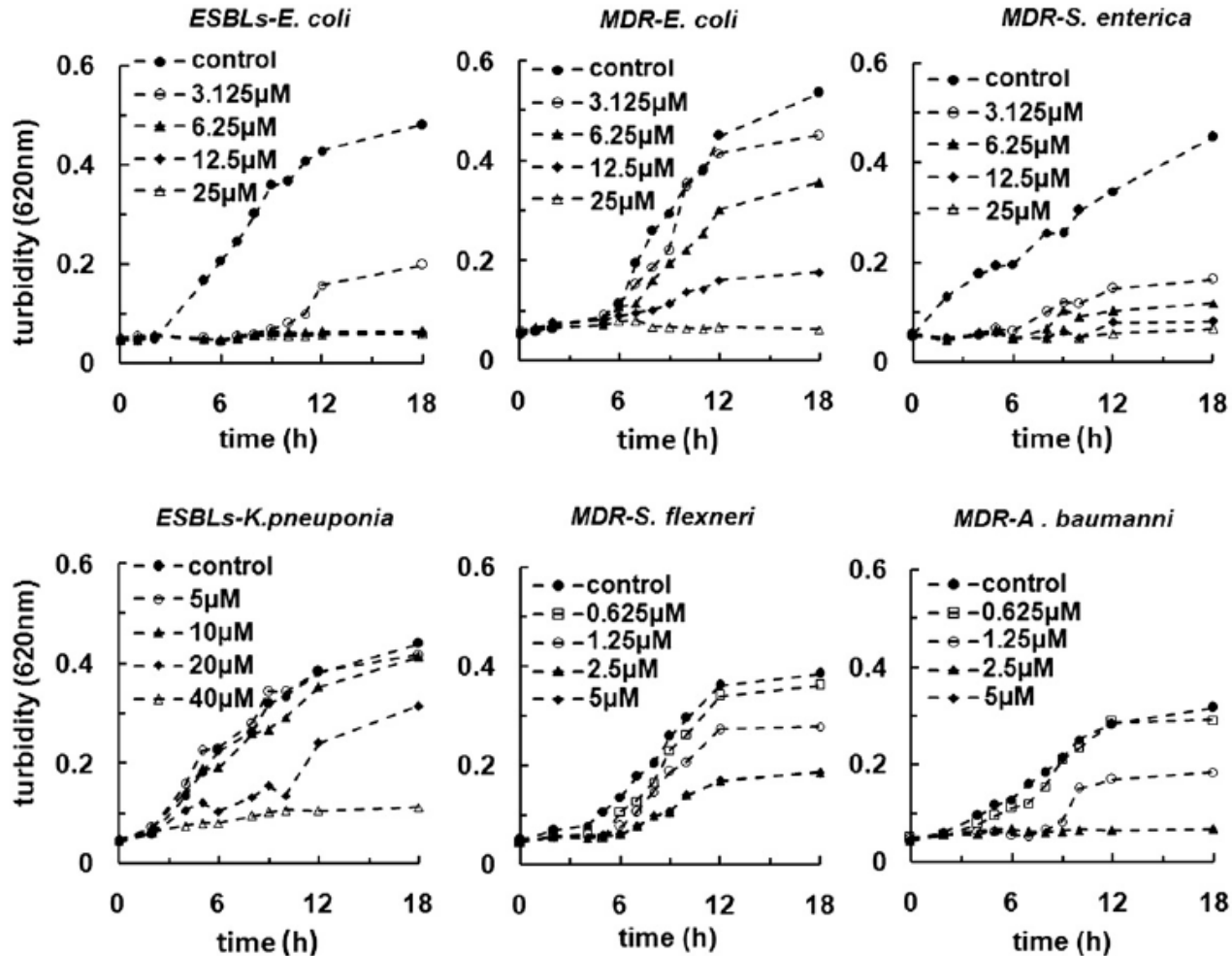
A seconda del grado di conservazione della loro sequenza bersaglio, si possono disegnare PNA:

- **ad ampio spettro d'azione:** in grado di inibire la crescita di patogeni appartenenti a generi e specie differenti;
- **specie-specifici:** approccio mirato, inibiscono la crescita di un solo patogeno senza creare disbiosi nel microbiota dell'ospite.

Voi come li disegnereste?

PNA ad ampio spettro

Un PNA disegnato su una regione conservata dell'mRNA del gene *rpoD* è in grado di inibire la crescita di diversi patogeni Gram-negativi, anche antibiotico resistenti.



PNA specie-specifici

Se si prede in esame una regione dell'mRNA non conservata, si possono disegnare PNA in grado di inibire in modo selettivo la crescita di una sola specie batterica.

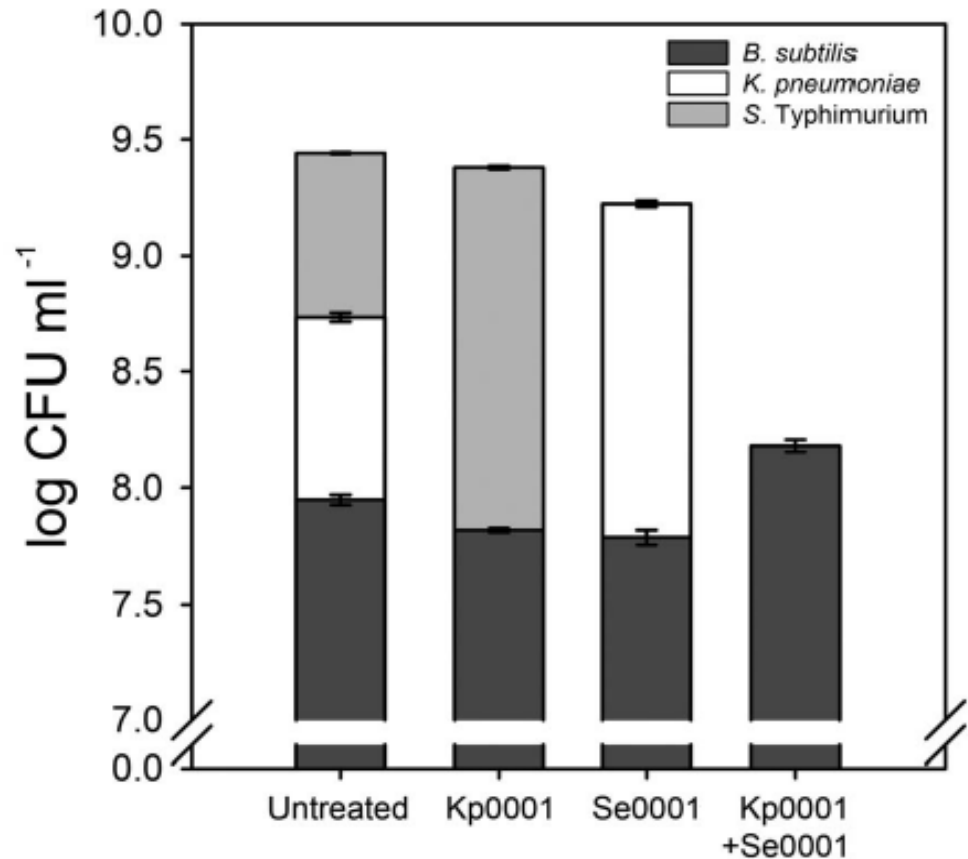
I PNA Kp0001 e Se0001 sono disegnati sulla stessa regione del gene *murA*, che codifica per un enzima necessario alla sintesi del peptidoglicano.

PNA Kp0001:

- appaiamento perfetto con l'mRNA del gene *murA* di *Klebsiella pneumoniae*;
- 2 *mismatch* con l'mRNA del gene *murA* di *Bacillus subtilis* e *Salmonella enterica* ser. Typhimurium.

PNA Se0001:

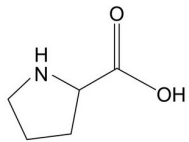
- appaiamento perfetto con l'mRNA del gene *murA* di *S. enterica* ser. Typhimurium;
- 2 *mismatch* con l'mRNA del gene *murA* di *B. subtilis* e *K. pneumoniae*.



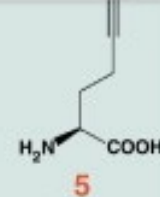
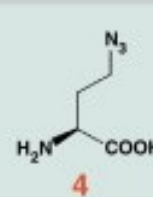
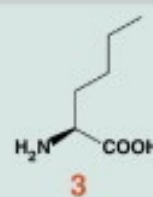
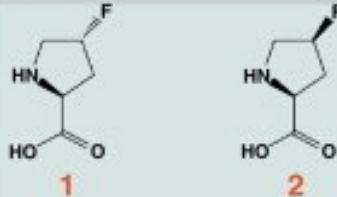
Gli aminoacidi non canonici

Come nel caso dei PNA, si utilizzano in biologia sintetica anche aminoacidi che non esistono in natura, gli aminoacidi non canonici (ncAA). Questi sono AA non presenti nei sistemi biologici, che possono conferire alle proteine nelle quali vengono incorporati delle proprietà particolari. Con i ncAA si può espandere il codice genetico. Si distinguono in iso-strutturali e non iso-strutturali (o ortogonali).

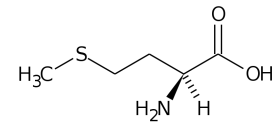
Prolina



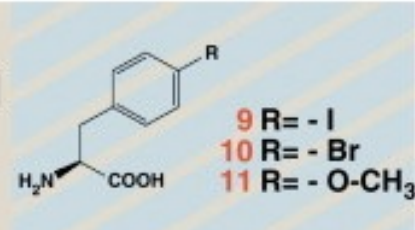
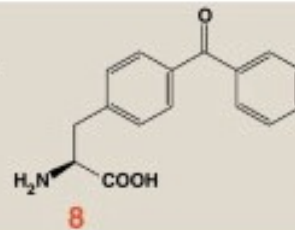
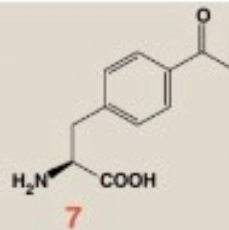
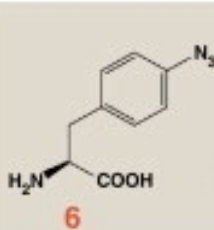
(a) Isostrutturali ncAAs



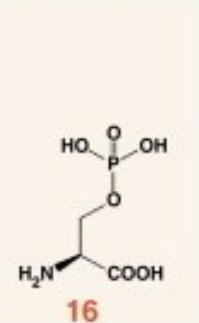
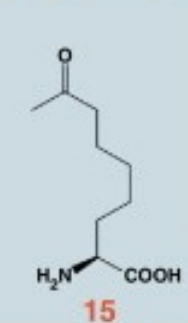
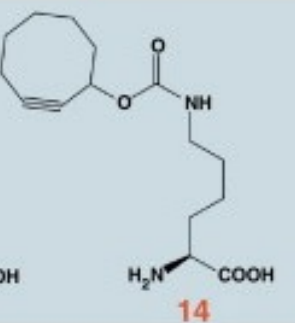
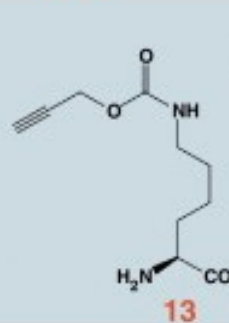
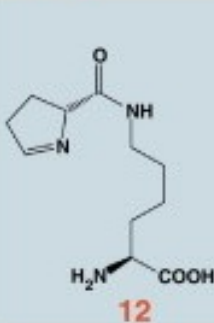
Metionina



(b) Orthogonal ncAAs



- 9 R = - I
- 10 R = - Br
- 11 R = - O-CH₃

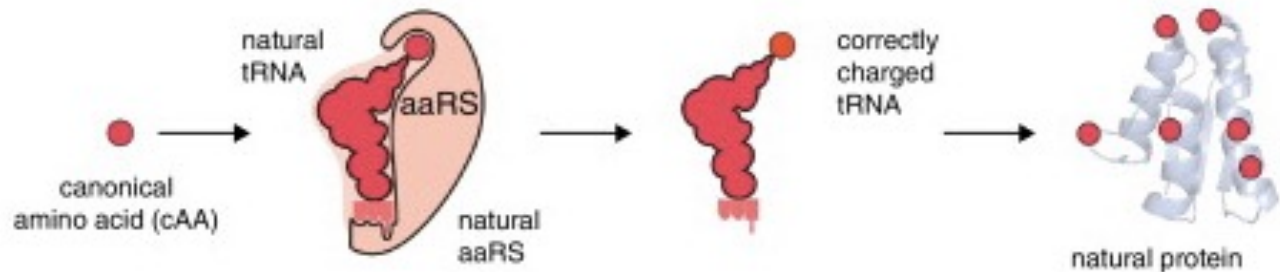


Gli aminoacidi non canonici

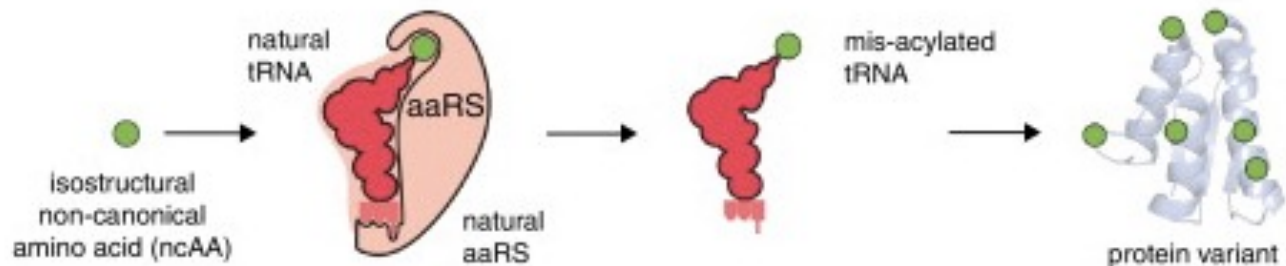
I ncAA possono essere incorporati nella proteina nascente dal tRNA e la aminoacil-tRNA sintetasi naturali se sono iso-strutturali rispetto all'AA naturale. Tale processo è noto come *Supplementation Based Incorporation* (SPI).

Per la SPI, basta supplementare il terreno di crescita con ncAA iso-strutturali. Normalmente si utilizzano ceppi auxotrofi per tale AA. I ceppi potrebbero essere non vitali, quindi si fanno crescere le cellule con l'AA naturale, poi si aggiunge il ncAA e si esprime la proteina di interesse.

(a) Normal aminoacylation



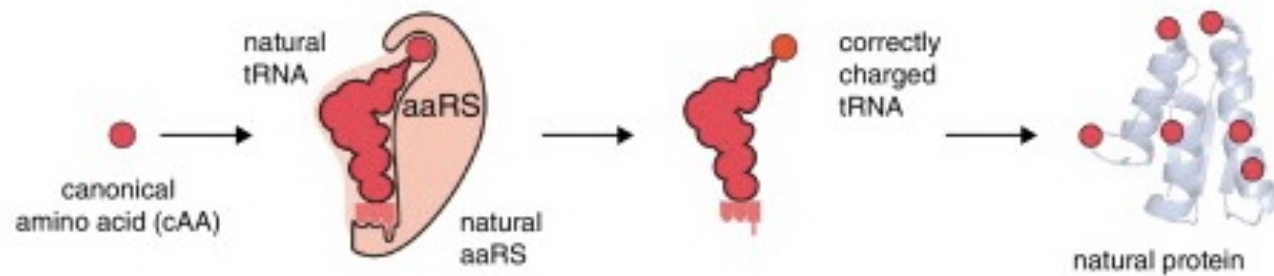
(b) Supplementation based incorporation method (SPI)



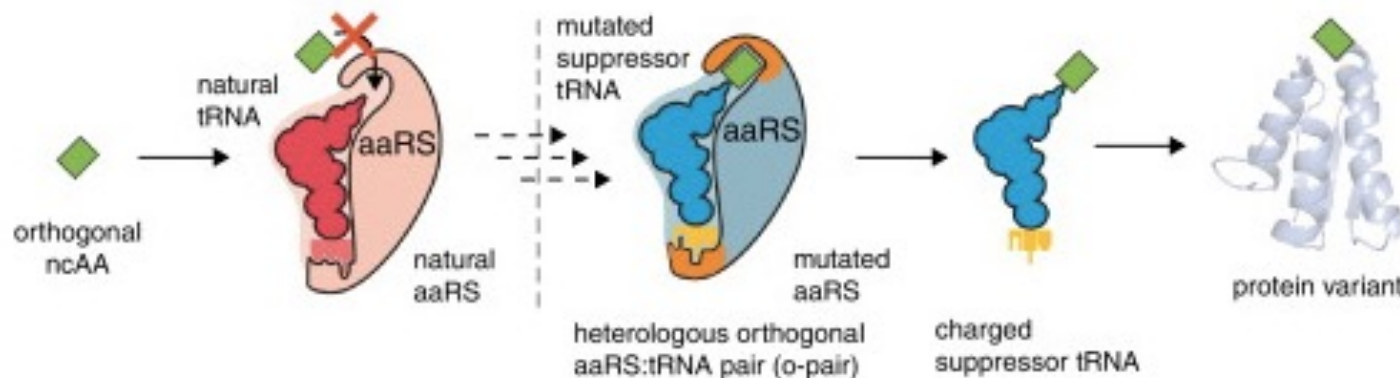
Gli aminoacidi non canonici

I ncAA che non sono iso-strutturali con gli AA naturali non vengono riconosciuti dai tRNA e dalle aminoacil-tRNA sintetasi naturali, e pertanto la loro incorporazione in una proteina nascente richiede tRNA e dalle aminoacil-tRNA sintetasi ingegnerizzati *ad hoc*. Ditte specializzate nelle biotecnologie stanno mettendo a punto ceppi che esprimano coppie tRNA/aminoacil-tRNA sintetasi in grado di riconoscere ncAA.

(a) Normal aminoacylation



(c) Stop codon suppressions approaches (SCS)



Cos'è davvero la Biologia Sintetica ?

Molecular Systems Biology (2006) doi:10.1038/msb4100073
© 2006 EMBO and Nature Publishing Group All rights reserved 1744-4292/06
www.molecularsystemsbiology.com
Article number: 2006.0028

molecular
systems
biology

Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline

Ernesto Andrianantoandro^{1,3}, Subhayu Basu^{1,3},
David K Karig^{1,3} and Ron Weiss^{1,2,*}

Già nel 2006 la Biologia Sintetica era stata proposta come una nuova disciplina situata al confine tra Biologia ed Ingegneria, che mira ad utilizzare approcci e metodi ingegneristici per progettare e realizzare nuovi componenti, sistemi e organismi bio-ispirati non esistenti in natura.

La differenza tra ingegneria genetica e biologia sintetica non si identifica nel fine (che può essere il medesimo), ma nell'approccio utilizzato per raggiungerlo.

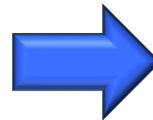
I principi alla base della biologia sintetica sono la **standardizzazione delle parti**, la **modularità nel loro assemblaggio**, e l'**ortogonalità dei processi**. Come nei campi ingegneristici, anche nella biologia sintetica spesso ci si avvale di **modelli *in silico***.

Standardizzazione delle parti e modularità nel loro assemblaggio

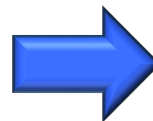
La **standardizzazione** e la **modularità** sono necessarie per poter arrivare a generare sistemi artificiali complessi, secondo una modalità progettuale simile a quella ingegneristica.

Potreste costruire un grattacielo o una portaerei con viti, bulloni e travi di acciaio tutti di dimensioni diverse e di cui non conoscete le proprietà funzionali?

Ingegneria genetica



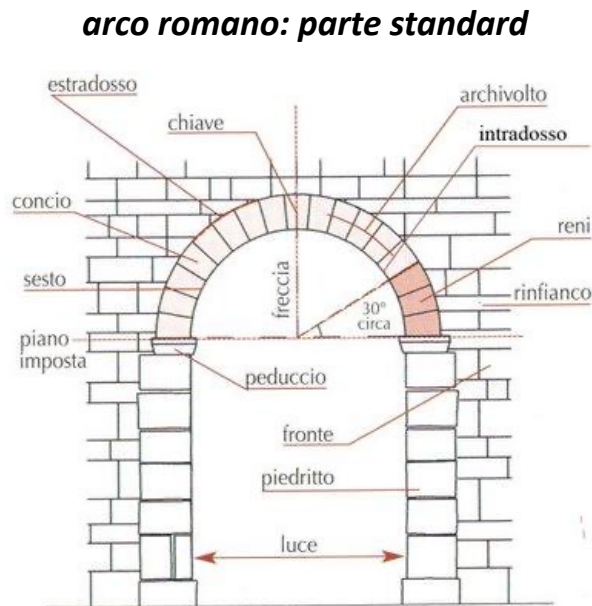
Biologia sintetica



Standardizzazione delle parti e modularità nel loro assemblaggio

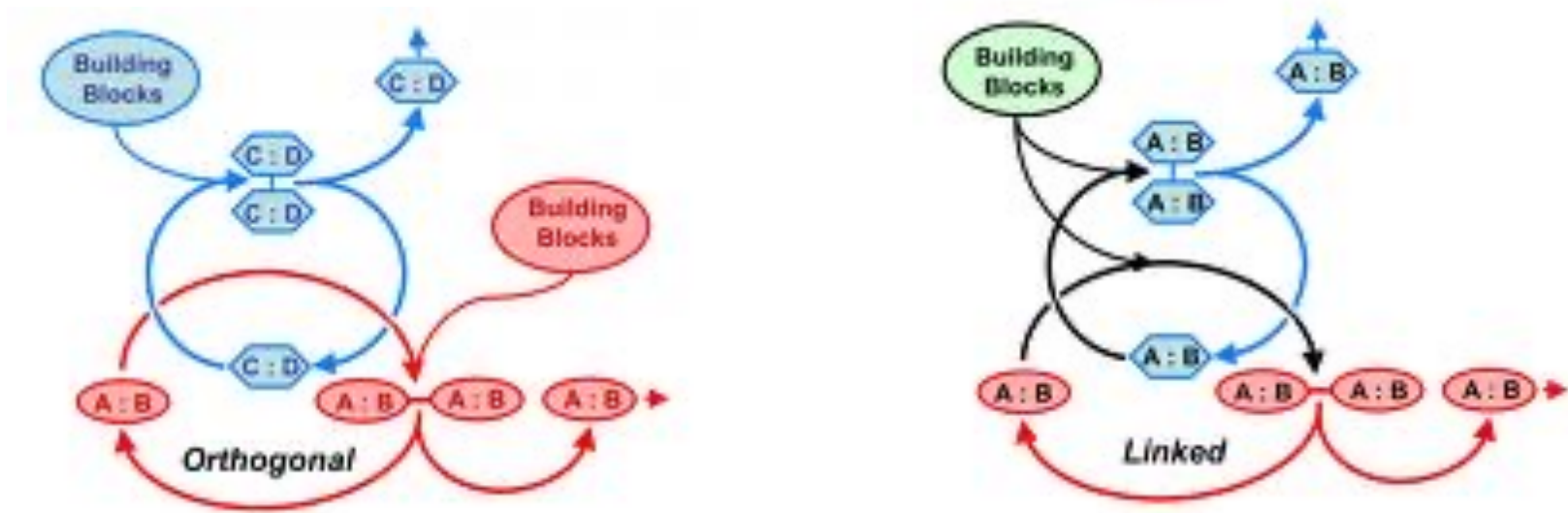
La **standardizzazione** e la **modularità** sono necessarie per poter arrivare a generare sistemi artificiali complessi, secondo una modalità progettuale simile a quella ingegneristica.

Potreste costruire un grattacielo o una portaerei con viti, bulloni e travi di acciaio tutti di dimensioni diverse e di cui non conoscete le proprietà funzionali?



Ortogonalità dei processi

L'**ortogonalità**, ovvero la mancanza di interazione tra vari processi, è necessaria per poter ottenere un processo controllabile e prevedibile. Cosa succederebbe se il vostro processo alterasse altri processi che sono correlati con esso? Potrebbe esserne a sua volta influenzato? Come possiamo prevedere l'andamento di un processo che interagisce con altri processi? Quando le interazioni diventano molteplici e reciproche, il sistema può divenire caotico.

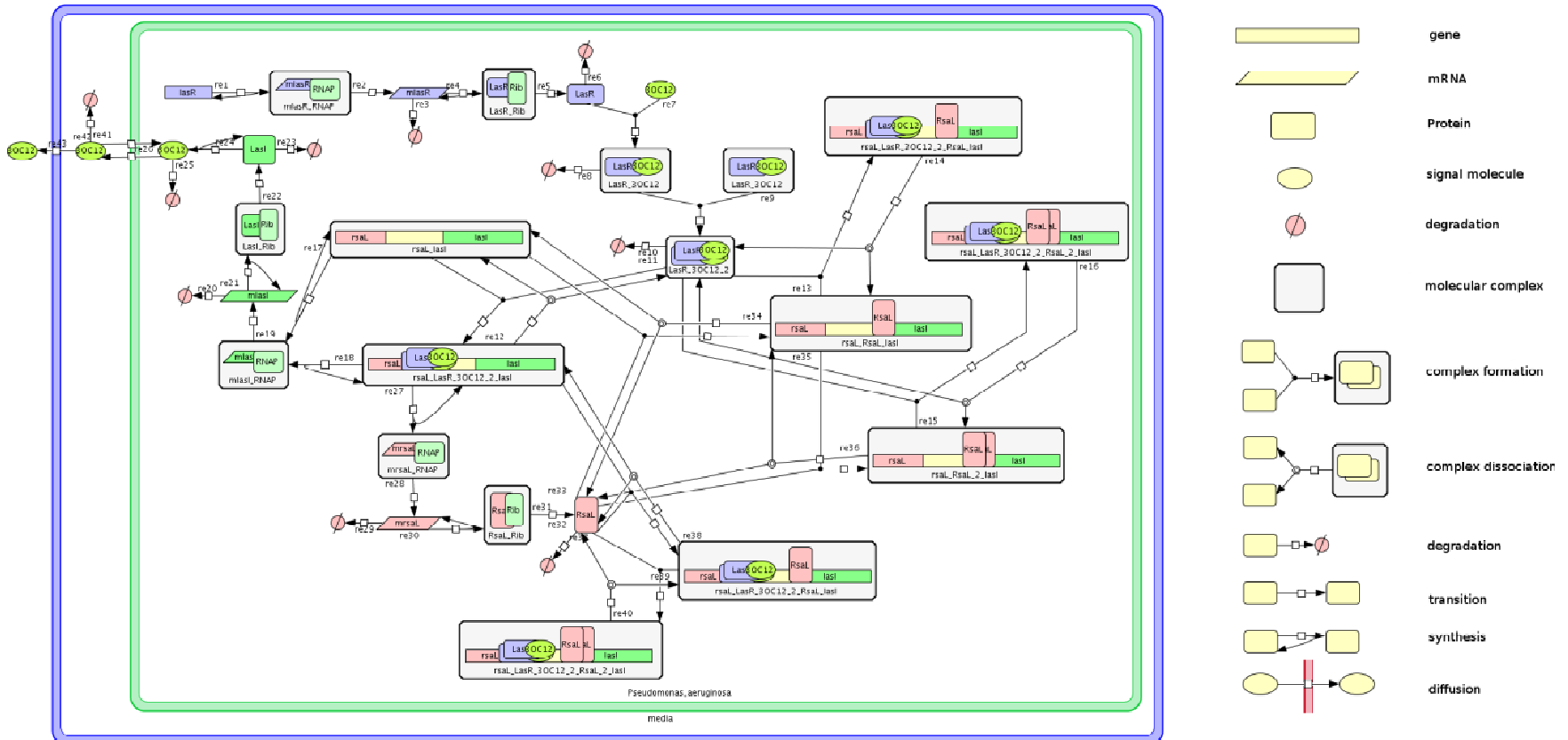


E' importante valutare in quale *background* cellulare si vuole inserire un circuito genetico sintetico, così da non avere interferenze con i processi endogeni. Bisogna definire uno "chassis"!

Uso dei modelli numerici *in silico*

Per prevedere il comportamento dei nuovi circuiti genetici generati per funzionalizzare le cellule una volta che questi vengono inseriti all'interno di uno *chassis*, la biologia sintetica spesso si avvale di simulazioni al computer (modelli *in silico*).

I **modelli *in silico*** consentono di effettuare con grande facilità simulazioni in condizioni difficili da riprodurre sperimentalmente. Inoltre, i modelli *in silico* permettono di "gestire la complessità" e sono predittivi.



Cosa sono i BioBricks ?

Vengono definiti come BioBricks delle sequenze di DNA standard che codificano per ben definite strutture e funzioni. Tali sequenze di DNA sono progettate per essere composte in modo modulare ed incorporate in cellule procariotiche od eucariotiche al fine di costruire nuovi sistemi genetici.

I BioBricks rappresentano uno sforzo per introdurre i principi ingegneristici della modularità e della standardizzazione nella biologia sintetica.

Grazie alla combinazione di “*parts*” come promotori, RBS, geni (codificanti per proteine o domini di proteine) e terminatori si possono generare nuovi circuiti genetici con nuove funzionalità e sistemi di regolazione *ad hoc*, noti come “*devices*”.

Cosa sono i BioBricks ?

Catalog - partsregistry.org

http://partsregistry.org/Catalog

biobricks









Catalog - partsregistry.org

Catalog

[< Back to Registry](#)

- Browse [parts by type](#) • [devices by type](#)
- Browse [parts and devices by function](#) • [by chassis](#) • [by standard](#) • [or by contributor](#)
- Browse [chassis](#)
- Browse [user-supplied catalog pages](#) - these pages have not undergone curation by the Registry but have been made by the Registry user community. Please feel free to add new catalog pages to this section.

Browse parts by type

| Catalog | List |
|---|--|
|  | Promoters (?) : A promoter is a DNA sequence that tends to recruit transcriptional machinery and lead to transcription of the downstream DNA sequence. |
|  | Ribosome Binding Sites (?) : A ribosome binding site (RBS) is an RNA sequence found in mRNA to which ribosomes can bind and initiate translation. |
|  | Protein domains (?) : Protein domains are portions of proteins cloned in frame with other proteins domains to make up a protein coding sequence. Some protein domains might change the protein's location, alter its degradation rate, target the protein for cleavage, or enable it to be readily purified. |
|  | Protein coding sequences (?) : Protein coding sequences encode the amino acid sequence of a particular protein. Note that some protein coding sequences only encode a protein domain or half a protein. Others encode a full-length protein from start codon to stop codon. Coding sequences for gene expression reporters such as LacZ and GFP are also included here. |
|  | Translational units (?) : Translational units are composed of a ribosome binding site and a protein coding sequence. They begin at the site of translational initiation, the RBS, and end at the site of translational termination, the stop codon. |
|  | Terminators (?) : A terminator is an RNA sequence that usually occurs at the end of a gene or operon mRNA and causes transcription to stop. |
|  | DNA (?) : DNA parts provide functionality to the DNA itself. DNA parts include cloning sites, scars, primer binding sites, spacers, recombination sites, conjugative transfer elements, transposons, origami, and aptamers. |
|  | Plasmid backbones (?) : A plasmid is a circular, double-stranded DNA molecules typically containing a few thousand base pairs that replicate within the cell independently of the chromosomal DNA. A plasmid backbone is defined as the plasmid sequence beginning with the BioBrick suffix, including the replication origin and antibiotic resistance marker. |

Cosa sono i BioBricks ?

Promoters/Catalog

Browse by function



Constitutive promoters: These promoters are active independent of transcription factors, and are "on" by default.



Cell signalling: The registry has a set of promoters related to sending and receiving signals between different cells.



Metal sensitive: This set includes promoters that are sensitive to various metals. The promoters are typically regulated by a receptor protein that binds to the metal ion or complex.



Phage promoters: A collection of all phage promoters available from the registry. The promoters are often used for very high expression of a protein. These promoters work in *E. coli* and other chassis but typically require a particular RNA polymerase to be present.



IIT Madras Stresskit promoters: a well-characterized collection of negatively regulated *E. coli* promoters that have been engineered to be recognized by alternative σ factors. This collection was developed by the 2008 IIT Madras iGEM team.



USTC logic promoters: a collection of multiple input promoters all based on a similar template. These promoters were developed by the 2007 USTC iGEM team.



| | | RNA Polymerase | | | | | | |
|-----------------|-----|----------------|--------------------|---------------------------|---------------|-----|------------|--------------------------|
| | | Prokaryotic | | | Bacteriophage | | Eukaryotic | |
| | | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | Miscellaneous prokaryotic | T7 | SP6 | Yeast | Miscellaneous eukaryotic |
| Regulation | | | | | | | | |
| Positive | + | 53 | 1 | 6 | - | - | 14 | 5 |
| Constitutive(?) | 0 | 63 | 5 | 2 | 12 | 1 | 10 | 2 |
| Negative(?) | - | 89 | 1 | - | 6 | - | 3 | 7 |
| Multiple | +/- | 111 | - | 1 | - | - | 5 | 4 |

Cosa sono i BioBricks ?

Promotori costitutivi

| -?- | Name | Description | Promoter Sequence | Positive Regulators | Negative Regulators |
|------|-------------|--|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1★ | BBa_I14018 | P(Bla) | ... gttatcacataggcagactctgttatgg | | |
| 1★ | BBa_I14033 | P(Cat) | agaggtccaacttcaccataatgaaaca | | |
| 1★ | BBa_I14034 | P(Kat) | taaacactaacggacaattctacctaaca | | |
| | BBa_I732021 | Template for Building Primer Family Member | acatcaagccaaattaaacaggattaacac | | |
| | BBa_I742126 | Reverse lambda ci-regulated promoter | gaggtaaaatagtcacacgcacgggtgta | | |
| | BBa_J01006 | Key Promoter absorbs 3 | caggccggataactccctataatgcgcca | | |
| 1★ W | BBa_J23100 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23101 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23102 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23103 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23104 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23105 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23106 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23107 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23108 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23109 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23110 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23111 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23112 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23113 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23114 | constitutive promoter family member | ... ggctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23115 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |
| 1★ W | BBa_J23116 | constitutive promoter family member | ... agctagctcagtcctaggtaacagctagc | | |

Promotori la cui espressione è indotta da metalli

| -?- | Name | Description | Promoter Sequence | Positive Regulators | Negative Regulators |
|-----|-------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1★ | BBa_I721001 | Lead Promoter | ... gaaaacctgtcaatgaagagcgatctatg | | |
| | BBa_I731004 | FecA promoter | ... ttctgttcgactcatagctgaacacaaca | | |
| | BBa_I760005 | Cu-sensitive promoter | atgacaaaattgcat | | |
| A | BBa_I765000 | Fe promoter | ... accaatgctgggaacggccaggcacctaa | | |
| A | BBa_I765007 | Fe and UV promoters | ... ctgaaagcgcataccgctatggagggggtt | | |
| 1★ | BBa_J3902 | PrFe (PI + PII rus operon) | ... tagatagctgaaagcgcataccgctatg | | |

I BioBricks sono comunemente impiegati come parti standard per ingegnerizzare i microrganismi

Anche nella lezione precedente abbiamo visto un paio di esempi in cui i microrganismi sono stati ingegnerizzati tramite BioBricks. Per l'ingegnerizzazione di tali batteri è stato fondamentale anche utilizzare simulazioni *in silico* e conoscere le proprietà dei *network motifs*

Molecular Systems Biology 7; Article number 521; doi:10.1038/msb.2011.55
 Citation: *Molecular Systems Biology* 7:521
 © 2011 EMBO and Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1744-4292/11
 www.molecularsystemsbiology.com

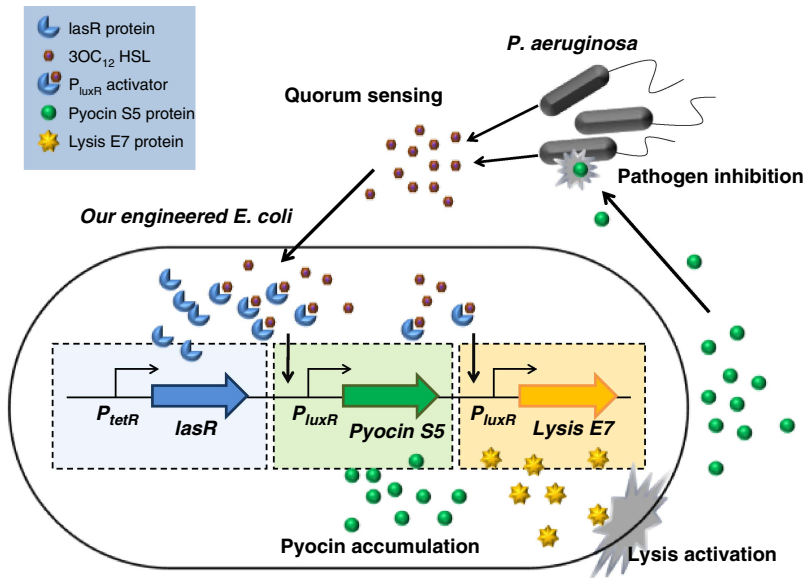
molecular
systems
biology

LETTER

doi:10.1038/nature18930

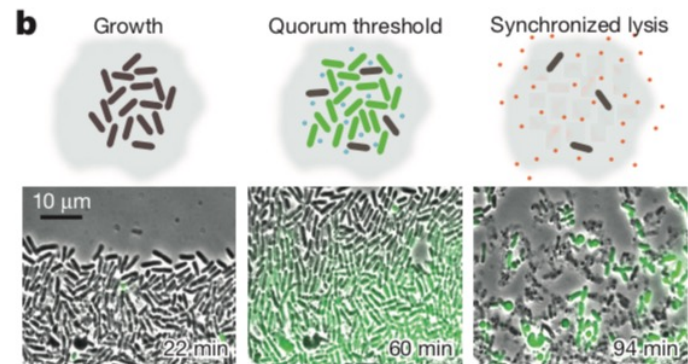
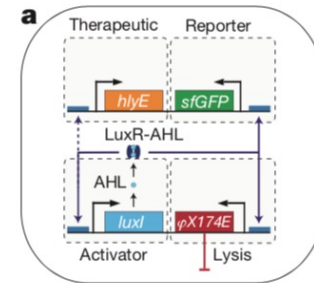
Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen

Nazanin Saeidi¹, Choon Kit Wong¹, Tat-Ming Lo, Hung Xuan Nguyen², Hua Ling, Susanna Su Jan Leong, Chueh Loo Poh* and Matthew Wook Chang*



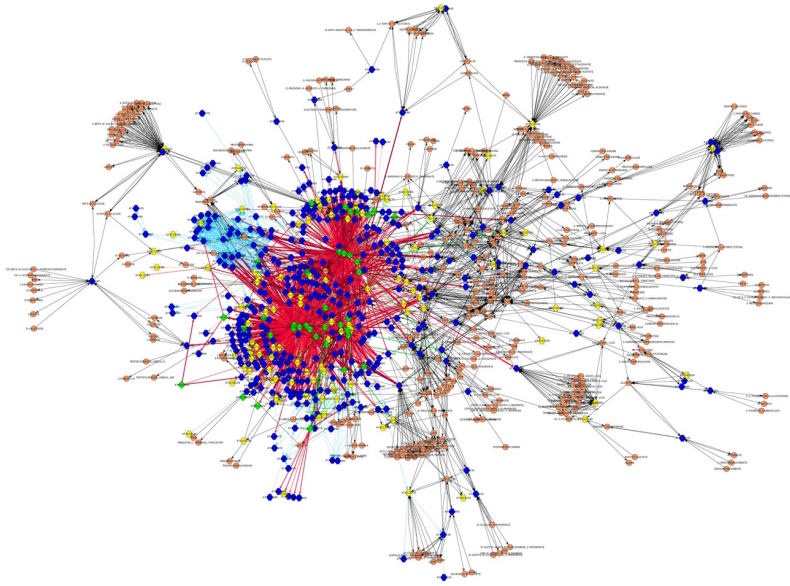
Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

M. Omar Din^{1*}, Tal Danino^{2,3*}, Arthur Prindle¹, Matt Skalak², Jangir Selimkhanov¹, Kaitlin Allen², Ellis Julio¹, Eta Atolia², Lev S. Tsimring³, Sangeeta N. Bhatia^{2,4,5,6,7,8} & Jeff Hasty^{1,3,9}



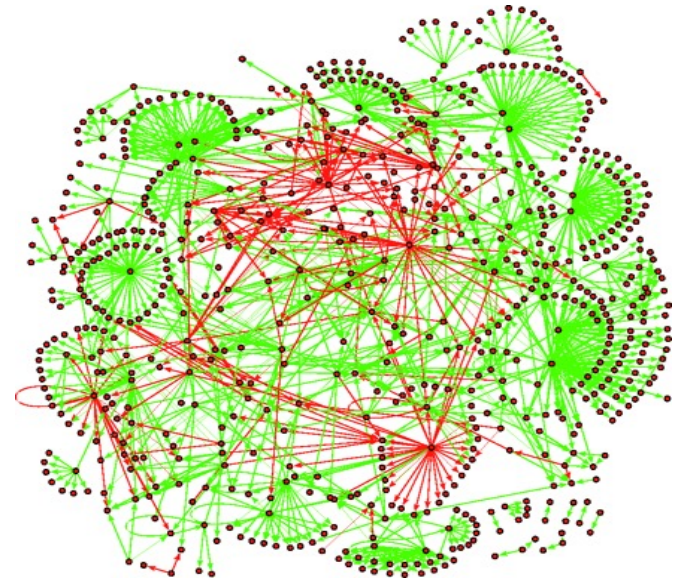
Per la costruzione di nuovi circuiti genetici che si comportino in modo programmabile e prevedibile è molto utile la conoscenza delle proprietà regolative dei *network motif*.

I network regolativi possono essere molto complessi...



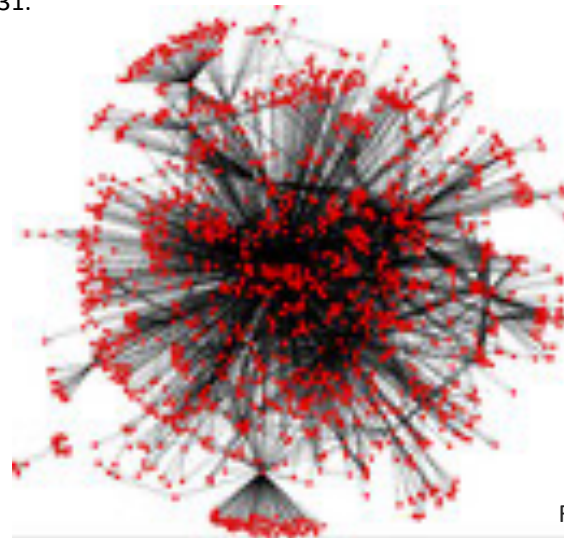
Regulatory network in *Arabidopsis*

Thum *et al.*, (2008) *BMC Systems Biology* 2:31.



Regulatory network in yeast

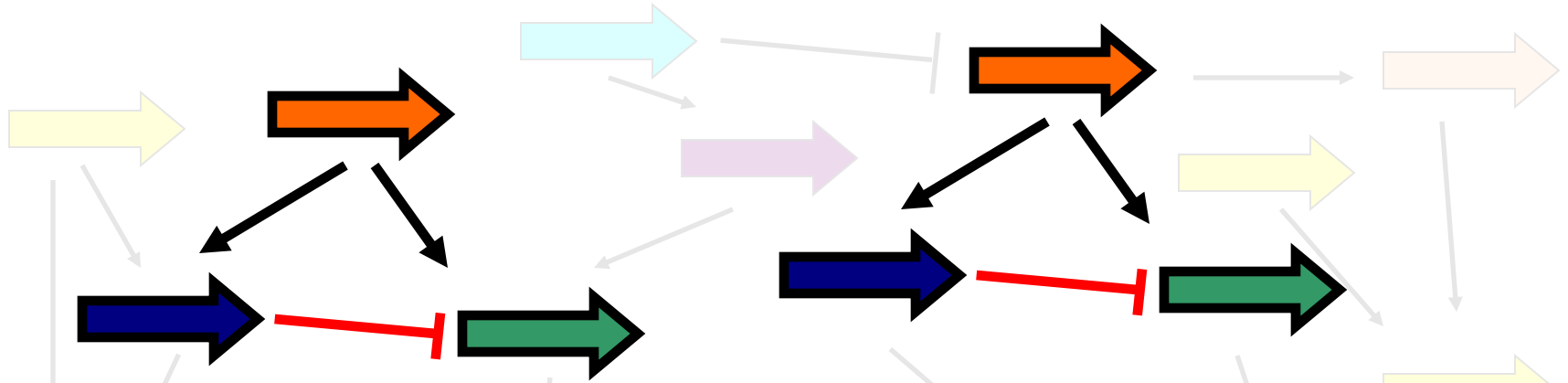
Bornholdt (2008) *J R Soc Interface* 5:S85-S94.



Regulatory network in *E. coli*

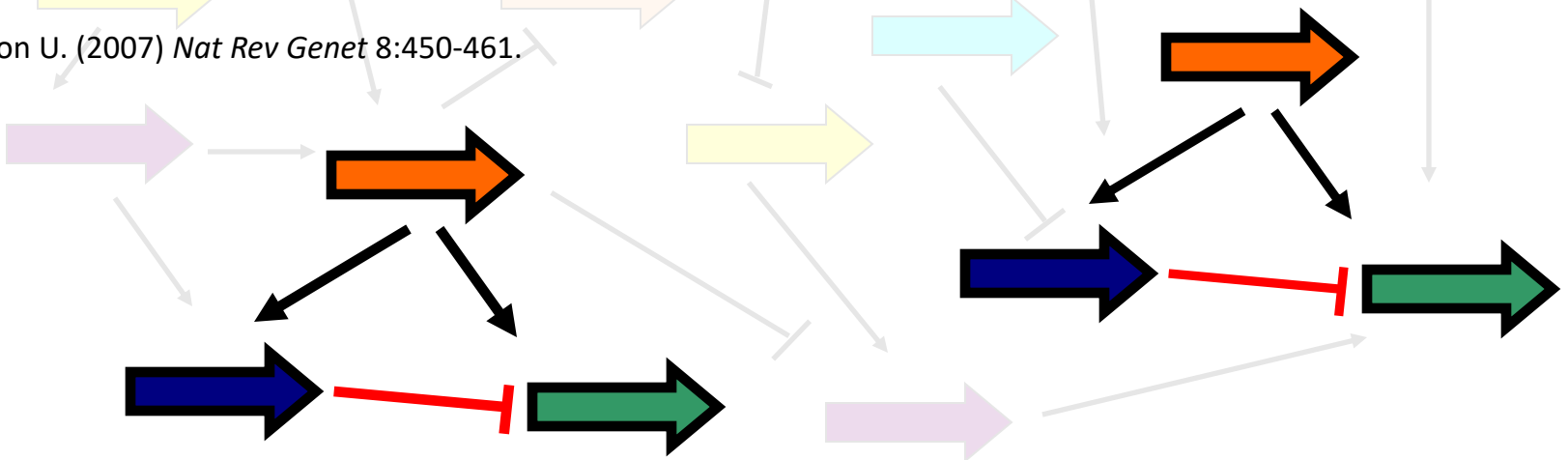
Freyre-Gonzalez *et al.*, (2010) *Nat Education* 3:24.

...ma sono composti da motivi (*network motifs*) ricorrenti !



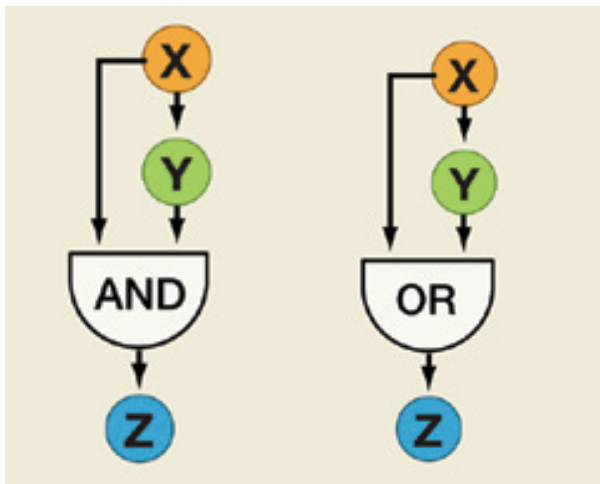
“The transcription networks of well-studied microorganisms appear to be made up of a small set of recurring regulation patterns, called **network motifs**. The same network motifs have recently been found in diverse organisms from bacteria to humans, suggesting that they **serve as basic building blocks of transcription networks.**”

Alon U. (2007) *Nat Rev Genet* 8:450-461.



Network motifs per la risposta agli stimoli: Coherent FFL

Nel Coherent Feedforward loop di tipo 1 (CFFL1), i regolatori X e Y possono regolare il gene output Z seconda una funzione AND oppure OR (*logic gates*).



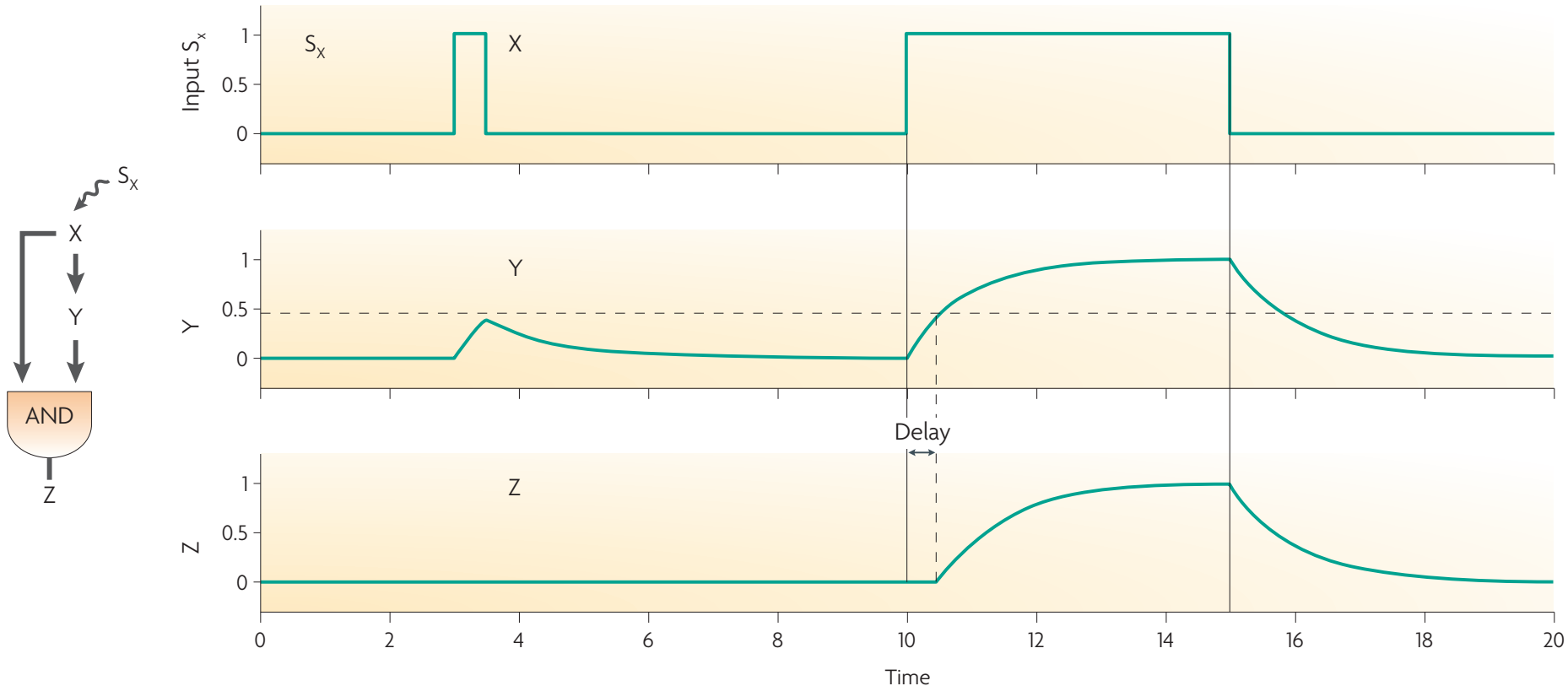
La *logic gate* **AND** prevede che entrambi i regolatori (**X e Y**) siano necessari ad attivare la trascrizione del gene output Z.

La *logic gate* **OR** prevede che i singoli regolatori (**X o Y**) siano sufficienti ad attivare la trascrizione del gene output Z.

Le *logic gate* **OR** oppure **AND** conferiscono proprietà differenti a questi due tipi di CFFL1.

Network motifs per la risposta agli stimoli: Coherent FFL

Un Coherent Feedforward loop di tipo 1 (CFFL1) con logic gate AND porta ad una attivazione ritardata del gene output Z rispetto alla percezione dello stimolo da parte del regolatore X (ritardo nello stato ON), mentre l'inattivazione del gene output Z avviene simultaneamente alla perdita dello stimolo che attiva X (nessun ritardo nello stato OFF). Ciò permette di "filtrare" degli stimoli transienti che altrimenti attiverebbero l'output Z quando non è necessario.

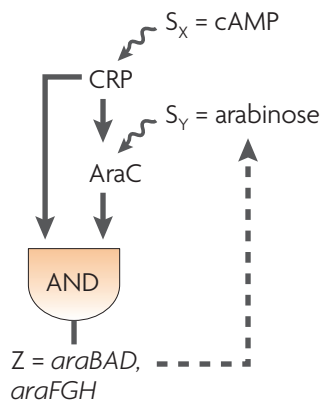


Network motifs per la risposta agli stimoli: Coherent FFL

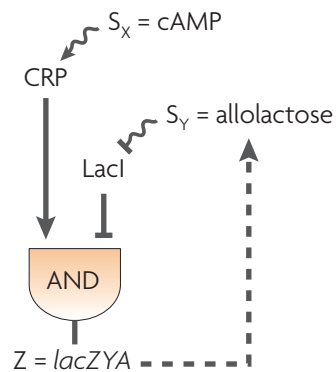
Un Coherent Feedforward loop di tipo 1 (CFFL1) con logic gate AND porta ad una attivazione ritardata del gene output Z rispetto alla percezione dello stimolo da parte del regolatore X (ritardo nello stato ON), mentre l'inattivazione del gene output Z avviene simultaneamente alla perdita dello stimolo che attiva X (nessun ritardo nello stato OFF). Ciò permette di "filtrare" degli stimoli transienti che altrimenti attiverebbero l'output Z quando non è necessario.

Ci sono moltissimi esempi di CFFL di tipo 1 con *logic gate* AND. Uno degli esempi più noti è la regolazione dei geni per la degradazione dell'arabinosio in *E. coli*.

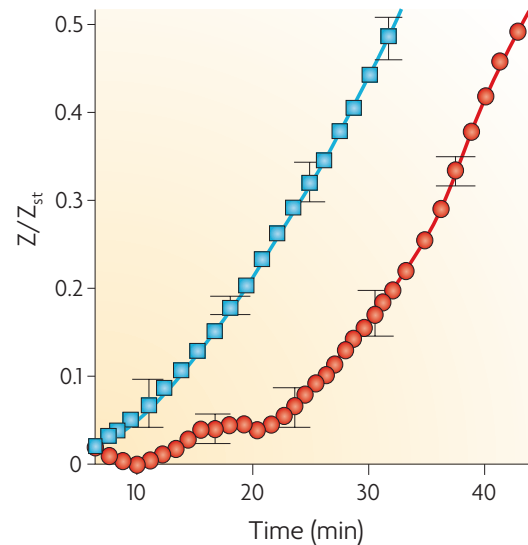
Arabinose system



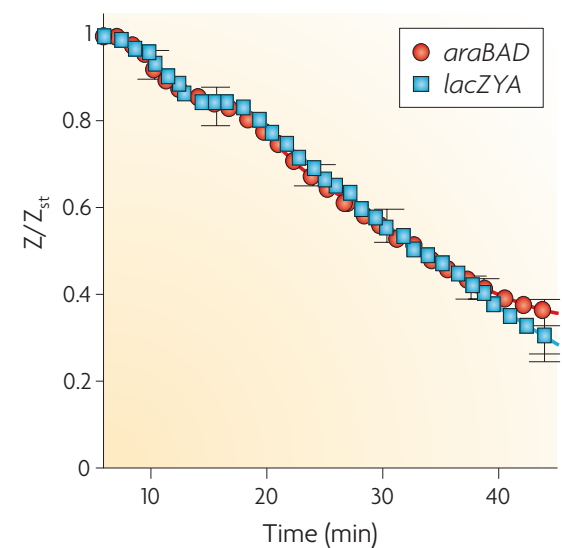
Lac system



ON step of S_x

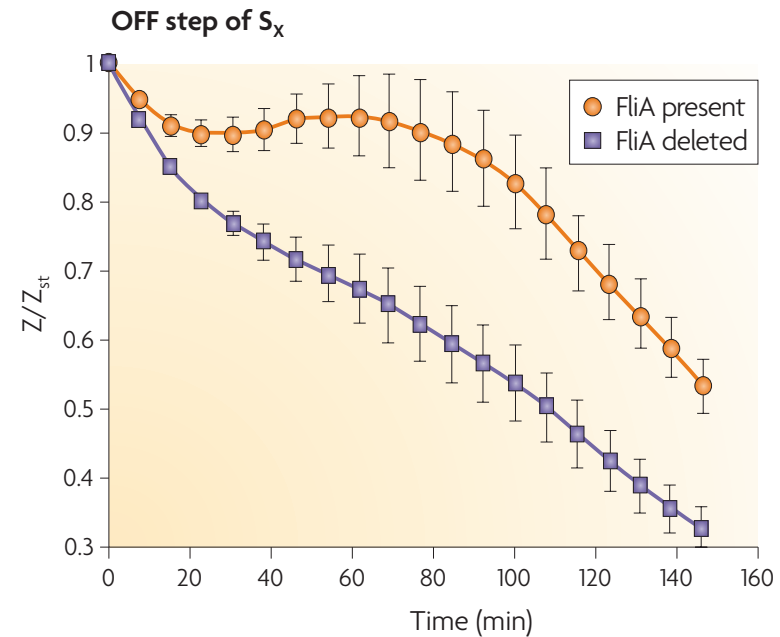
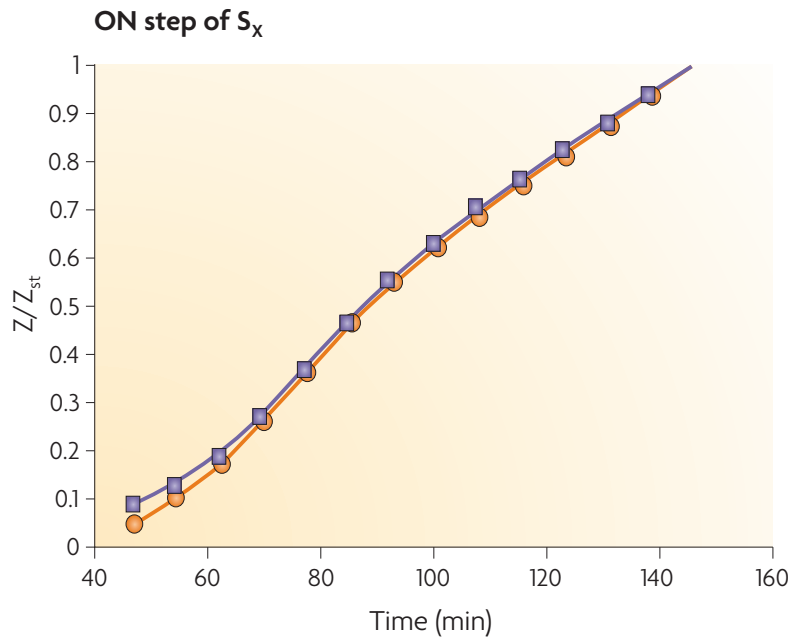
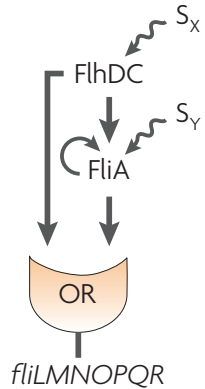


OFF step of S_x



Network motifs per la risposta agli stimoli: Coherent FFL

Un Coherent Feedforward loop di tipo 1 (CFFL1) con logic gate OR porta ad una attivazione immediata del gene output Z rispetto alla percezione dello stimolo da parte del regolatore X (nessun ritardo nello stato ON), mentre l'inattivazione del gene output Z avviene in modo ritardato rispetto alla perdita dello stimolo che attiva X (ritardo nello stato OFF). Ciò permette di "filtrare" l'assenza transiente dello stimolo, che altrimenti porterebbe all'inattivazione del gene output Z.



Network motifs per le biotecnologie

I Feedback Loops negativi tendono a generare oscillazioni. Su questo tipo di *network motif* si basano i ritmi circadiani.

Nature. 2010 January 21; 463(7279): 326–330. doi:10.1038/nature08753.

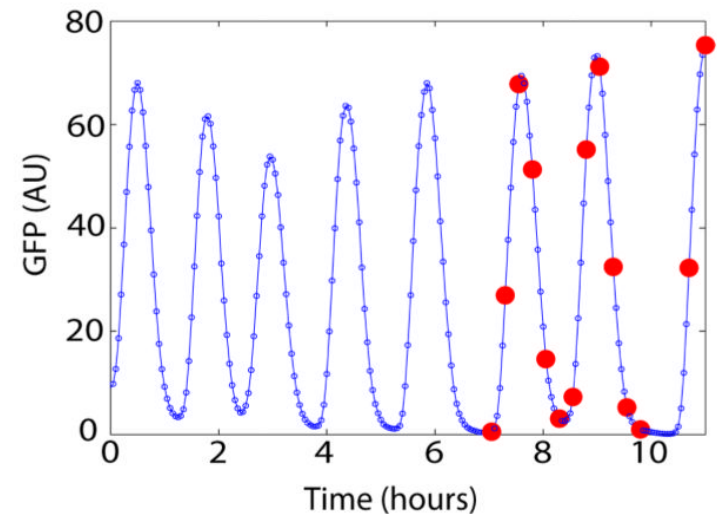
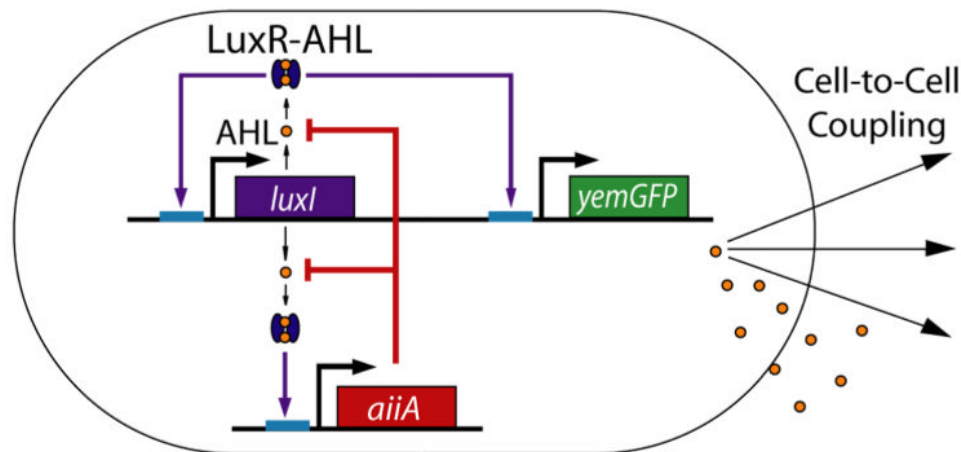
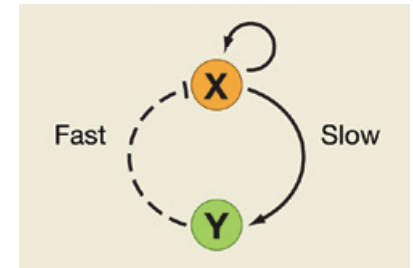
A synchronized quorum of genetic clocks

Tal Danino^{1,*}, Octavio Mondragón-Palomino^{1,*}, Lev Tsimring^{2,†}, and Jeff Hasty^{1,2,3,4,†}

¹Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA

²BioCircuits Institute, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA

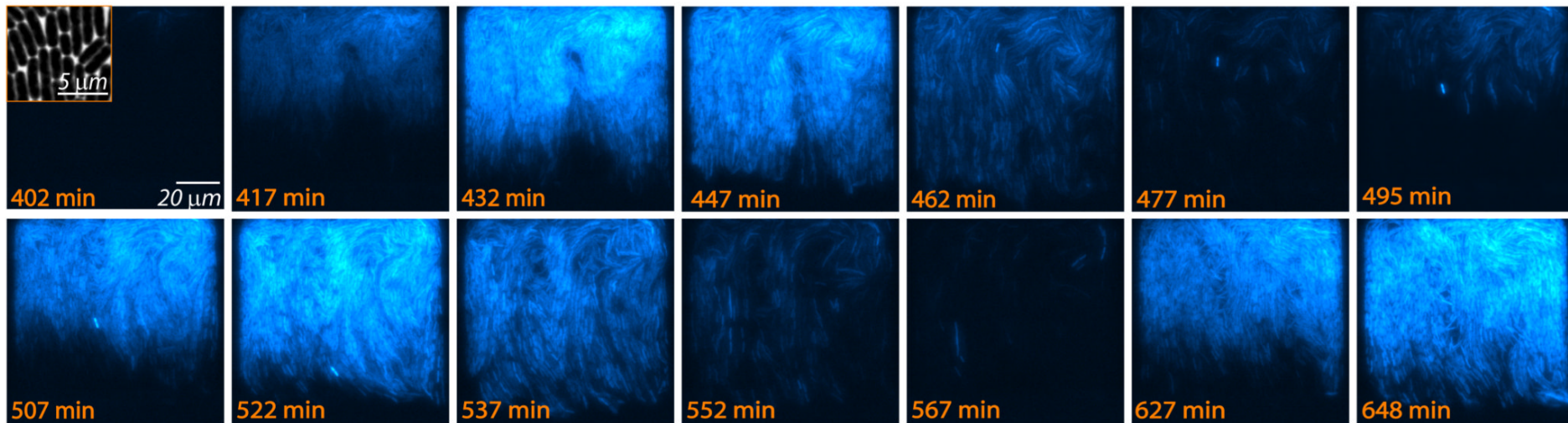
³Molecular Biology Section, Division of Biological Science, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA



Network motifs per le biotecnologie

I Feedback Loops negativi tendono a generare oscillazioni. Su questo tipo di *network motif* si basano i ritmi circadiani.

Emissione di fluorescenza dei batteri contenenti il sistema di regolazione oscillante durante il tempo. Queste sono foto di una singola microcella (o biopixel) di un *microfluidic device* in cui i batteri sono contenuti.



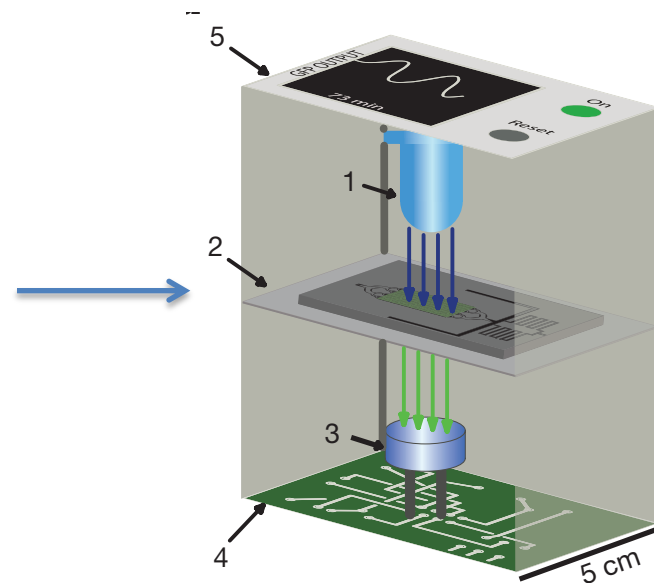
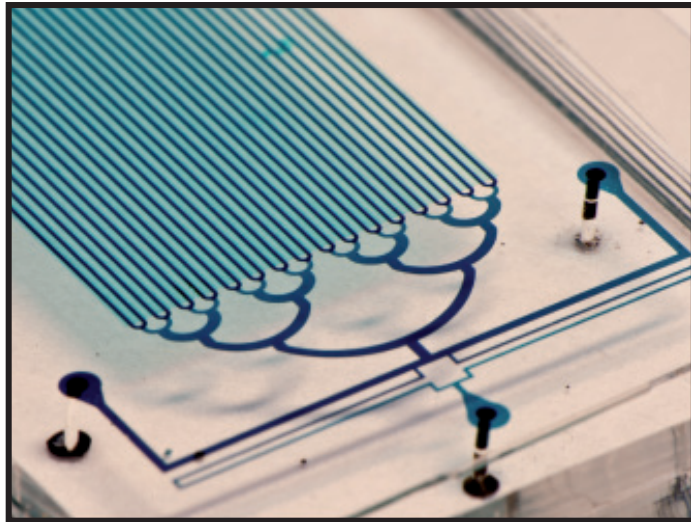
Network motifs per le biotecnologie

Lo studio dei *network motifs* sta aprendo la via a nuovi approcci biotecnologici che utilizzino tali sistemi regolativi per conferire alle produzioni e, più in generale, ai processi biotecnologici, l'andamento desiderato.

A sensing array of radically coupled genetic 'biopixels'

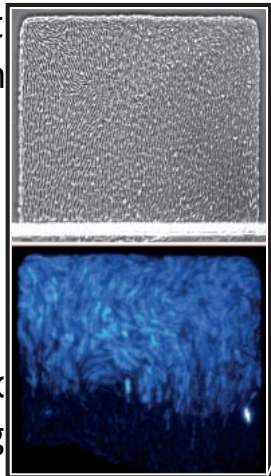
Arthur Prindle^{1*}, Phillip Samayoa^{2*}, Ivan Razinkov¹, Tal Danino¹, Lev S. Tsimring³ & Jeff Hasty^{1,2,3,4}

In questo lavoro i ricercatori vogliono generare un sensore che si basi su variazioni di frequenza del segnale emesso, piuttosto che sull'ampiezza di tale segnale. Le variazioni di frequenza hanno il vantaggio di poter essere facilmente monitorate, trasferite e digitalizzate. Inoltre, le variazioni di frequenza sono meno sensibili a differenze nello strumento di lettura e non devono essere continuamente calibrate.

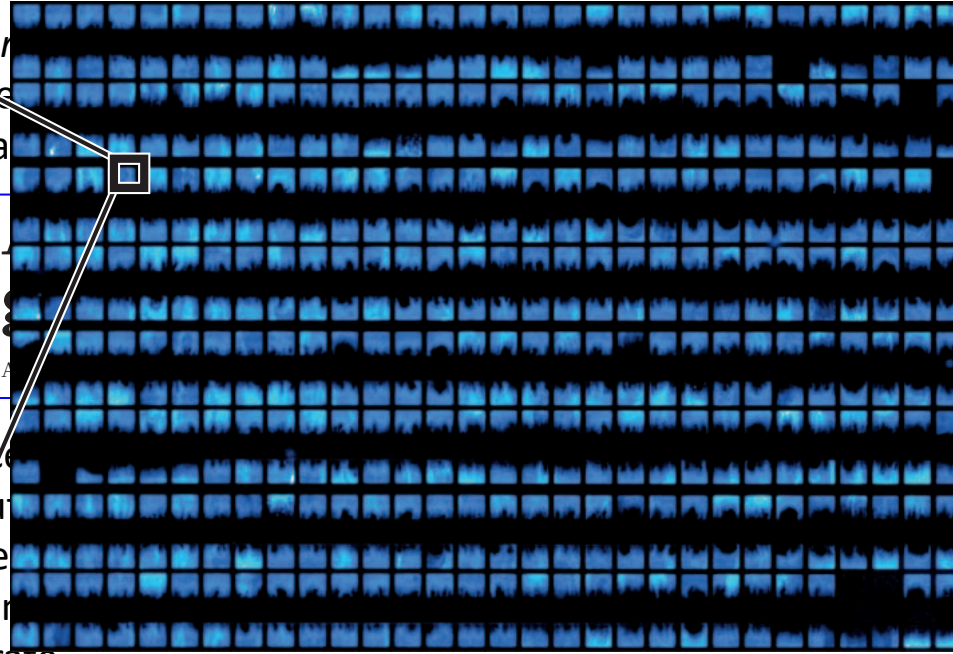


Network motifs per le biotecnologie

Lo studio dei *network motifs* in sistemi biologici è fondamentale per l'analisi della loro struttura e funzione.



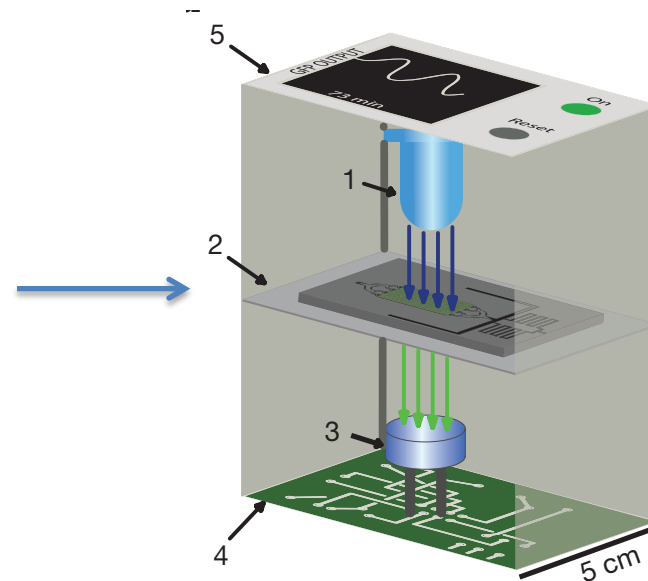
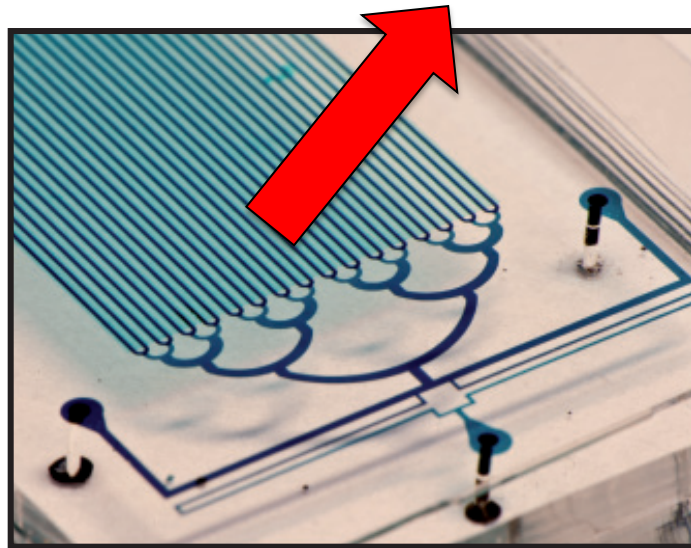
In alcuni sistemi biologici, le variazioni di frequenza del segnale sono un vantaggio di poter essere calibrate. In altri, le variazioni di frequenza sono un inconveniente che deve essere continuamente calibrato.



...ologici che utilizzino tali processi biotecnologici,

led

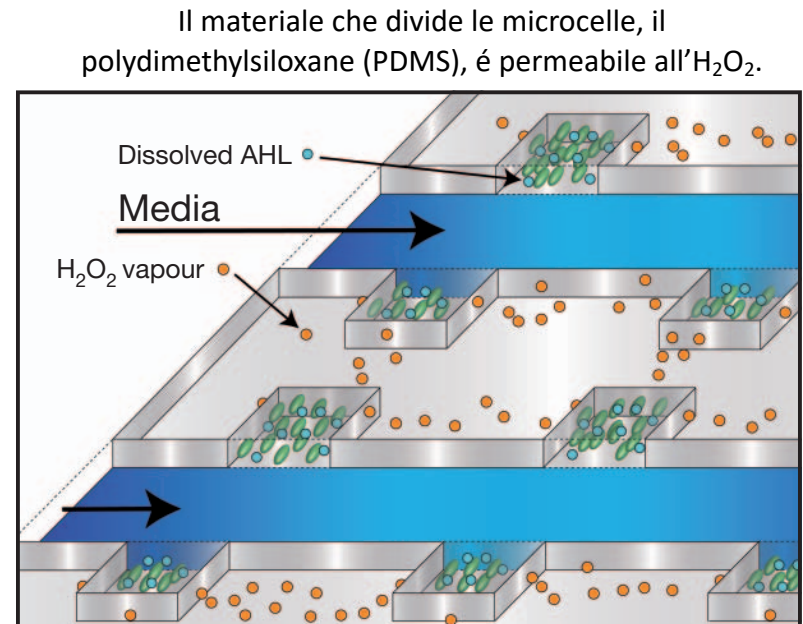
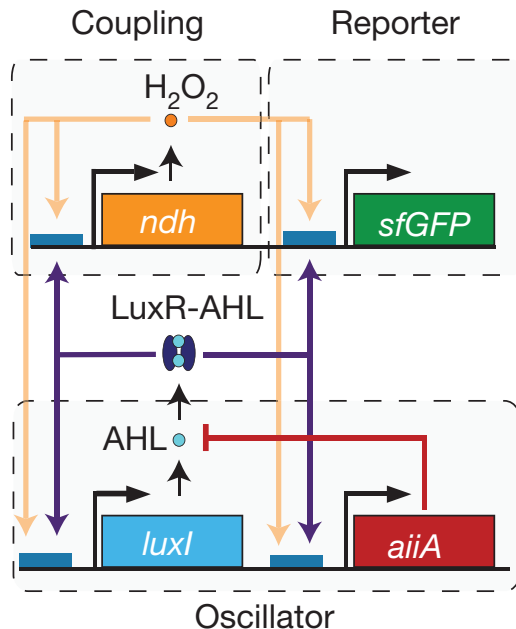
...variazioni di frequenza del segnale. Inoltre, le variazioni di frequenza hanno il vantaggio di poter essere calibrate. In altri, le variazioni di frequenza sono un inconveniente che deve essere continuamente calibrato.



Sviluppo di un biosensore a frequenza

I ricercatori avevano già generato un sistema sensore oscillante basato sul QS, ma non era possibile espandere questo sistema su scala macroscopica per poterlo accoppiare a sistemi di rilevamento del segnale ottico economici e rapidi. Questa limitazione è dovuta alla scarsa e lenta diffusibilità della molecola segnale del QS su scala macroscopica.

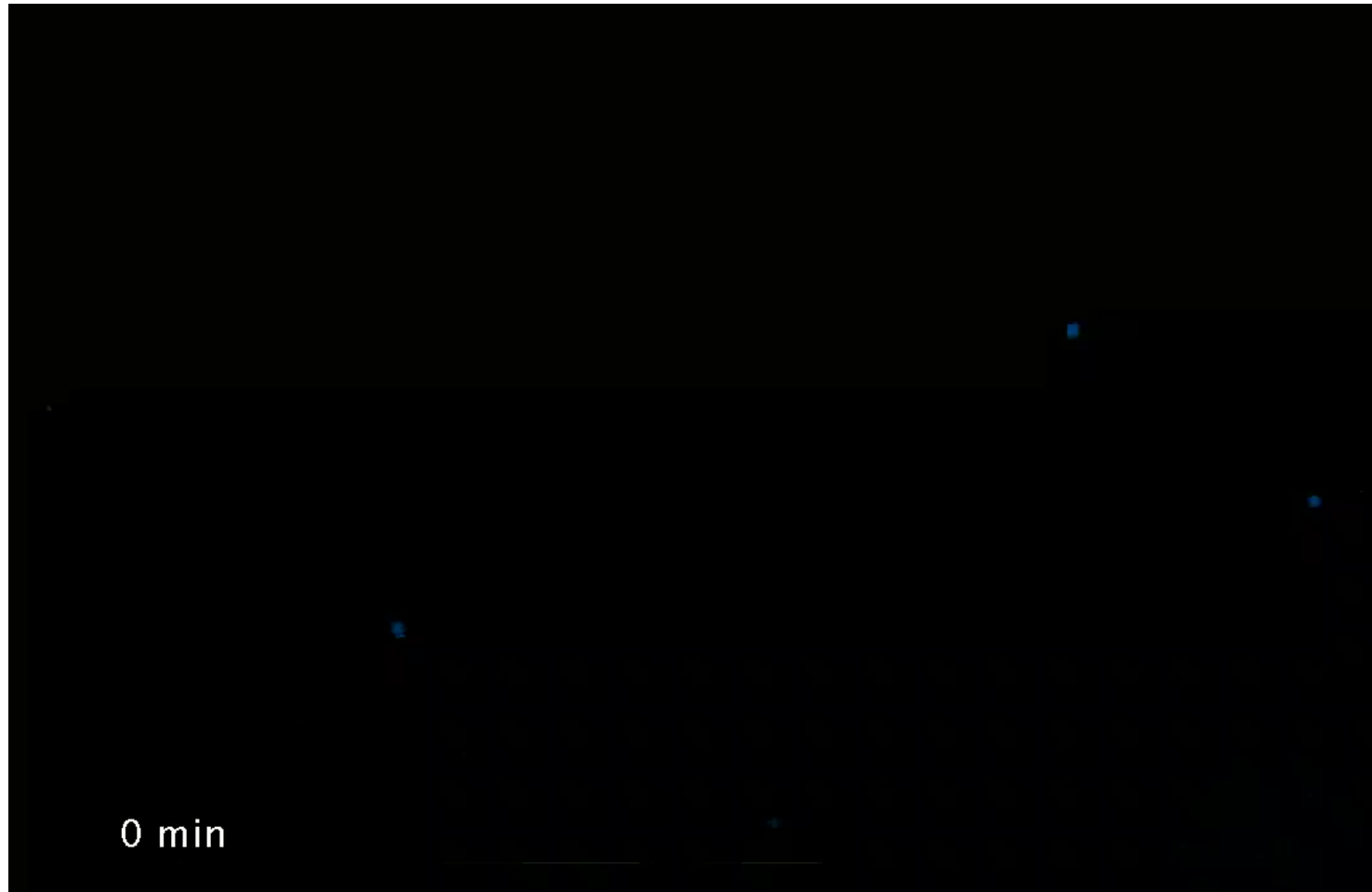
Per risolvere questo problema, i ricercatori hanno accoppiato al sistema oscillante basato sul QS, un sistema di segnalazione intercellulare basato sulla produzione ed il sensing dell' H_2O_2 . Questa molecola può facilmente e rapidamente diffondere da una microcella ad un'altra nel *microfluidic device*, e pertanto può sincronizzare gli oscillatori rappresentati dalle singole microcelle (o biopixels). Pertanto, il QS e la lattonasi AiiA sincronizzano l'espressione genica (produzione di GFP) nella singola microcella e la rendono oscillante, mentre l' H_2O_2 sincronizza queste oscillazioni tra una microcella e le microcelle adiacenti, rendendo il propagarsi dell'oscillazione stabile e sincronizzato anche su scale macroscopiche.



Sviluppo di un biosensore a frequenza

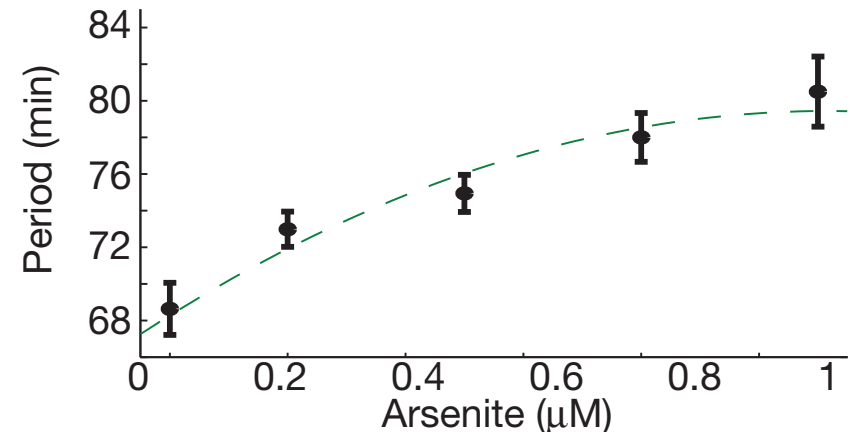
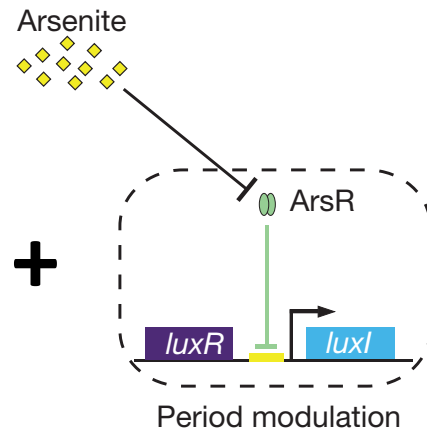
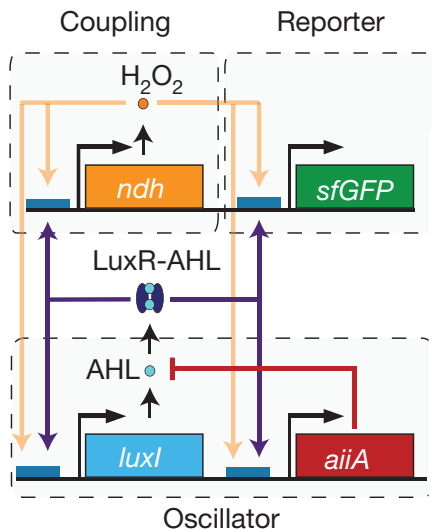
Ricapitolando, in una singola microcella il sistema oscillante funziona, però quando si hanno migliaia di microcelle in un unico *microfluidic device*, ogni microcella oscilla in modo autonomo.

Tutte le microcelle oscillano all'unisono solo quando l' H_2O_2 prodotto nelle singole microcelle sincronizza le oscillazioni tra una microcella e l'altra.



Sviluppo di un biosensore a frequenza

A questo punto i ricercatori hanno inserito un ulteriore elemento nel sistema, un gene *luxI* addizionale sotto il controllo di un promotore represso da ArsR. Il repressore ArsR, espresso in modo costitutivo, reprime l'espressione del gene *luxI* addizionale, e quindi la sintesi ulteriore di molecola segnale del QS, a meno che nel mezzo di crescita non sia presente arsenito. Quindi, in presenza di arsenito, ArsR non sarà più in grado di reprimere l'espressione del gene *luxI* addizionale, e ciò porterà ad un aumento nei livelli di molecola segnale del QS prodotta. Questo effetto è rilevabile come un aumento nell'ampiezza e nel periodo delle oscillazioni.



Sviluppo di biocomputers

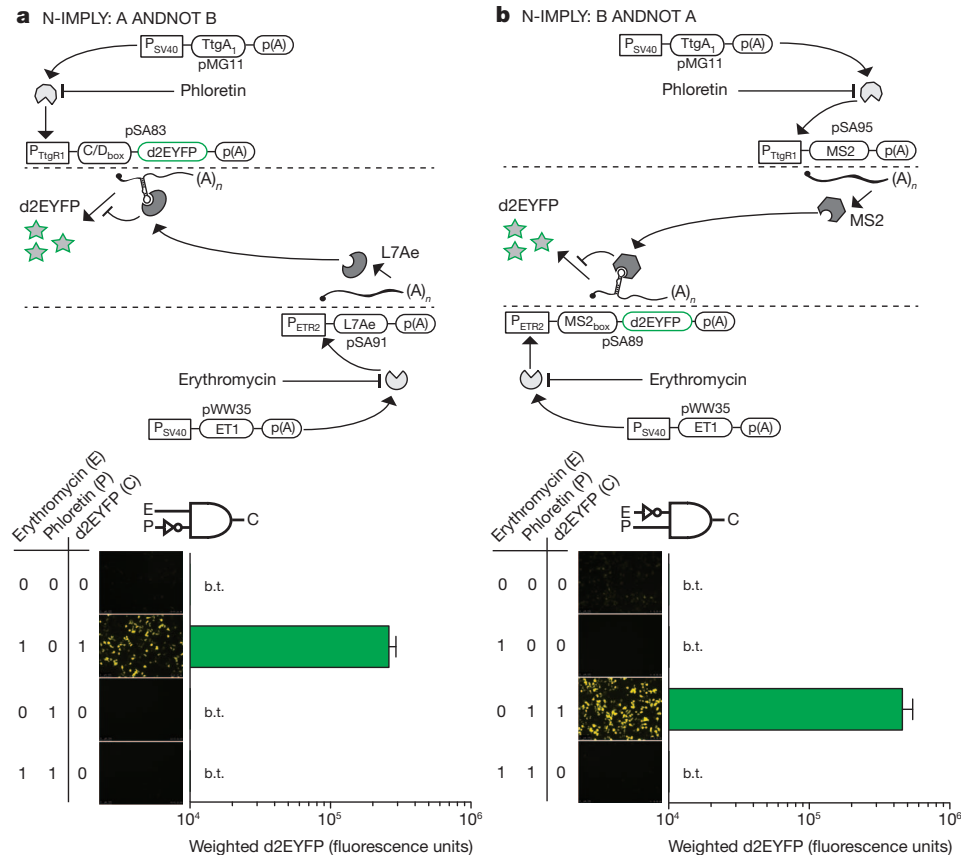
I *network motifs* possono essere assemblati per generare delle risposte integrate prevedibili, per quanto complesse, agli stimoli. In questo modo possono essere “computeate” delle informazioni.

LETTER

doi:10.1038/nature11149

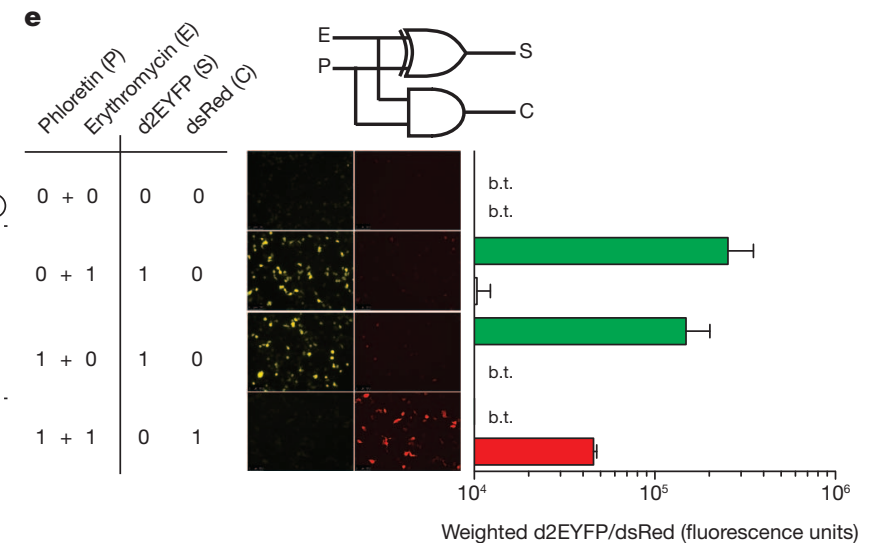
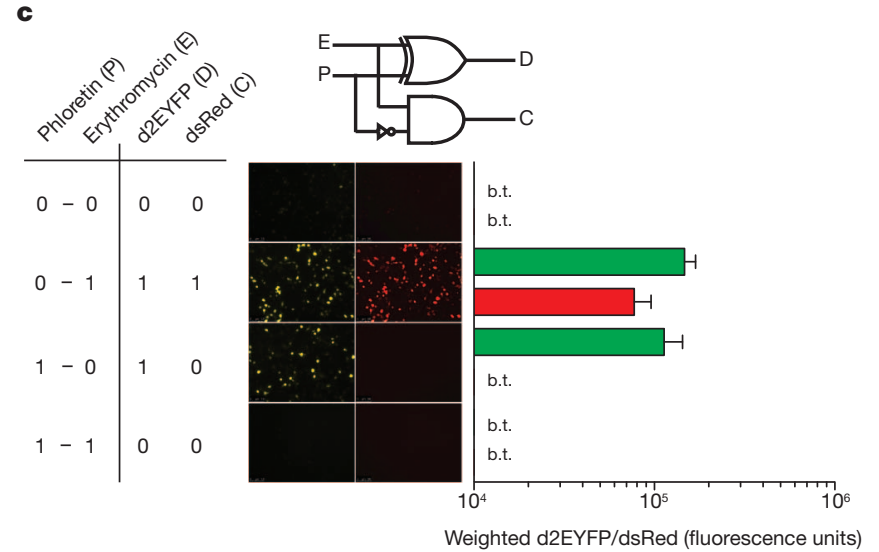
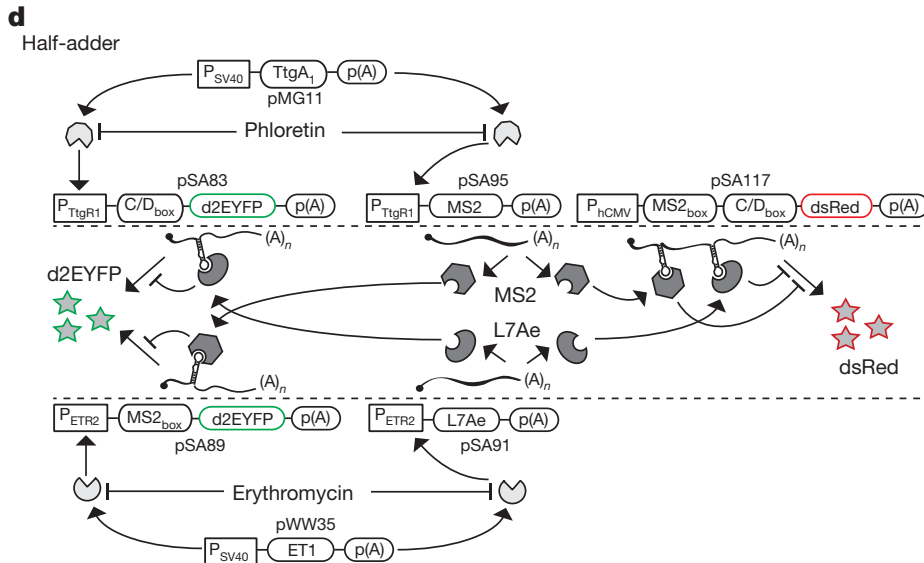
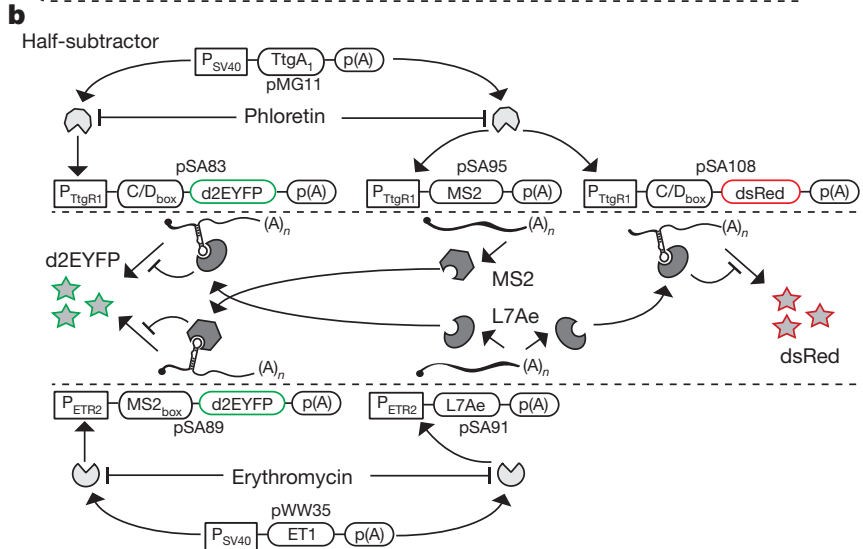
Programmable single-cell mammalian biocomputers

Simon Ausländer¹, David Ausländer¹, Marius Müller¹, Markus Wieland¹ & Martin Fussenegger^{1,2}



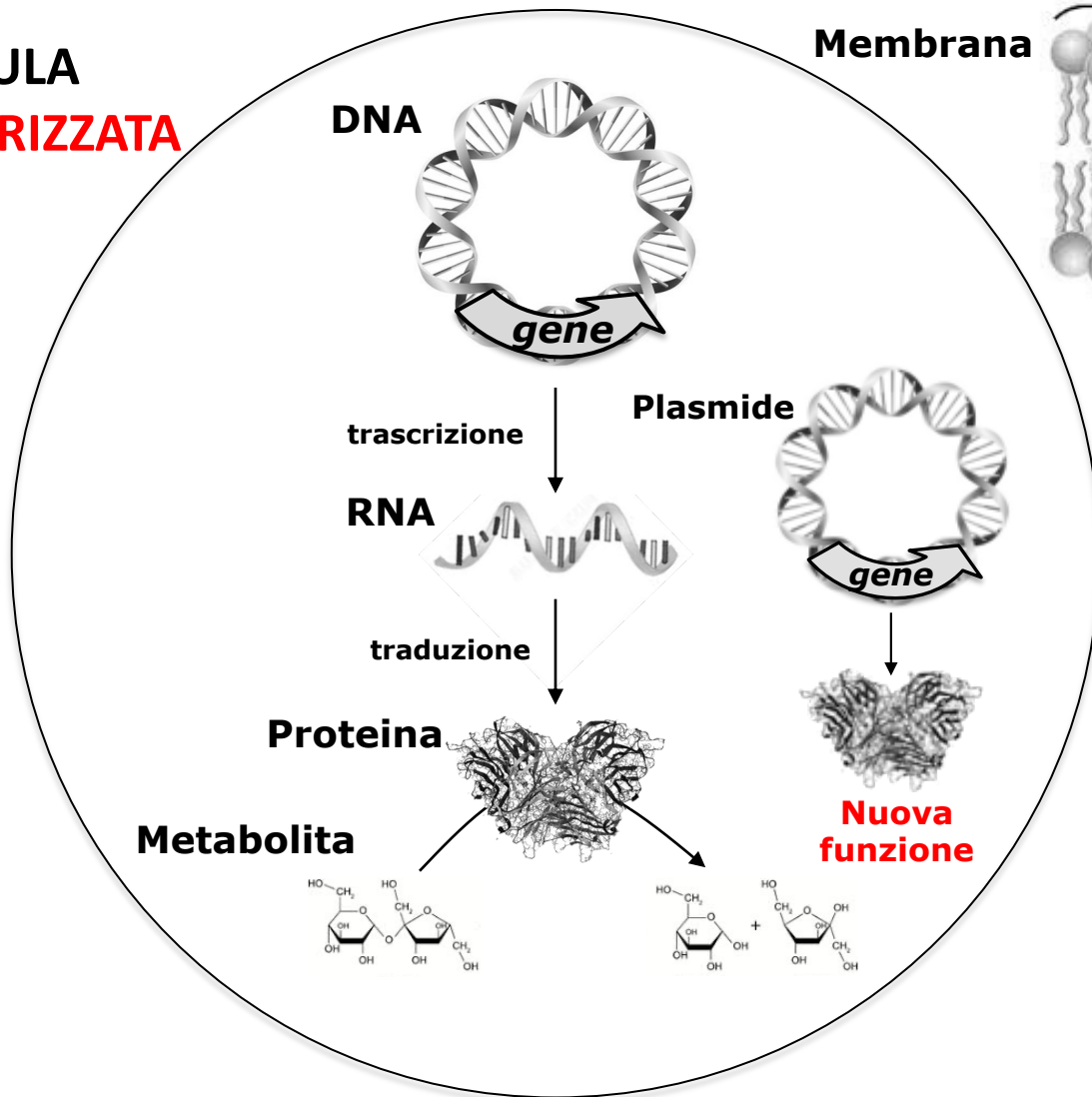
Sviluppo di biocomputers

I *network motifs* possono essere assemblati per generare delle risposte integrate prevedibili, per quanto complesse, agli stimoli. In questo modo possono essere “computeate” delle informazioni.

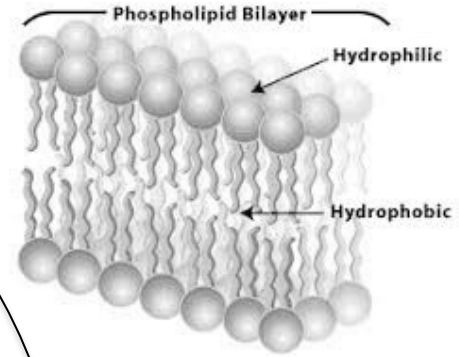


Purtroppo, nonostante il *design* dei nuovi circuiti genetici ottimizzati mediante simulazioni *in silico* possa essere perfetto, a volte il microrganismo che viene funzionalizzato con tali circuiti non si comporta come atteso. Ciò avviene perché i nuovi circuiti genetici inseriti nel microrganismo possono interagire in modo indesiderato con i processi già in atto nella cellula, ovvero può non essere ortogonale rispetto ai circuiti genetici naturali.

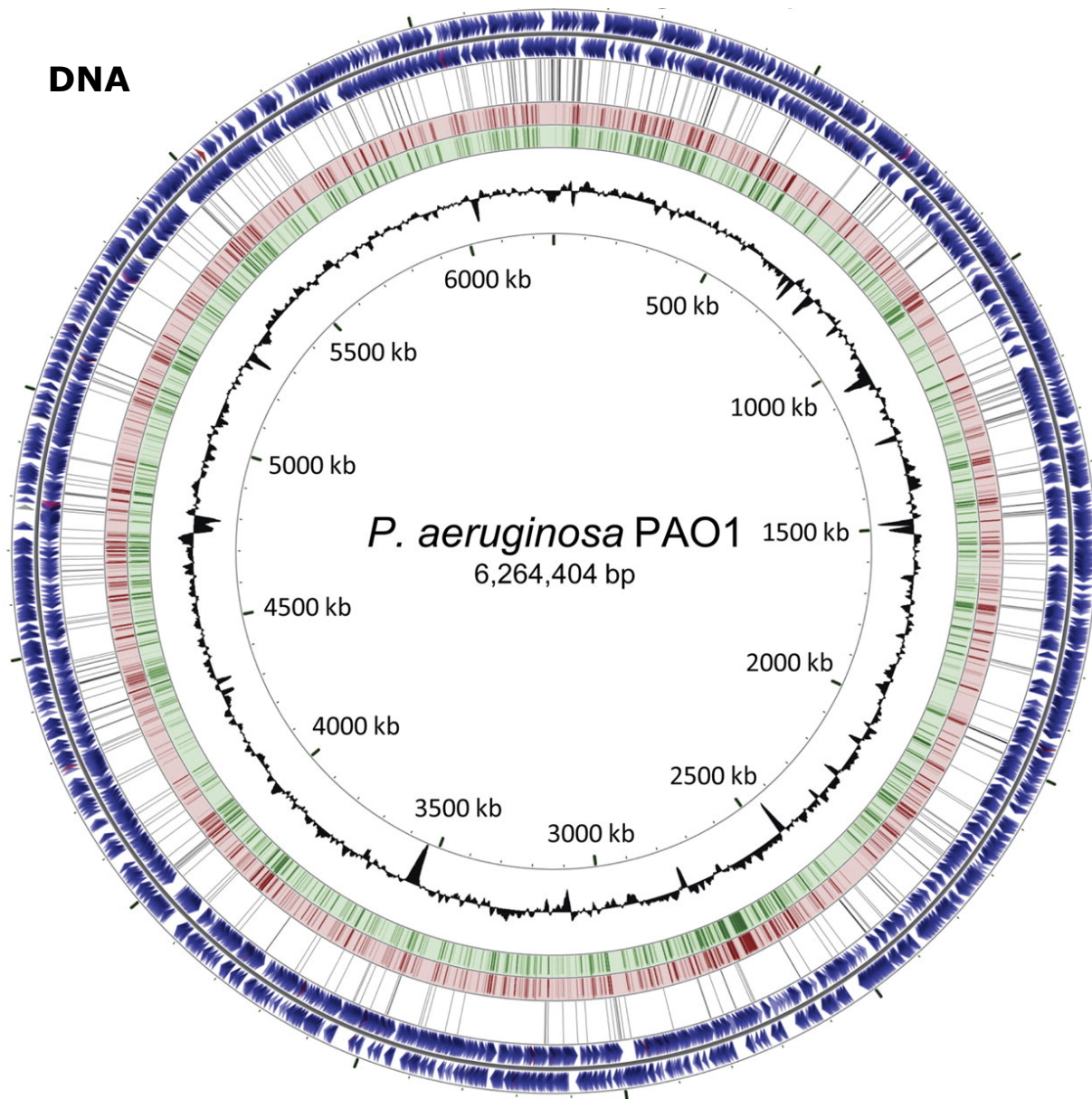
**CELLULA
INGEGNERIZZATA**



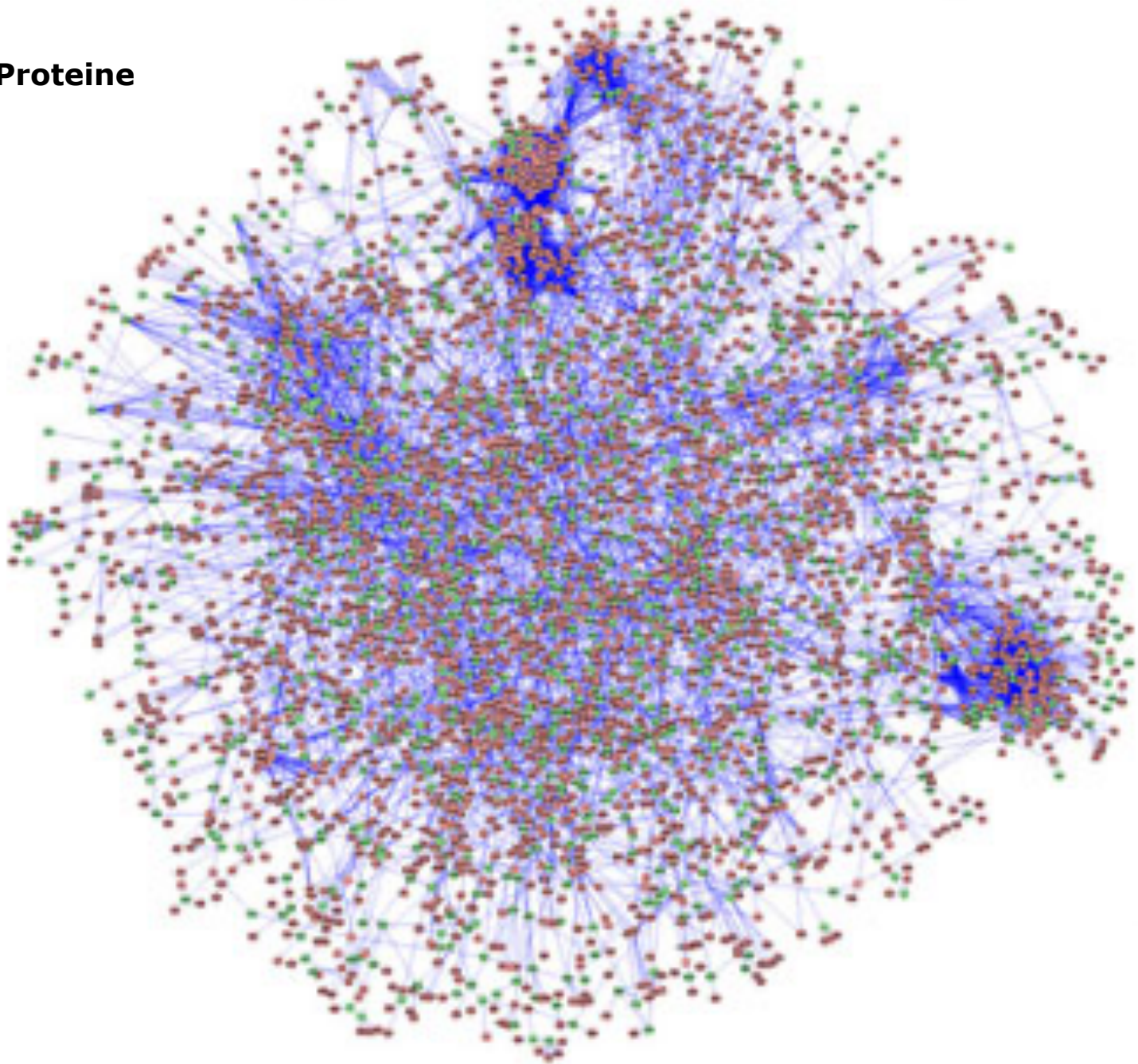
Membrana



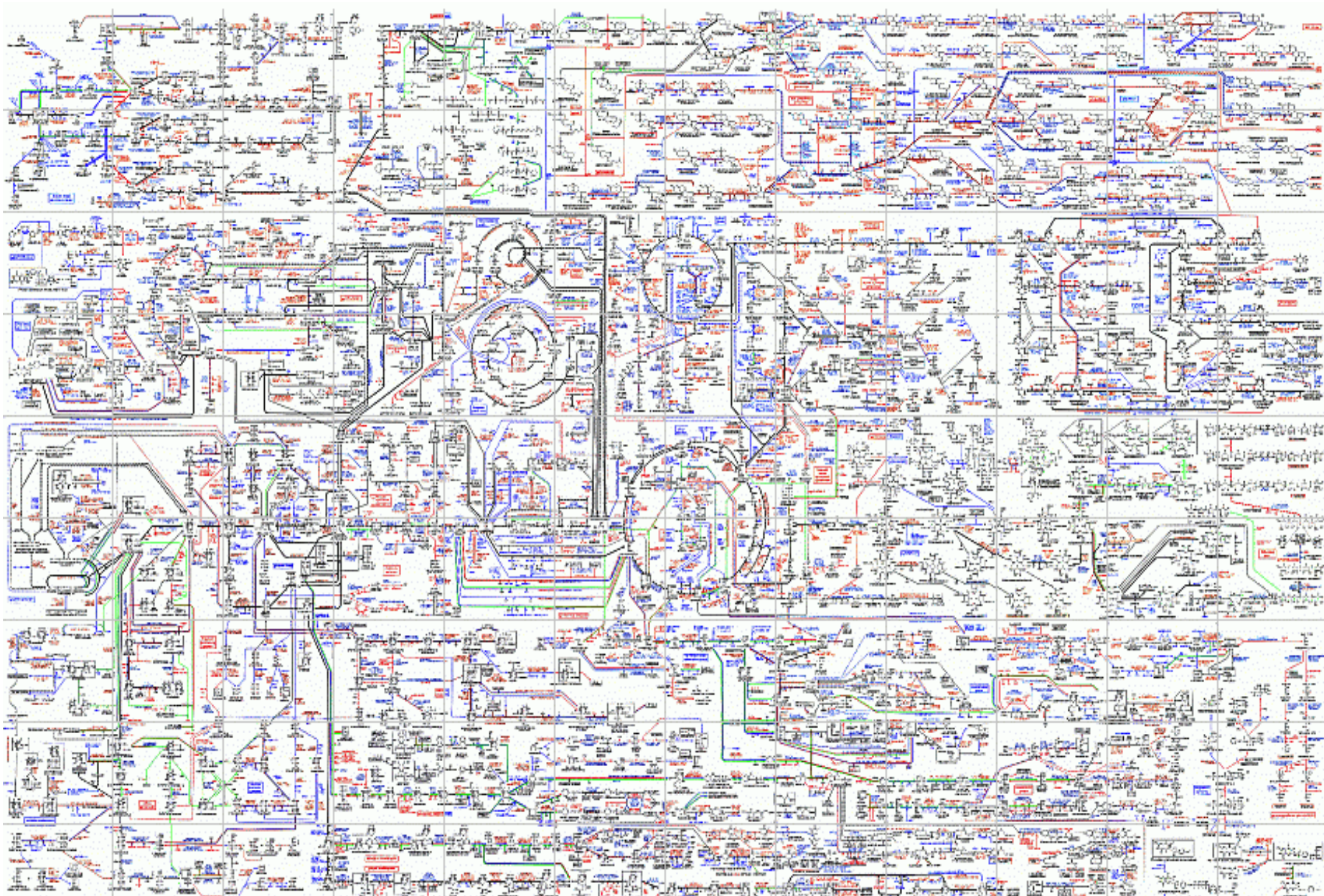
DNA



Proteine

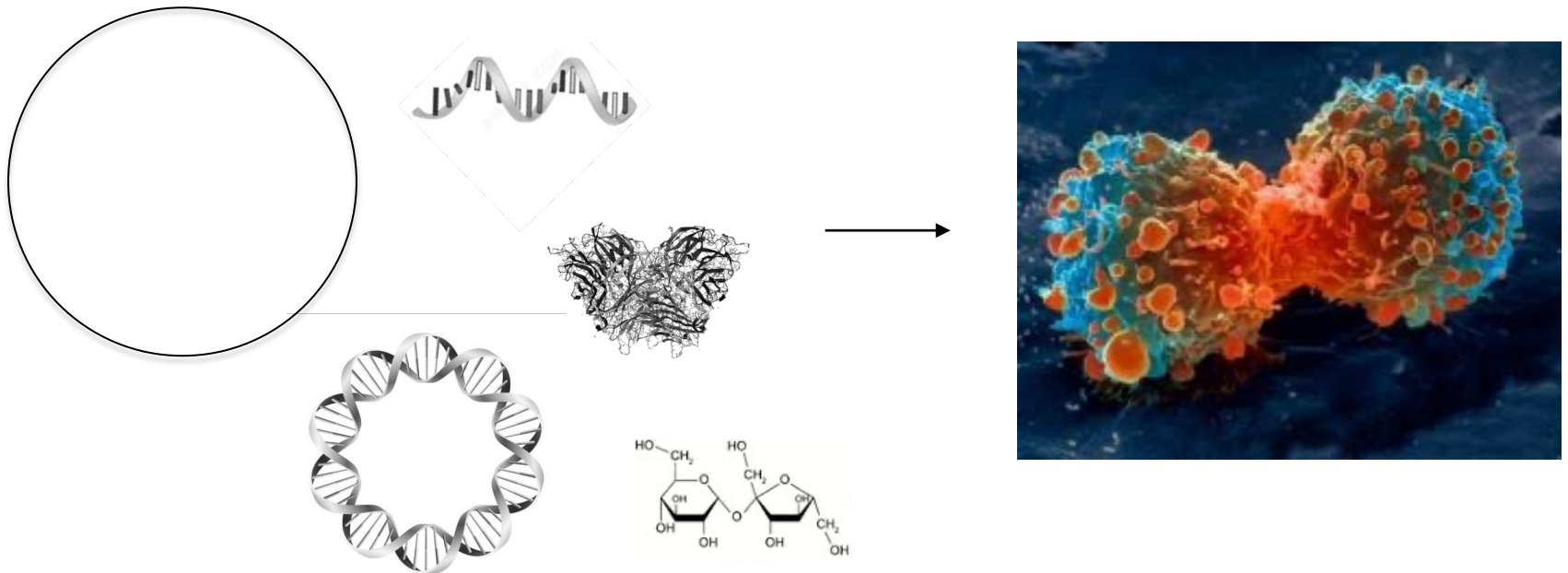


Metaboliti



La complessità delle cellule naturali limita la nostra comprensione della loro funzionalità

E' molto difficile, se non impossibile, prevedere possibili interazioni tra i nuovi circuiti genetici sintetici e i processi cellulari endogeni.



La cellula minima

Uno dei principali obiettivi della biologia sintetica è quello di creare delle **cellule minime** estremamente **specializzate nello svolgere solo il compito richiesto**, andando ad eliminare tutte le funzioni accessorie evolute in milioni di anni in risposta all'ambiente, e che per un microrganismo specializzato da utilizzare in laboratorio come una **nanofactory** o un **soft-nanorobot** sono superflue ed energeticamente svantaggiose.

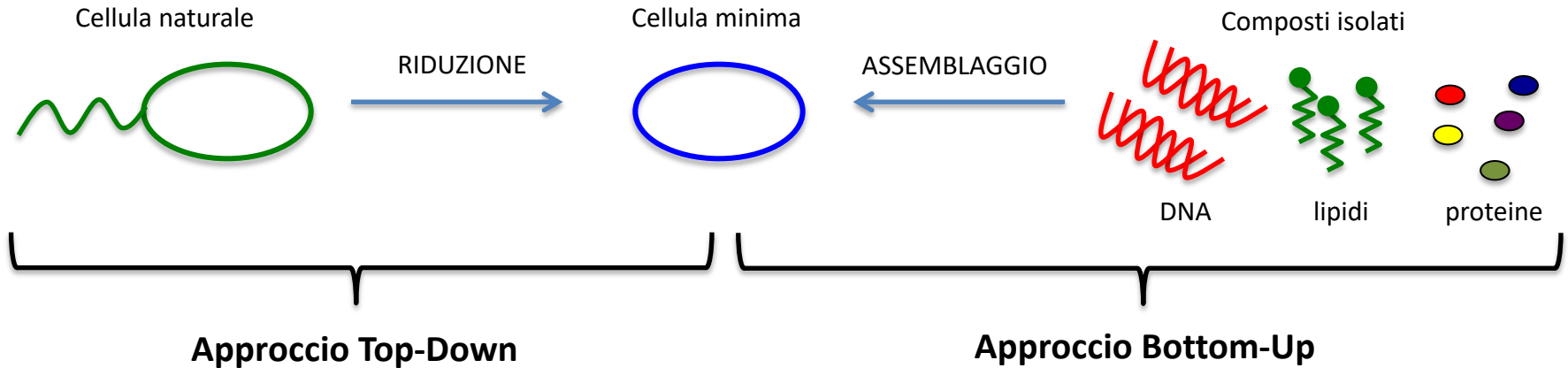
Se ad esempio volete utilizzare un microrganismo per la produzione di un metabolita di interesse commerciale o di un enzima, oggi dovete fornire al microrganismo energia sufficiente per produrre, oltre al prodotto che vi interessa, anche **migliaia di altre molecole non necessarie al processo**. Inoltre, avete il problema di dover purificare il prodotto di interesse dalle altre migliaia di molecole che non vi interessano.

Un altro aspetto di rilievo è che, poiché le cellule "naturali" sono estremamente complesse, quando al loro interno inserite dei circuiti genetici per conferire loro delle capacità particolari (es. produrre un metabolita di interesse, fungere da biosensori, degradare sostanze tossiche), non è facilmente prevedibile quale sarà il reale comportamento delle cellule ingegnerizzate. Nelle cellule minime, al contrario, sarebbe possibile eliminare eventuali intersezioni tra vari processi metabolici e regolativi con il processo che volete sviluppare, così da avere un singolo processo **funzionale ortogonale** che proceda con la massima velocità, in modo prevedibile e senza interferenze.

Inoltre **una cellula minima è molto meno autonoma (più controllabile) e non evolve come una cellula "naturale"**. Anche per quanto riguarda il loro possibile impiego come agenti per *l'intelligent drug delivery*, come potrebbero evolvere batteri iniettati all'interno del corpo umano? Quale sarebbe il vostro grado di controllo su di essi? Sicuramente i *soft-nanorobot* sarebbero più sicuri.

La cellula minima

Due diversi approcci si stanno utilizzando per ottenere cellule minime.



Il concetto alla base di questo approccio è di partire da cellule naturali e ridurre il genoma andando ad eliminare tutti i geni superflui, non indispensabili all'auto-mantenimento, alla duplicazione e alle funzioni richieste.

Questo approccio cerca di ricreare le funzioni necessarie ad un organismo per auto-mantenersi, duplicarsi e svolgere la funzione richiesta, mediante assemblaggio delle componenti minime richieste.

Entrambi gli approcci richiedono la definizione delle componenti minime necessarie ad un organismo vivente per mantenere la propria identità e per replicarsi.

La cellula minima

In molti tentano di definire i minimi componenti necessari alla vita.

- 1) **Studio dei genomi minimi:** alcuni ricercatori partono da organismi con genomi molto ridotti e li confrontano per capire quali sia il core di geni essenziali. Non è così semplice perché molti microrganismi possono sfruttare metabolismi di altri organismi della comunità in cui vivono.
- 1) **Approcci di riduzione:** altri ricercatori cercano di ridurre i genomi andando ad eliminare frammenti di genomi o singoli geni in modo sequenziale. Molto difficile e laborioso. Se ad esempio si elimina un gene per una anti-tossina il microrganismo muore, a meno che non si elimini contemporaneamente anche il gene per la tossina.
- 1) **Approccio del *rational design*:** altri ricercatori ancora tentano di definire i componenti minimi necessari al mantenimento e alla replicazione di un organismo in modo razionale ed ingegneristico *in silico*. Molto complesso a causa della nostra limitata conoscenza dei processi alla base della vita.

Per ora siamo lontani da raggiungere l'obiettivo di generare una cellula minima sintetica mediante un approccio *Bottom-Up* che sia viva, ovvero che possa auto-mantenersi e replicarsi, ma stiamo raggiungendo dei traguardi intermedi. Infatti, ad oggi possiamo generare dei modelli cellulari basati su liposomi ("cellule minime semi-sintetiche") in grado di svolgere delle azioni in modo programmabile.

Il primo microrganismo sintetico

Da anni Craig Venter lavora ad un progetto che mira ad ottenere mediante un approccio *Top-Down* un microrganismo sintetico con genoma minimo. L'idea è quella di sintetizzare un genoma disegnato *ad hoc* da inserire in uno *chassis* cellulare, così da generare una cellula minima programmabile secondo le proprie necessità.

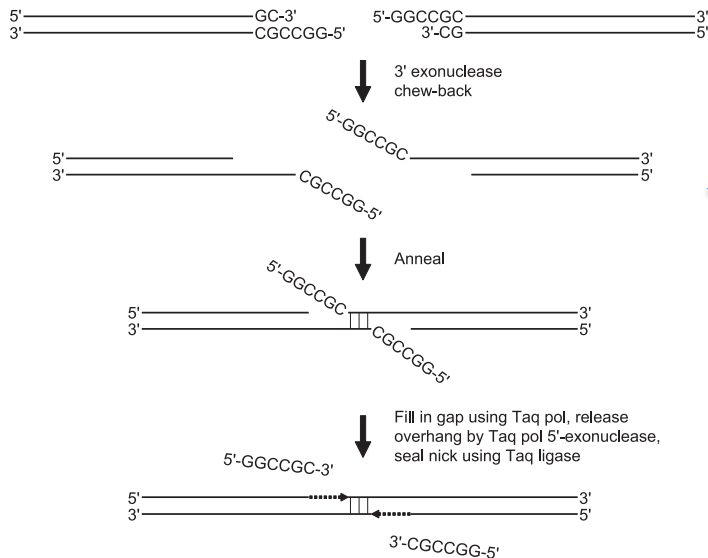
1° passaggio: sintesi di un cromosoma artificiale.

Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome

Daniel G. Gibson, Gwynedd A. Benders, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Holly Baden-Tillson, Jayshree Zaveri, Timothy B. Stockwell, Anushka Brownley, David W. Thomas, Mikkel A. Algire, Chuck Merryman, Lei Young, Vladimir N. Noskov, John I. Glass, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith*

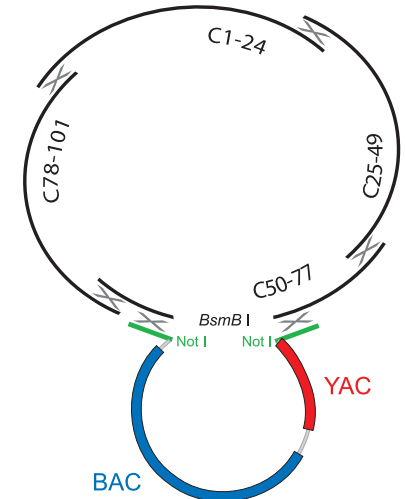
E' stato scelto il genoma di *Mycoplasma genitalium* G37, perché è molto piccolo (582970 bp – 525 geni).

Pezzi di genoma sintetici di 5-7 Kbp sono stati assemblati mediante vari passaggi di ricombinazione, prima *in vitro* e poi *in vivo*, così da ottenere un cromosoma sintetico.



← Ricombinazione *in vitro*

Ricombinazione *in vivo* →



Il primo microrganismo sintetico

2° passaggio: trapianto del genoma da una specie batterica ad un'altra.

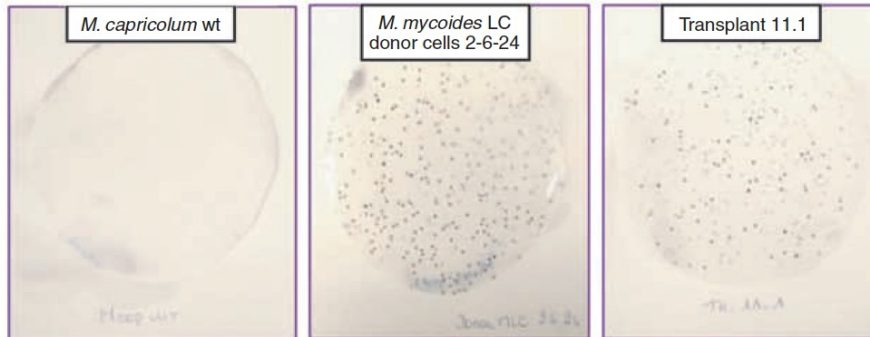
Genome Transplantation in Bacteria: Changing One Species to Another

Carole Lartigue, John I. Glass,* Nina Alperovich, Rembert Pieper, Prashanth P. Parmar, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, J. Craig Venter

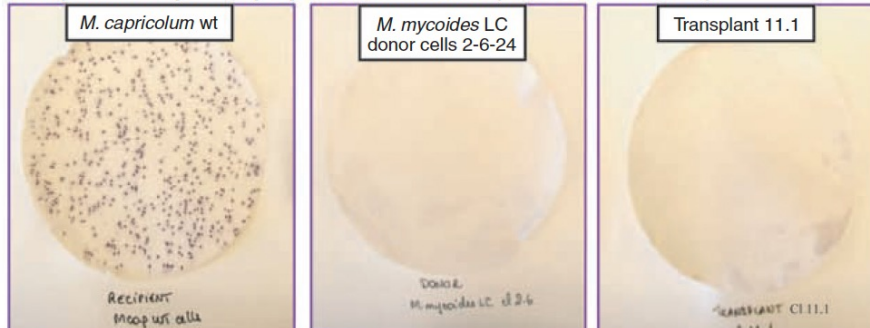
Il genoma di *Mycoplasma mycoides* è stato estratto (intero!) da questo batterio e trasferito in cellule di *Mycoplasma capricolum*.

Si sono ottenute delle colonie di *Mycoplasma* che contengono solo il genoma di *Mycoplasma mycoides*.

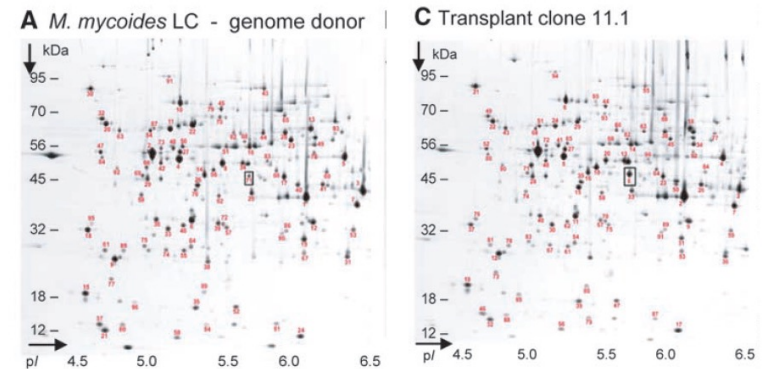
M. mycoides LC-specific monoclonal antibody (anti-VchL)



M. capricolum-specific polyclonal antibodies (anti-VmcE & VmcF)



2D-protein electrophoresis



Il primo microrganismo sintetico

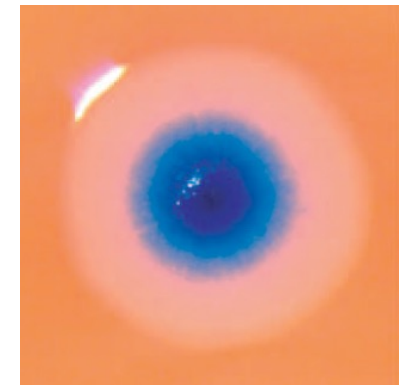
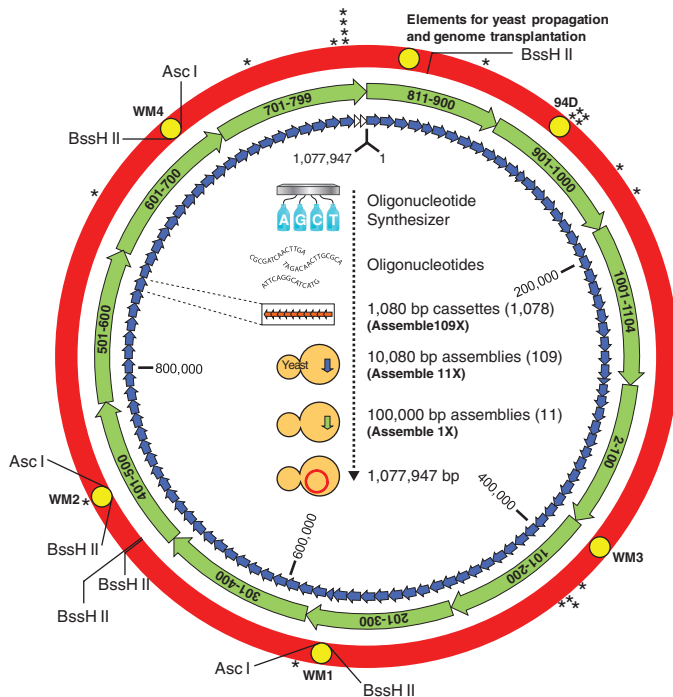
3° passaggio: unire i passaggi 1 e 2 (sintetizzare un genoma e trapiantarlo in un ospite).

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,¹ Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}

Il genoma di *Mycoplasma mycoides* è stato sintetizzato (in pezzi) ed assemblato mediante ricombinazione *in vitro* ed *in vivo*. Il cromosoma sintetico così ottenuto è stato impiantato in cellule di *Mycoplasma capricolum*.

Le cellule ottenute, in grado di replicarsi autonomamente, avevano il fenotipo di *Mycoplasma mycoides*. Il batterio con genoma sintetico è stato ribattezzato *syn1.0*.

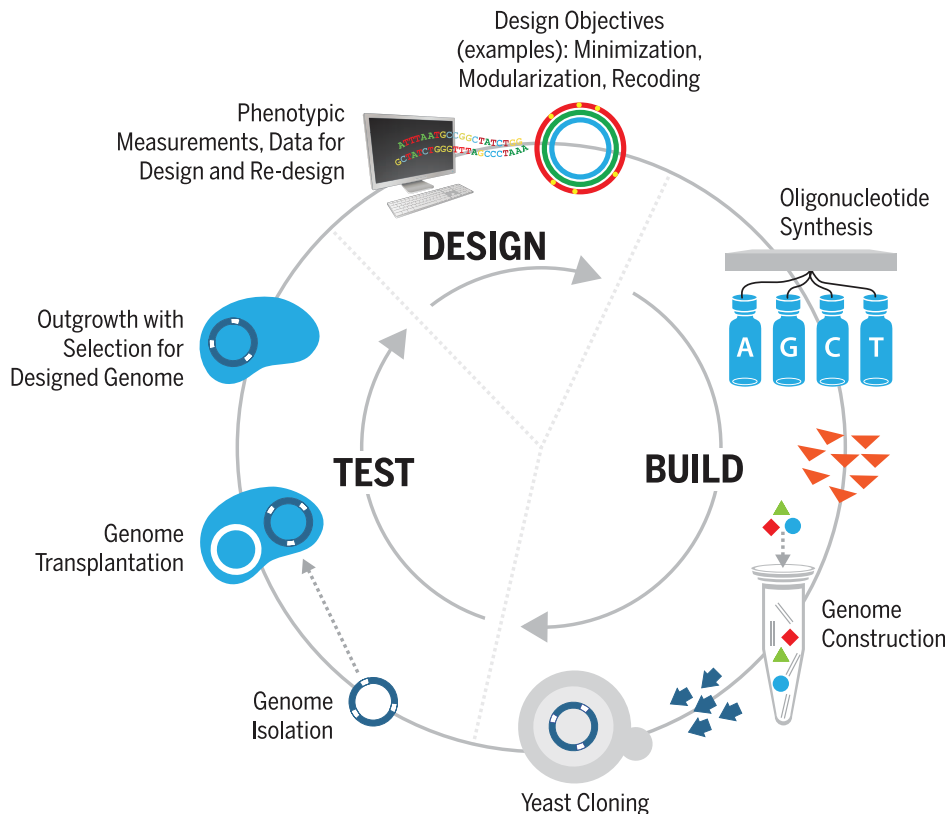


Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

4° passaggio: sintetizzare un genoma minimo e trapiantarlo in una cellula ospite

Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III,*† Ray-Yuan Chuang,† Vladimir N. Noskov, Nacyra Assad-Garcia, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, John Gill, Krishna Kannan, Bogumil J. Karas, Li Ma, James F. Pelletier, Zhi-Qing Qi, R. Alexander Richter, Elizabeth A. Strychalski, Lijie Sun, Yo Suzuki, Billyana Tsvetanova, Kim S. Wise, Hamilton O. Smith, John I. Glass, Chuck Merryman, Daniel G. Gibson, J. Craig Venter*



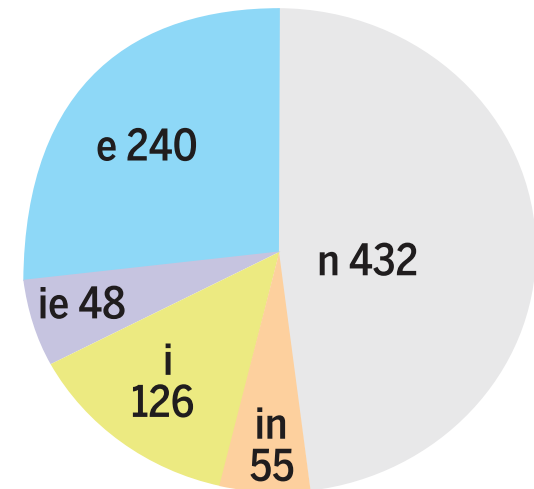
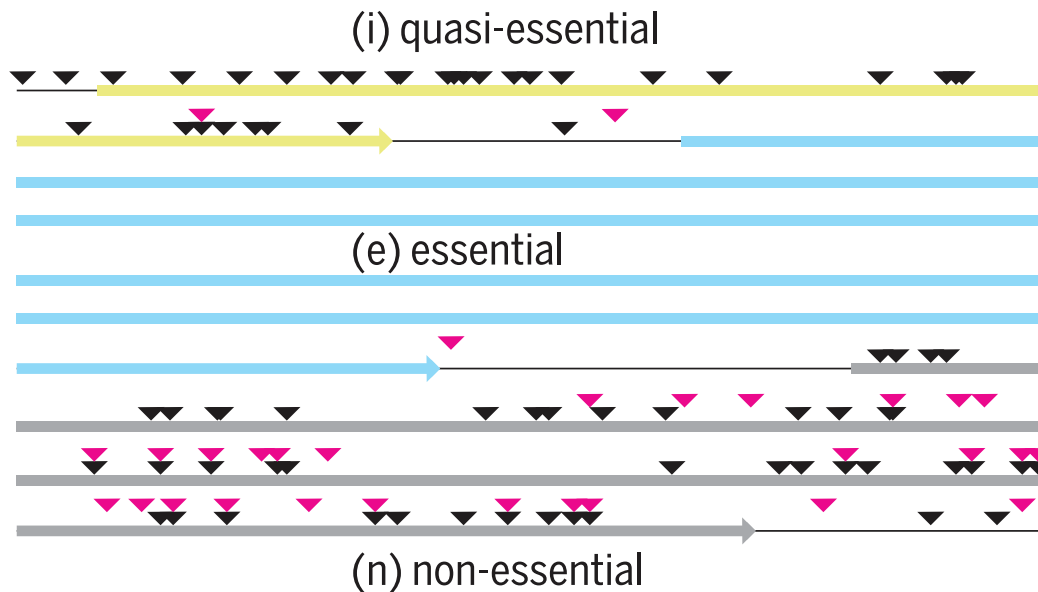
Partendo dal batterio *syn1.0* (901 geni), i ricercatori hanno provato a ridurre il genoma in modo razionale, eliminando tutti i geni che non erano predetti come geni essenziali alla sua vitalità.

Questo approccio è fallito, mostrando come siano ancora limitate le nostre conoscenze di quali geni siano essenziali alla vita.

Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

A questo punto i ricercatori hanno condotto un approccio di mutagenesi random con trasposoni su *syn1.0*. Sono stati mappati i siti di inserzione del trasposone in 80000 mutanti indipendenti. In questo modo sono stati identificati geni essenziali (e), geni non essenziali (n), e geni “quasi essenziali” (i), la cui mutazione aveva un effetto negativo sulla crescita del batterio.

Molti geni non essenziali sono stati eliminati, generando un batterio vitale con genoma minimo, *syn2.0*.



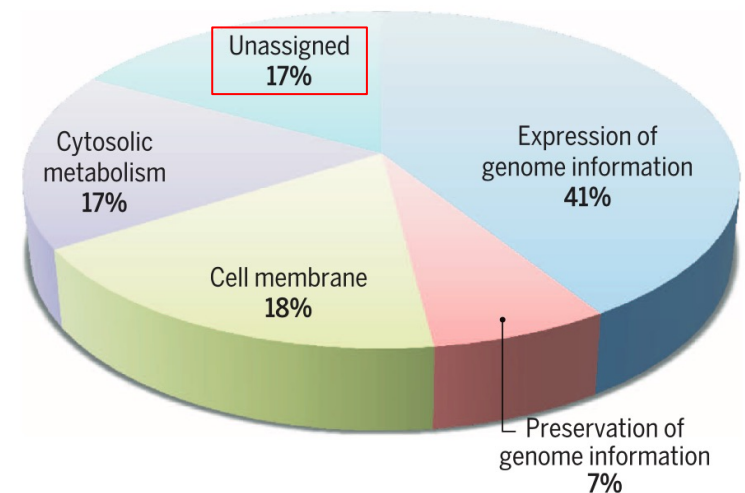
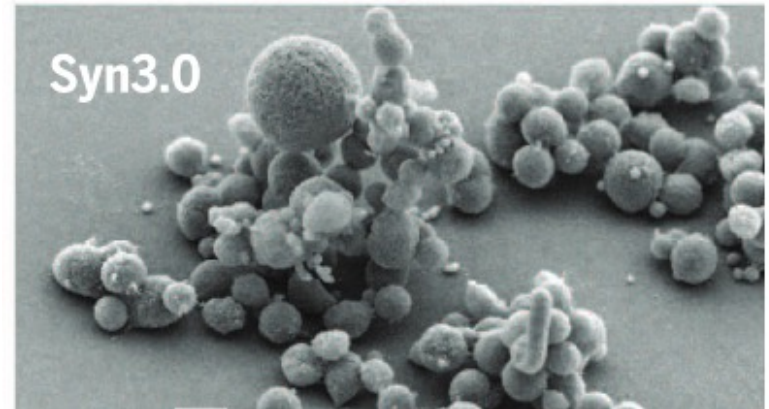
Anche il batterio *syn2.0* è stato sottoposto a mutagenesi random, ed il processo è stato ripetuto per vari cicli: sintesi del nuovo genoma minimo, validazione della vitalità, mutagenesi, sintesi di un nuovo genoma minimo,.....

Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

In questo modo i ricercatori hanno ottenuto il batterio *syn3.0*, con genoma minimo di 473 geni, inferiore a qualsiasi microrganismo noto a vita autonoma (il minimo è *Mycoplasma genitalium* con 525 geni).

È interessante notare come 79 dei 473 geni di *syn3.0* (~17%) siano a funzione sconosciuta!

| Functional category | Kept | Deleted |
|---|------------|------------|
| Glucose transport and glycolysis* | 15 | 0 |
| Ribosome biogenesis* | 14 | 1 |
| Protein export* | 10 | 0 |
| Transcription* | 9 | 0 |
| RNA metabolism* | 7 | 0 |
| DNA topology* | 5 | 0 |
| Chromosome segregation* | 3 | 0 |
| DNA metabolism* | 3 | 0 |
| Protein folding* | 3 | 0 |
| Translation* | 89 | 2 |
| RNA (rRNAs, tRNAs, small RNAs)* | 35 | 4 |
| DNA replication* | 16 | 2 |
| Lipid salvage and biogenesis* | 21 | 4 |
| Cofactor transport and salvage* | 21 | 4 |
| rRNA modification* | 12 | 3 |
| tRNA modification* | 17 | 2 |
| Efflux* | 7 | 3 |
| Nucleotide salvage | 19 | 8 |
| DNA repair | 6 | 8 |
| Metabolic processes | 10 | 10 |
| Membrane transport | 31 | 32 |
| Redox homeostasis | 4 | 4 |
| Proteolysis | 10 | 11 |
| Regulation | 9 | 10 |
| Unassigned | 79 | 134 |
| Cell division | 1 | 3 |
| Lipoprotein | 15 | 72 |
| Transport and catabolism of nonglucose carbon sources | 2 | 34 |
| Acylglycerol breakdown | 0 | 4 |
| Mobile elements and DNA restriction | 0 | 73 |
| Total | 473 | 428 |



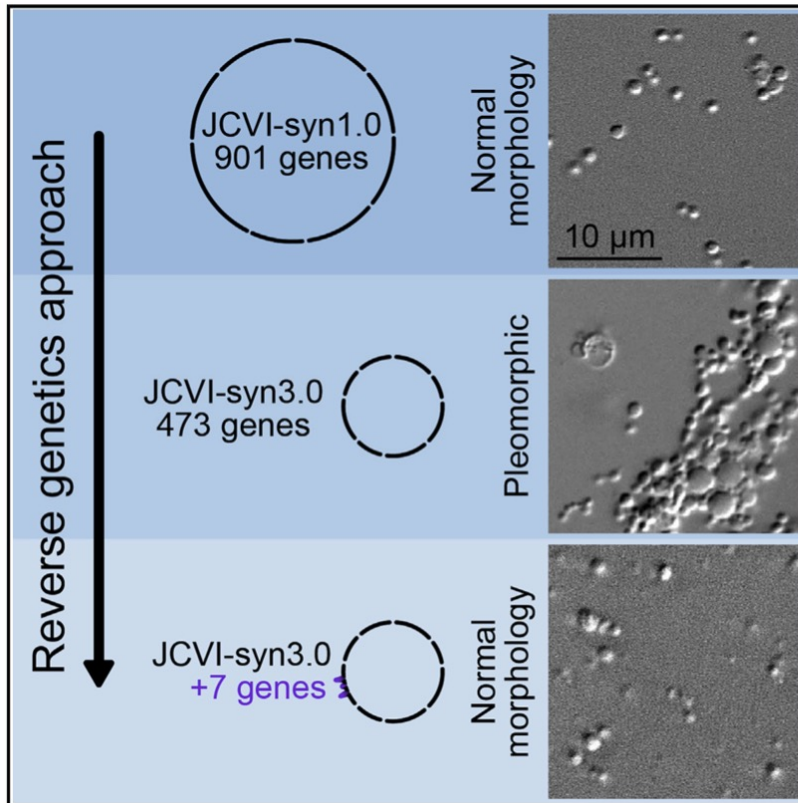
Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

Cell

Article

Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell

Graphical abstract



Authors

James F. Pelletier, Lijie Sun,
Kim S. Wise, ..., Ray-Yuan Chuang,
John I. Glass, Elizabeth A. Strychalski

Correspondence

elizabeth.strychalski@nist.gov (E.A.S.),
jglass@jcvl.org (J.I.G.)

In brief

A reverse genetics approach determined that seven genes are required together for normal cell division in a genomically minimal cell; these include two known cell division genes, *ftsZ* and *sepF*, a hydrolase of unknown substrate, and four genes that encode membrane-associated proteins of unknown function.

Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

Possiamo veramente parlare di microrganismi sintetici? E di microrganismo con genoma minimo?

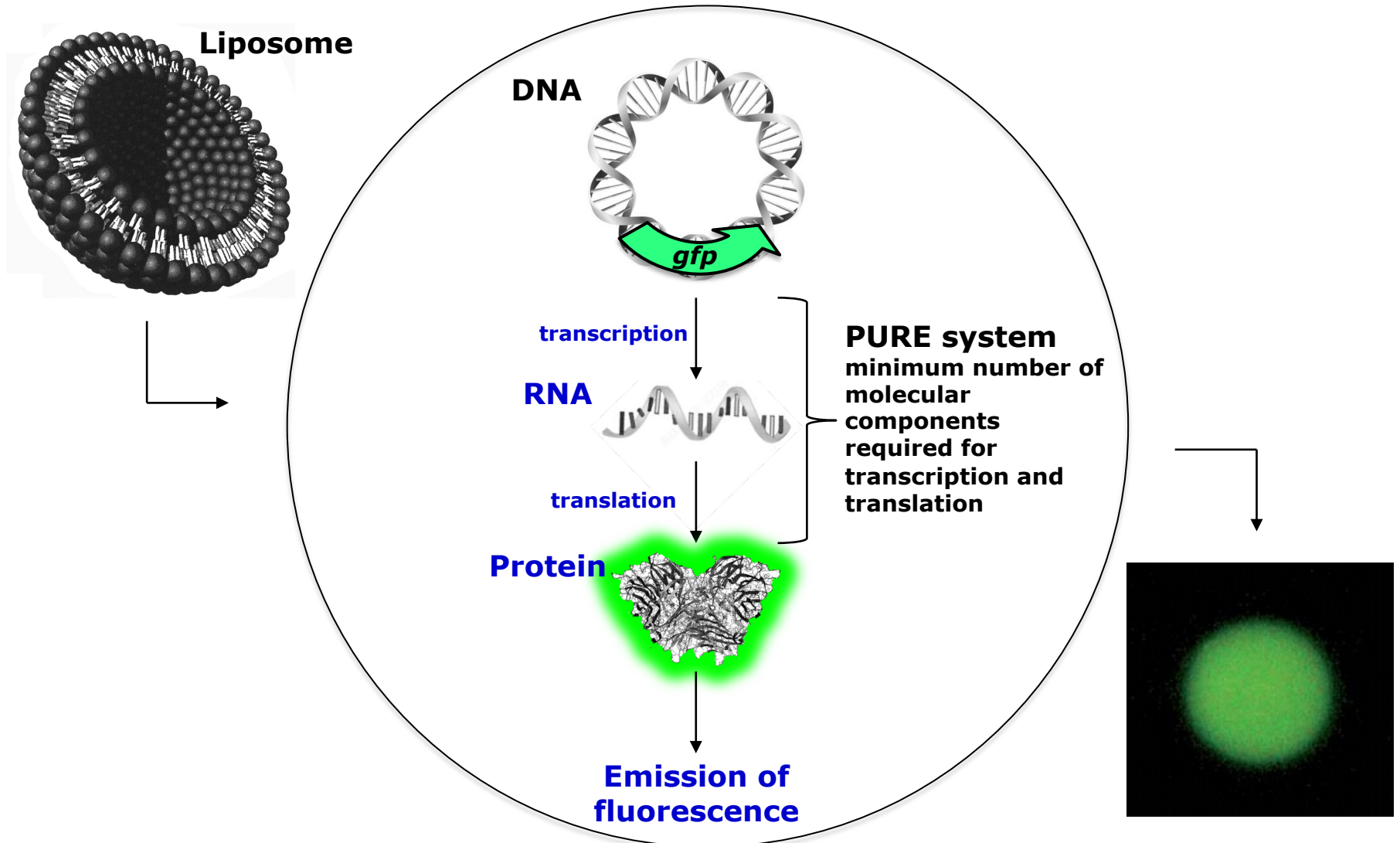
Questi lavori rappresentano sicuramente un grande avanzamento tecnologico, in quanto hanno portato allo sviluppo di nuove tecniche dalle enormi potenzialità per il futuro: sintetizzare ed assemblare un genoma, trapiantare un genoma intero in un altro organismo.

Tuttavia, i genomi sintetizzati, non considerando delle specifiche sequenze introdotte o eliminate dai ricercatori, erano identici ai genomi naturali, e gli organismi “sintetici” ottenuti avevano membrana e citoplasma della cellula ricevente. Non tutto il microrganismo era sintetico, ma solo il suo genoma (anche l’assemblaggio del genoma sintetico richiede dei passaggi di ricombinazione in cellule di lievito).

Inoltre per quanto riguarda il genoma minimo, questo è senza dubbio un’approssimazione, in quanto alcuni geni possono essere essenziali solo in funzione delle condizioni ambientali o del contesto genetico in cui si trovano. Un’importante considerazione di carattere scientifico/filosofico riguarda anche un requisito imposto a *syn 3.0* dai ricercatori, la necessità di replicarsi in tempi brevi. Possiamo affermare che un organismo che non si divide non sia vivo? Uno degli aspetti che mostrano come la nostra comprensione dei meccanismi alla base della vita sia tuttora limitata è l’identificazione di 79 geni essenziali a funzione ignota.

Gli scenari aperti da questi lavori ci portano comunque ad immaginare un futuro in cui si potranno sintetizzare genomi disegnati *ad hoc* perché il microrganismo “sintetico” sia in grado di esprimere i fenotipi desiderati in modo più controllato, limitando le funzioni accessorie non desiderate.

Synthetic cells are models of primitive/simplified cells

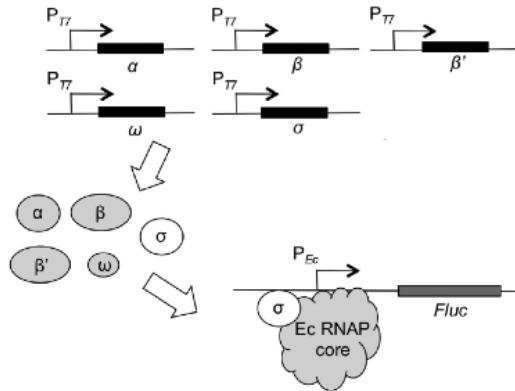


Synthetic cells can be programmed to accomplish specific tasks

Drive gene transcription

In vitro genetic reconstruction of bacterial transcription initiation by coupled synthesis and detection of RNA polymerase holoenzyme

Haruichi Asahara and Shaorong Chong*

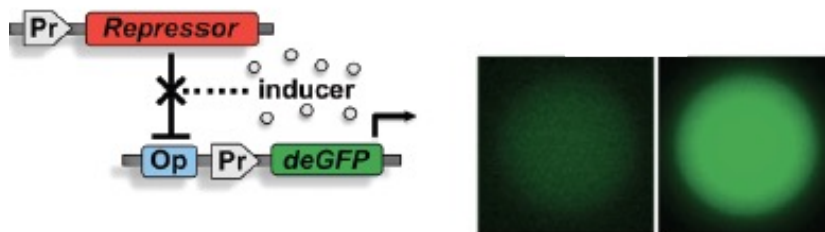


Asahara and Chong (2010) *NAR* 38:e141.

Regulate gene transcription

An *E. coli* Cell-Free Expression Toolbox: Application to Synthetic Gene Circuits and Artificial Cells

Jonghyeon Shin and Vincent Noireaux*

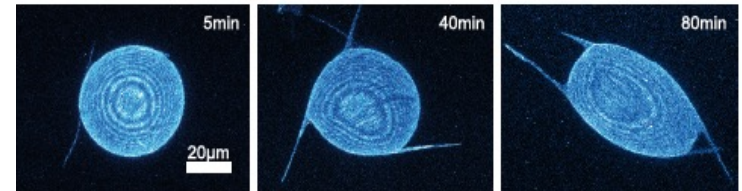


Shin and Noireaux (2012) *ACS Synth Biol* 1:29-41.

Move

Topology and dynamics of active nematic vesicles

Felix C. Keber,^{1,2*} Etienne Loiseau,^{1*} Tim Sanchez,^{3*} Stephen J. DeCamp,³ Luca Giomi,^{4,5} Mark J. Bowick,⁶ M. Cristina Marchetti,⁶ Zvonimir Dogic,^{2,3} Andreas R. Bausch^{1†}

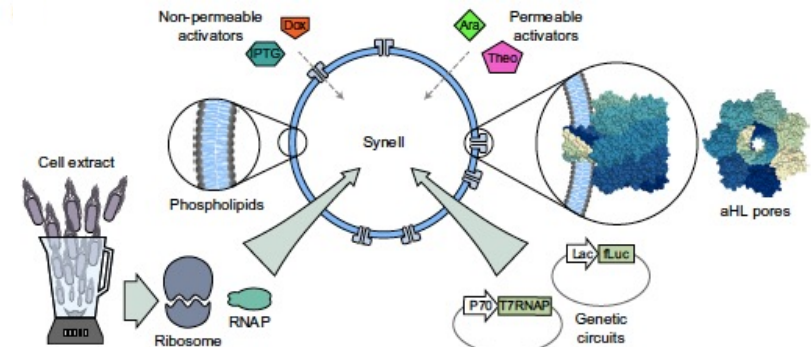


Keber *et al.* (2014) *Science* 345:1135-1139.

Exchange information with the environment

Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells

Katarzyna P. Adamala^{1†}, Daniel A. Martin-Alarcon^{2†}, Katriona R. Guthrie-Honea¹ and Edward S. Boyden^{1,2,3*}



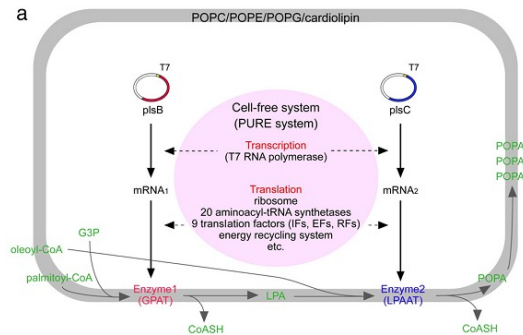
Adamala *et al.* (2017) *Nat Chem* 9:431-439.

Synthetic cells can be programmed to accomplish specific tasks

Synthesize lipids

A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells

Yutetsu Kuruma^a, Pasquale Stano^{a, b}, Takuya Ueda^c, Pier Luigi Luisi^b 

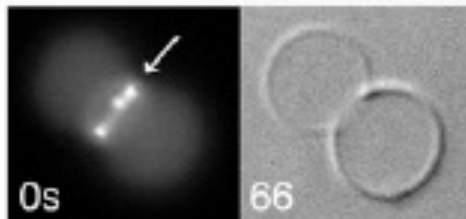


Kuruma *et al.* (2009) *Biochim Biophys Acta* 1788:567-574.

Divide into two synthetic cells

Liposome division by a simple bacterial division machinery

Masaki Osawa (大澤正輝)¹ and Harold P. Erickson

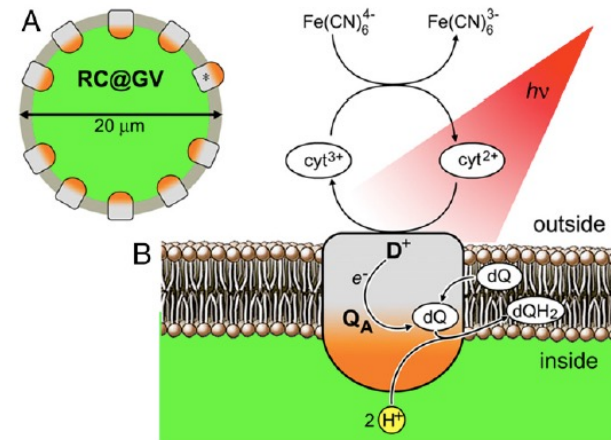


Osawa and Erickson (2013) *PNAS* 110:11000-11004.

Produce energy

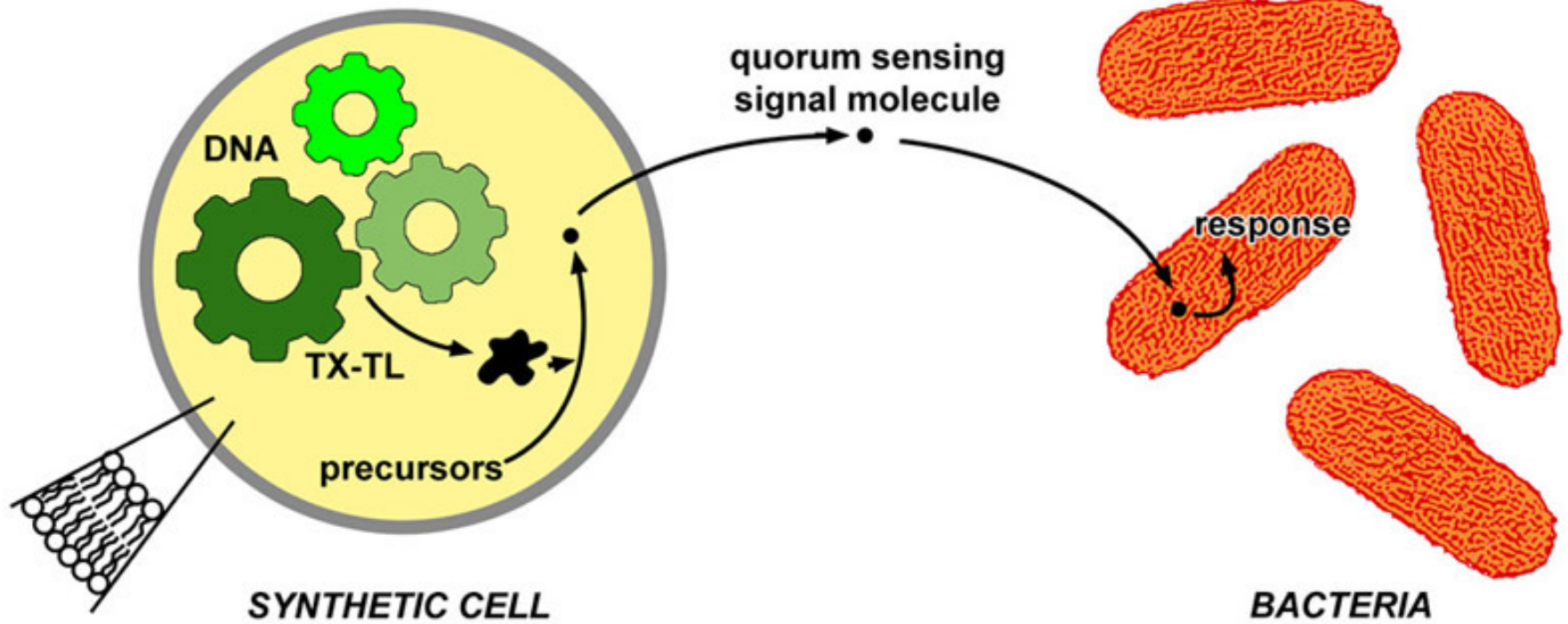
Highly oriented photosynthetic reaction centers generate a proton gradient in synthetic protocells

Emiliano Altamura^a, Francesco Milano^b, Roberto R. Tangorra^a, Massimo Trotta^b, Omar Hassan Omar^c, Pasquale Stano^{d,1}, and Fabio Mavelli^{a,2}



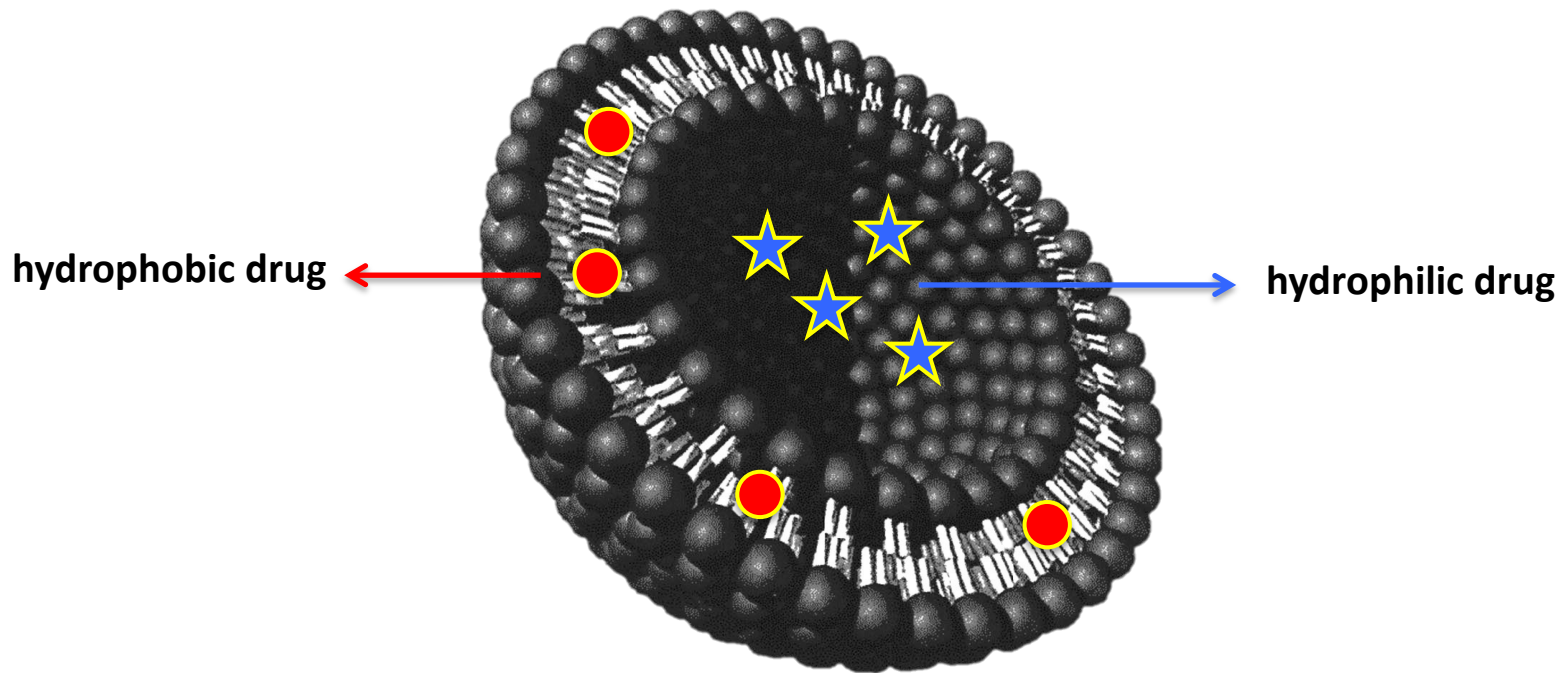
Altamura *et al.* (2017) *PNAS* 114:3837-3842.

Generation of synthetic cells able to interface with natural cells



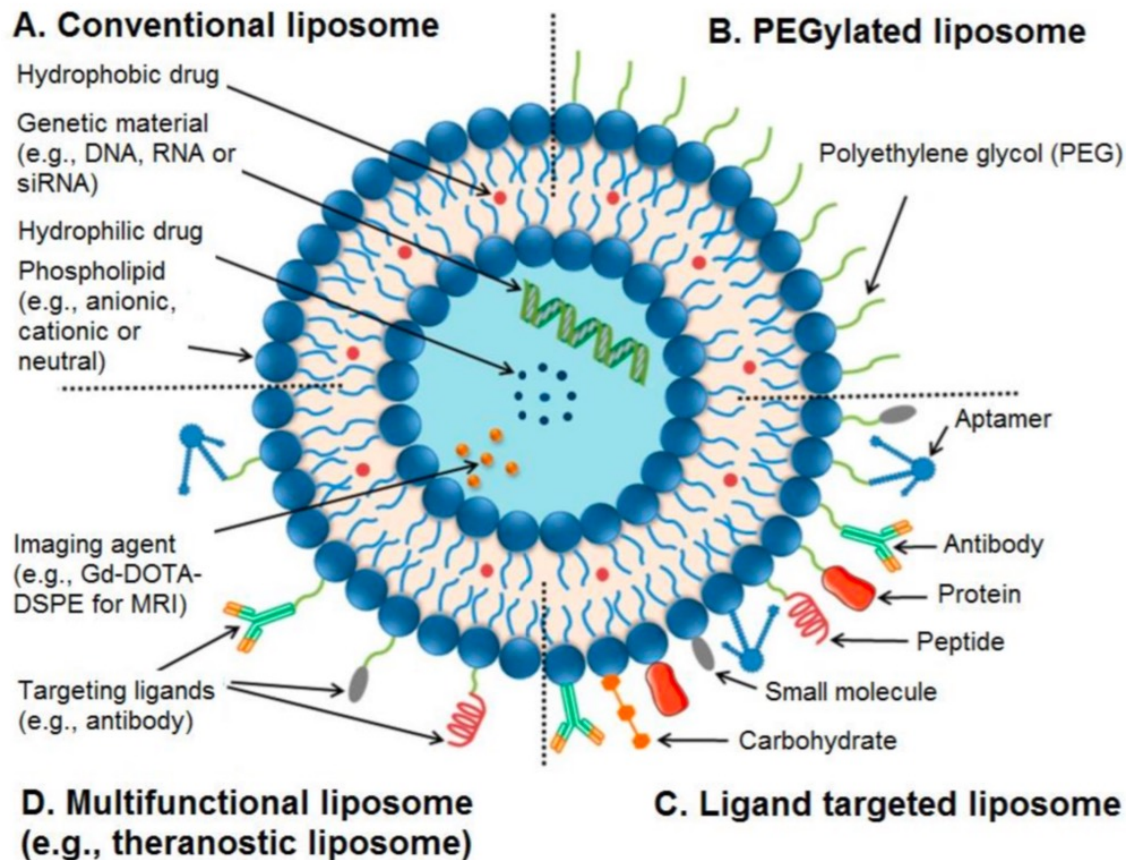
Liposomes as drug carriers

Liposomes are well established for a range of pharmaceutical and biomedical applications with the unique capability of entrapment of both hydrophilic (polar) and hydrophobic (nonpolar) compounds due to their amphipathic nature in aqueous media.



Liposomes as drug carriers

Liposomes are biocompatible, they are naturally nontoxic, non-immunogenic, and biodegradable. They have a role in enhancing drug solubility, providing targeted drug delivery, reducing the toxic effect of drugs, providing protection against drug degradation, enhancing circulation half-life.



Liposomes as drug carriers

Liposomes are used as delivery systems in diverse medical fields, including **anti-cancer**, **anti-fungal** and **anti-inflammatory** drugs.

In 1995, liposomal **doxorubicin** (Doxil™) was first introduced in U.S., to treat ovarian cancer and AIDS-related Kaposi's sarcoma.

DaunoXome® was developed by NeXstar Pharmaceuticals (Boulder, CO, USA) for the delivery of **daunorubicin**, and was FDA approved in 1996 for the management of advanced HIV-associated Kaposi's sarcoma.

Other anticancer-liposomal products: Mepact® by Takeda Pharmaceutical (Deerfield, IL, USA), DepoCyt® by SkyPharma Inc. (Belgravia, London, UK), Marqibo® by Talon Therapeutics (San Francisco, CA, USA) and a fluorouracil, leucovorin combination with liposomes (Merrimack Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA, USA), Myocet® by Elan Pharmaceuticals (San Francisco, CA, USA).

Liposomal products were also developed for other diseases such as **fungal infections (Amphotec® and AmBisome®)**. Liposomes have become an important carrier systems for vaccine development leading to the development of **vaccines such as Epaxal® and Inflexal V®** for hepatitis and influenza, respectively.

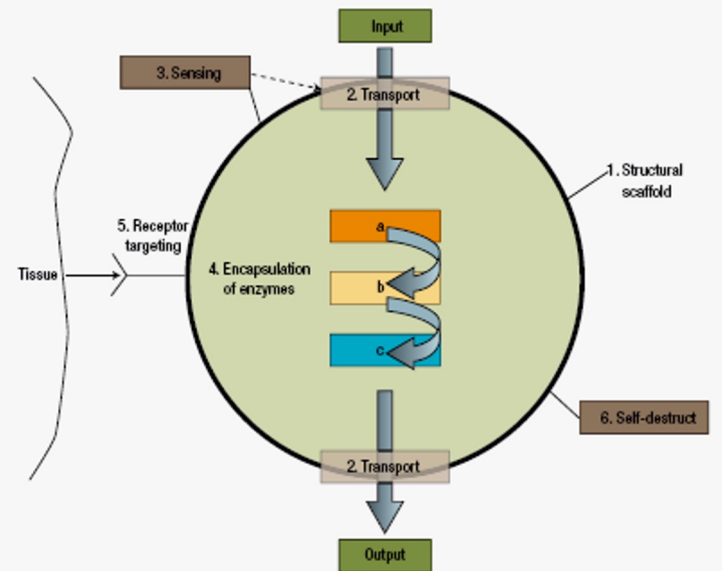
Can we generate smart liposome-based drug carriers interfacing with natural cells?

Synthetic cells able to process external stimuli and to consequently react (*i.e.*, to interface with natural cells) could be employed as “**soft nano-robots**” for future intelligent drug delivery approaches, as biosensors, as cell-free nanofactories, etc...

Towards an *in vivo* biologically inspired nanofactory

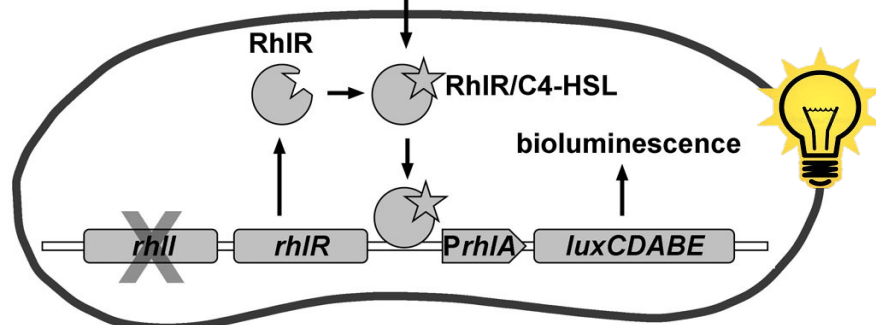
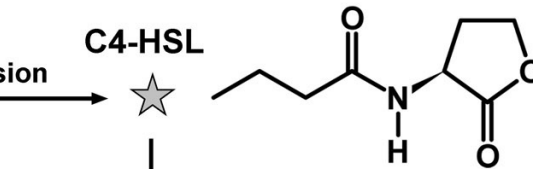
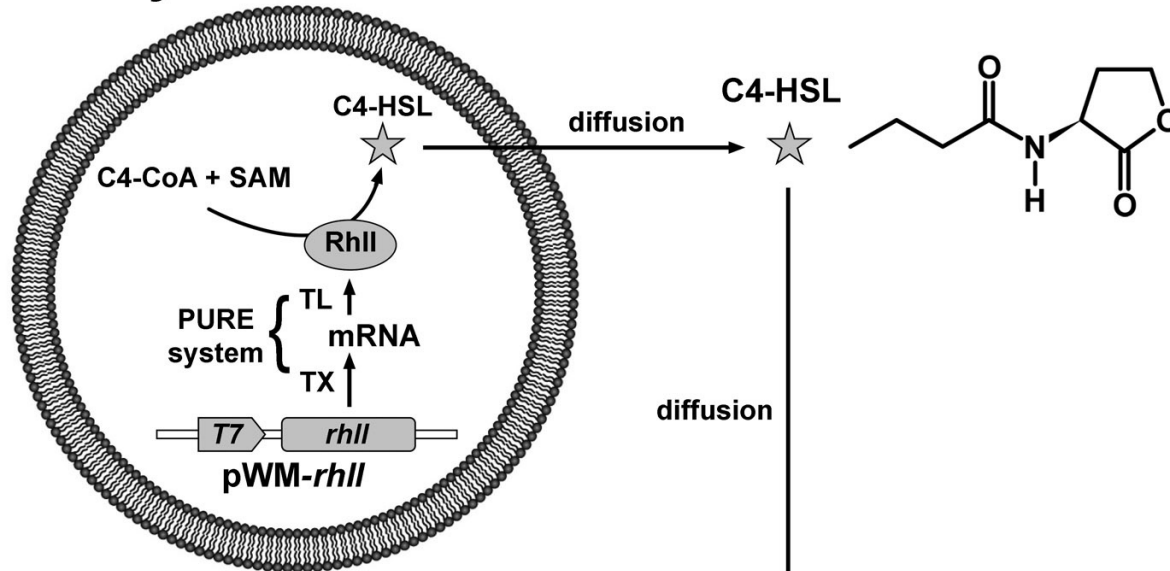
PHILIP R. LEDUC^{1*}, MICHAEL S. WONG^{2*}, PLACID M. FERREIRA³, RICHARD E. GROFF⁴, KIRYN HASLINGER⁵, MICHAEL P. KOONCE⁶, WOO Y. LEE⁷, J. CHRISTOPHER LOVE⁸, J. ANDREW McCAMMON⁹, NANCY A. MONTEIRO-RIVIERE¹⁰, VINCENT M. ROTELLO¹¹, GARY W. RUBLOFF¹², ROBERT WESTERVELT¹³ AND MINAMI YODA¹⁴

LeDuc *et al.* (2006) *Nature Nanotech* 2:3-7.



Quorum sensing-based communication between synthetic cells and *Pseudomonas aeruginosa*

synthetic cell



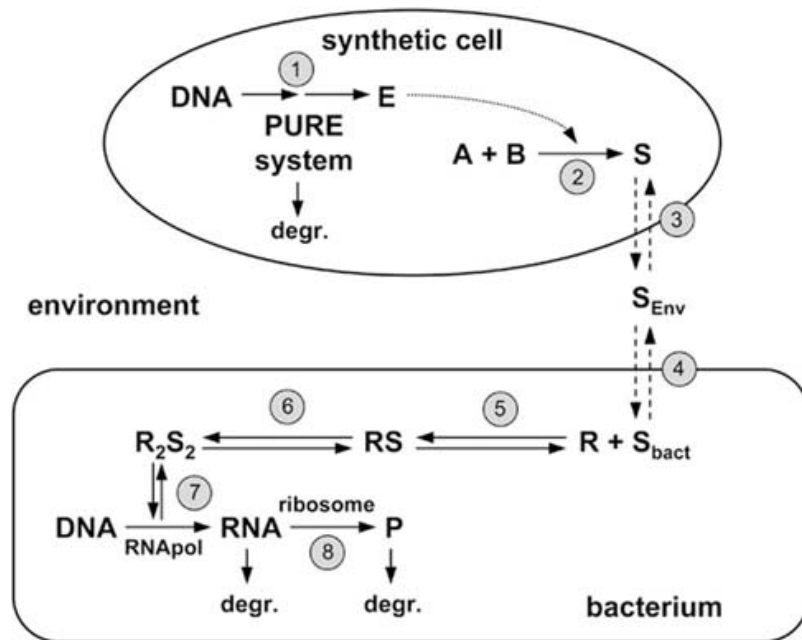
P. aeruginosa RepC4lux

Engineered *P. aeruginosa* biosensor strain that does not produce C4-HSL, and emits light in response to exogenous C4-HSL.

Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

1) preliminary numerical modeling

Schematic representation of the communication process



Kinetic differential equations used in the model

I. Synthetic cell

$$1 \quad \frac{d[E]}{dt} = (k_{TXIS}t) \cdot k_{TLPS} \exp(-k_{inact}S^t)$$

$$2 \quad \frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k_{cat}[E] \frac{[A]}{K_{MA} + [A]} \frac{[B]}{K_{MB} + [B]}$$

$$3 \quad \frac{d[S]_{sc}}{dt} = k_{cat}[E] \frac{[A]}{K_{MA} + [A]} \frac{[B]}{K_{MB} + [B]} - \frac{\sigma_{sc} \delta^{\varphi}}{V_{sc}} ([S]_{sc} - [S]_{env})$$

II. Environment

$$3,4 \quad \frac{d[S]_{env}}{dt} = N_{sc} \frac{\sigma_{sc} \delta^{\varphi}}{V_{sc}} ([S]_{sc} - [S]_{env}) + N_{bact} \frac{\sigma_{bact} \delta^{\varphi}}{V_{bact}} ([S]_{bact} - [S]_{env})$$

III. Bacterium

$$4,5 \quad \frac{d[S]_{bact}}{dt} = -\frac{\sigma_{bact} \delta^{\varphi}}{V_{bact}} ([S]_{bact} - [S]_{env}) - k_{on}[R][S]_{bact} + k_{off}[RS]$$

$$5,6 \quad \frac{d[R]}{dt} = -k_{on}[R][S]_{bact} + k_{off}[RS]$$

$$5,6 \quad \frac{d[RS]}{dt} = k_{on}[R][S] - k_{off}[RS] - 2k_{dim}[RS]^2 + 2k_{diss}[R_2S_2]$$

$$6 \quad \frac{d[R_2S_2]}{dt} = k_{dim}[RS]^2 - k_{diss}[R_2S_2]$$

$$7 \quad \frac{d[mRNA]}{dt} = \frac{1}{3L} k_{TX} C_{RNAPol} \frac{C_{DNA}}{K_{MTX} + C_{DNA}} \cdot \frac{[R_2S_2]^p}{K_{MR_2S_2}^p + [R_2S_2]^p} - k_{deg,mRNA}[mRNA]$$

$$8 \quad \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{L} k_{TL} C_{rib} \frac{[mRNA]}{K_{MTL} + [mRNA]} - k_{deg,P}[P]$$

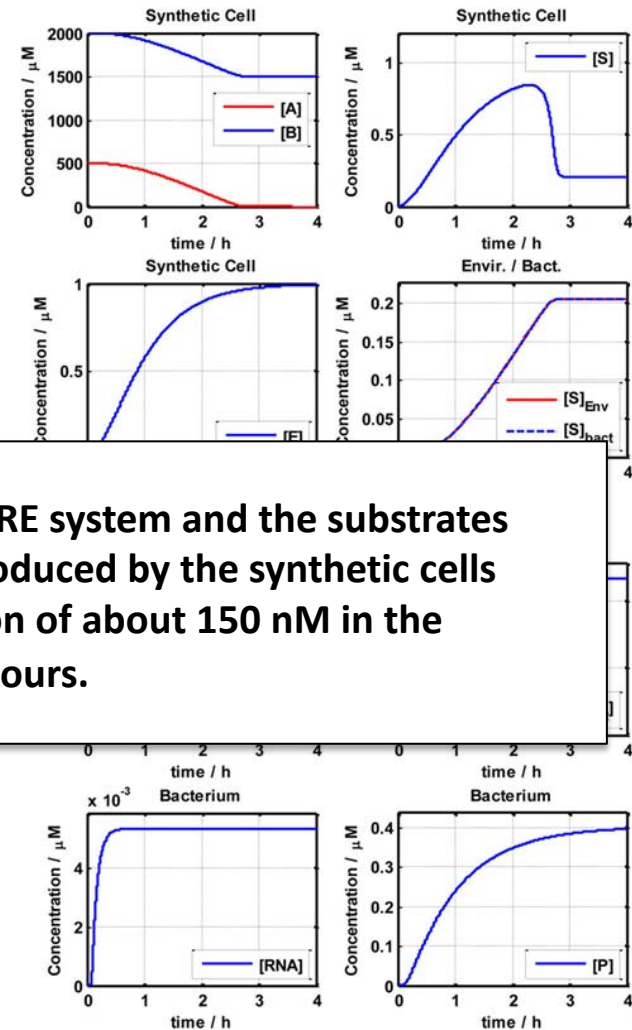
Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

1) preliminary numerical modeling

Physical parameters, thermodynamic and kinetic constants used in the model

| Symbol | Meaning | Value | Units |
|---------------------|---|---------------------|----------------------|
| V | Reaction volume | $2 \cdot 10^5$ | μm^3 |
| N_{sc} | Number of synthetic cell in V | 1 | |
| N_{bact} | Number of bacteria in V | 320 | |
| r_{sc} | Synthetic cell radius | 2.7 | μm |
| σ_{sc} | Synthetic cell surface | 91.6 | μm^2 |
| V_{sc} | Synthetic cell volume | 84.2 | μm^3 |
| V_{bact} | Bacterium volume | 1 | μm^3 |
| σ_{bact} | Bacterium surface | 4.8 | μm^2 |
| k_{TXPS} | Transcription rate (PURE system) | | |
| k_{TLPS} | Translation rate (PURE system) | | |
| $k_{TXPS} k_{TLPS}$ | Product of TX-TL rates (PURE system) | $2.8 \cdot 10^{-7}$ | $\mu\text{M s}^{-2}$ |
| $k_{inactPS}$ | Translation inactivation constant (PURE system) | $5.3 \cdot 10^{-4}$ | s^{-1} |
| k_{cat} | Catalytic constant of the enzyme E | 0.1 | s^{-1} |
| K_{MA} | Michaelis-Menten constant for A | 10 | μM |
| K_{MB} | Michaelis-Menten constant for B | 200 | μM |

Results of numerical integration

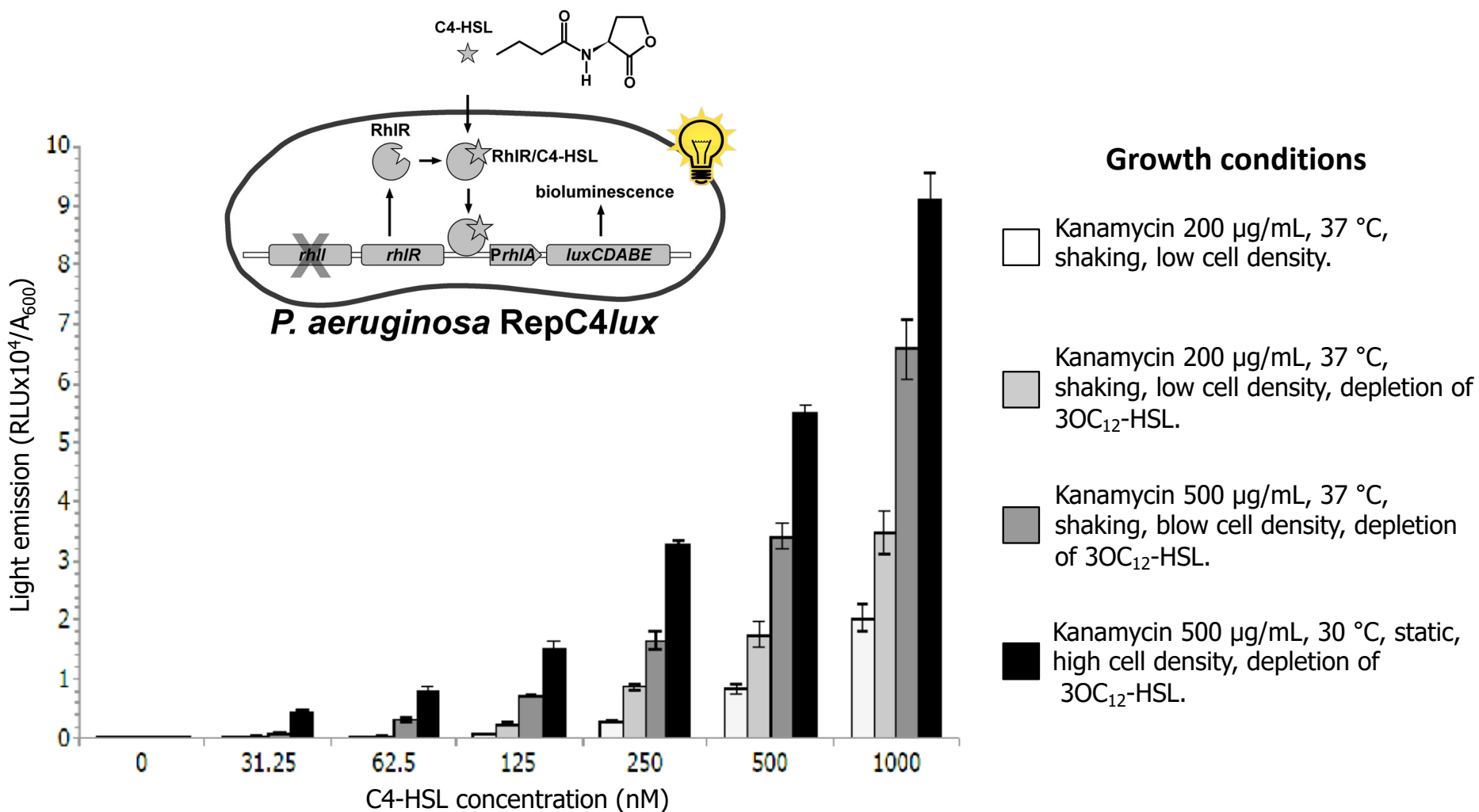


If containing a plasmid with the *rhII* gene, the PURE system and the substrates SAM and C4-CoA, the C4-HSL signal molecule produced by the synthetic cells expressing RhII should reach the concentration of about 150 nM in the environment within 2.5 hours.

| | | | |
|----------------|--|---------------------|--------------------|
| K_{MTX} | RNA polymerase/DNA binding constant | 0.5 | μM |
| K_{MR2S2} | Hill affinity constant of R_2S_2 /DNA promoter | $2.5 \cdot 10^{-5}$ | μM |
| n | Hill cooperative coefficient | 1.5 | |
| $k_{deg-mRNA}$ | mRNA degradation rate constant | $3 \cdot 10^{-3}$ | s^{-1} |
| C_{RNApol} | RNA polymerase concentration | $6 \cdot 10^{-2}$ | μM |
| C_{DNA} | Promoter/reporter gene concentration | $2 \cdot 10^{-3}$ | μM |
| L | Length of the reporter protein P | 250 | aa |
| k_{TL} | Translation rate | 15 | aa s^{-1} |
| K_{MTL} | Ribosome/mRNA binding constant | 0.1 | μM |
| k_{deg-P} | Protein degradation rate constant | $3 \cdot 10^{-4}$ | s^{-1} |
| C_{rib} | Ribosome concentration | 0.04 | μM |

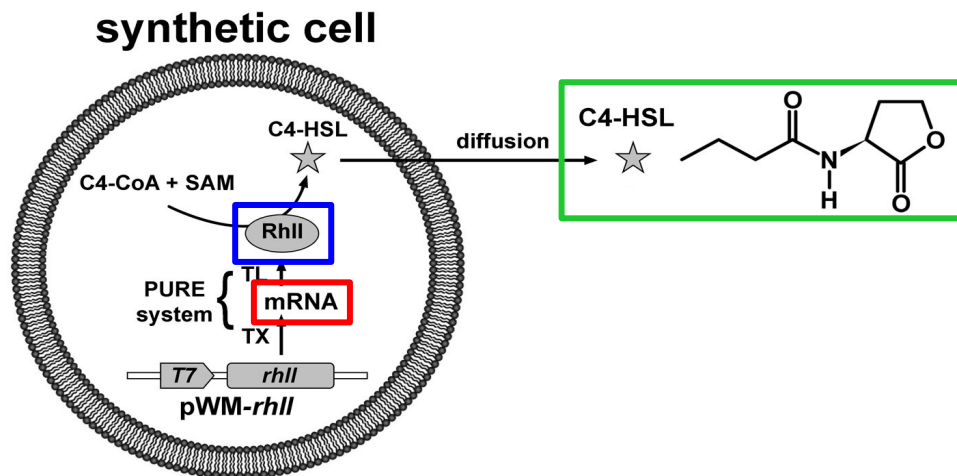
Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

2) wet-lab experiments

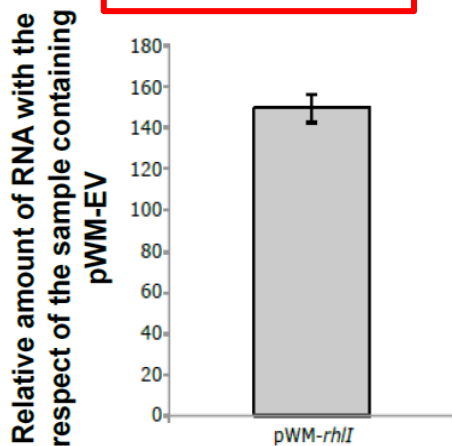


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

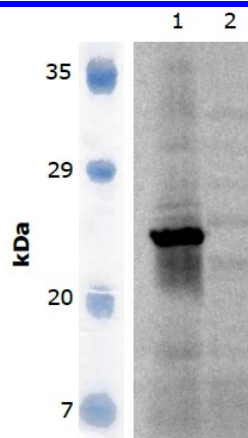
2) wet-lab experiments



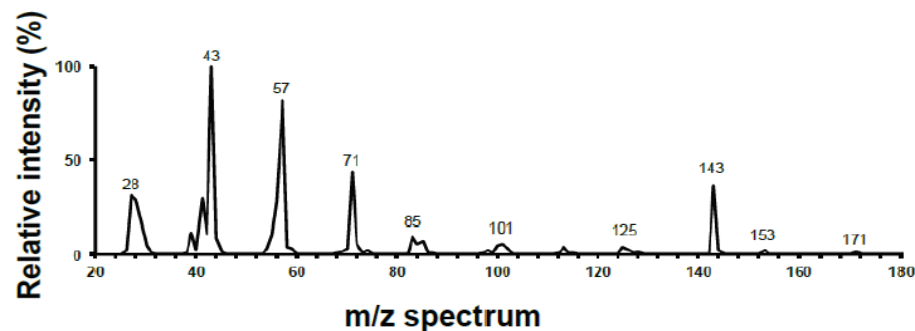
Transcription
of the *rhII* gene



Expression
of the RhII enzyme

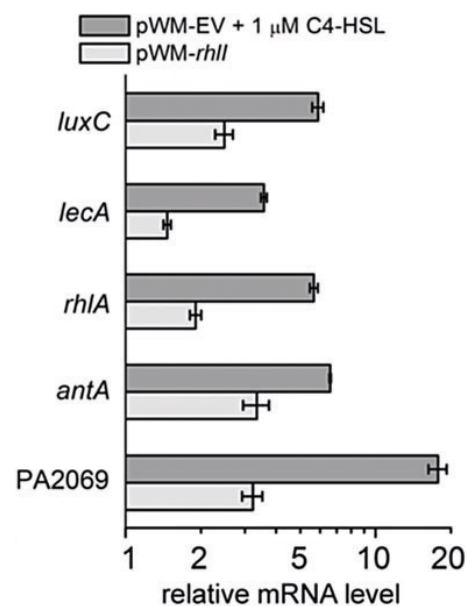
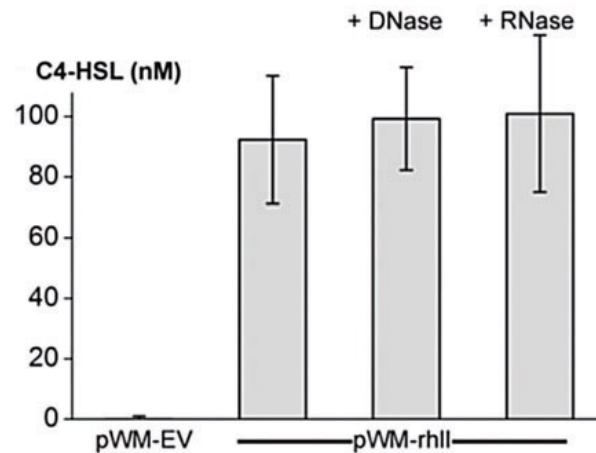
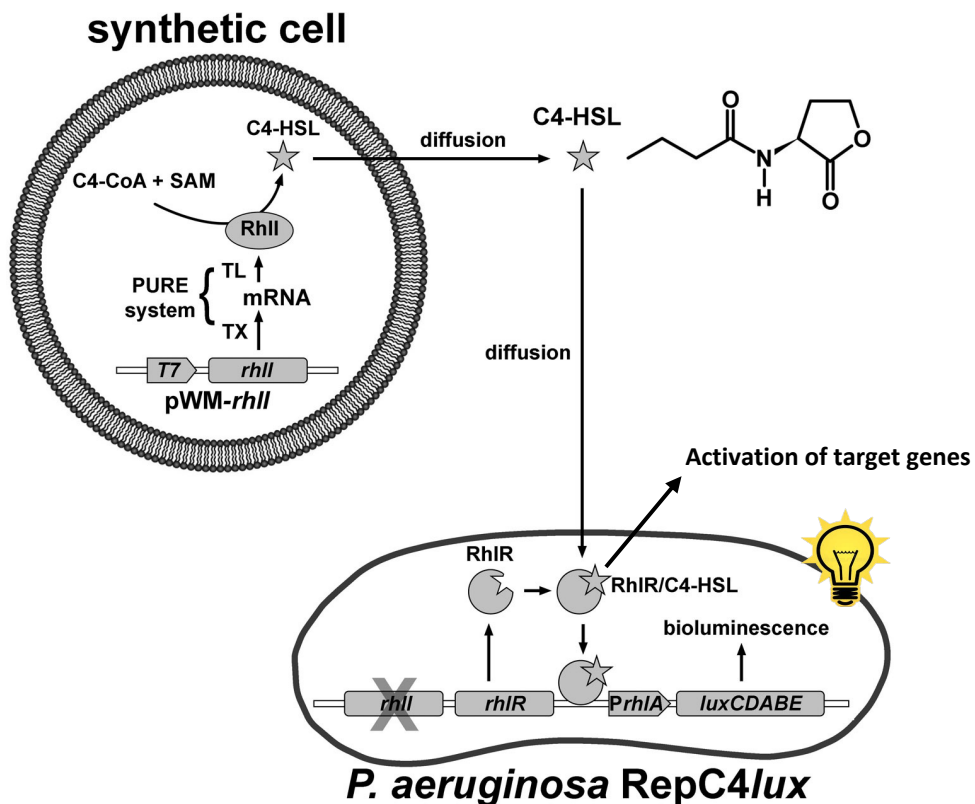


Synthesis
of the C4-HSL signal molecule

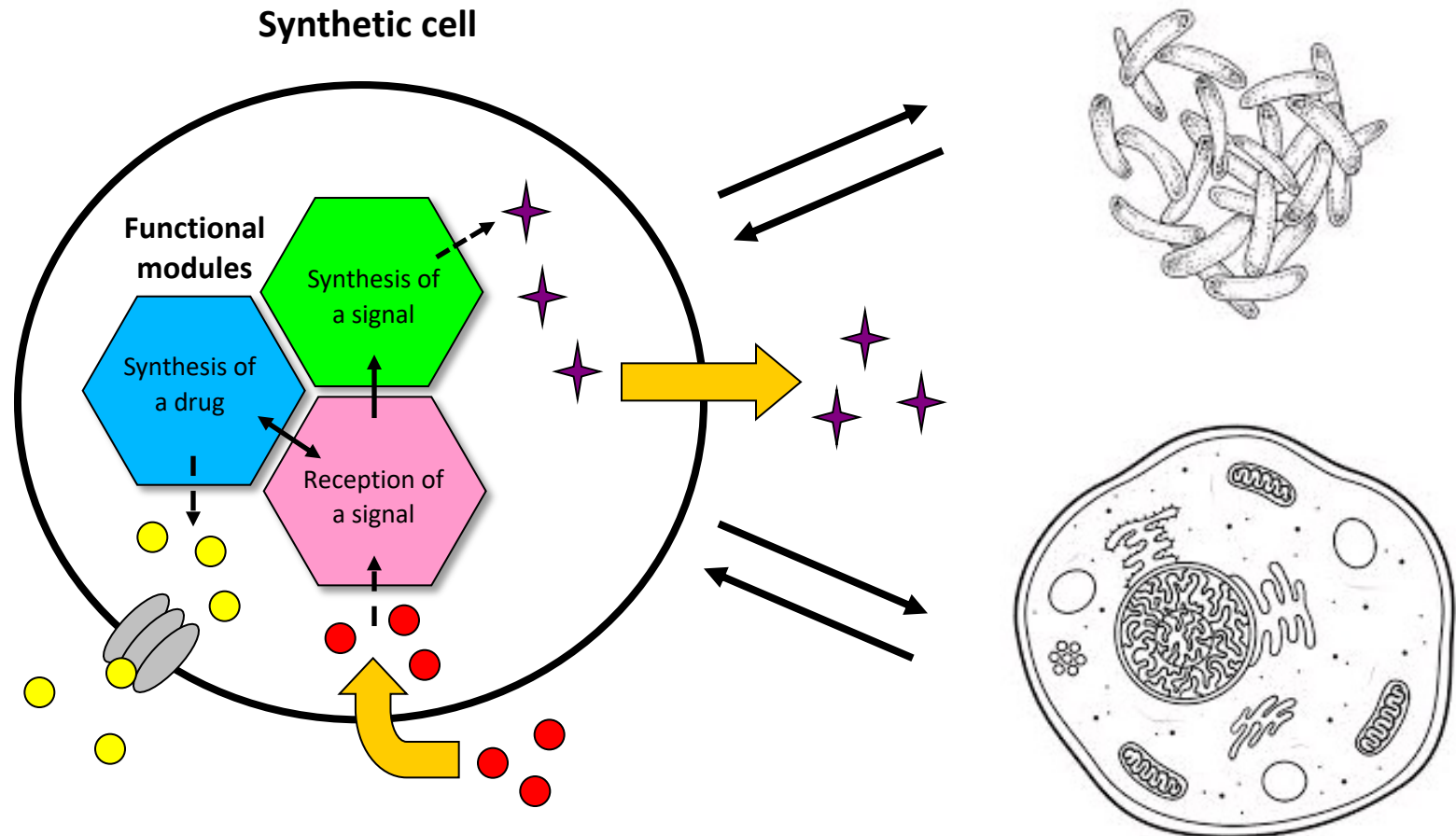


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

2) wet-lab experiments

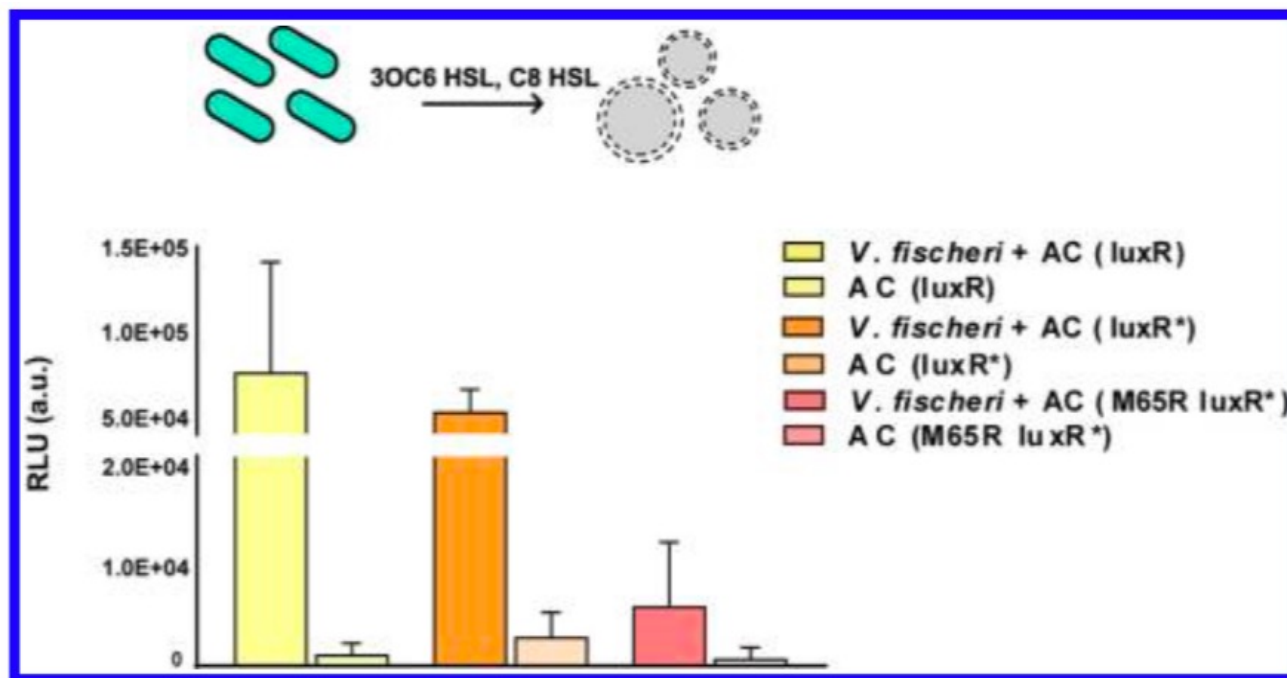


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria to develop innovative drug delivery approaches

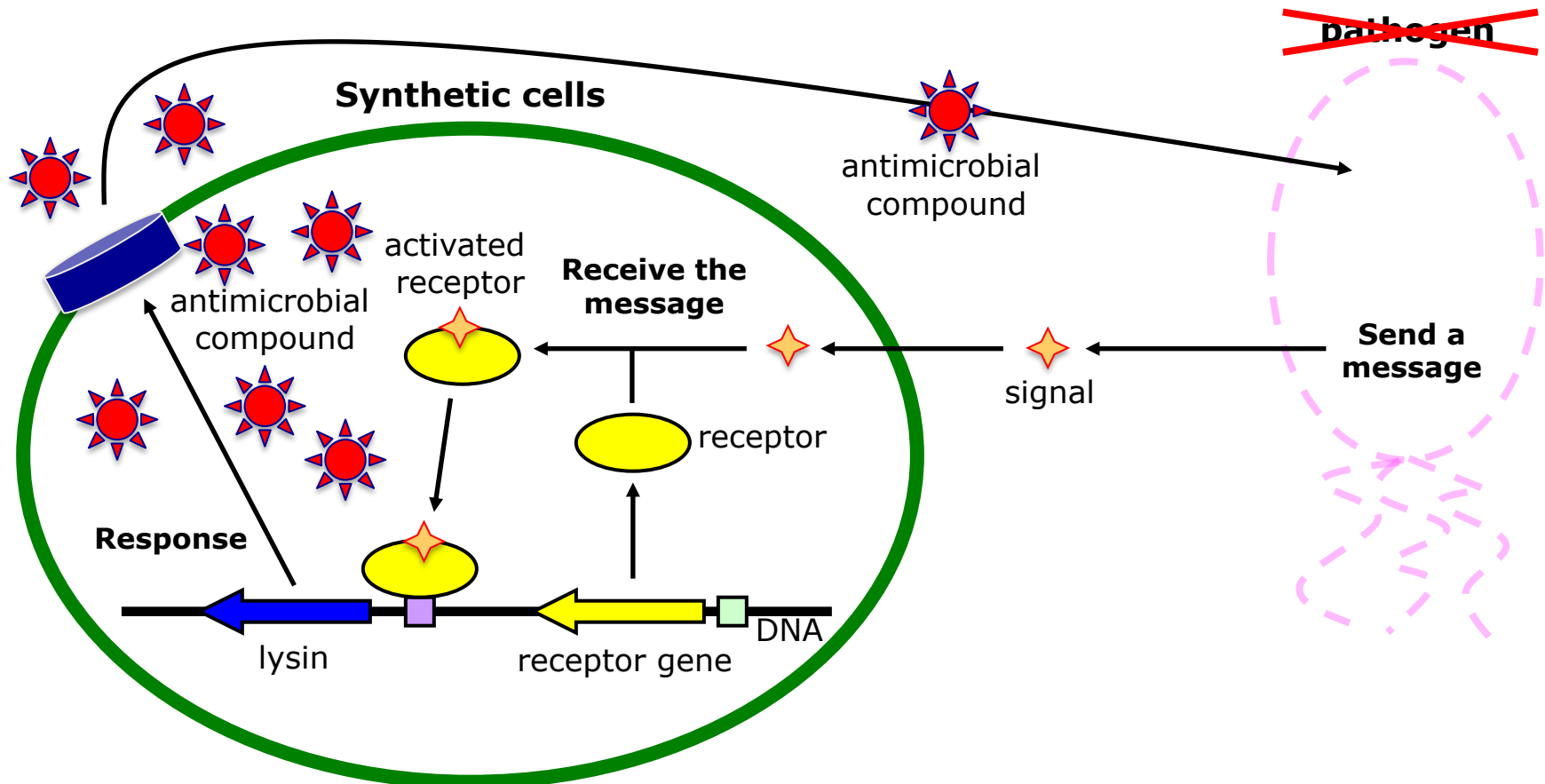


Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells

Roberta Lentini,^{†,‡} Noël Yeh Martín,^{†,‡} Michele Forlin,[†] Luca Belmonte,[†] Jason Fontana,[†] Michele Cornella,[†] Laura Martini,[†] Sabrina Tamburini,[†] William E. Bentley,[§] Olivier Jousson,[†] and Sheref S. Mansy^{*,†,‡}



Generation of synthetic cells interfacing with bacteria to develop innovative drug delivery approaches

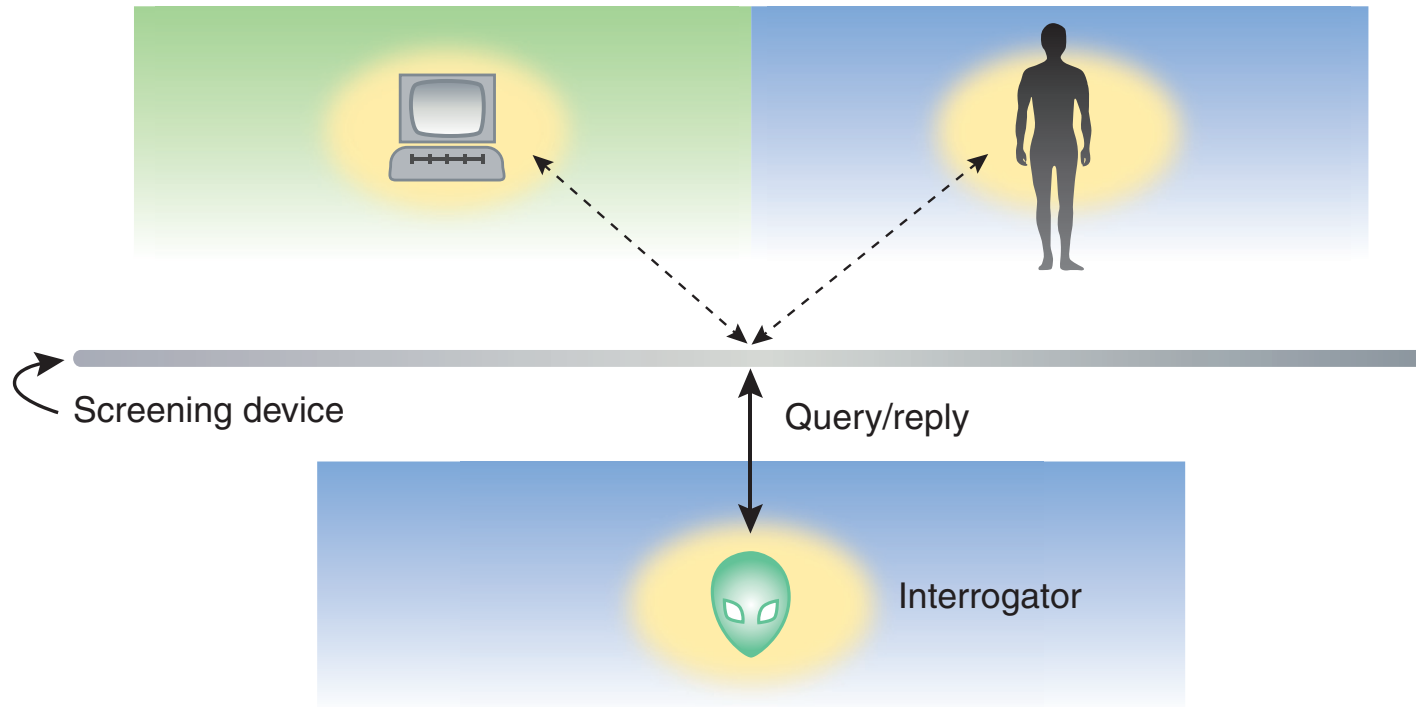


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria to shed light on basic principles of life

The imitation game—a computational chemical approach to recognizing life

Leroy Cronin, Natalio Krasnogor, Benjamin G Davis, Cameron Alexander, Neil Robertson, Joachim H G Steinke, Sven L M Schroeder, Andrei N Khlobystov, Geoff Cooper, Paul M Gardner, Peter Siepmann, Benjamin J Whitaker & Dan Marsh

When is an artificial cell alive? A Turing test-like method may provide the answer.



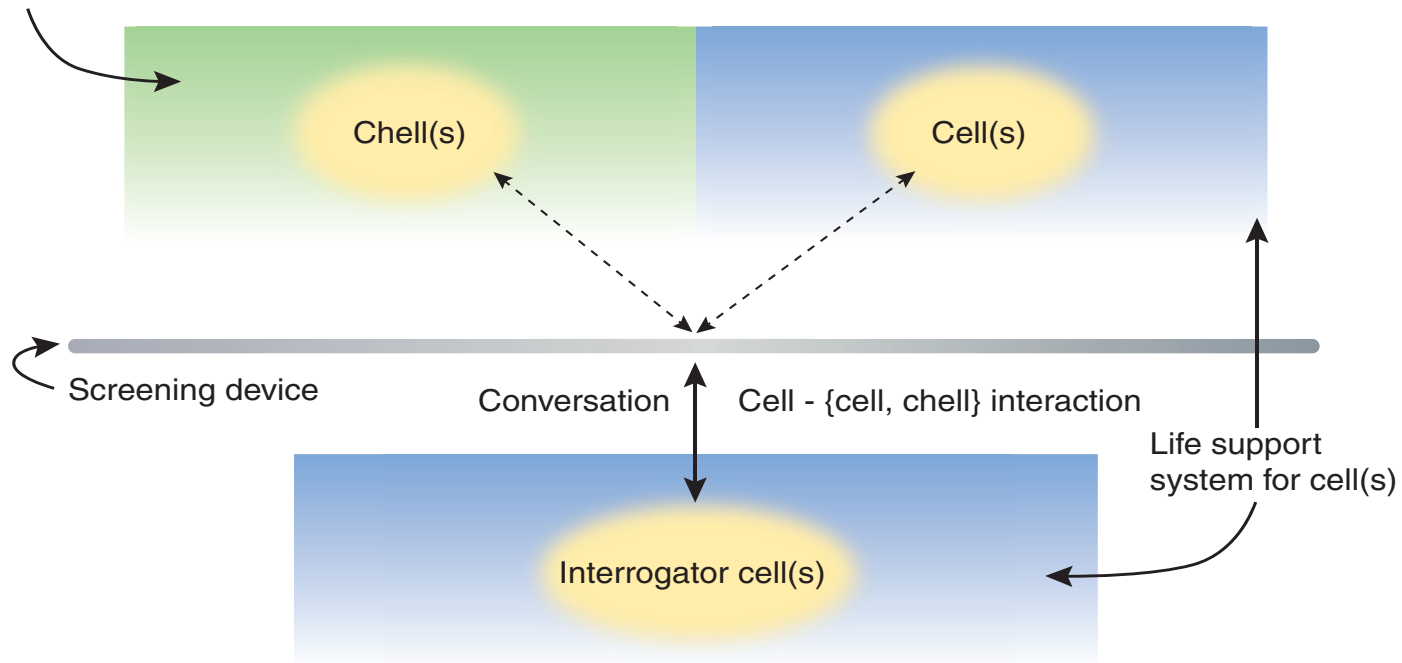
Generation of synthetic cells interfacing with bacteria to shed light on basic principles of life

The imitation game—a computational chemical approach to recognizing life

Leroy Cronin, Natalio Krasnogor, Benjamin G Davis, Cameron Alexander, Neil Robertson, Joachim H G Steinke, Sven L M Schroeder, Andrei N Khlobystov, Geoff Cooper, Paul M Gardner, Peter Siepmann, Benjamin J Whitaker & Dan Marsh

When is an artificial cell alive? A Turing test-like method may provide the answer.

Life support system for chell(s)



Lecture consigliate

- Cronin L, Krasnogor N, Davis BG, Alexander C, Robertson N, Steinke JH, *et al.* (2006) The imitation game - a computational chemical approach to recognizing life. *Nat Biotechnol* 24:1203-1206.
- De Lorenzo V, Danchin A (2008) Synthetic biology: discovering new worlds and new words. *EMBO Rep* 9:822-827.
- De Lorenzo V (2011) Beware of metaphors: chasses and orthogonality in synthetic biology. *Bioeng Bugs* 2:3-7.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329:52-56.
- Hutchison CA 3rd, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, *et al.* (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 351:aad6253.
- Leduc PR, Wong MS, Ferreira PM, Groff RE, Haslinger K, Koonce MP, *et al.* (2007) Towards an *in vivo* biologically inspired nanofactory. *Nat Nanotechnol* 2:3-7.
- Narenji H, Gholizadeh P, Aghazadeh M, Rezaee MA, Asgharzadeh M, Kafil HS (2017) Peptide nucleic acids (PNAs): currently potential bactericidal agents. *Biomed Pharmacother* 93:580-588.
- Olusanya TOB, Haj Ahmad RR, Ibegbu DM, Smith JR, Elkordy AA (2018) Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules* 23(4).
- Rampioni G, D'Angelo F, Messina M, Zennaro A, Kuruma Y, Tofani D, Leoni L, Stano P (2018) Synthetic cells produce a quorum sensing chemical signal perceived by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Commun (Camb)* 54:2090-2093.
- Rampioni G, D'Angelo F, Leoni L, Stano P (2019) Gene-Expressing Liposomes as Synthetic Cells for Molecular Communication Studies. *Front Bioeng Biotechnol* 7:1.
- Rampioni G, Leoni L, Stano P (2019) Molecular Communications in the Context of "Synthetic Cells" Research. *IEEE Trans Nanobioscience* 18:43-50.
- Stano, P, Rampioni G, Carrara P, Damiano L, Leoni L, Luisi PL (2012) Semi-synthetic minimal cells as a tool for biochemical ICT. *Biosystems* 109:24-34.
- Van Dessel N, Swofford CA, Forbes NS (2015) Potent and tumor specific: arming bacteria with therapeutic proteins. *Ther Deliv* 6:385-399.
- Weber W, Fussenegger M (2012) Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nat Rev Genet* 13:21-35.