

La biologia sintetica:
dai batteri ingegnerizzati alle
cellule sintetiche in grado di
interagire con le cellule naturali

Giordano Rampioni

Università degli Studi Roma Tre - Dipartimento di Scienze
Laboratorio di Biotecnologie dei Microrganismi

Cos'è la Biologia Sintetica ?

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 5 studiosi di Biologia Sintetica cos'è la Biologia Sintetica otterrete 6 risposte differenti.”

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

La Biologia Sintetica è situata al confine tra Biologia ed Ingegneria, e mira a progettare e realizzare nuovi componenti, sistemi e organismi bio-ispirati non esistenti in natura.

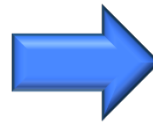
I principi alla base della biologia sintetica sono la **standardizzazione** e la **modularità** delle componenti, e l'**ortogonalità** dei processi.

Cos'è la Biologia Sintetica ?

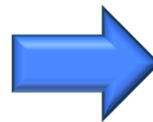
La **standardizzazione** e la **modularità** sono necessarie per poter arrivare a generare sistemi artificiali complessi, secondo una modalità progettuale simile a quella ingegneristica.

Potreste costruire un grattacielo o una portaerei con viti, bulloni e travi di acciaio tutti di dimensioni diverse?

Ingegneria genetica



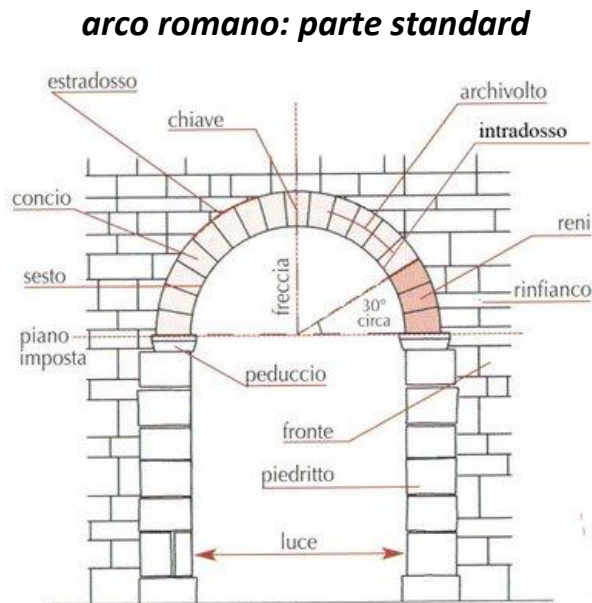
Biologia sintetica



Cos'è la Biologia Sintetica ?

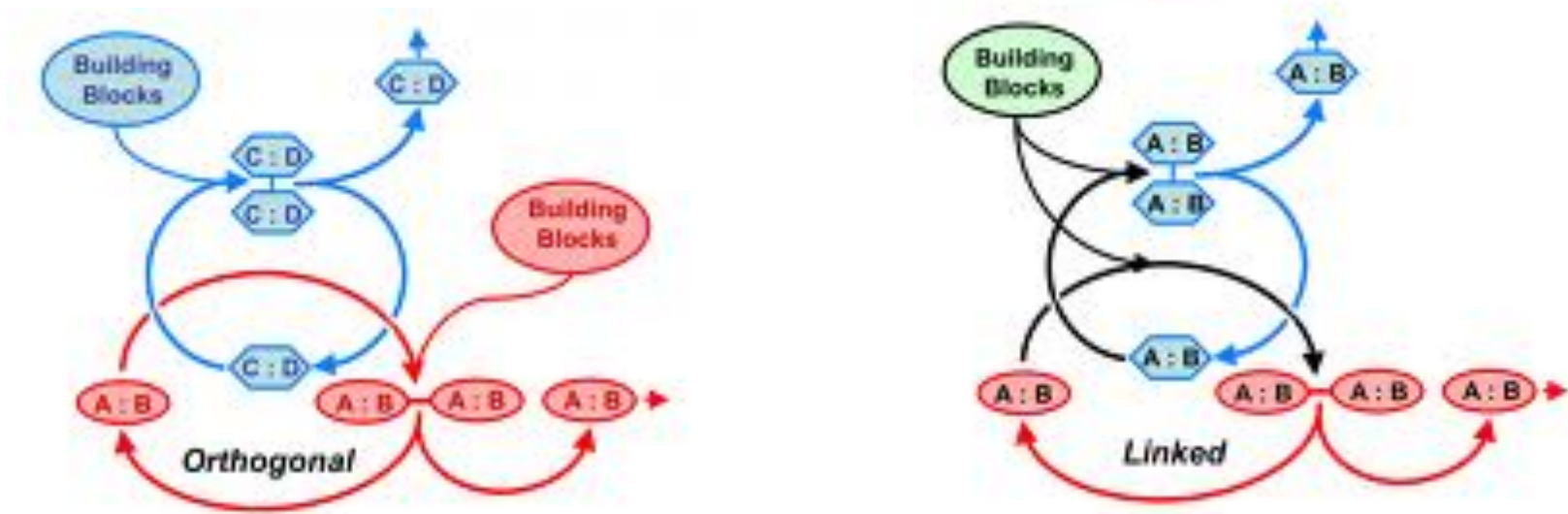
La **standardizzazione** e la **modularità** sono necessarie per poter arrivare a generare sistemi artificiali complessi, secondo una modalità progettuale simile a quella ingegneristica.

Potreste costruire un grattacielo o una portaerei con viti, bulloni e travi di acciaio tutti di dimensioni diverse?



Cos'è la Biologia Sintetica ?

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.

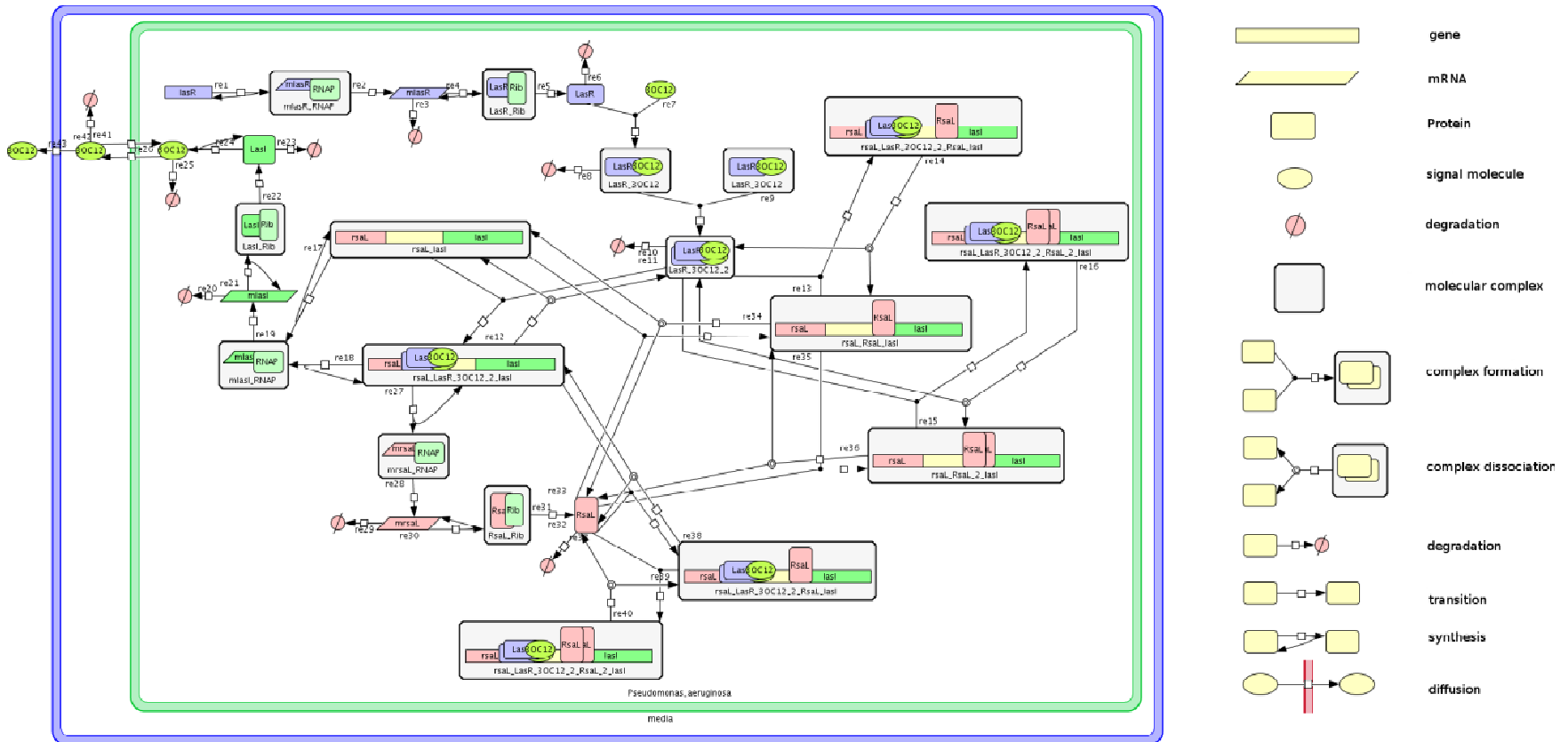


E' importante valutare in quale background cellulare si vuole inserire un sistema genetico/metabolico sintetico, così da non avere interferenze con i processi endogeni. Bisogna definire uno "chassis"!

Cos'è la Biologia Sintetica ?

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 simulazioni in condizioni difficili da riprodurre sperimentale. 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 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 - partsregistry.org

http://partsregistry.org/Promoters


Registry of Standard Biological Parts


Go Search


page discussion view source history

Log in / create account

Promoters

 [Promoter catalog](#)

 [Promoter design](#)

 [Promoter help](#)


A promoter is a DNA sequence that can recruit transcriptional machinery and lead to transcription of the downstream DNA sequence. The specific sequence of the promoter determines the strength of the promoter (a strong promoter leads to a high rate of transcription initiation).

In addition to sequences that "promote" transcription, a promoter may include additional sequences known as operators that control the strength of the promoter. For example, a promoter may include a binding site for a protein that attracts or obstructs the RNAP binding to the promoter. The presence or absence of the protein will affect the strength of the promoter. Such a promoter is known as a regulated promoter.

An input/output description of promoter function

Sometimes, we ignore the details of how a promoter works and think of a promoter as a device that converts inputs into outputs. You can do this when designing a multi-component system that includes promoters whose activity must be regulated by other species in the system. A promoter can be thought of as a device that outputs a certain number of transcribing RNA polymerases per unit time. Promoters can have different numbers of inputs. A constitutive promoter has no inputs. Technically, even a constitutive promoter has inputs, such as the level of free RNA polymerase, but we often assume that levels of free RNA polymerase are either unchanging, or never be the limiting factor in transcription initiation. The level of a repressor that negatively regulates a promoter is an input to a promoter.

References



The registry symbol for a promoter is shown above a typical sequence for a bacterial promoter. The lavender shaded boxes indicate the two most conserved regions of a bacterial promoter and are located at -10 and -35 bases from the transcriptional start site (shaded in green). There are, on average, 17bp between the -10 and -35 sites and 7bp between the -10 site and the transcriptional start site [1][2][3][4].

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	gaggtaaaatagtcacacgcacgggtta		
	BBa_J01006	Key Promoter absorbs 3	caggccggataactccctataatgcgcca		
1★ W	BBa_J23100	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtacagtctagc		
1★ W	BBa_J23101	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctaggtattatgctagc		
1★ W	BBa_J23102	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctaggtactgtctagc		
1★ W	BBa_J23103	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctagggattatgctagc		
1★ W	BBa_J23104	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctaggtattgtctagc		
1★ W	BBa_J23105	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtactatgctagc		
1★ W	BBa_J23106	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtatagctagc		
1★ W	BBa_J23107	constitutive promoter family member	... ggctagctcagccctaggtattatgctagc		
1★ W	BBa_J23108	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctaggtataatgctagc		
1★ W	BBa_J23109	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctagggactgtctagc		
1★ W	BBa_J23110	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtacaatgctagc		
1★ W	BBa_J23111	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtatagctagc		
1★ W	BBa_J23112	constitutive promoter family member	... agctagctcagtcctagggattatgctagc		
1★ W	BBa_J23113	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctagggattatgctagc		
1★ W	BBa_J23114	constitutive promoter family member	... ggctagctcagtcctaggtacaatgctagc		
1★ W	BBa_J23115	constitutive promoter family member	... agctagctcagccctggtacaatgctagc		
1★ W	BBa_J23116	constitutive promoter family member	... aactagctcagtcctaggtataatgctagc		

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	... ttctggtcgactcatagctgaacacaaca		
	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		

Cosa sono i BioBricks ?

Alcuni “*devices*” si possono trovare già assemblati.

Browse parts and devices by function

*This section replaces the previous **Featured parts** pages.*



Biosynthesis: Parts involved in the production or degradation of chemicals and metabolites are listed here.



Cell-cell signaling and quorum sensing: Parts involved in intercellular signaling and quorum sensing between bacteria.



Cell death: Parts involved in killing cells.



Coliroid: Parts involved in taking a bacterial photograph.



Conjugation: Parts involved in DNA conjugation between bacteria.



Motility and chemotaxis: Parts involved in motility or chemotaxis of cells.



Odor production and sensing: Parts that produce or sense odorants.



DNA recombination: Parts involved in DNA recombination.



Viral vectors: Parts involved in the production and modification of Viral vectors.

Cosa sono i BioBricks ?

more...

-?-	Name	Type	Description	Length
1★ W	BBa_F1610	Signalling	3OC ₆ HSL Sender Device	798
1★ W	BBa_F2620	Signalling	3OC ₆ HSL -> PoPS Receiver	1061
1★ W	BBa_F2621	Signalling	3OC ₆ HSL Receiver Device	1158
1★ W	BBa_F2622	Signalling	3OC ₆ HSL Receiver Device	1062
A	BBa_I0424	Signalling	I0404.I6101	2700
A	BBa_I0426	Signalling	I0406.I6107	2798
A	BBa_I0428	Signalling	I0408.I6106	2872
	BBa_I0429	Signalling	I0408.I6116	2858
1★	BBa_I0460	Generator	aiiA Device (B0034.C0060.B0015)	969
1★ W	BBa_I0462	Generator	luxR Protein Generator	936
	BBa_I0464	Signalling	LasR Protein Generator	936
1★	BBa_I0466	Signalling	RhlR Protein Generator	942
	BBa_I0468	Signalling	Cin R Protein Generator	942
A	BBa_I13018	Signalling	LuxR Cassette under Ptet (Other)	998
	BBa_I13035	Signalling	3OC ₆ HSL Receiver Device with Inducible Control of LuxR and a YFP Output device	3003
A	BBa_I13202	Signalling	3OC ₆ HSL Sender Controlled by Lac Repressible Promoter	803
U	BBa_I13203	Signalling	pBad.aiiA protein generator (LVA-)	2129
U	BBa_I13205	Signalling	HSL/aiiA test construct	4239
	BBa_I13206	Signalling	aiiA (LVA-) protein generator driven by ptet	973
A	BBa_I13207	Signalling	HSL/aiiA test construct	4142
A	BBa_I13208	Signalling	aiiA (LVA-) protein generator driven by plac	973
	BBa_I13210	Signalling	Lux/Cin Relaxation Oscillator	5661
	BBa_I13211	Signalling	Biobricked version of the natural Lux quorum sensing system	1964
	BBa_I13212	Signalling	LuxR Protein Generator Controlled by the Left Lux Promoter	1095
	BBa_I13213	Signalling	BioBricked version of the natural Lux system with order reversed	1964
A W	BBa_I13261	Signalling	Lux Receiver (I13263 with reversed part order)	2044

Possiamo rendere un batterio innocuo un killer di patogeni mediante l'utilizzo di BioBricks?

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

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*

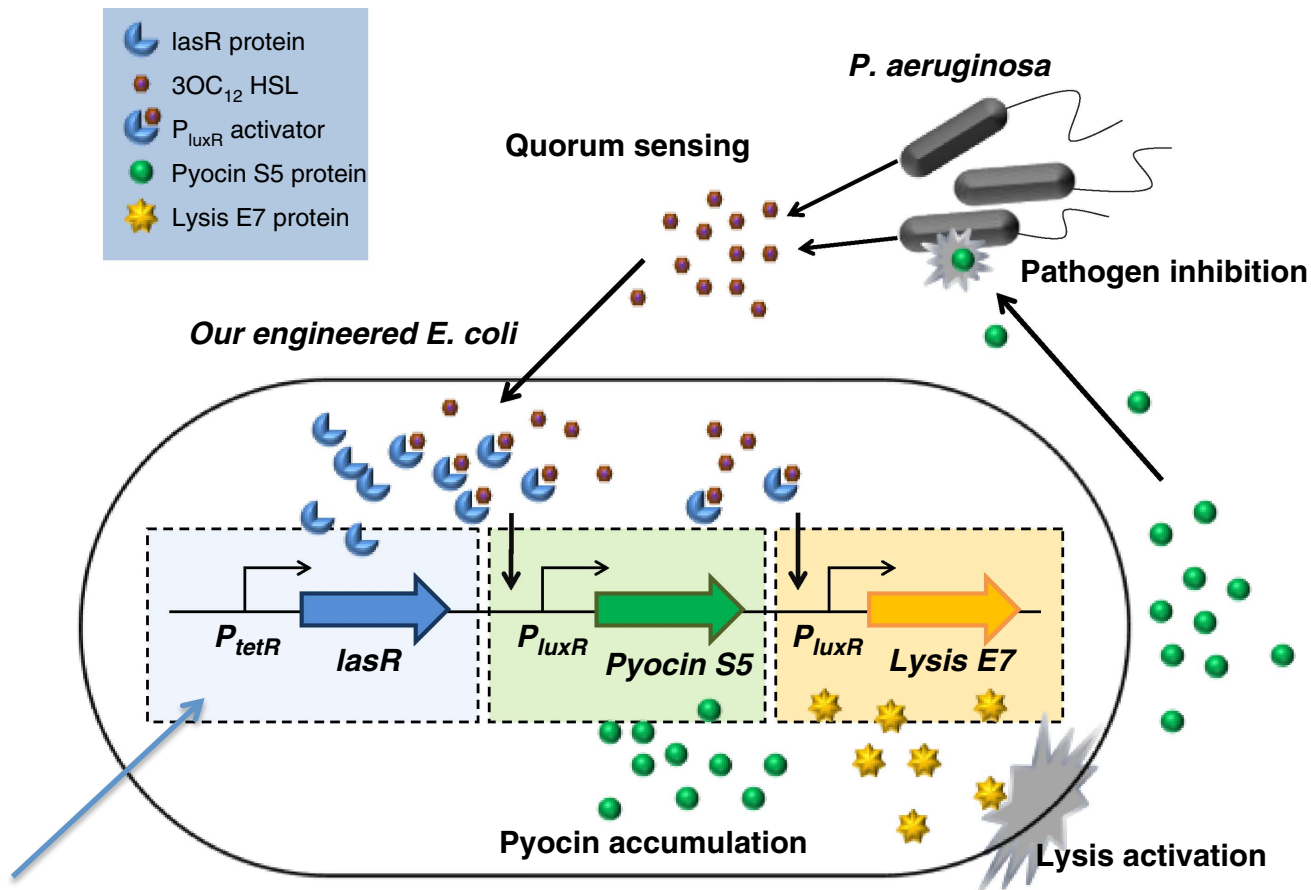
In questo lavoro un ceppo di *E. coli* di laboratorio (non patogeno) è stato ingegnerizzato mediante BioBricks per produrre una tossina in grado di uccidere il patogeno umano *P. aeruginosa*. Il ceppo di *E. coli* ingegnerizzato mediante BioBricks produce la tossina solo quando si trova in presenza di tale patogeno !!!

“Pathogen sensing and killing system”

Possiamo rendere un batterio innocuo un killer di patogeni mediante l'utilizzo di BioBricks?

Nel ceppo di *E. coli* è stato inserito il gene *lasR*, codificante per il recettore LasR, attivato dalla molecola segnale del QS di *P. aeruginosa* 3OC₁₂-HSL, il gene per la "tossina" piocina S5 ed il gene per la lisina E7. Il gene *lasR* è espresso in modo costitutivo, mentre i geni per la piocina S5 e la lisina E7 sono sotto il controllo di un promotore attivato dal complesso LasR/3OC₁₂-HSL.

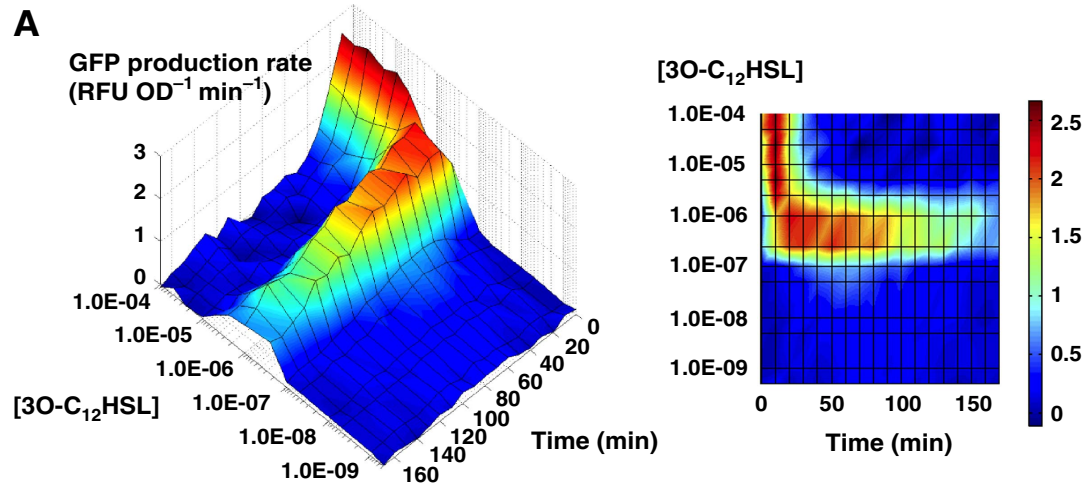
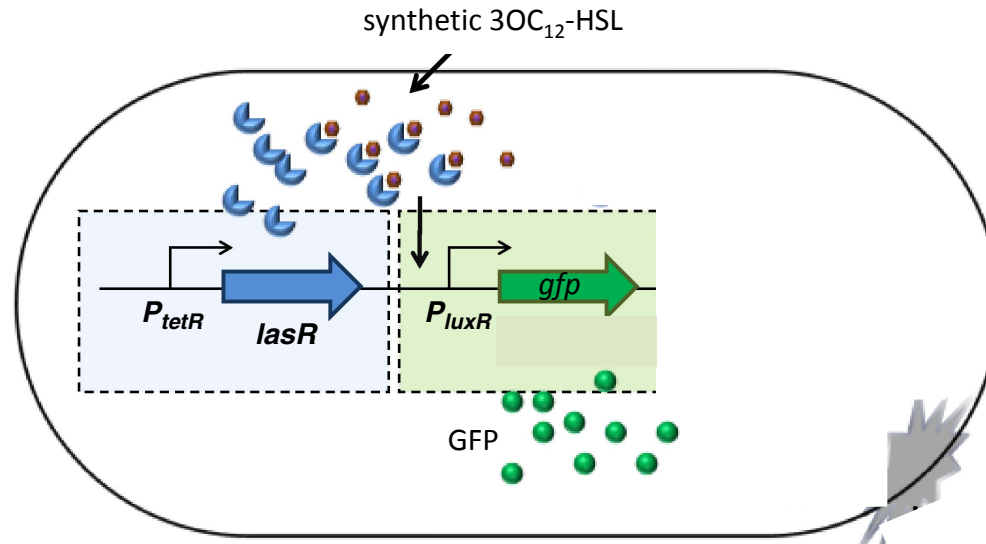
Quando il ceppo di *E. coli* "sente" *P. aeruginosa*, produce la piocina S5 e la rilascia (liscando).



Circuito regolativo sintetico generato mediante Biobricks.

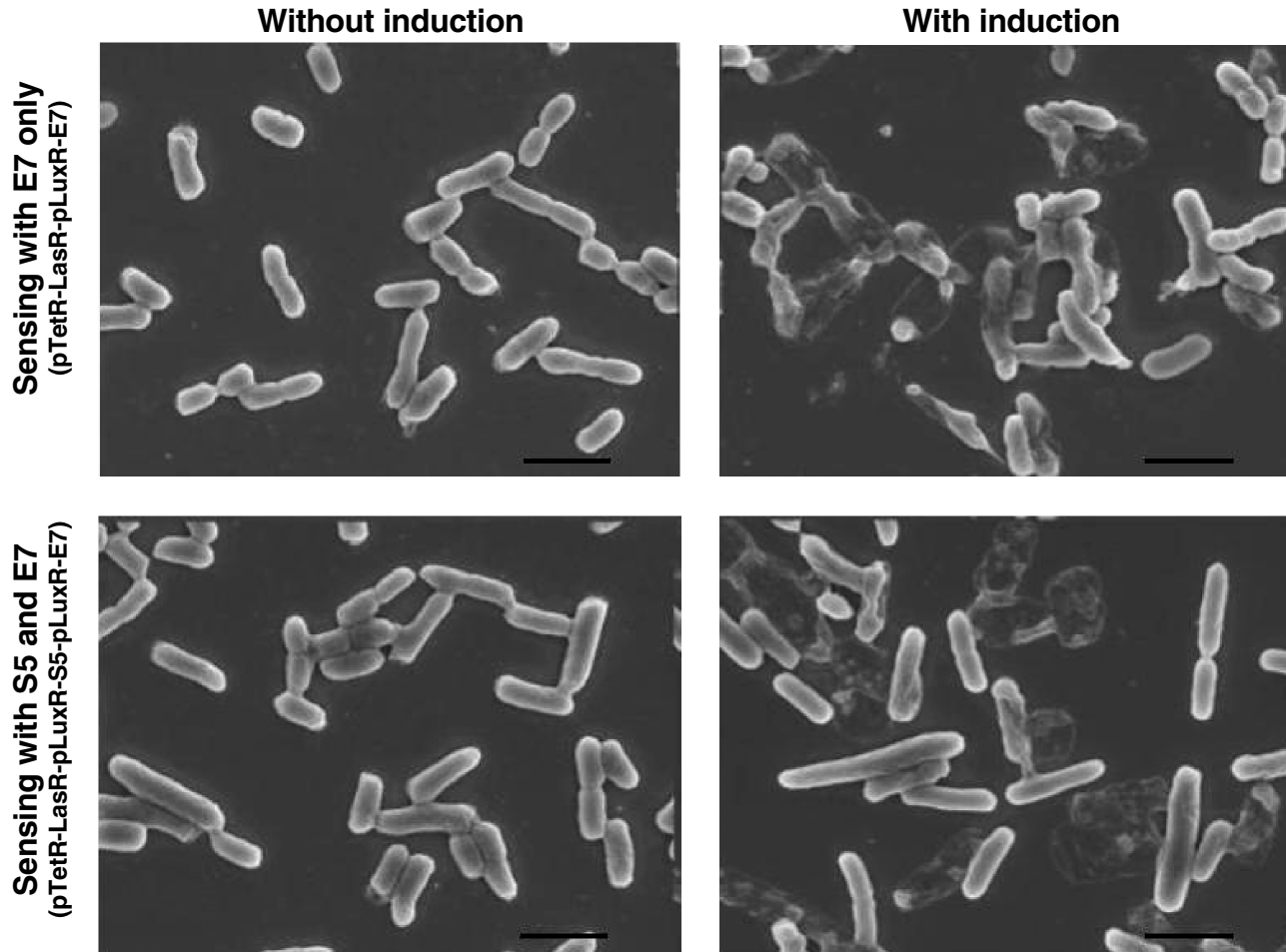
Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen

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



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*

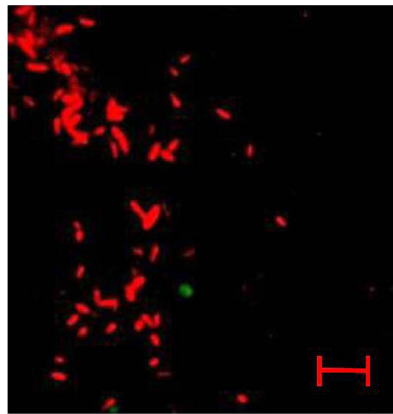
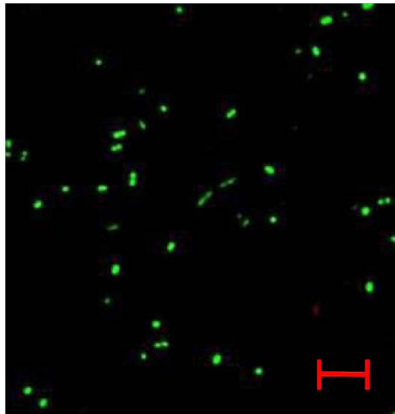


Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen

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

Exposed to supernatant
of wild-type *E. coli*

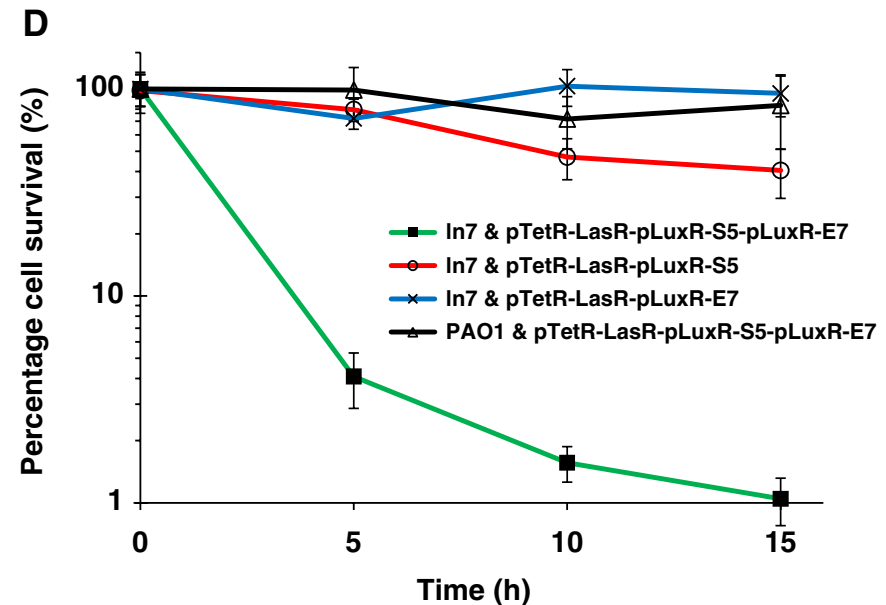
Exposed to supernatant of
engineered *E. coli* induced
with native 3OC₁₂HSL



→ *P. aeruginosa* cells imaged with
LIVE/DEAD staining.

The engineered *E. coli* strain can detect
and kill *P. aeruginosa*.

←

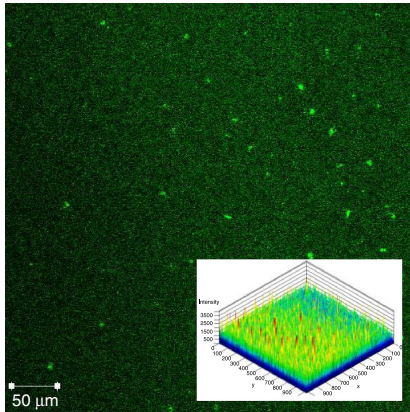


Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen

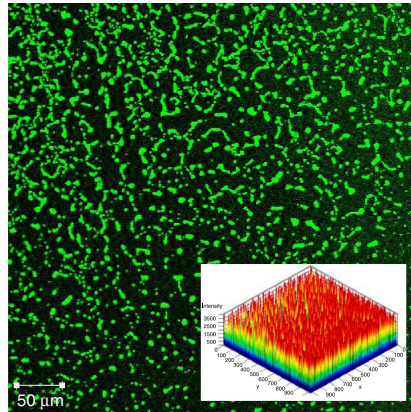
Nazanin Saeidi¹, Choon Kit Wong¹, Tat-Ming Lo, Hung Xuan Nguyen², Hua Ling, Susanna Su Jan Leong, Chueh Loo Poh* and Matthew Wook Chang*

B

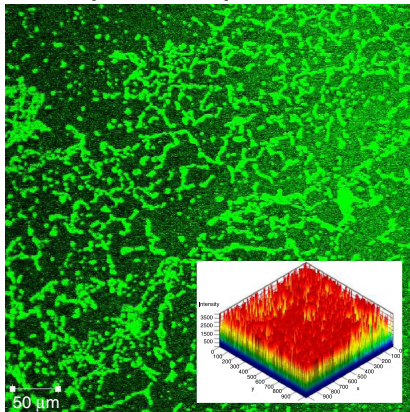
In7 biofilm cultured with *E. coli*
pTetR-LasR-pLuxR-S5-pLuxR-E7



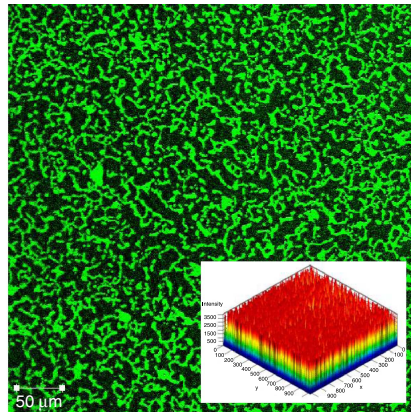
In7 biofilm cultured with *E. coli*
pTetR-LasR-pLuxR-S5



In7 biofilm cultured with *E. coli*
pTetR-LasR-pLuxR-E7



In7 biofilm



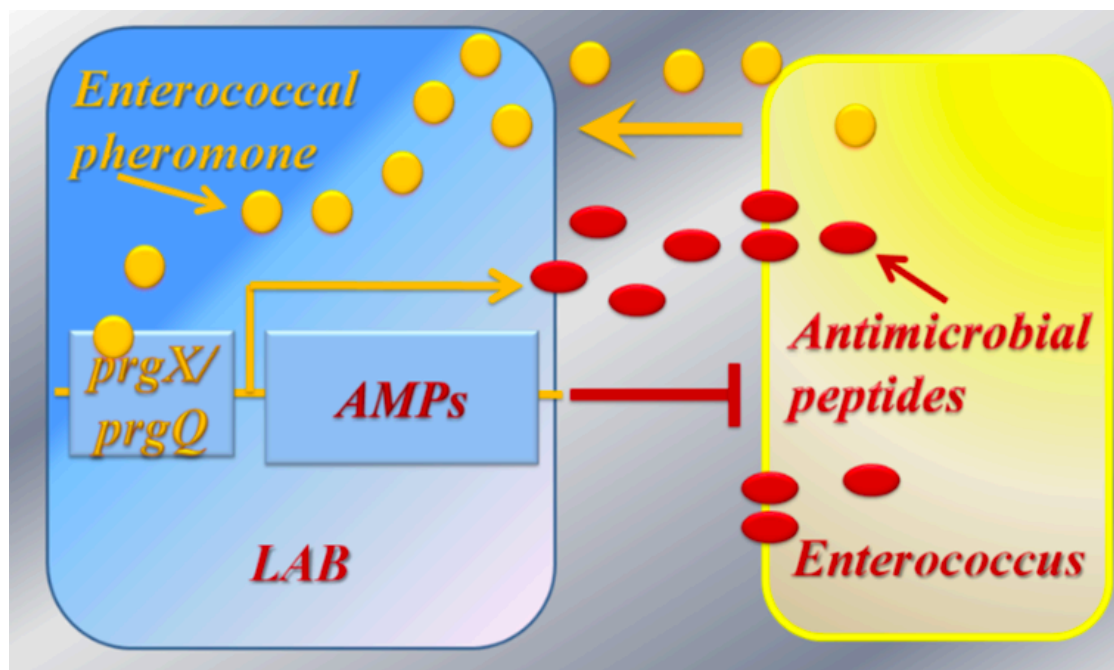
This engineered bacterium can be also considered as an intelligent drug delivery vehicle!

The same approach can be used to engineer probiotics

Modified Lactic Acid Bacteria Detect and Inhibit Multiresistant Enterococci

Juan Borrero,[†] Yuqing Chen,[‡] Gary M. Dunny,[‡] and Yiannis N. Kaznessis^{*,†}

[†]Department of Chemical Engineering and Materials Science, [‡]Department of Microbiology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455, United States



Possiamo rendere un batterio innocuo un killer di tumori ?

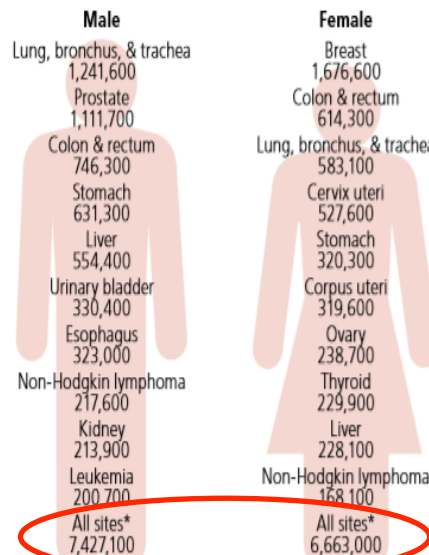
Worldwide

	Rank	Deaths	%
Cardiovascular diseases	1	17,513	31%
Malignant neoplasms	2	8,204	15%
Infectious and parasitic diseases	3	6,431	12%
Respiratory diseases	4	4,040	7%
Unintentional injuries	5	3,716	7%
Respiratory infections	6	3,060	5%
Digestive diseases	7	2,263	4%
Diabetes mellitus	8	1,497	3%
Intentional injuries	9	1,428	3%
Genitourinary diseases	10	1,195	2%
Nutritional deficiencies	11	559	1%
Congenital anomalies	12	556	1%
Maternal conditions	13	296	1%
Musculoskeletal diseases	14	216	0%
Other neoplasms	15	193	0%
All causes		55,843	

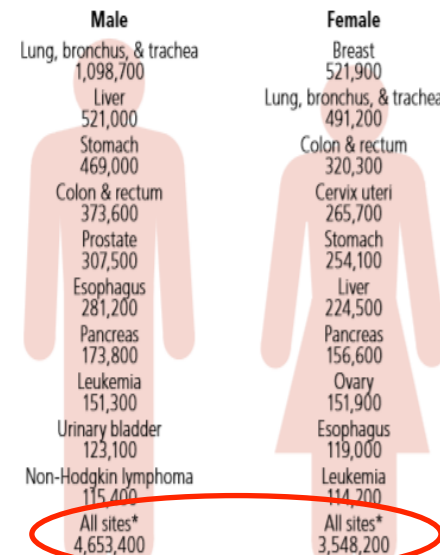
Secondo gli ultimi dati raccolti dalla Organizzazione Mondiale della Sanità le neoplasie risultano essere la seconda causa di morte nel mondo.

Solo nel 2012 i nuovi casi di tumore nel mondo sono stati 14 milioni ed i decessi più di 8 milioni.

Estimated New Cases



Estimated Deaths



Worldwide

* Sono esclusi i dati riguardanti il tumore alla pelle di tipo non melanoma. Le stime totali potrebbero non essere accurate a causa dell'arrotondamento.

Terapie attualmente utilizzate nella cura dei tumori

- Chemioterapia

Utilizzo di farmaci antitumorali

- Radioterapia

Irradiazione con raggi ionizzanti

- Chirurgia

Asportazione fisica della massa tumorale

Limiti delle terapie attualmente utilizzate

Bassa selettività per le cellule tumorali

Scarsa capacità di raggiungere e di penetrare i tessuti tumorali

Incapacità di trattare le metastasi

Migliorare le attuali terapie o ricercarne di nuove

```
graph LR; A["Bassa selettività per le cellule tumorali"] --> D["Migliorare le attuali terapie o ricercarne di nuove"]; B["Scarsa capacità di raggiungere e di penetrare i tessuti tumorali"] --> D; C["Incapacità di trattare le metastasi"] --> D;
```


I batteri sono promettenti agenti antitumorali

1868

Karl David Wilhelm Busch induce volontariamente l'infezione erisipela in una ragazza affetta da tumore, ed osserva un'evidente regressione della massa tumorale.

1882

Friedrich Fehleisen individua l'agente eziologico dell'erisipela, *Streptococcus pyogenes*, lo inocula in 7 pazienti affetti da tumore, ed osserva regressione totale del tumore in 3 pazienti.

1893

William Bradley Coley studia gli effetti antitumorali di un preparato ottenuto filtrando una co-coltura dei batteri *S. pyogenes* e *Serratia marcescens*. Questo preparato, noto come "tossina" di Coley, porta alla regressione dei tumori solidi in molti dei pazienti seguiti da Coley.

1899

La *Parke-Davis & Company*, un'importante casa farmaceutica americana, inizia la produzione su larga scala della "tossina" di Coley.

1936

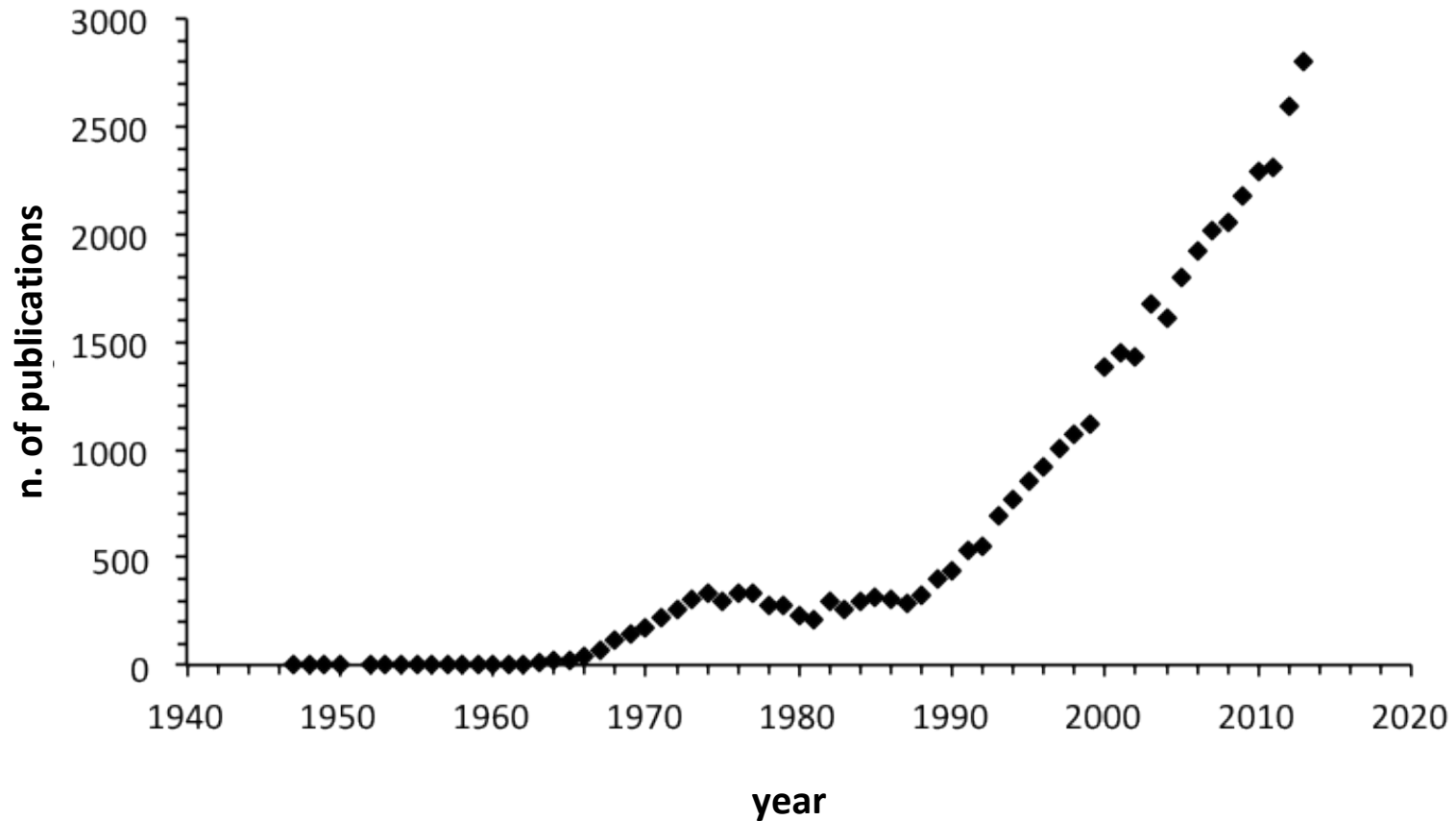
William Coley muore dopo aver trattato con la sua "tossina" più di mille pazienti affetti da tumore. Il medico riporta che tale trattamento è risultato efficace in oltre il 50% dei casi.

1952

La *Parke-Davis & Company* smette di produrre la "tossina" di Coley, che 10 anni dopo non viene riconosciuta dalla *Food and Drug Administration* come farmaco antitumorale.

Bacteria are promising anti-tumour agents

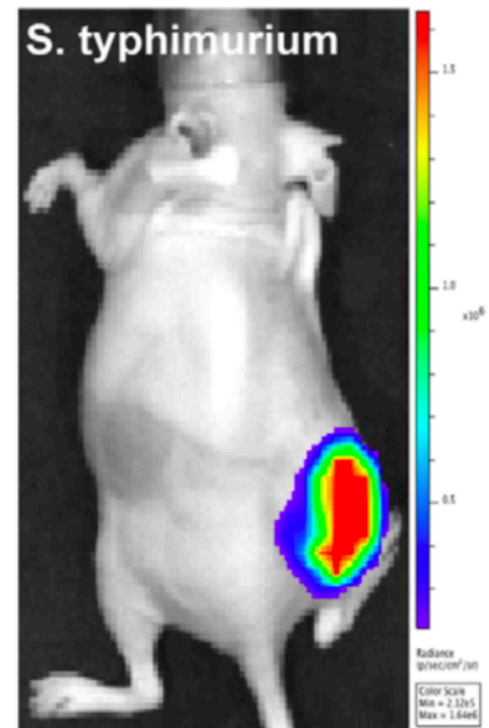
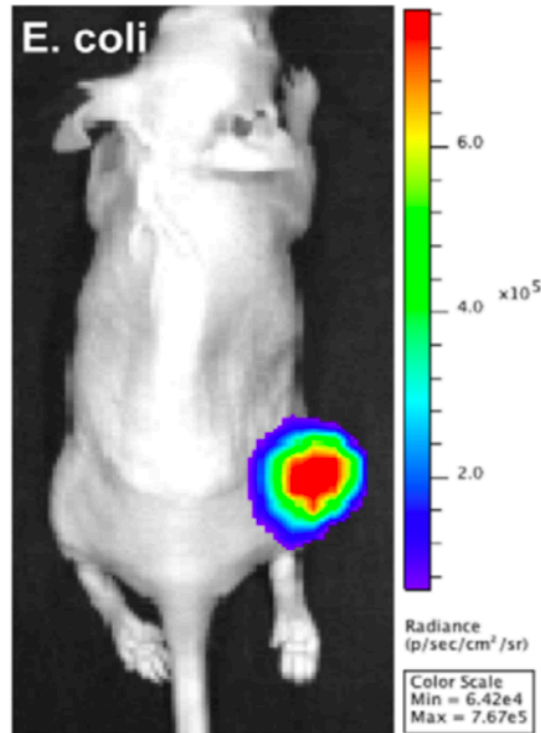
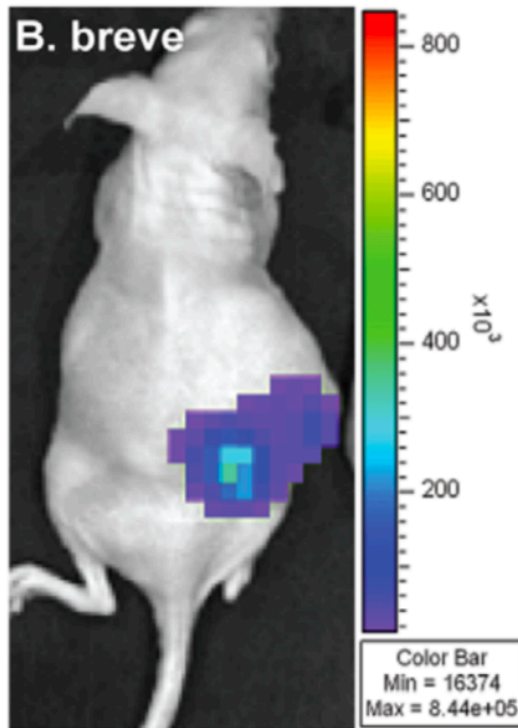
Scientific manuscripts retrieved in Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) with the query "*bacteria AND tumour AND therapy*".



High Resolution *In Vivo* Bioluminescent Imaging for the Study of Bacterial Tumour Targeting

Michelle Cronin¹, Ali R. Akin², Sara A. Collins^{1,3}, Jeff Meganck², Jae-Beom Kim², Chwanrow K. Baban¹, Susan A. Joyce⁴, Gooitzen M. van Dam⁵, Ning Zhang², Douwe van Sinderen⁴, Gerald C. O'Sullivan¹, Noriyuki Kasahara³, Cormac G. Gahan^{4,6}, Kevin P. Francis², Mark Tangney^{1,3*}

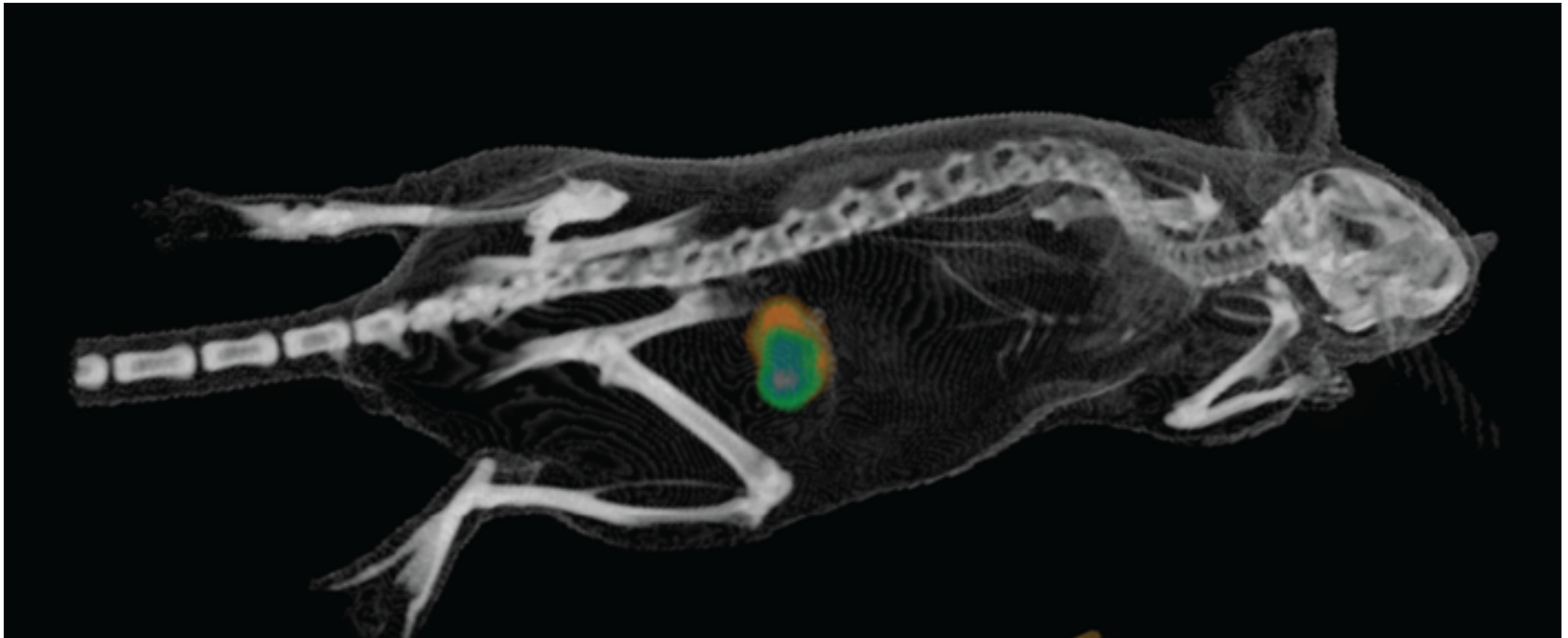
Many genera of bacteria have been shown to preferentially accumulate in tumours, including *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium* and *Bifidobacterium*. Bacteria administered by tail vein injection co-localize with solid tumours.



High Resolution *In Vivo* Bioluminescent Imaging for the Study of Bacterial Tumour Targeting

Michelle Cronin¹, Ali R. Akin², Sara A. Collins^{1,3}, Jeff Meganck², Jae-Beom Kim², Chwanrow K. Baban¹, Susan A. Joyce⁴, Gooitzen M. van Dam⁵, Ning Zhang², Douwe van Sinderen⁴, Gerald C. O'Sullivan¹, Noriyuki Kasahara³, Cormac G. Gahan^{4,6}, Kevin P. Francis², Mark Tangney^{1,3*}

Many genera of bacteria have been shown to preferentially accumulate in tumours, including *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium* and *Bifidobacterium*. Bacteria administered by tail vein injection co-localize with solid tumours.

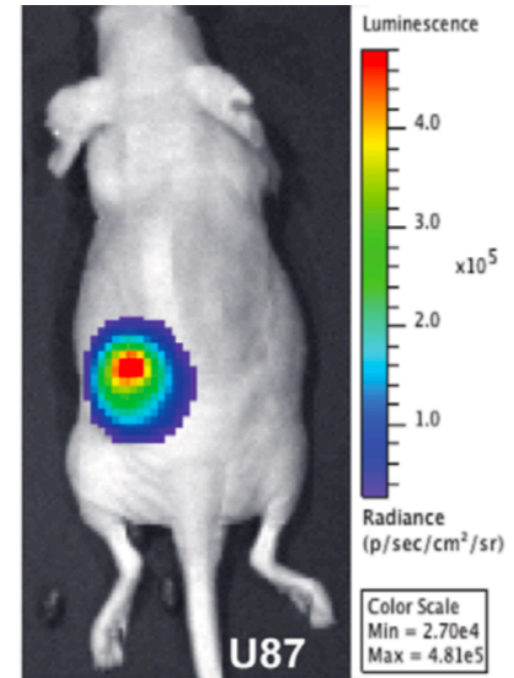
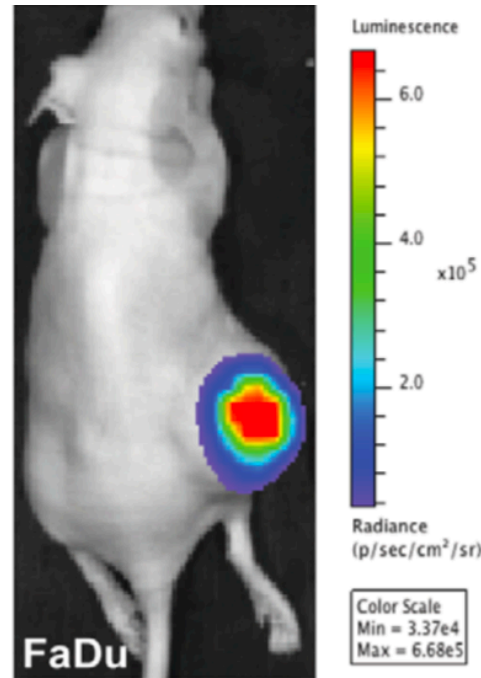
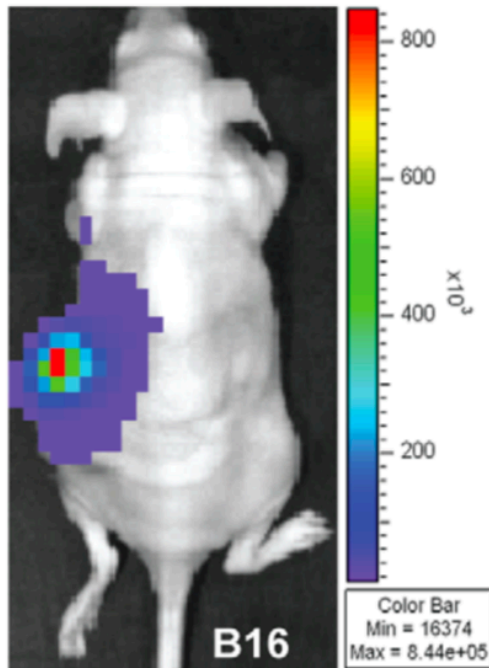


High Resolution *In Vivo* Bioluminescent Imaging for the Study of Bacterial Tumour Targeting

Michelle Cronin¹, Ali R. Akin², Sara A. Collins^{1,3}, Jeff Meganck², Jae-Beom Kim², Chwanrow K. Baban¹, Susan A. Joyce⁴, Gooitzen M. van Dam⁵, Ning Zhang², Douwe van Sinderen⁴, Gerald C. O'Sullivan¹, Noriyuki Kasahara³, Cormac G. Gahan^{4,6}, Kevin P. Francis², Mark Tangney^{1,3*}

Bacteria co-localize with different tumour types.

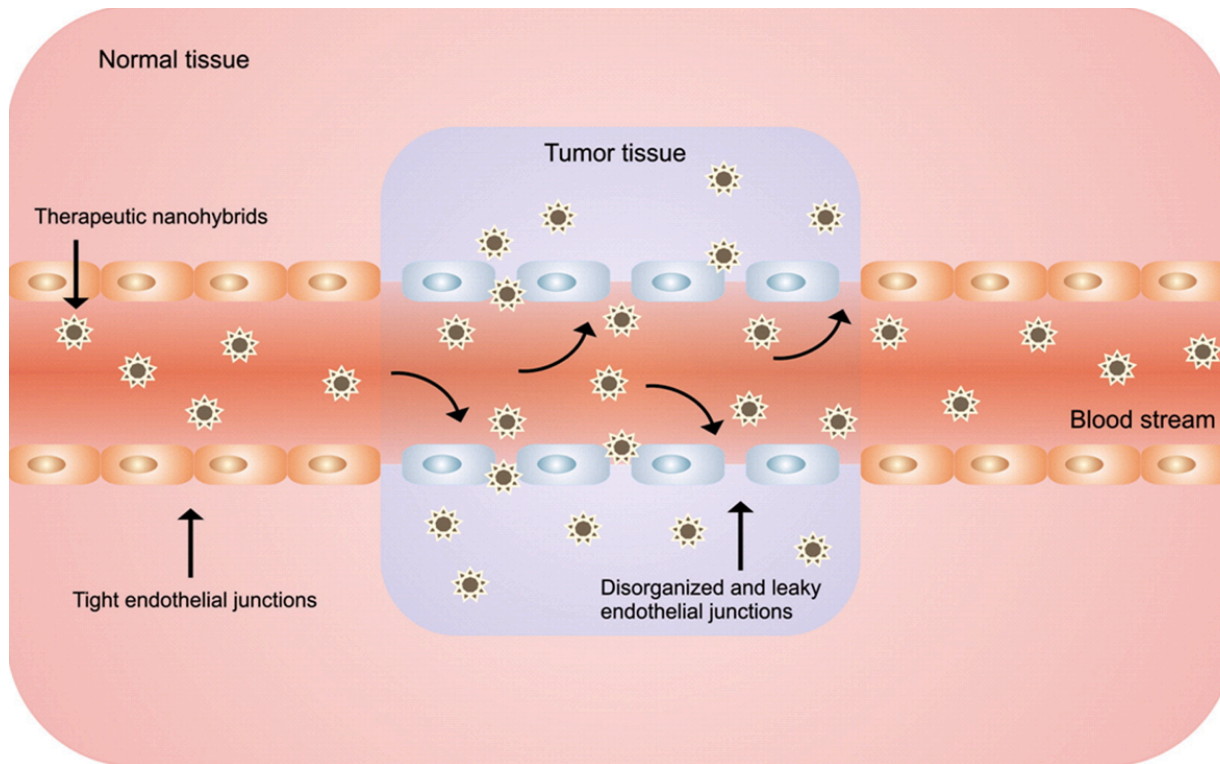
e.g. *E. coli* MG1655 co-localization with melanoma B16, carcinoma FaDu, e glioblastoma U87.



High Resolution *In Vivo* Bioluminescent Imaging for the Study of Bacterial Tumour Targeting

Michelle Cronin¹, Ali R. Akin², Sara A. Collins^{1,3}, Jeff Meganck², Jae-Beom Kim², Chwanrow K. Baban¹, Susan A. Joyce⁴, Gooitzen M. van Dam⁵, Ning Zhang², Douwe van Sinderen⁴, Gerald C. O'Sullivan¹, Noriyuki Kasahara³, Cormac G. Gahan^{4,6}, Kevin P. Francis², Mark Tangney^{1,3*}

This ability is partly due to the "*enhanced permeability and retention effect*".

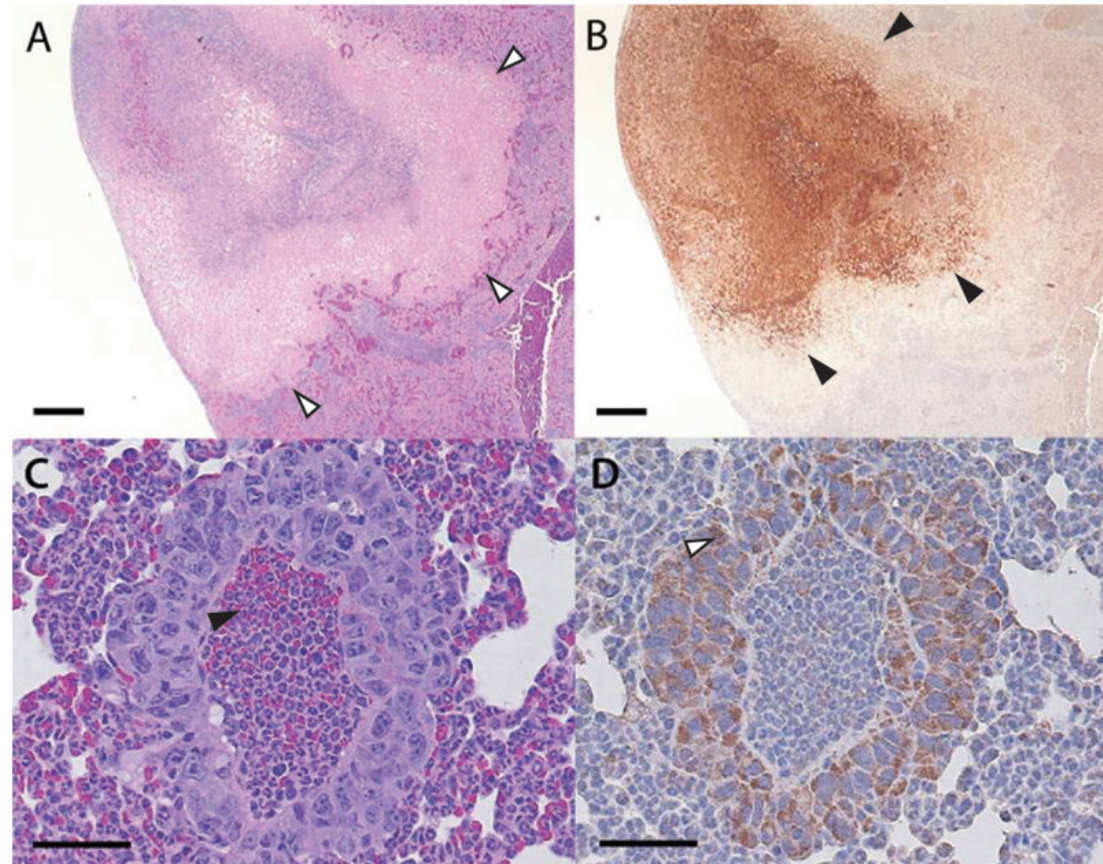


In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis

Sabha Ganai^{1,2}, Richard B. Arenas^{1,2,3}, Jeremy P. Sauer⁴, Brooke Bentley³, and Neil S. Forbes^{2,3,4,*}

Cancer Gene Ther. 2011 July ; 18(7): 457–466.

Bacteria also co-localize with lung and liver metastasis.





HHS Public Access

Author manuscript

Sci Transl Med. Author manuscript; available in PMC 2015 July 22.

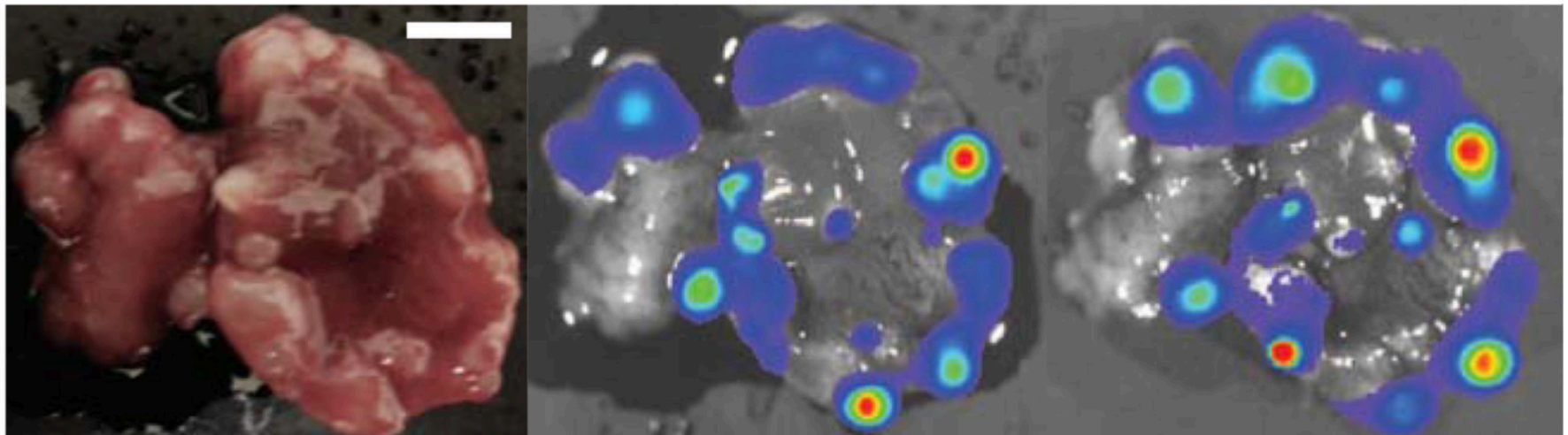
Published in final edited form as:

Sci Transl Med. 2015 May 27; 7(289): 289ra84. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3519.

Programmable probiotics for detection of cancer in urine

Tal Danino^{1,*}, Arthur Prindle^{2,*}, Gabriel A. Kwong^{1,†}, Matthew Skalak¹, Howard Li², Kaitlin Allen¹, Jeff Hasty^{2,3,4,‡}, and Sangeeta N. Bhatia^{1,5,6,7,8,§,‡}

Co-localization of the orally administered probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 with liver metastasis in mouse.



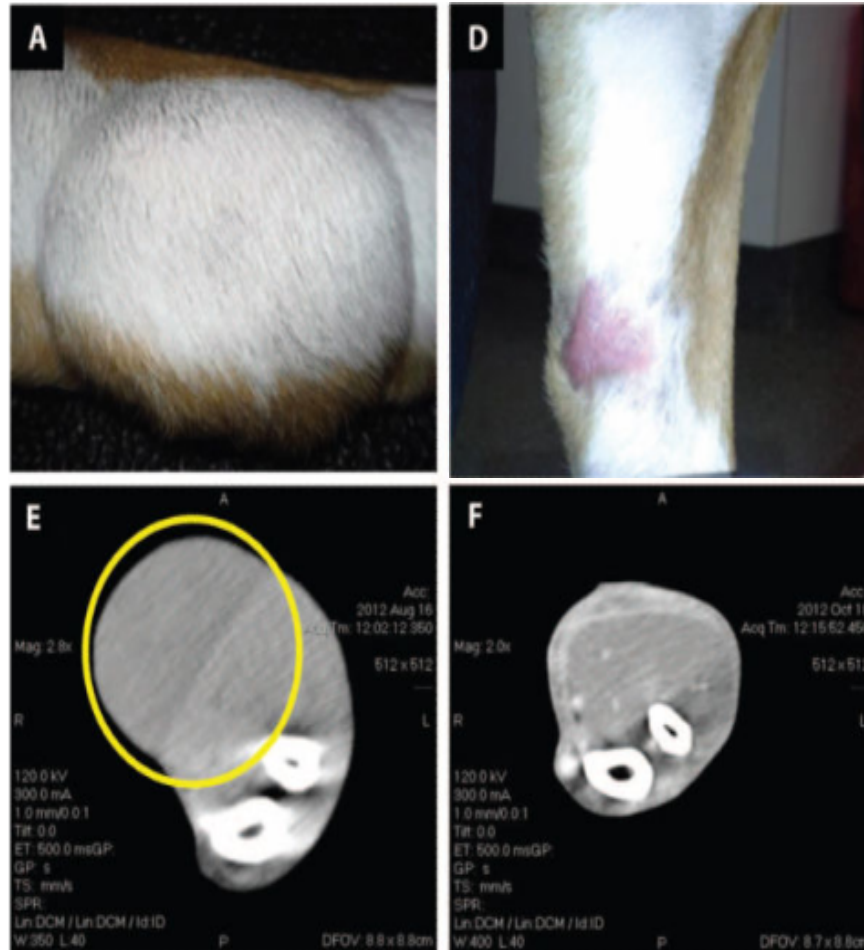
Excised liver

Tumor luminescence

Bacterial luminescence

Alcuni batteri hanno attività oncolitica

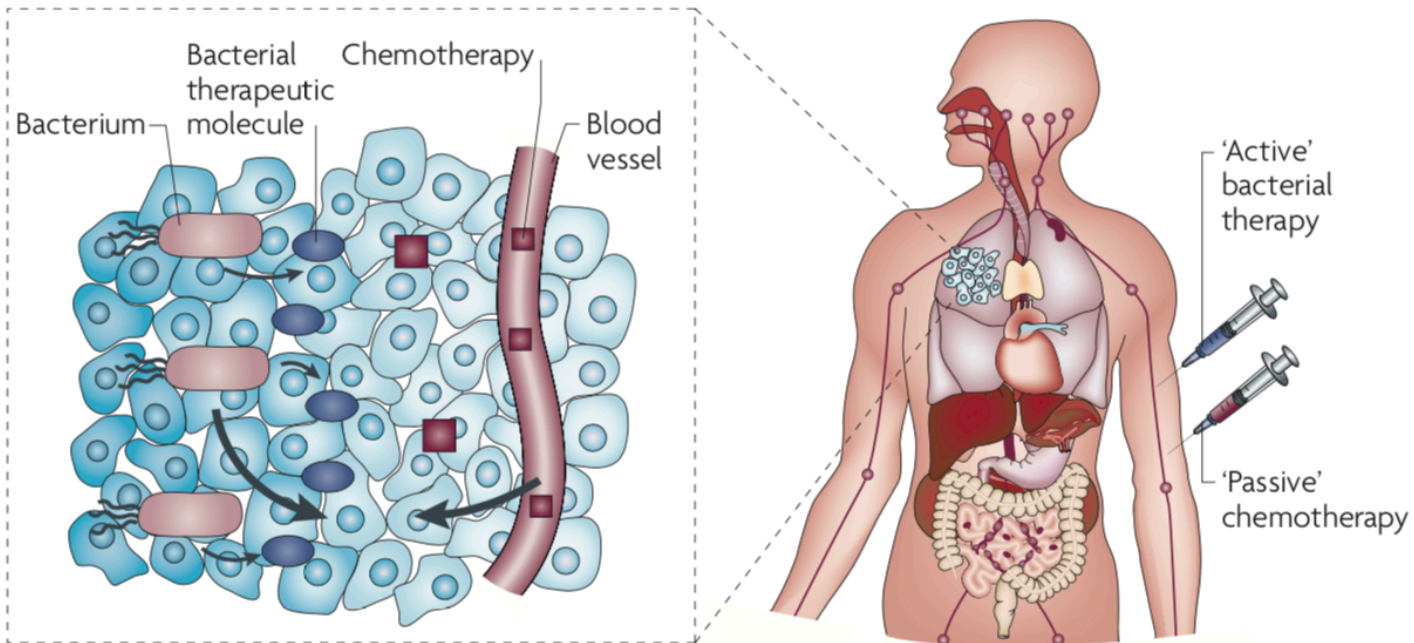
Spore di *Clostridium* possono germinare solo nella zona anossica interna alla massa tumorale. Qui alcuni ceppi producono proteasi che degradano le cellule tumorali, espletando un'attività oncolitica.



Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy

Neil S. Forbes

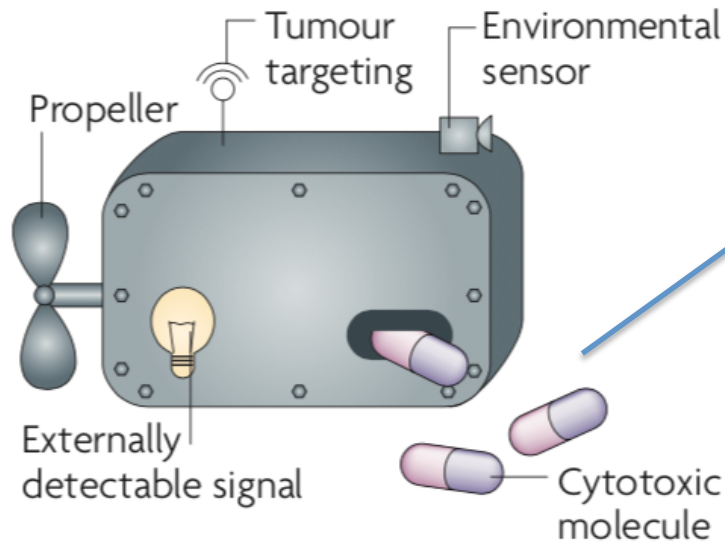
Some bacteria, especially *Clostridium* sp., are endowed with oncolytic activity. Bacteria can be used in combination with “passive” chemotherapy.



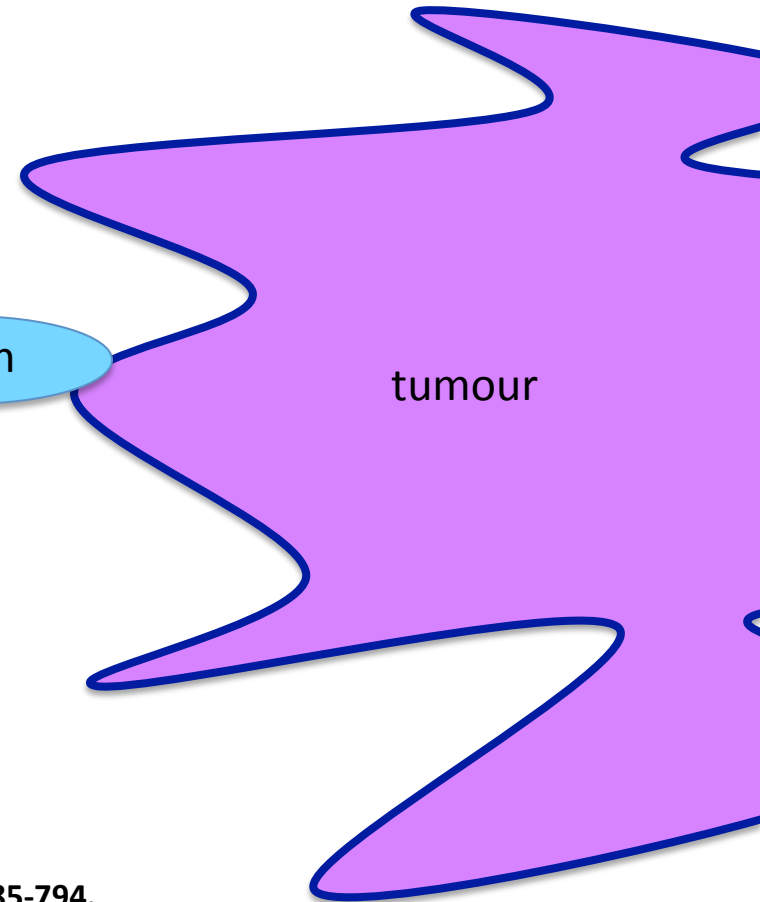
Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy

Neil S. Forbes

Bacteria can be engineered to convert pro-drugs in anticancer drugs or to produce anticancer drugs *in situ*.



Toxin



Spores of *Clostridium* engineered for clinical efficacy and safety cause regression and cure of tumors *in vivo*

John T. Heap^{1,5,*}, Jan Theys^{2,*}, Muhammad Ehsaan¹, Aleksandra M Kubiak¹, Ludwig Dubois², Kim Paesmans², Lieve Van Mellaert³, Richard Knox⁴, Sarah A. Kuehne¹, Phillipe Lambin² and Nigel P. Minton¹

¹ Clostridia Research Group, Centre for Biomolecular Sciences, School of Life Sciences, The University of Nottingham, University Park, Nottingham, UK.

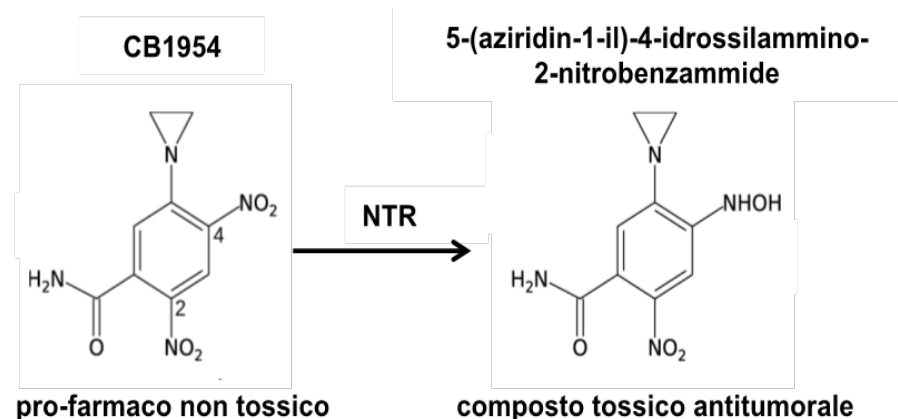
² Maastr Lab, Research Institute GROW, University of Maastricht, MD Maastricht, The Netherlands.

³ Molecular Bacteriology, Rega Institute for Medical Research, University Leuven, Minderbroedersstraat, Belgium.

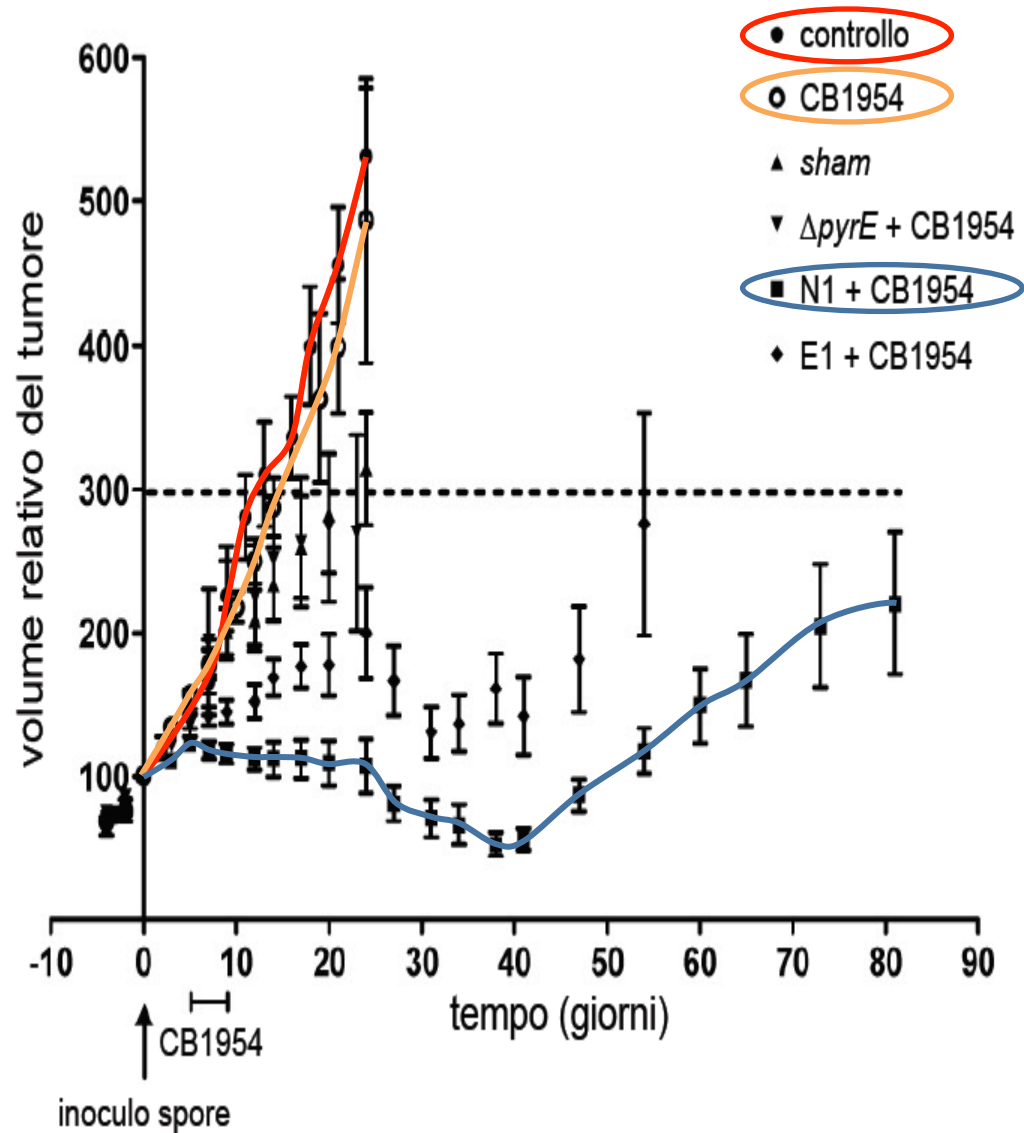
⁴ Morvus Technology Limited, Ty Myddfai, Llanarthne, Carmarthen, UK.

⁵ Present address: Centre for Synthetic Biology and Innovation, Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK.

Spore di *Clostridium* possono germinare nella zona anossica di tumori solidi e convertire in situ un pro-farmaco (non tossico) in un farmaco antitumorale (tossico).



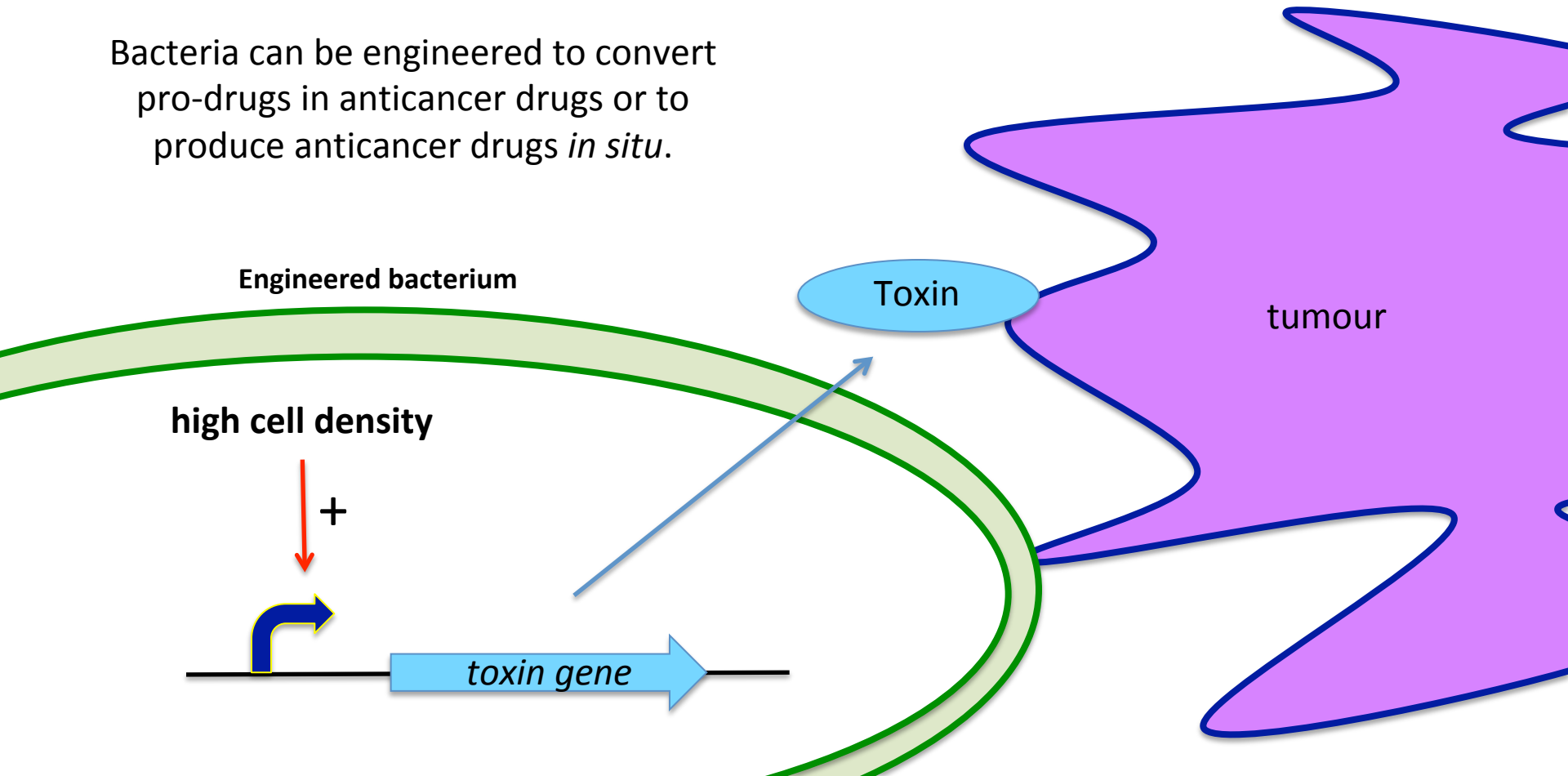
La somministrazione combinata di spore del ceppo N1 e del farmaco CB1954 rallenta l'aumento di volume della massa tumorale.



Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy

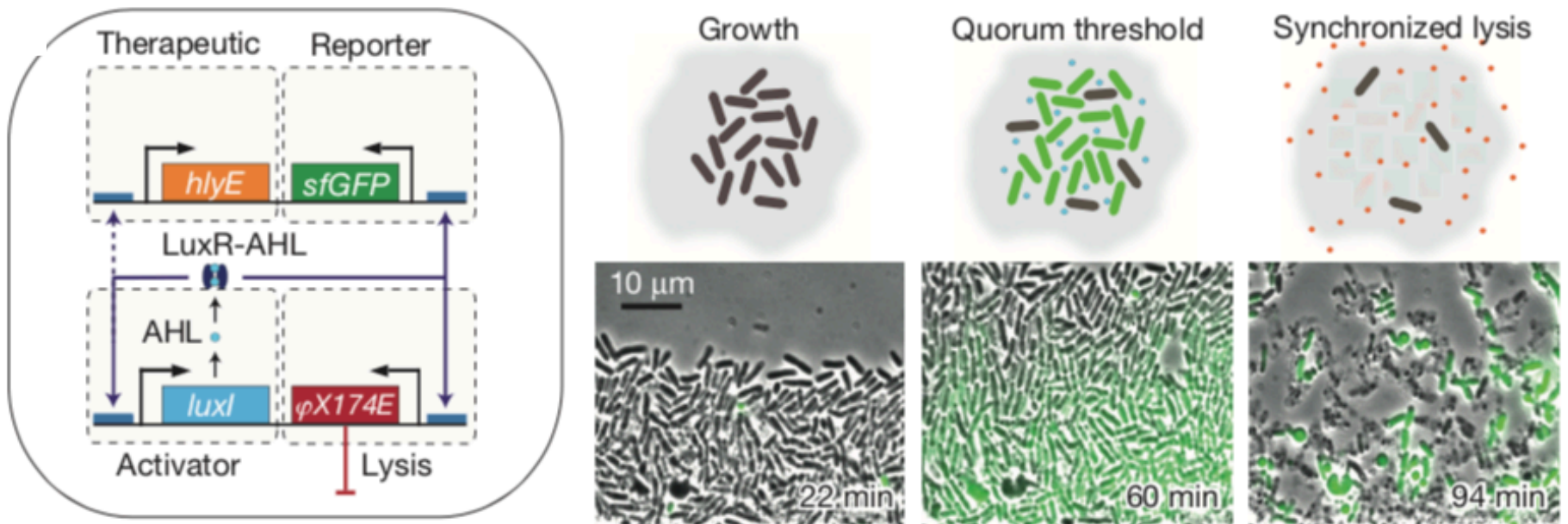
Neil S. Forbes

Bacteria can be engineered to convert pro-drugs in anticancer drugs or to produce anticancer drugs *in situ*.



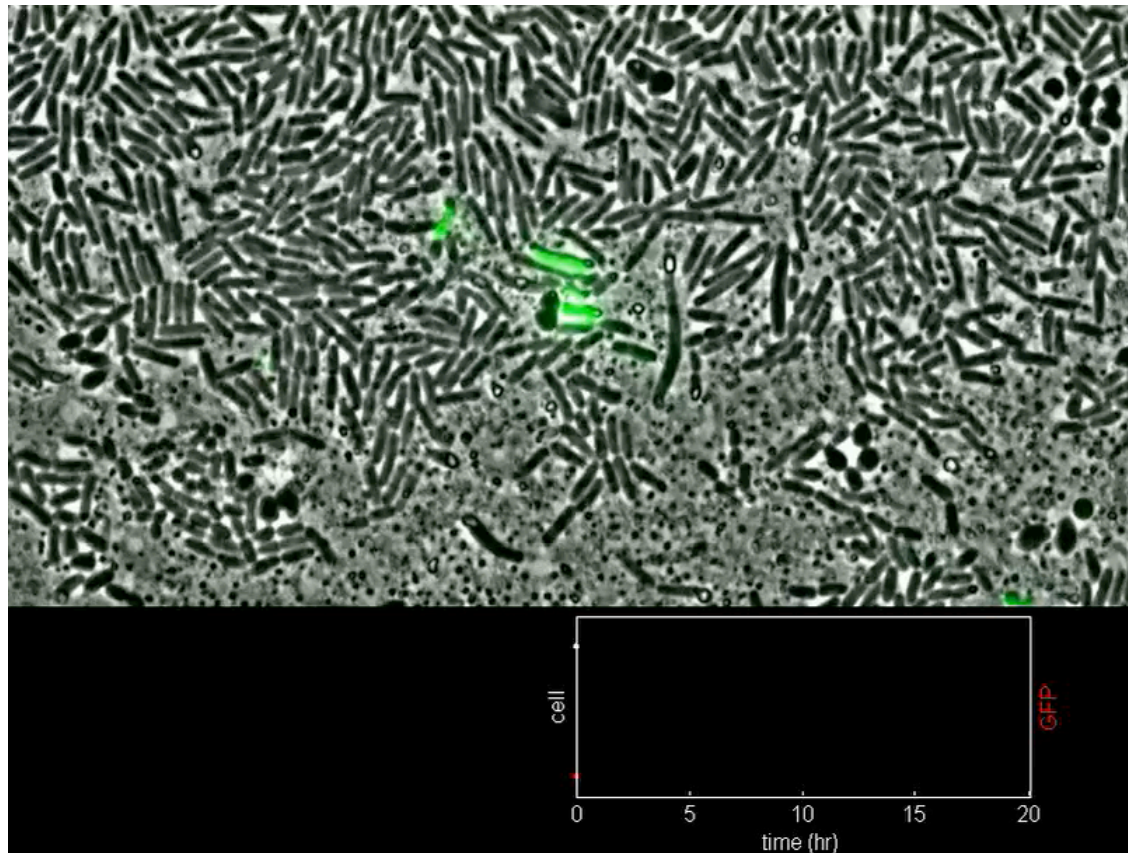
Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

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



Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

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

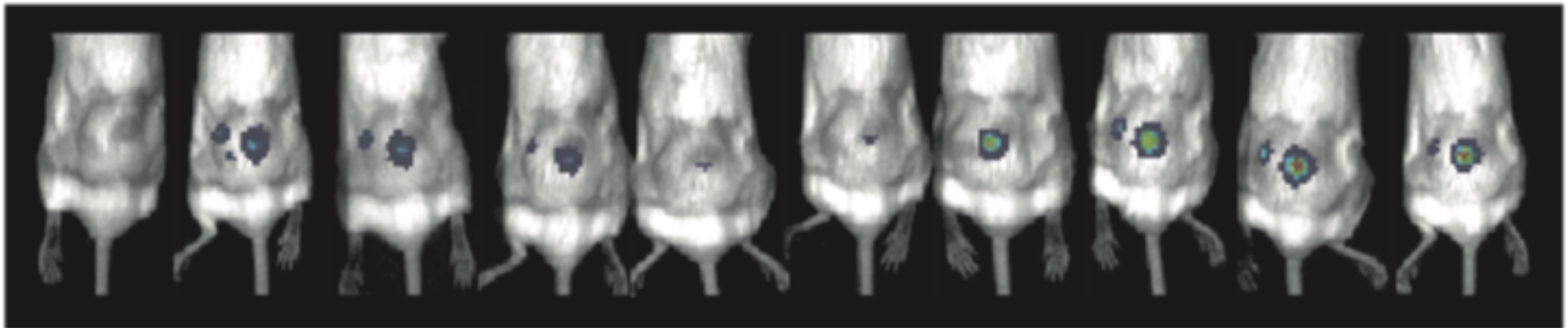


Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

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

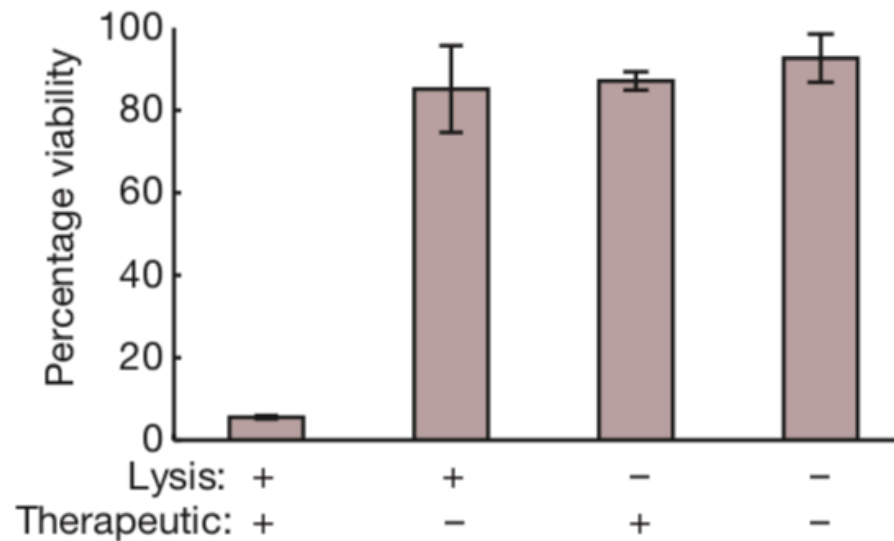
Intratumoural delivery

0 h 14 h 19 h 25 h 39 h 43 h 49 h 55 h 64 h 76 h



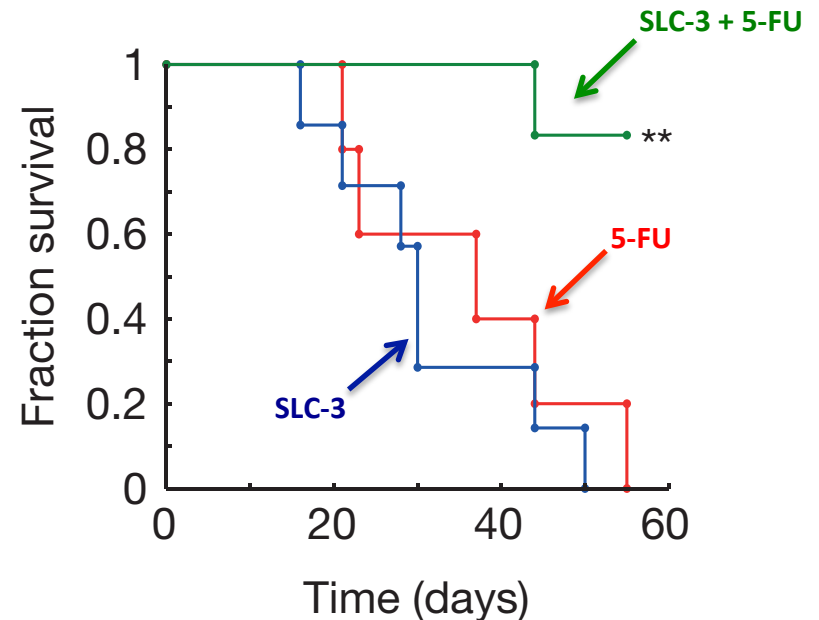
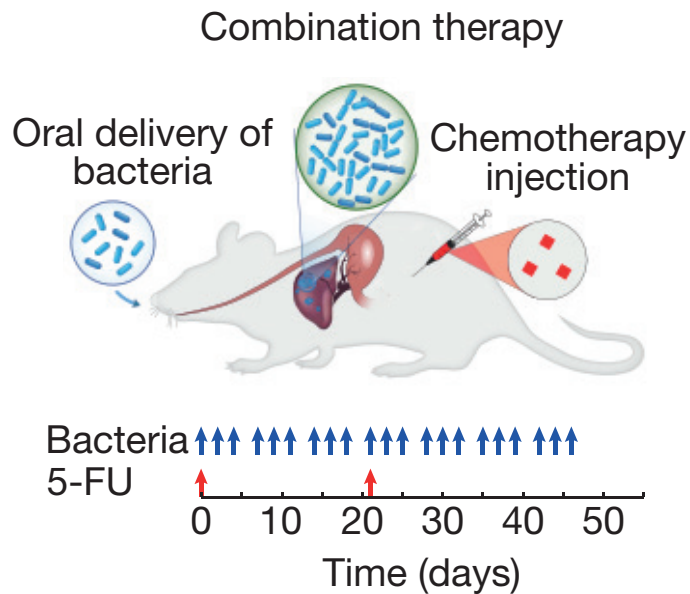
Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

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



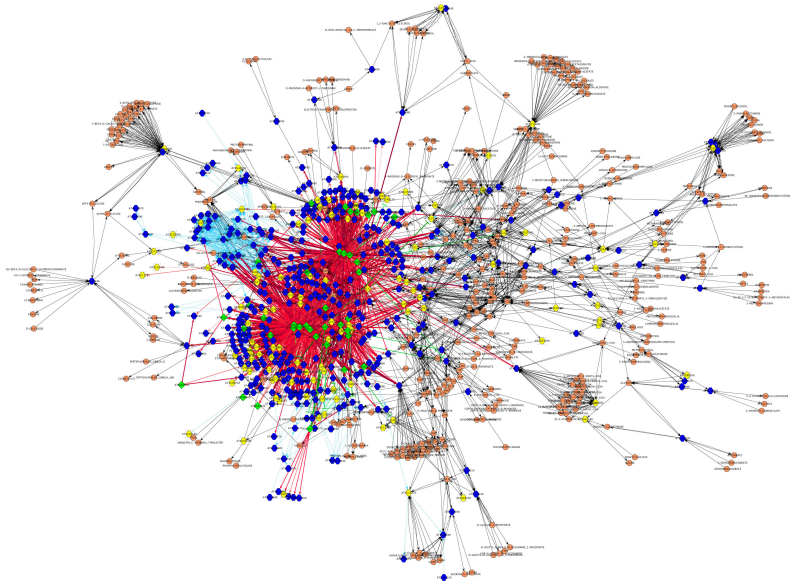
Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery

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



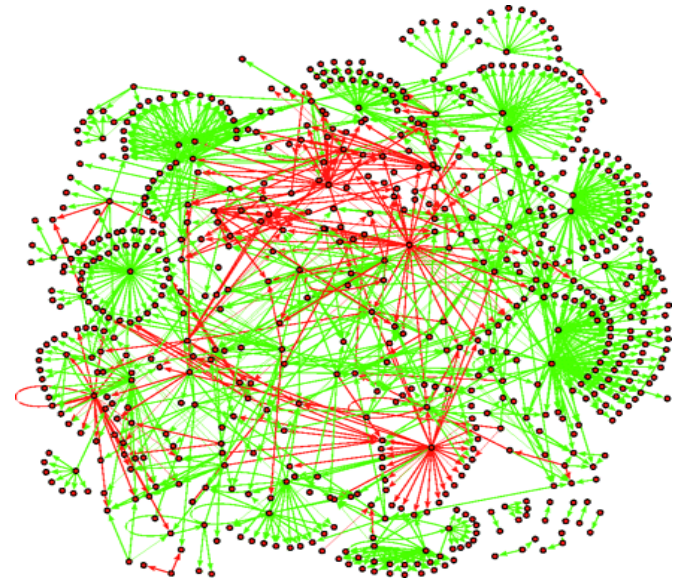
Per la costruzione di nuovi circuiti genetici che si comportino in modo programmabile e prevedibile è molto utile la conoscenza delle proprietà regolative dei *network motif*.

I network regolativi possono essere molto complessi...



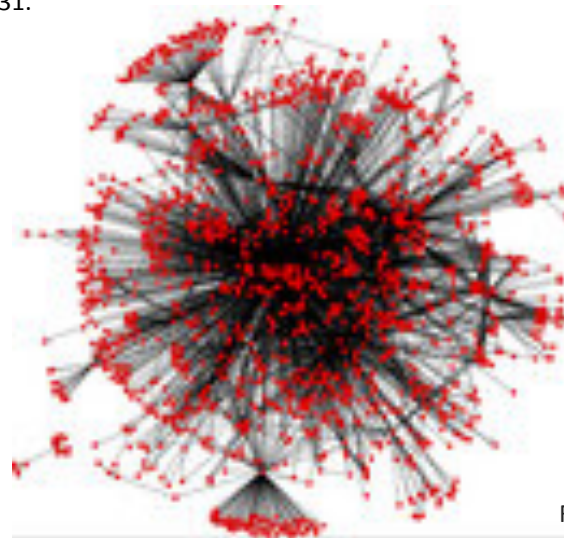
Regulatory network in *Arabidopsis*

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



Regulatory network in yeast

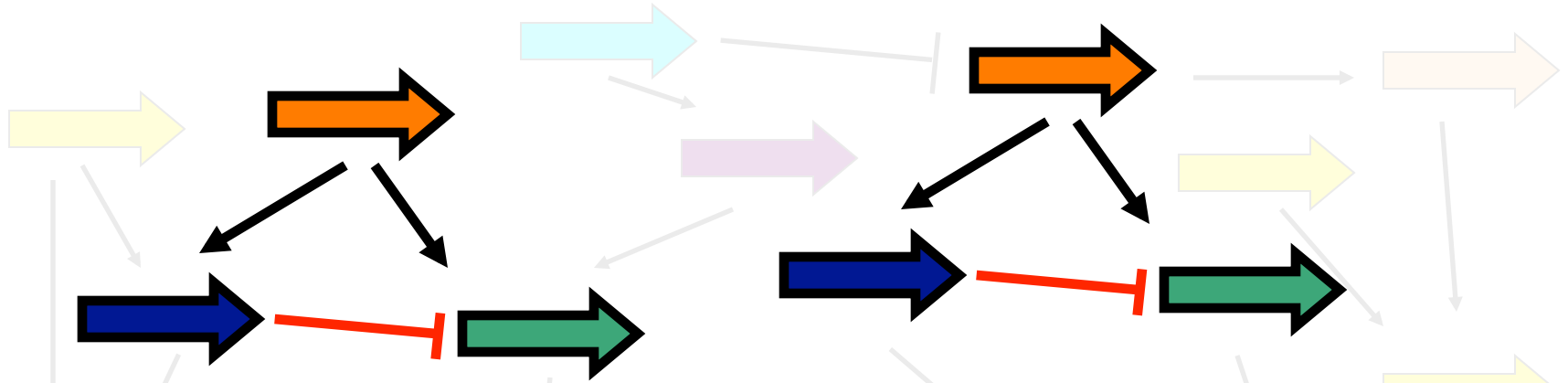
Bornholdt (2008) *J R Soc Interface* 5:S85-S94.



Regulatory network in *E. coli*

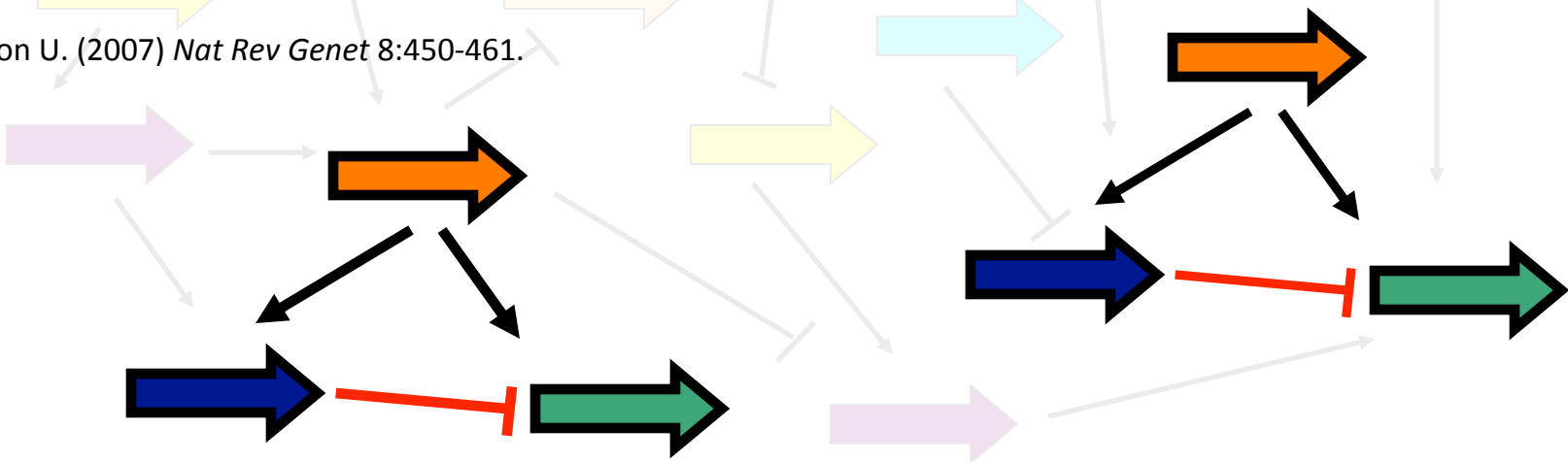
Freyre-Gonzalez *et al.*, (2010) *Nat Education* 3:24.

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



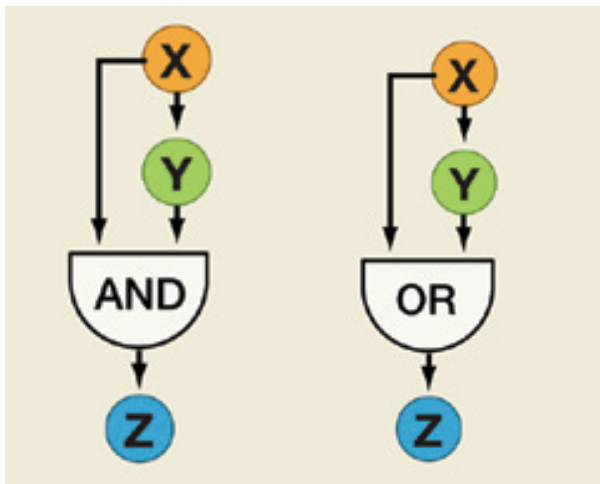
“The transcription networks of well-studied microorganisms appear to be made up of a small set of recurring regulation patterns, called **network motifs**. The same network motifs have recently been found in diverse organisms from bacteria to humans, suggesting that they **serve as basic building blocks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



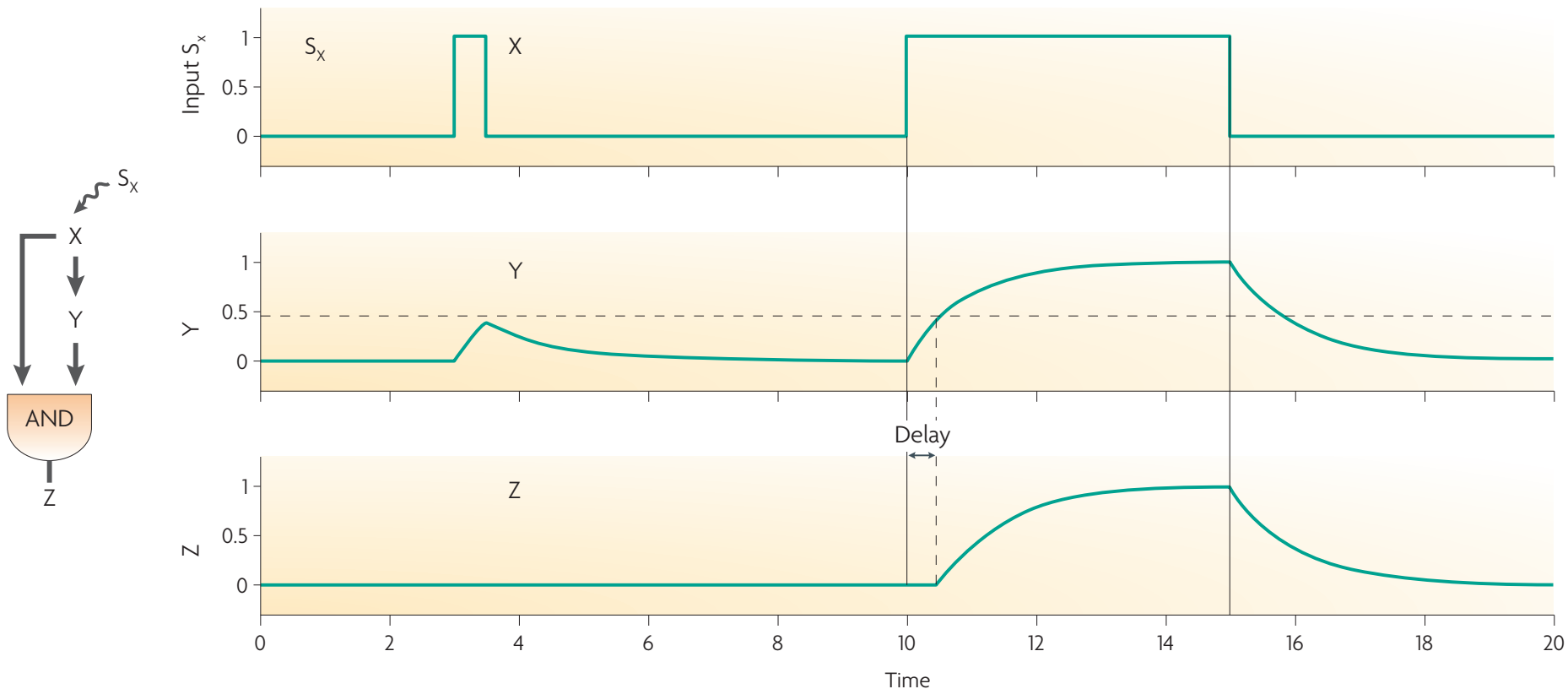
La *logic gate* **AND** prevede che entrambi i regolatori (**X e Y**) siano necessari ad attivare la trascrizione del gene output Z.

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 attiverrebbero l'output Z quando non è necessario.

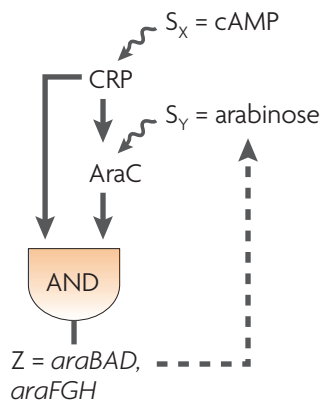


Network motifs per la risposta agli stimoli: Coherent FFL

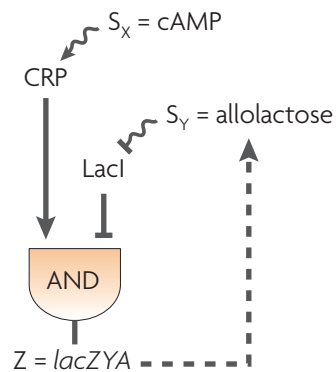
Un Coherent Feedforward loop di tipo 1 (CFFL1) con logic gate AND porta ad una attivazione ritardata del gene output Z rispetto alla percezione dello stimolo da parte del regolatore X (ritardo nello stato ON), mentre l'inattivazione del gene output Z avviene simultaneamente alla perdita dello stimolo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

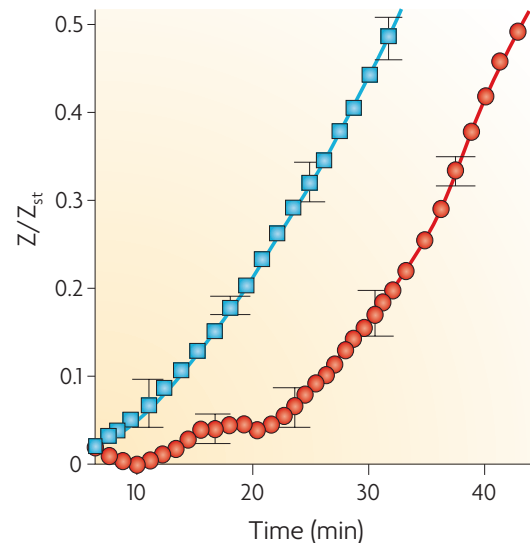
Arabinose system



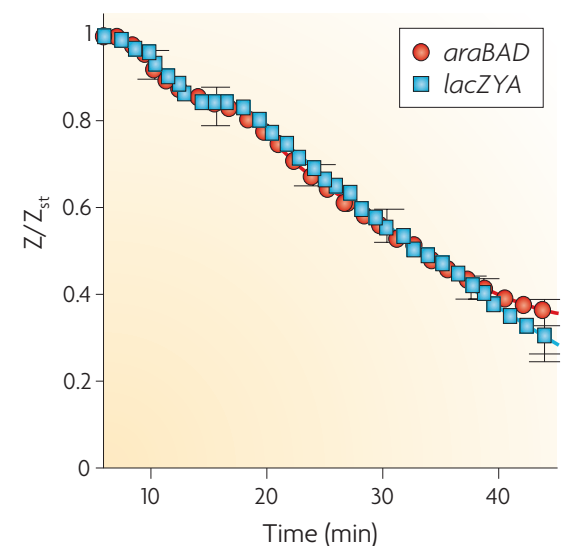
Lac system



ON step of S_x

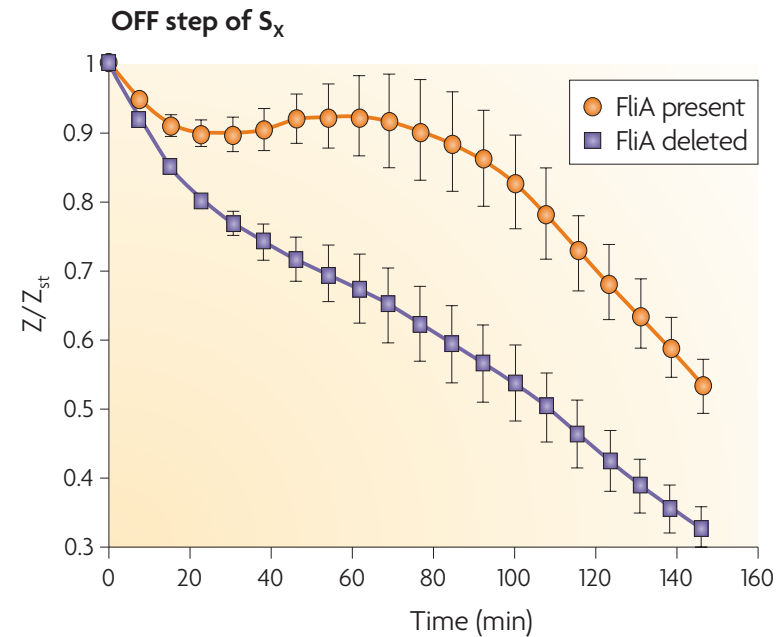
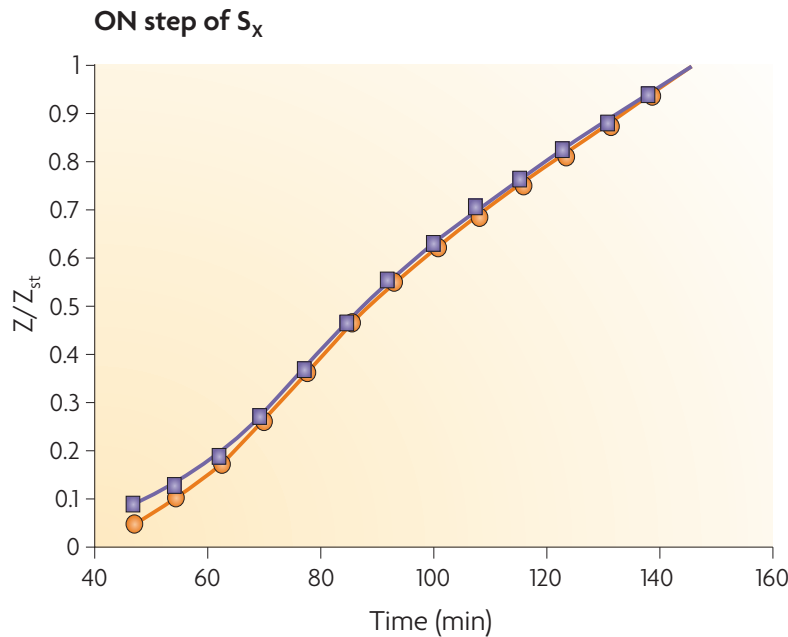
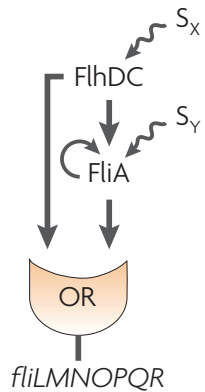


OFF step of S_x



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.



... o per lo sviluppo di biosensori basati su variazioni di frequenza del segnale.

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.

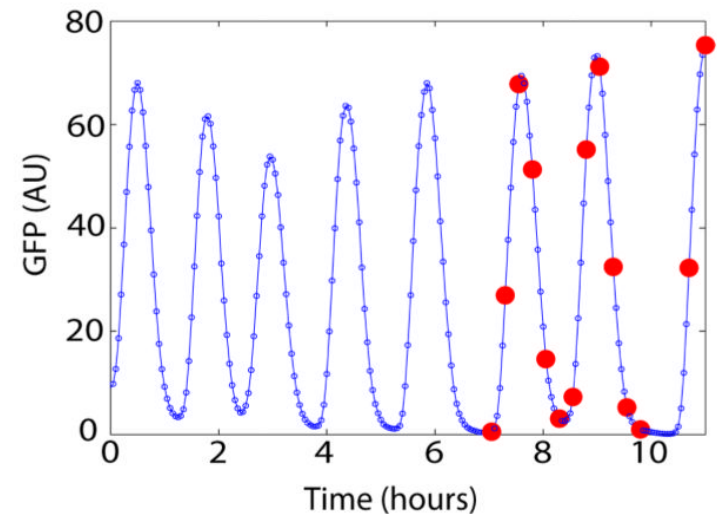
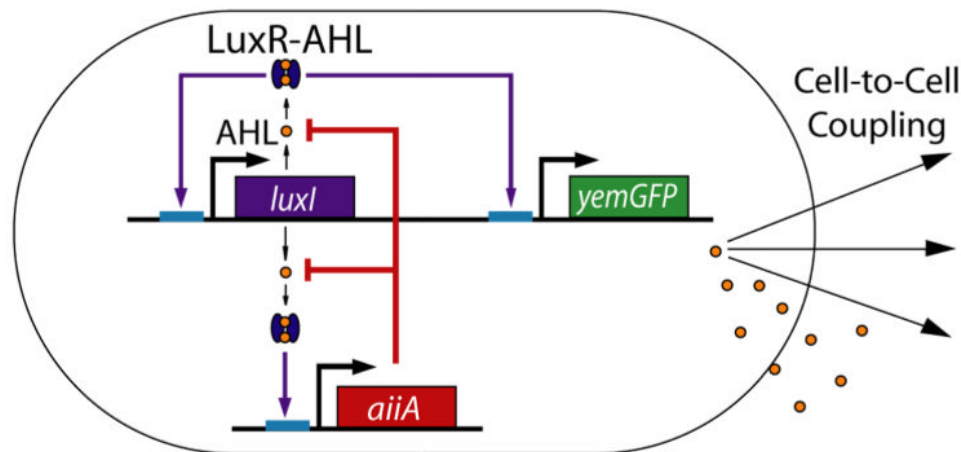
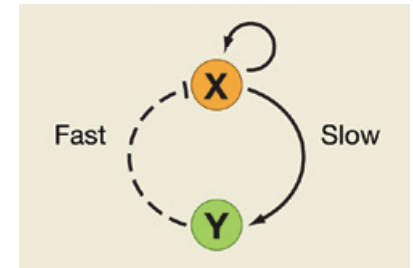
A synchronized quorum of genetic clocks

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

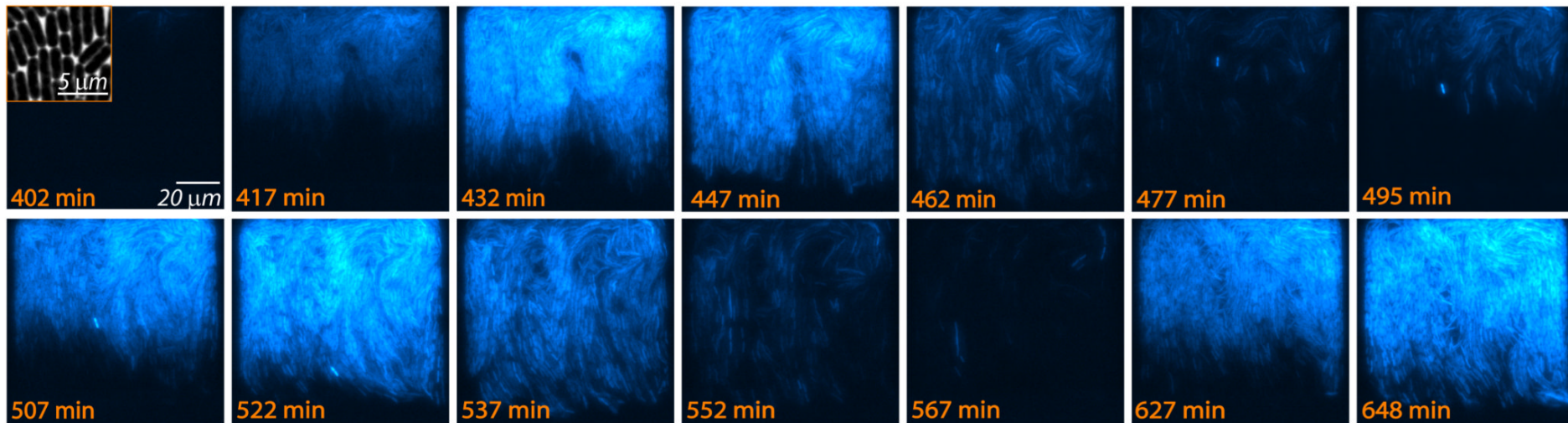
³Molecular Biology Section, Division of Biological Science, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA



... o per lo sviluppo di biosensori basati su variazioni di frequenza del segnale.

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.



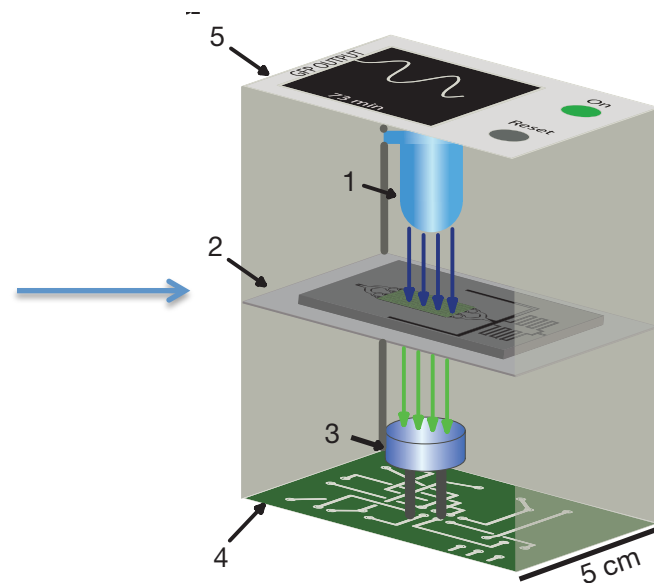
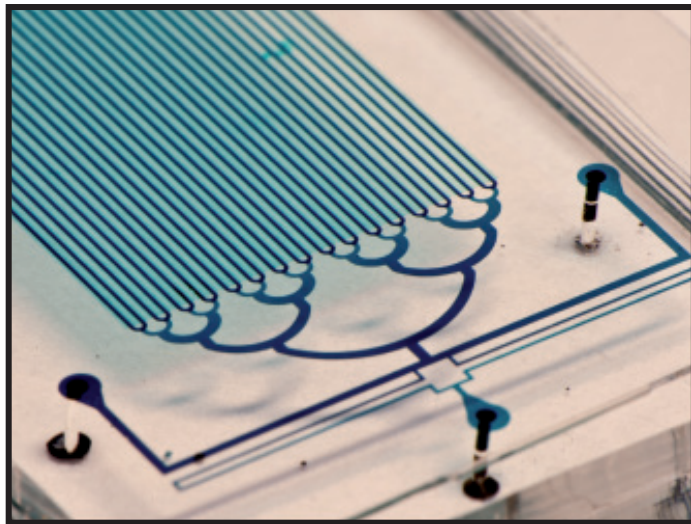
Network motifs per le biotecnologie

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'

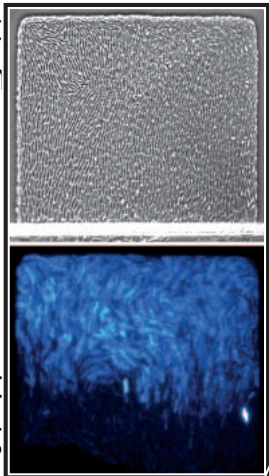
Arthur Prindle^{1*}, Phillip Samayoa^{2*}, Ivan Razinkov¹, Tal Danino¹, Lev S. Tsimring³ & Jeff Hasty^{1,2,3,4}

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.

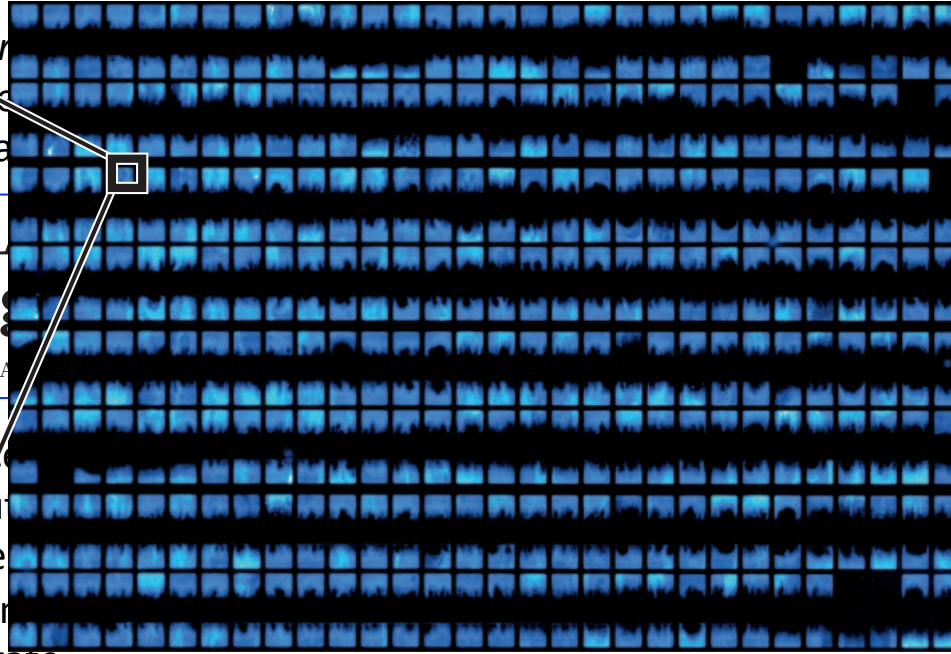


Network motifs per le biotecnologie

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



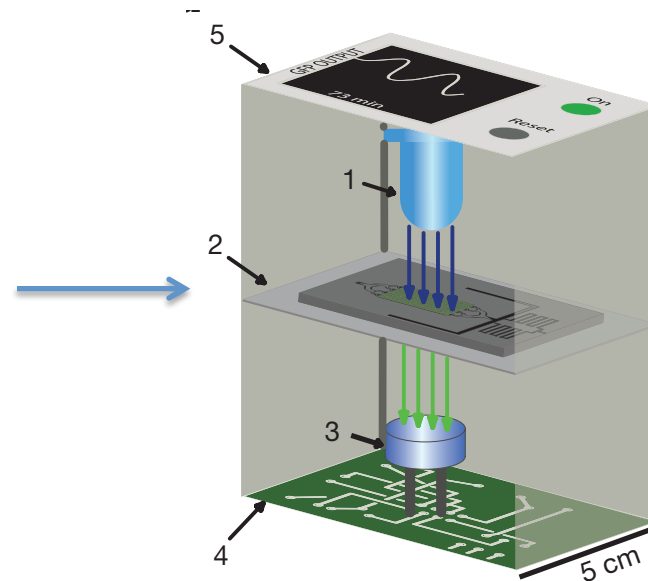
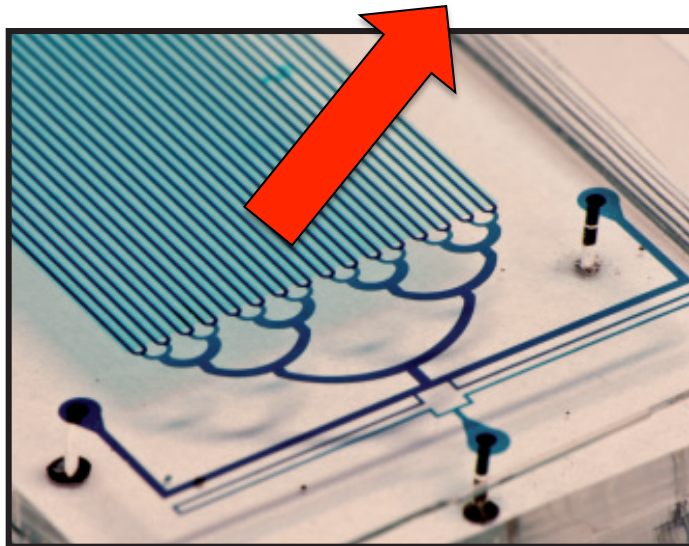
In alcuni sistemi biologici, le variazioni di frequenza del segnale sono vantaggiose. In altri, le variazioni di frequenza sono svantaggiose. In alcuni, le variazioni di frequenza sono continuamente calibrate.



...nologici che utilizzino tali processi biotecnologici

led

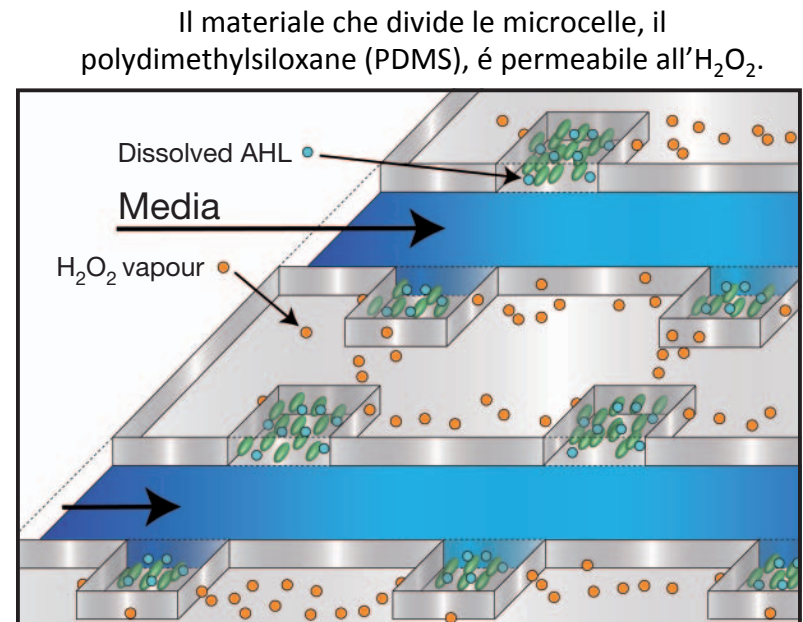
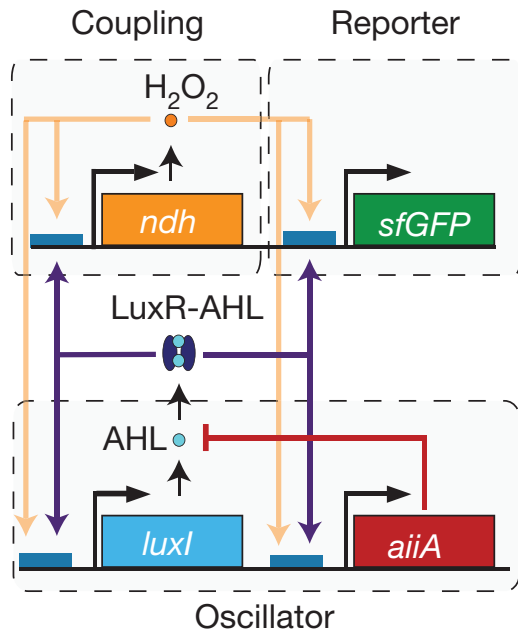
...variazioni di frequenza del segnale. Inoltre, le variazioni di frequenza non devono essere continuamente calibrate.



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.

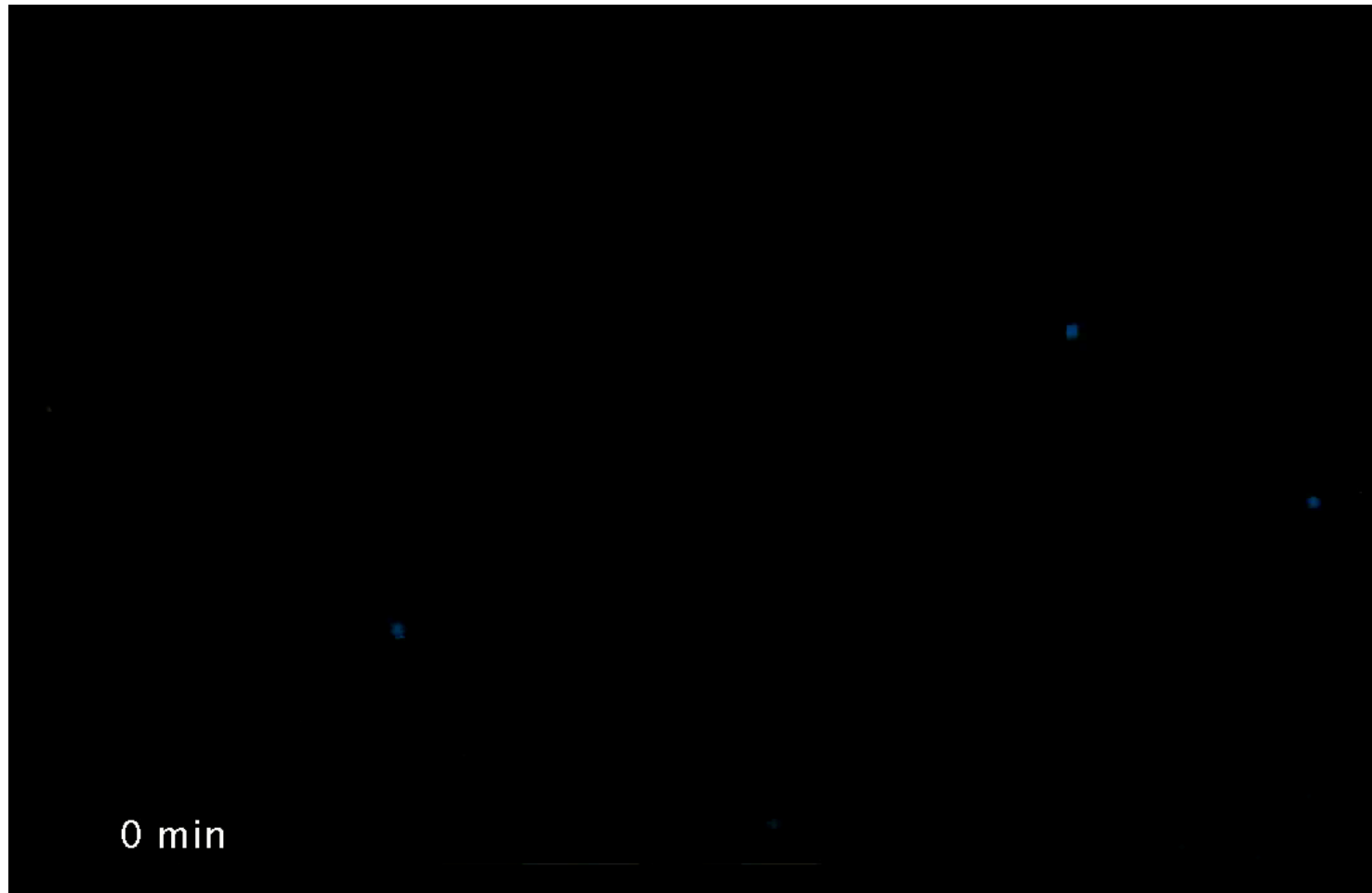
Per risolvere questo problema, i ricercatori hanno accoppiato al sistema oscillante basato sul QS, un sistema di segnalazione intercellulare basato sulla produzione ed il sensing dell' H_2O_2 . Questa molecola può facilmente e rapidamente diffondere da una microcella ad un'altra nel *microfluidic device*, 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

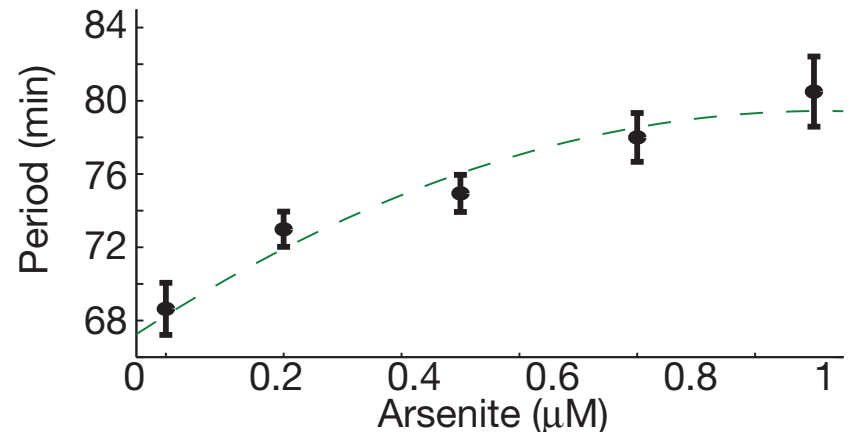
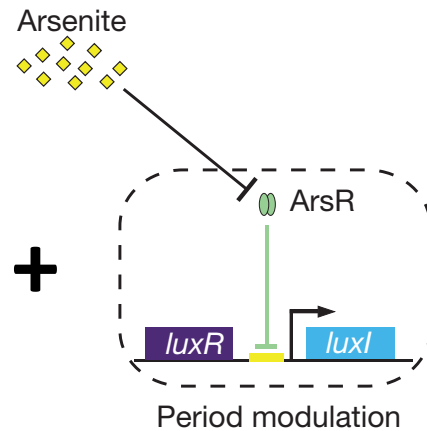
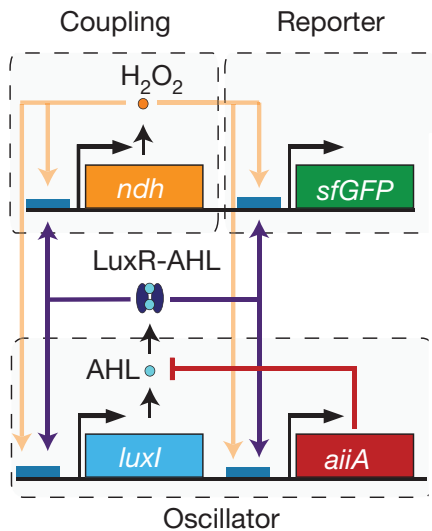
Ricapitolando, in una singola microcella il sistema oscillante funziona, però quando si hanno migliaia di microcelle in un unico *microfluidic device*, ogni microcella oscilla in modo autonomo.

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.

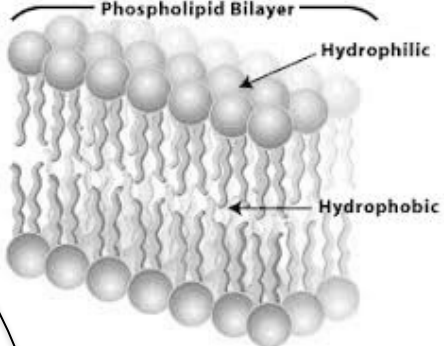
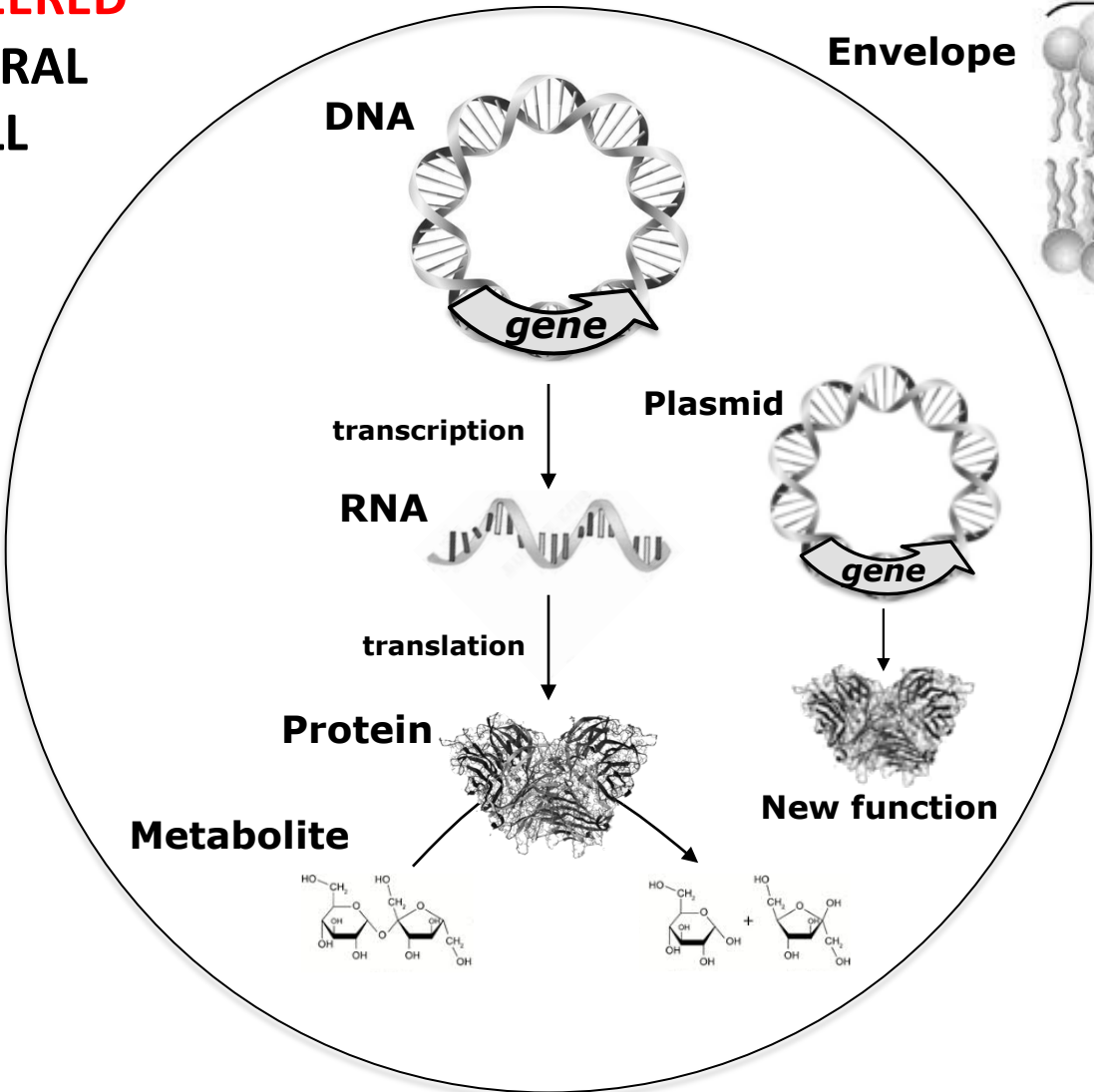


Sviluppo di un biosensore a frequenza

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.

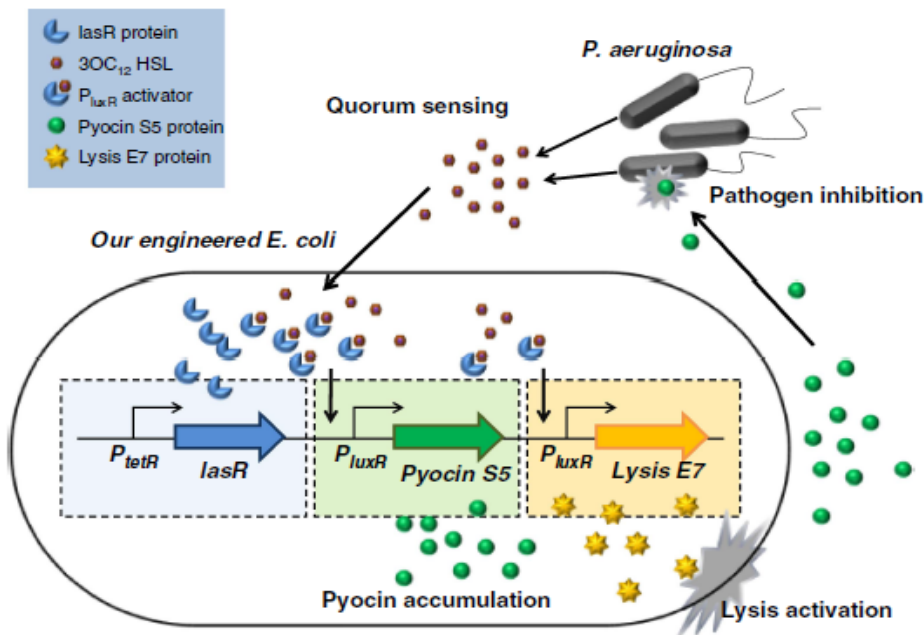


**ENGINEERED
NATURAL
CELL**

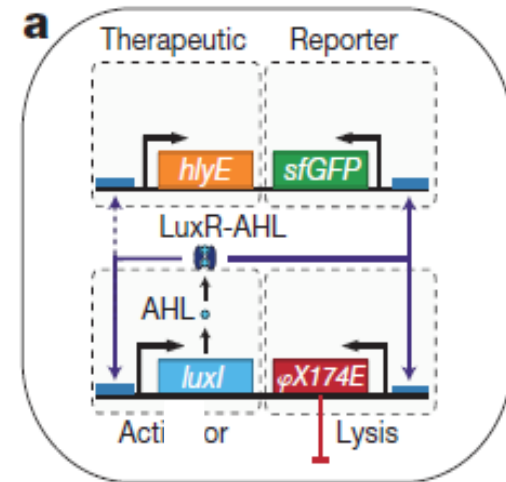


Engineered cells are useful in different fields:

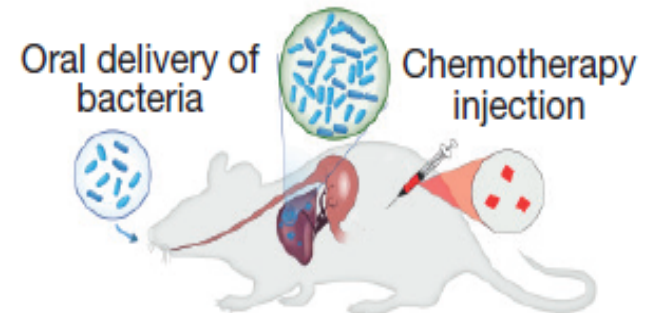
- Production of fine chemicals, drugs, biofuels
- Bioremediation
- Generation of biosensors
- Biomedical applications
- etc...



Saeidi et al. (2011) *Mol Syst Biol* 7:521

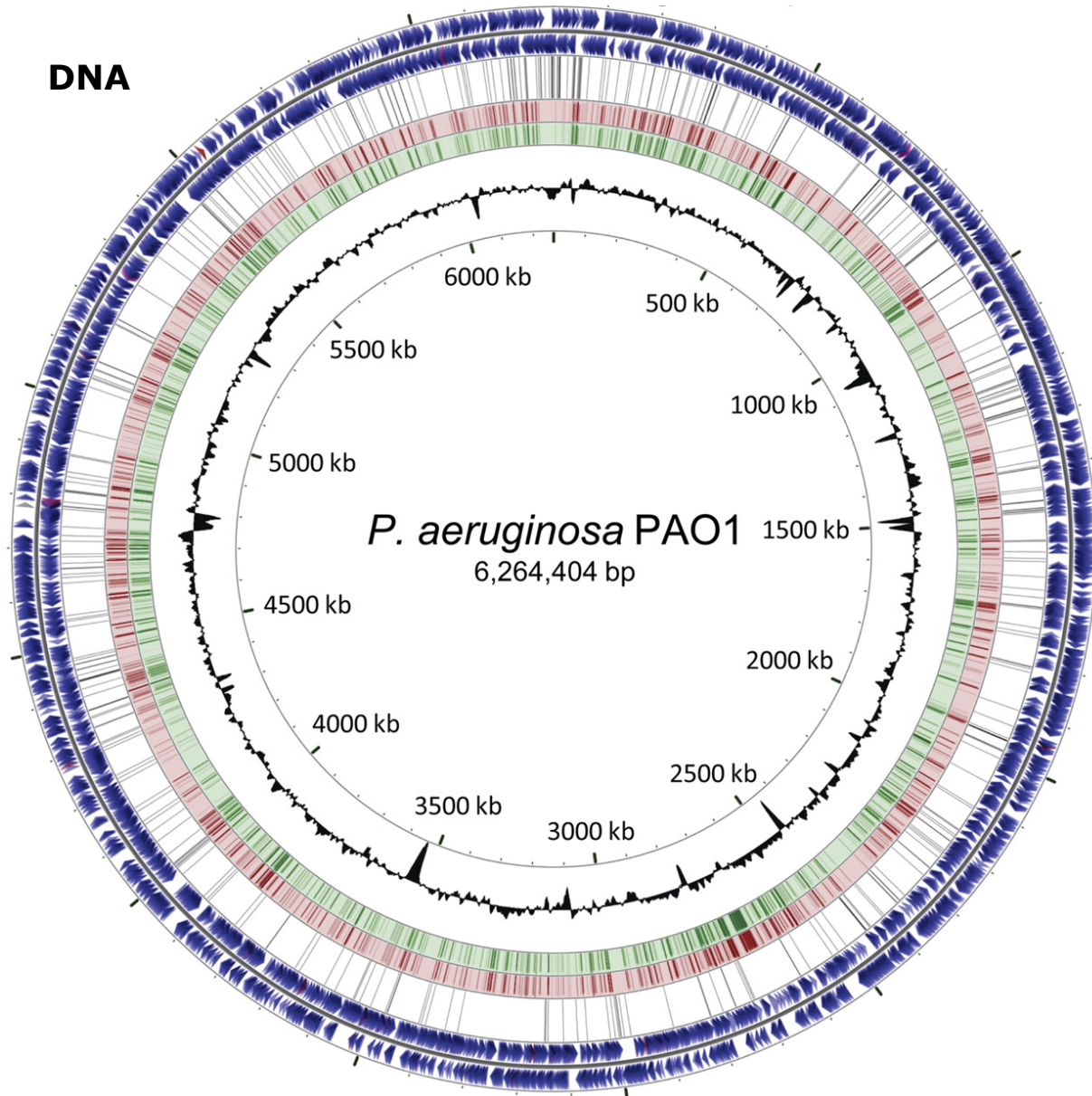


a Combination therapy

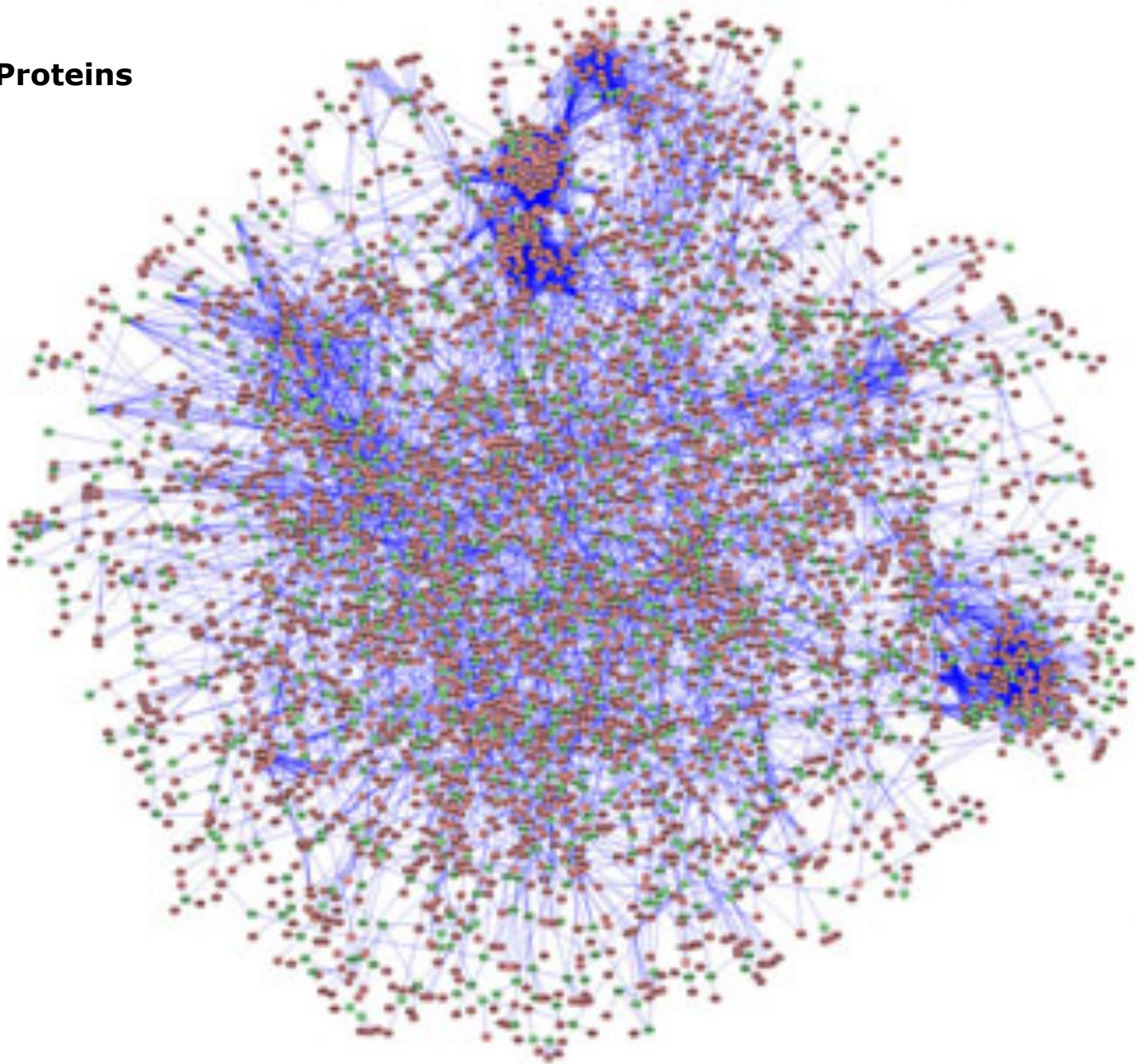


Din et al. (2016) *Nature* 536:81-85

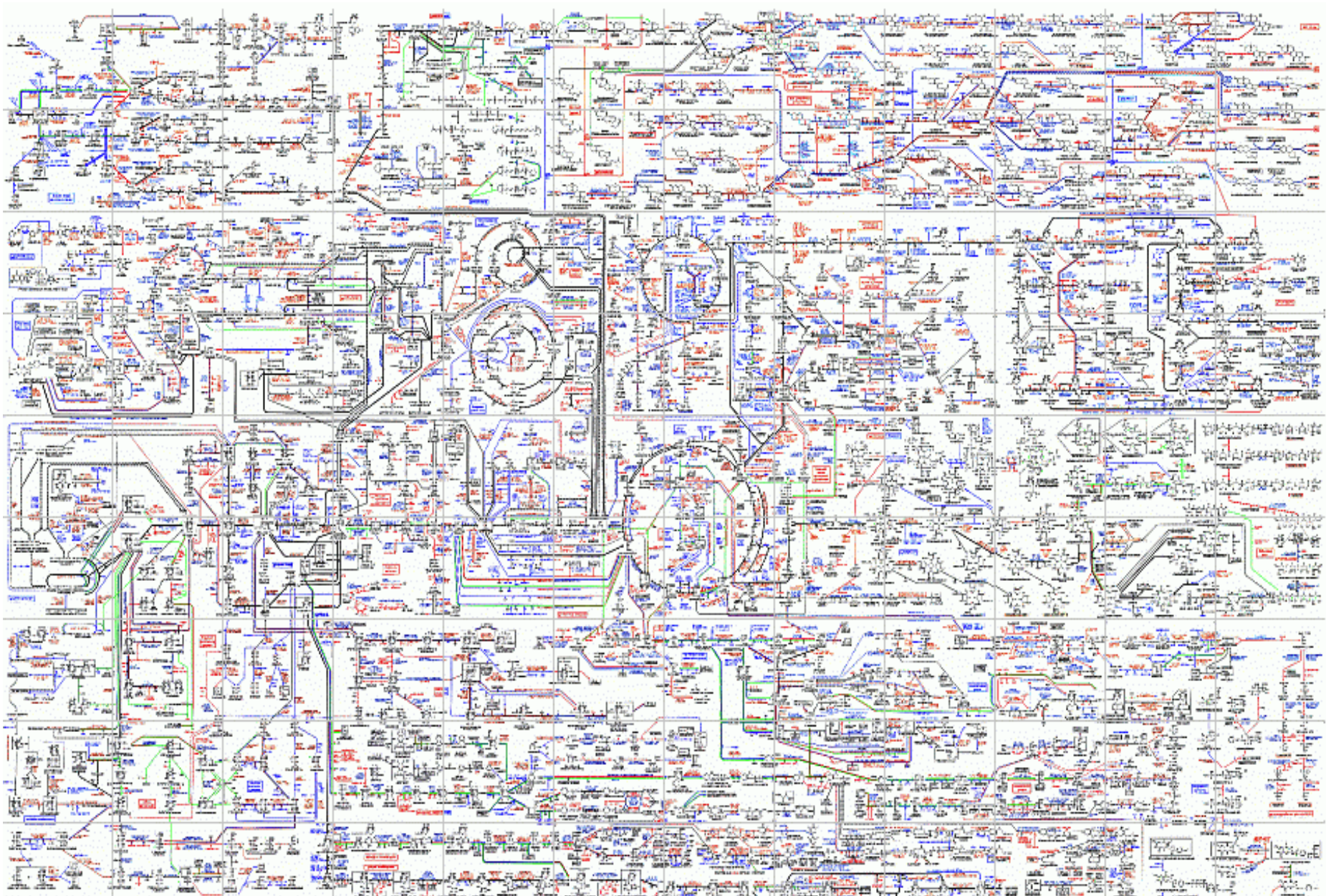
DNA



Proteins

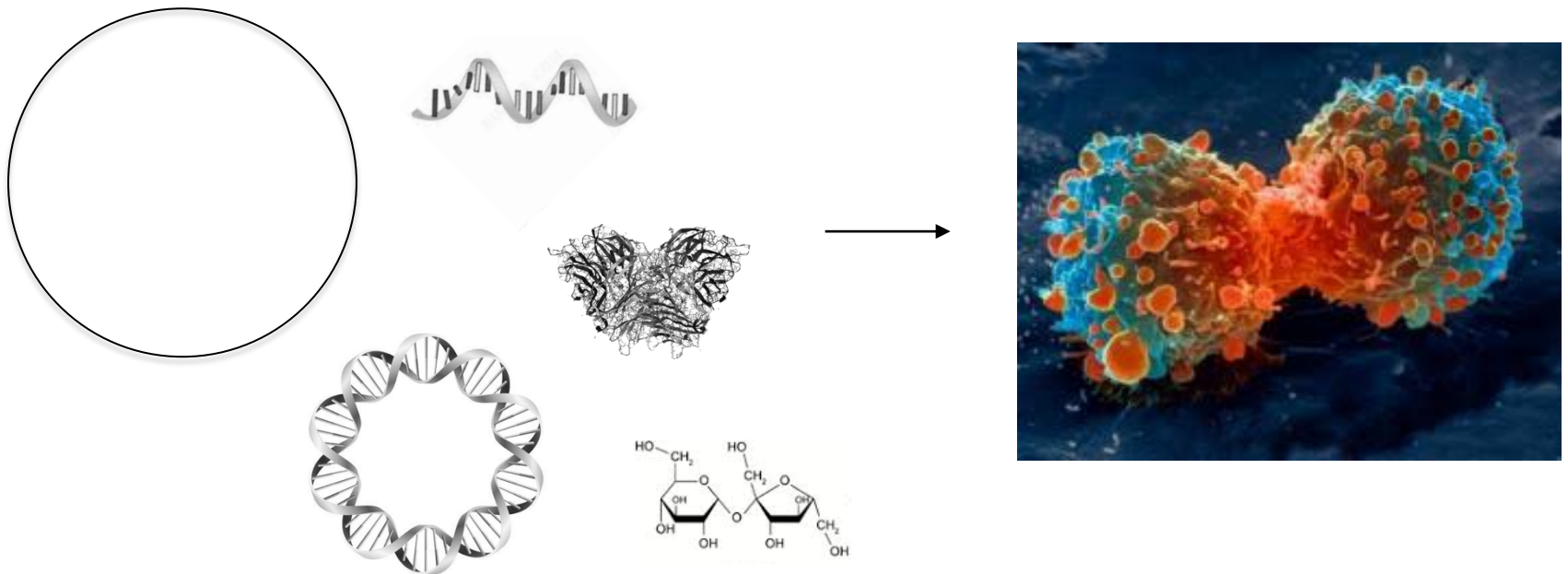


Metabolites



The complexity of modern cells limits our understanding of their functionality

We cannot predict possible interactions between synthetic gene circuits and
endogenous cellular metabolism.



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.

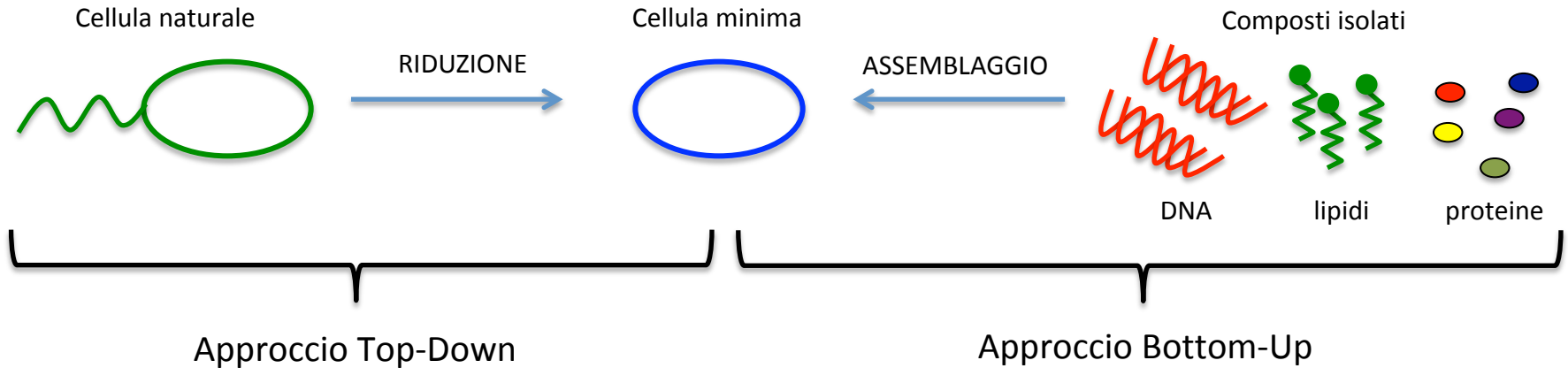
Se ad esempio volete utilizzare un microrganismo per la produzione di un metabolita di interesse commerciale o di un enzima, oggi dovete fornire al microrganismo energia sufficiente per produrre, oltre al prodotto che vi interessa, anche migliaia di altre molecole non necessarie al processo. Inoltre, 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 assemblamento 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.
- 2) 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.
- 3) 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 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

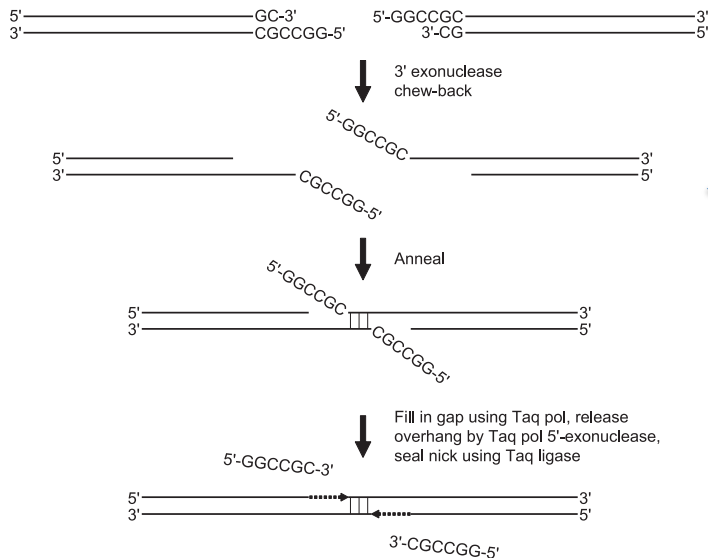
Da anni Craig Venter lavora ad un progetto che mira ad ottenere mediante un approccio *Top-Down* un microrganismo sintetico con genoma minimo. L'idea è quella di sintetizzare un genoma disegnato *ad hoc* da inserire in uno *chassis* cellulare, così da generare una cellula minima programmabile secondo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

1° passaggio: sintesi di un cromosoma artificiale.

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

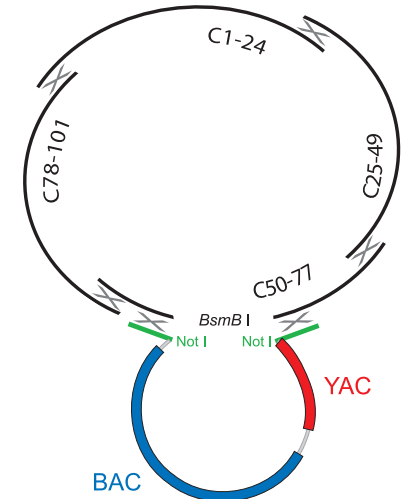
Daniel G. Gibson, Gwynedd A. Benders, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Holly Baden-Tillson, Jayshree Zaveri, Timothy B. Stockwell, Anushka Brownley, David W. Thomas, Mikkel A. Algire, Chuck Merryman, Lei Young, Vladimir N. Noskov, John I. Glass, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison III,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



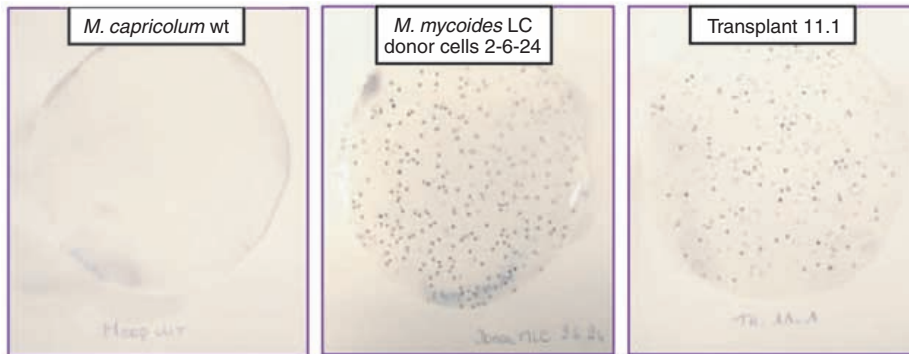
Il primo microrganismo sintetico

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

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



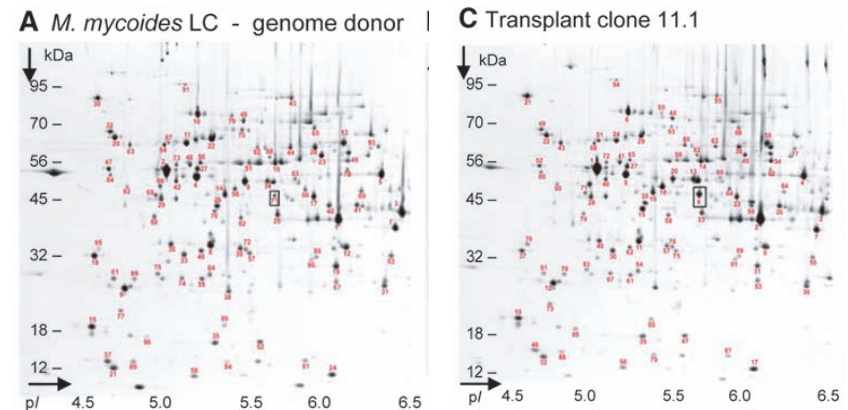
M. capricolum-specific polyclonal antibodies (anti-VmCE & VmCF)



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*.

2D-protein electrophoresis



Il primo microrganismo sintetico

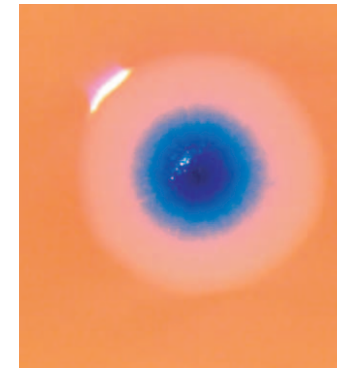
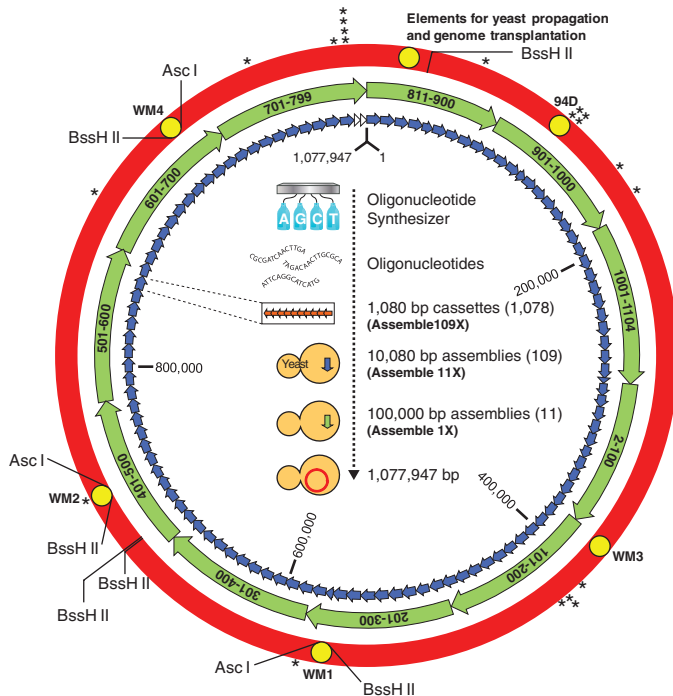
3° passaggio: unire i passaggi 1 e 2 (sintetizzare un genoma e trapiantarlo in un ospite).

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*.

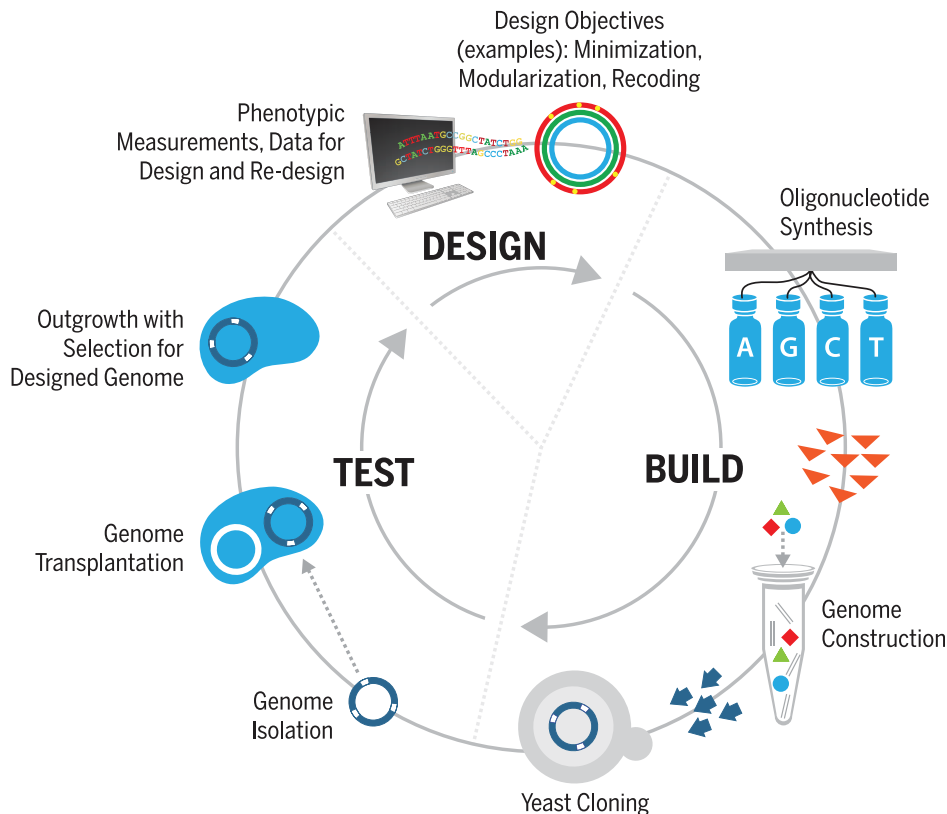


Il primo microrganismo sintetico con genoma minimo

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*



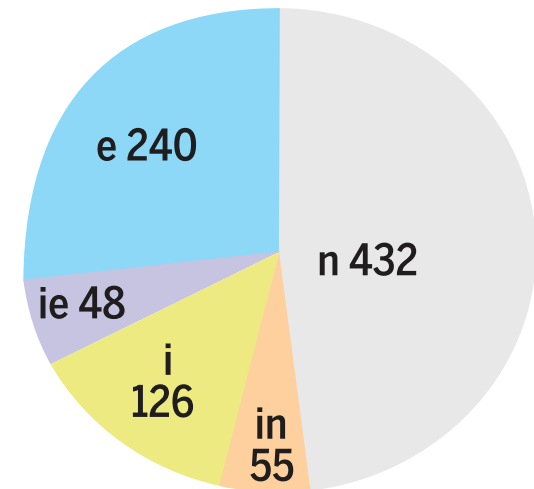
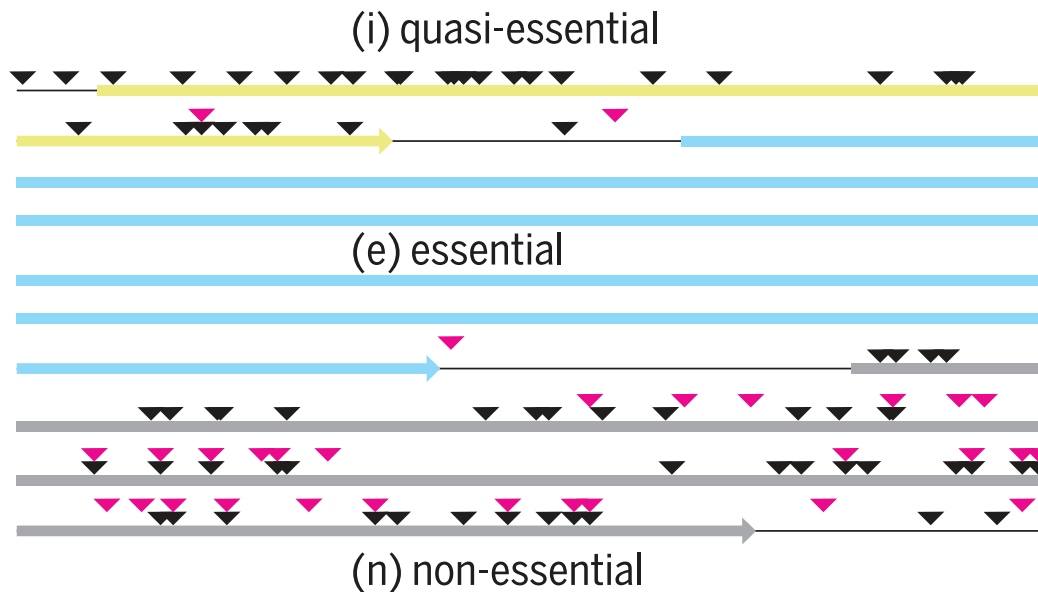
Partendo dal batterio *syn1.0* (901 geni), i ricercatori hanno provato a ridurre il genoma in modo razionale, eliminando tutti i geni che non erano predetti come geni essenziali alla sua vitalità.

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*.



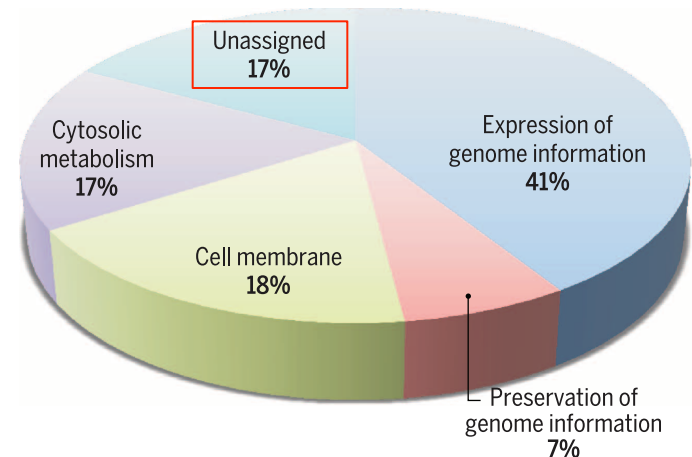
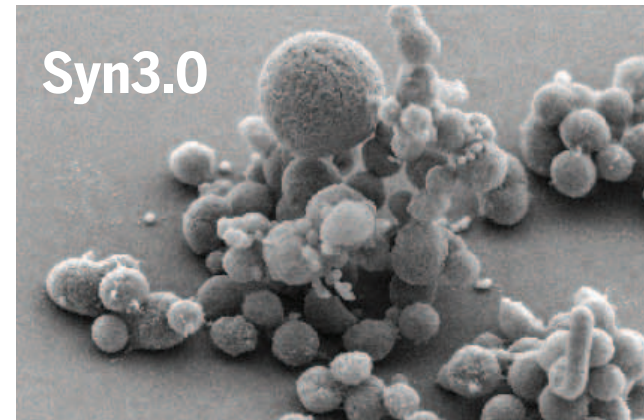
Anche il batterio *syn2.0* è stato sottoposto a mutagenesi random, ed il processo è stato ripetuto per vari cicli: sintesi del nuovo genoma minimo, validazione della vitalità, mutagenesi, sintesi di un nuovo genoma minimo,.....

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

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

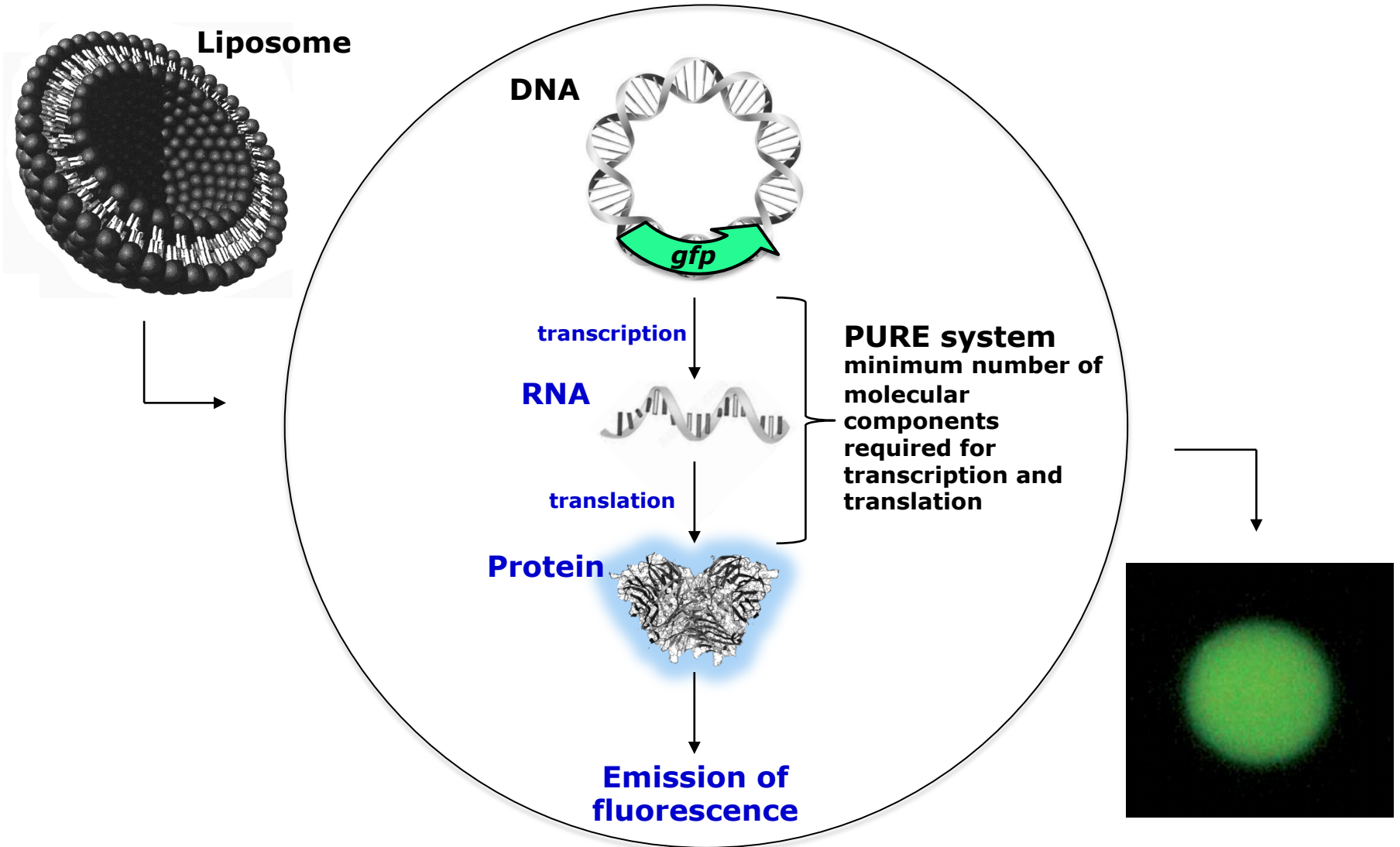
Questi lavori rappresentano sicuramente un grande avanzamento tecnologico, in quanto hanno portato allo sviluppo di nuove tecniche dalle enormi potenzialità per il futuro: sintetizzare ed assemblare un genoma, trapiantare un genoma intero in un altro organismo.

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

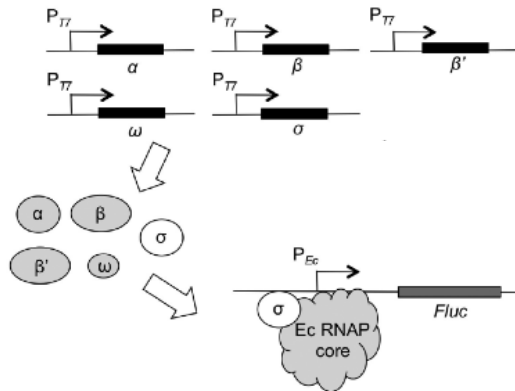


Synthetic cells can be programmed to accomplish specific tasks

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*

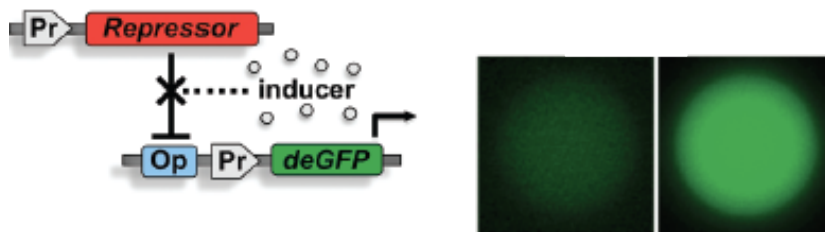


Asahara and Chong (2010) *NAR* 38:e141.

Regulate gene transcription

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

Jonghyeon Shin and Vincent Noireaux*

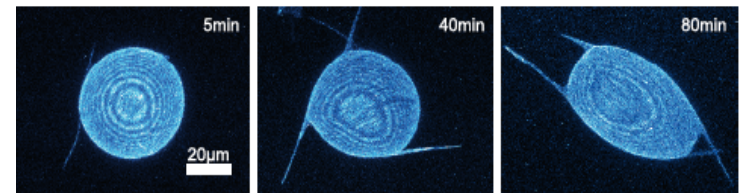


Shin and Noireaux (2012) *ACS Synth Biol* 1:29-41.

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†}

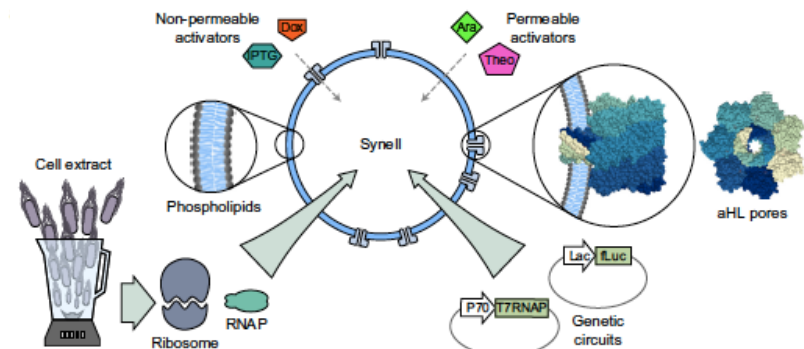


Keber *et al.* (2014) *Science* 345:1135-1139.

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*}



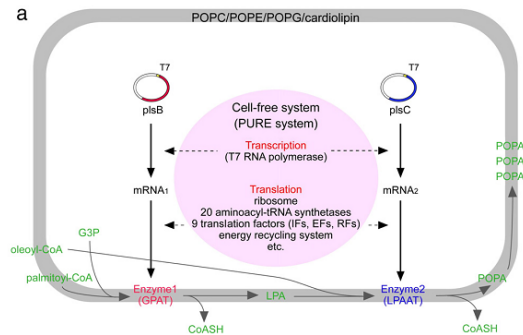
Adamala *et al.* (2017) *Nat Chem* 9:431-439.

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 

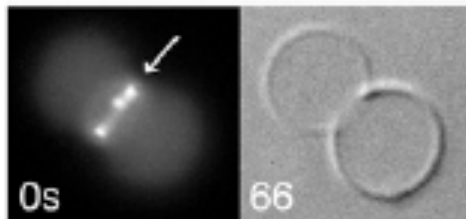


Kuruma *et al.* (2009) *Biochim Biophys Acta* 1788:567-574.

Divide into two synthetic cells

Liposome division by a simple bacterial division machinery

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

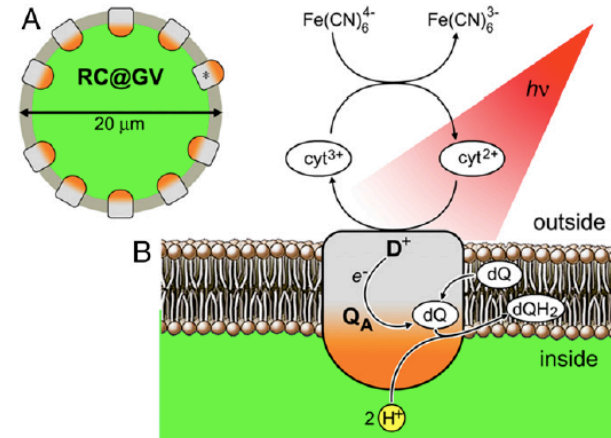


Osawa and Erickson (2013) *PNAS* 110:11000-11004.

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.

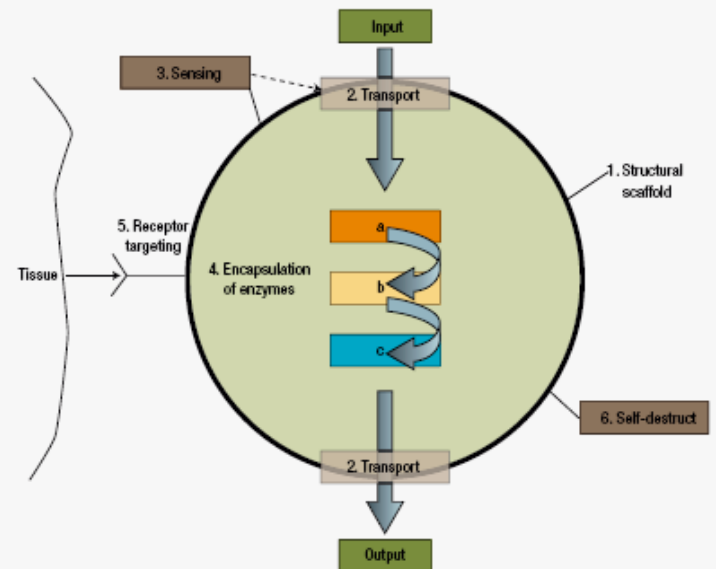
Can we generate synthetic cells interfacing with natural cells?

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.



Notably, liposomes are already used for drug delivery in human .

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.

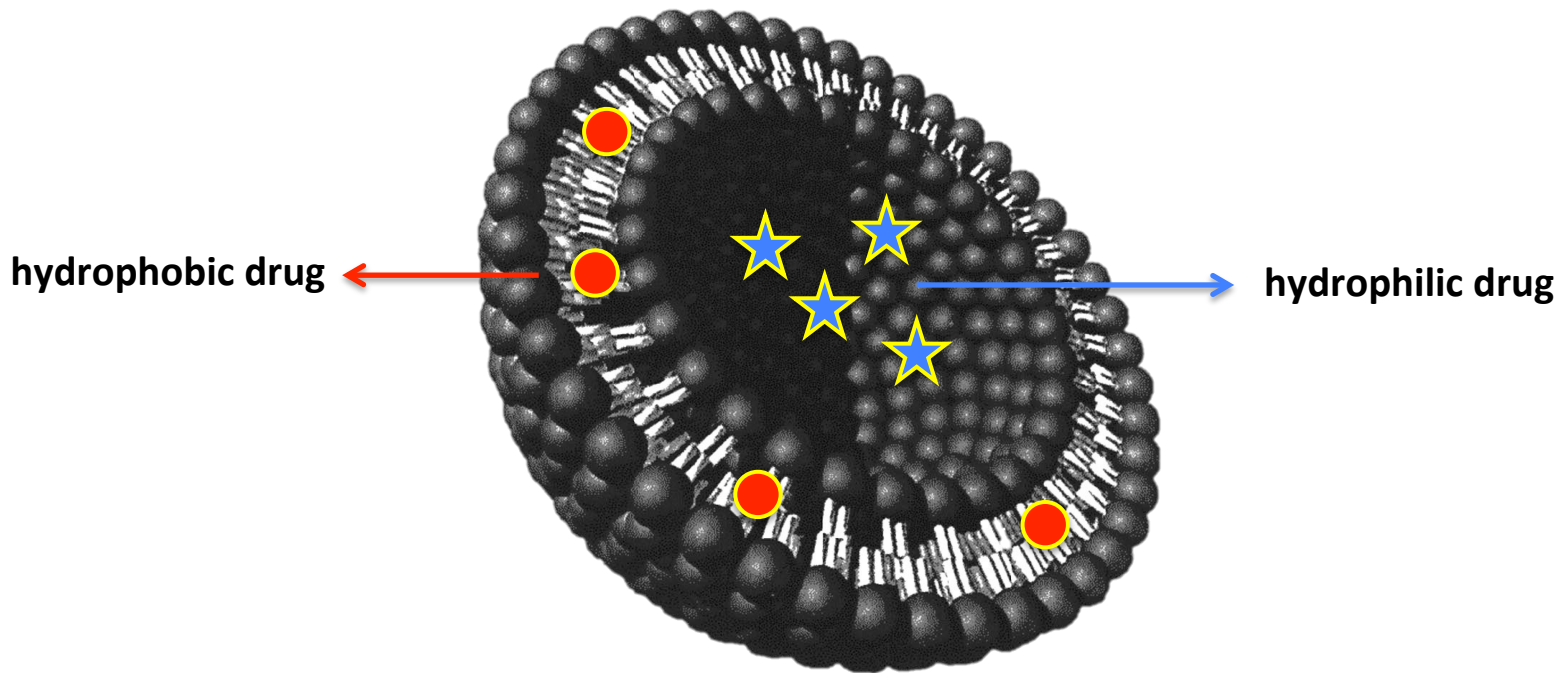
DaunoXome® was developed by NeXstar Pharmaceuticals (Boulder, CO, USA) for the delivery of **daunorubicin**, and was FDA approved in 1996 for the management of advanced HIV-associated Kaposi's sarcoma.

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.

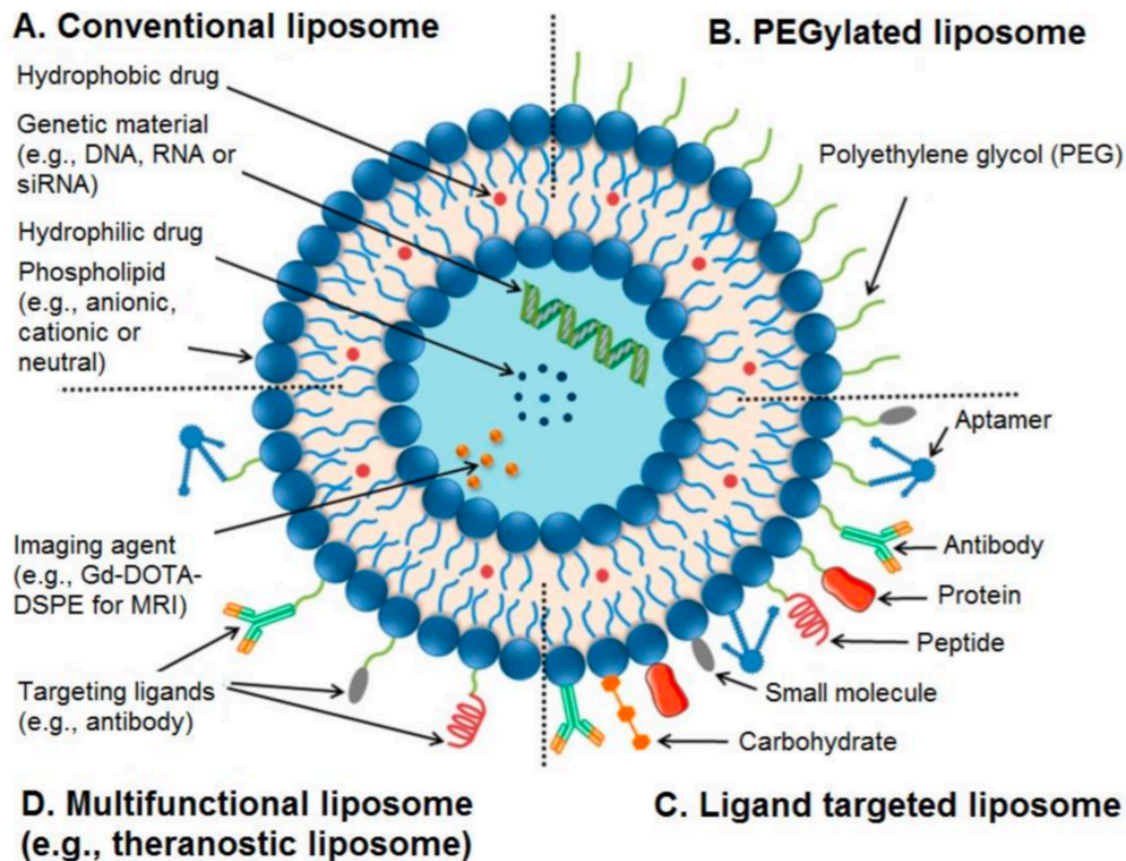
Liposomes as drug carriers

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.



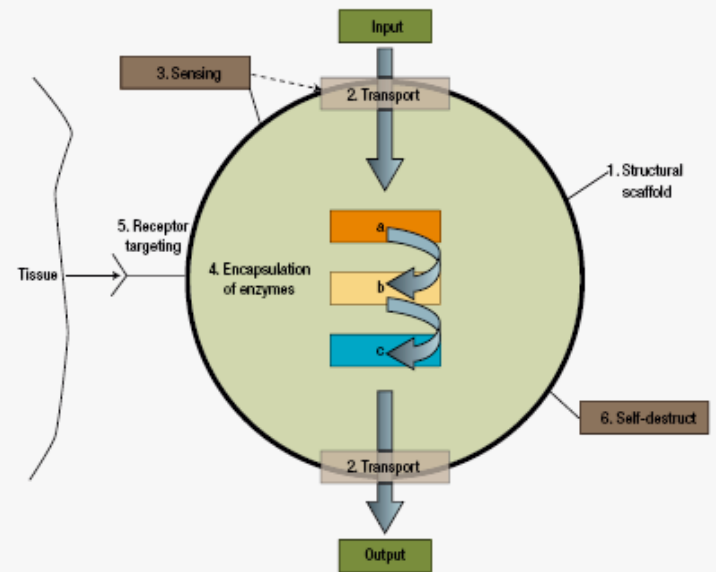
Can we generate **smart liposome-based drug carriers** interfacing with natural cells?

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

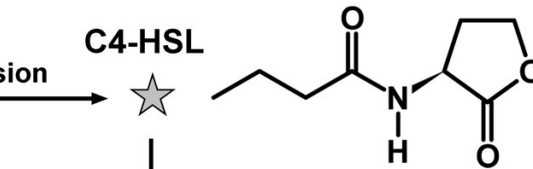
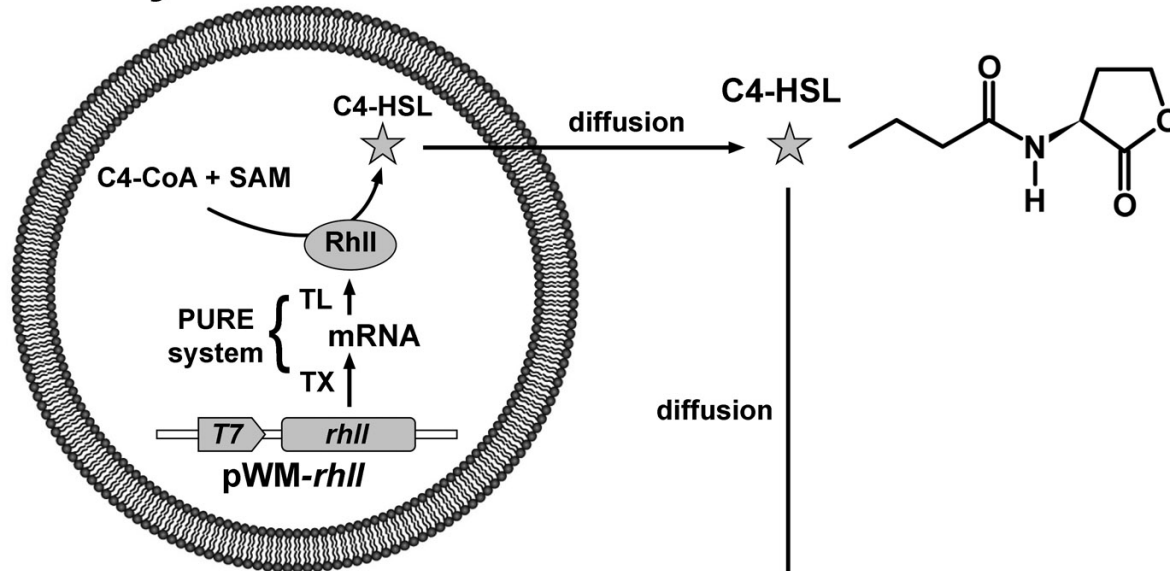
LeDuc *et al.* (2006) *Nature Nanotech* 2:3-7.



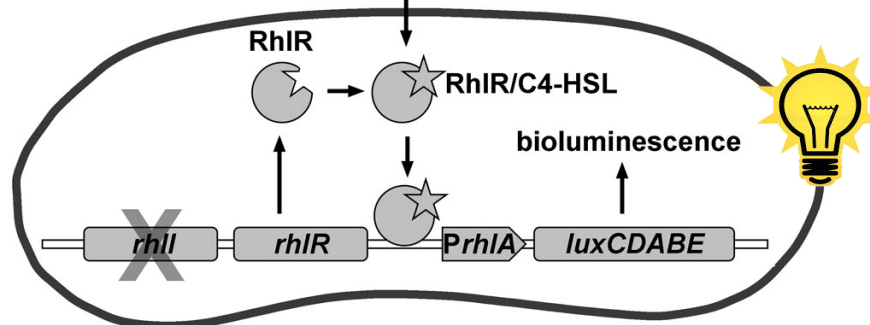
Notably, liposomes are already used for drug delivery in human .

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

synthetic cell



diffusion



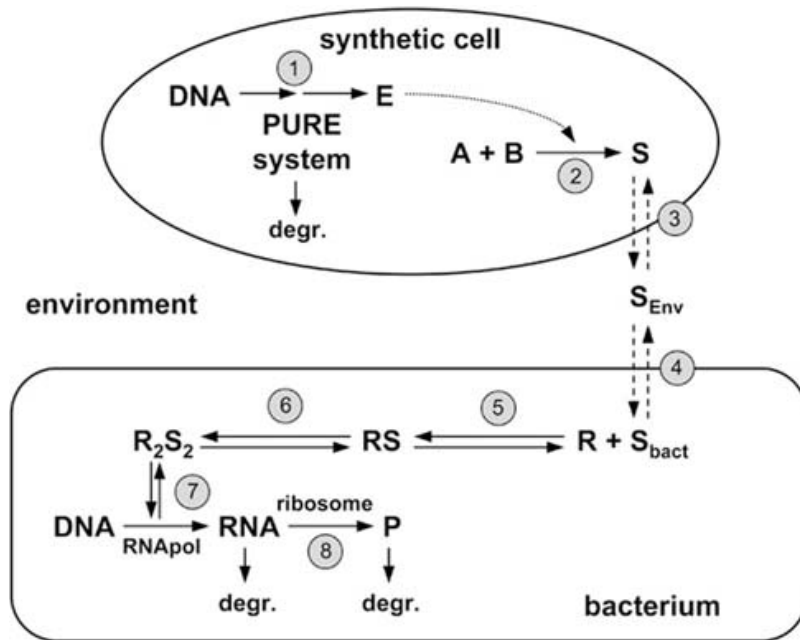
***P. aeruginosa* RepC4lux**

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

$$1 \quad \frac{d[E]}{dt} = (k_{TXIS}t) \cdot k_{TLPS} \exp(-k_{inact}S^2t)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

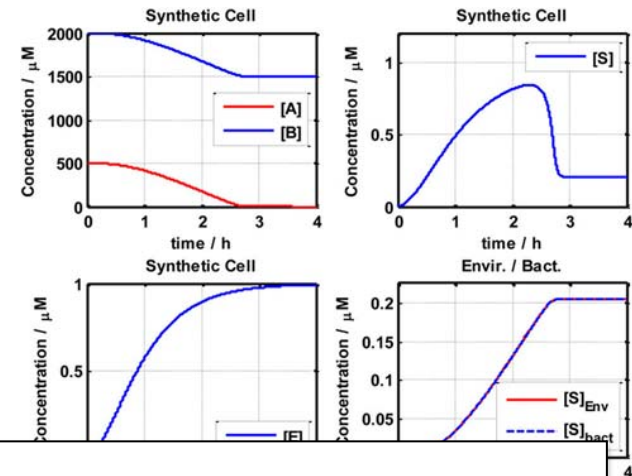
Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

1) preliminary numerical modeling

Physical parameters, thermodynamic and kinetic constants used in the model

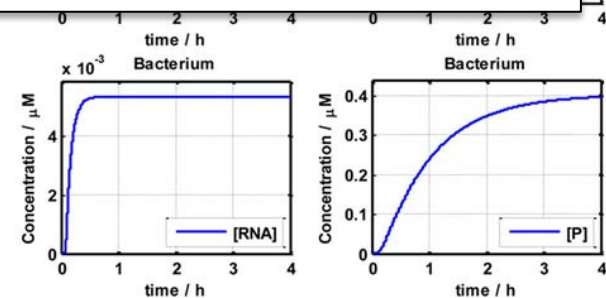
Symbol	Meaning	Value	Units
V	Reaction volume	$2 \cdot 10^5$	μm^3
N_{sc}	Number of synthetic cell in V	1	
N_{bact}	Number of bacteria in V	320	
r_{sc}	Synthetic cell radius	2.7	μm
V_{sc}	Synthetic cell volume	91.6	μm^2
V_{bact}	Bacterium volume	84.2	μm^3
σ_{bact}	Bacterium surface	1	μm^2
k_{TXPS}	Transcription rate (PURE system)	4.8	μm^2
k_{TLPS}	Translation rate (PURE system)		
$k_{TXPS} k_{TLPS}$	Product of TX-TL rates (PURE system)	$2.8 \cdot 10^{-7}$	$\mu\text{M} \text{ s}^{-2}$
$k_{inactPS}$	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



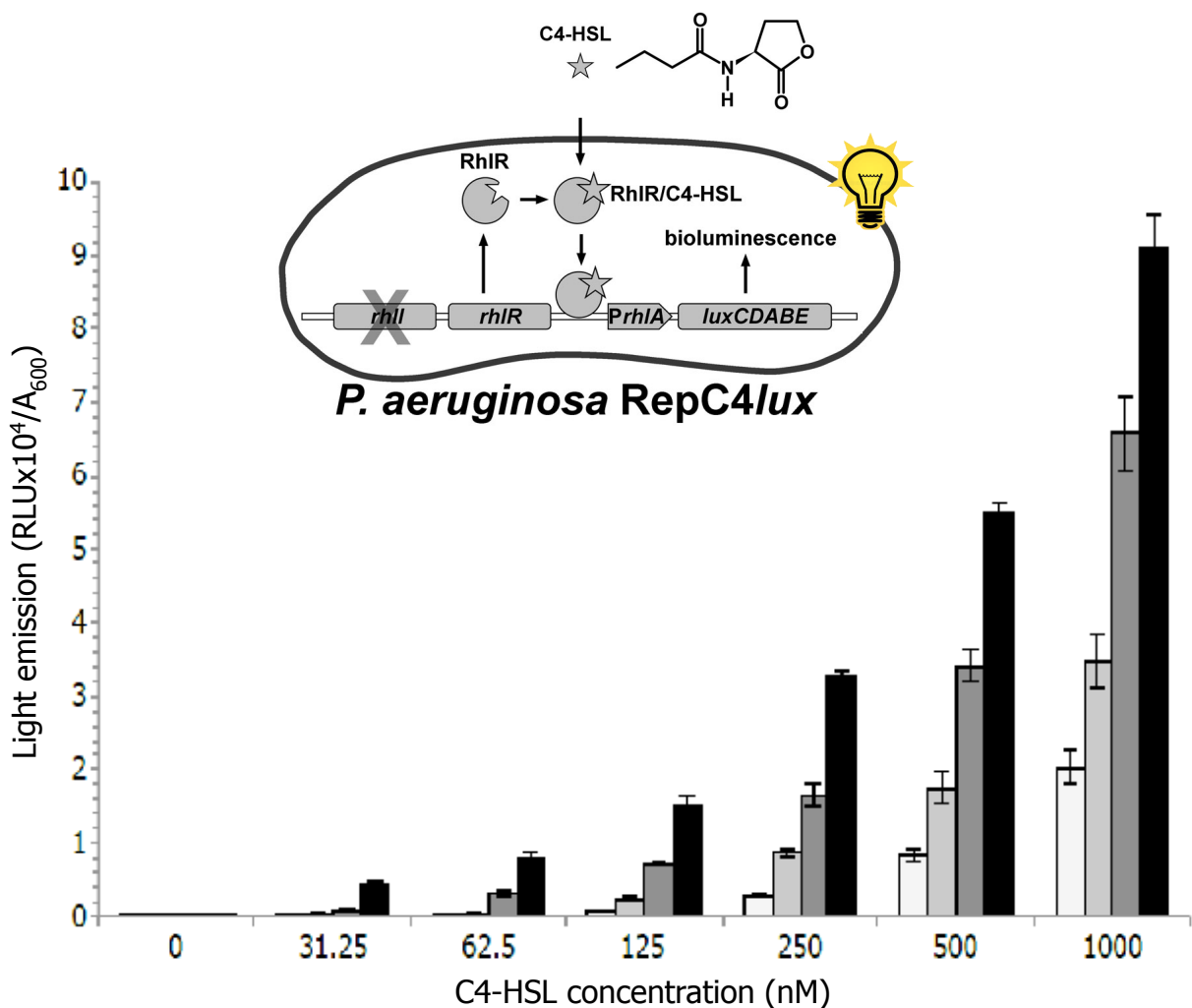
If containing a plasmid with the *rhII* gene, the PURE system and the substrates SAM and C4-CoA, the C4-HSL signal molecule produced by the synthetic cells expressing RhII should reach the concentration of about 150 nM in the environment within 2.5 hours.

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

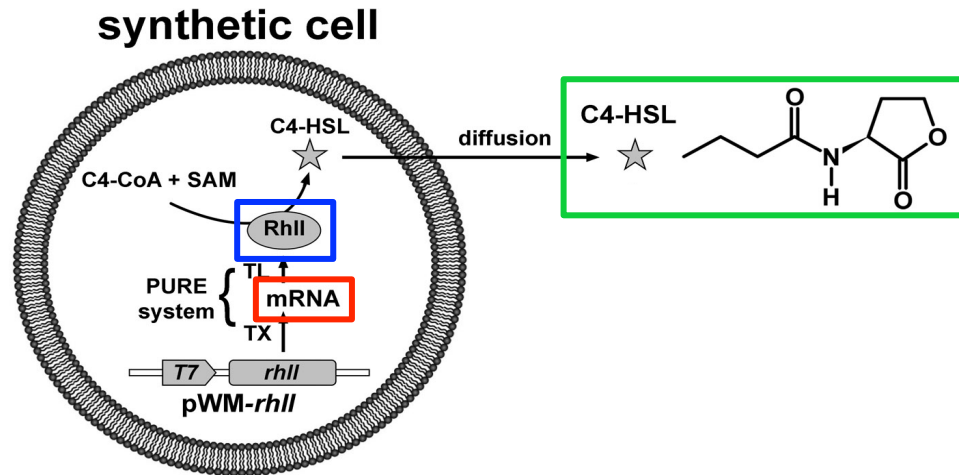


Growth conditions

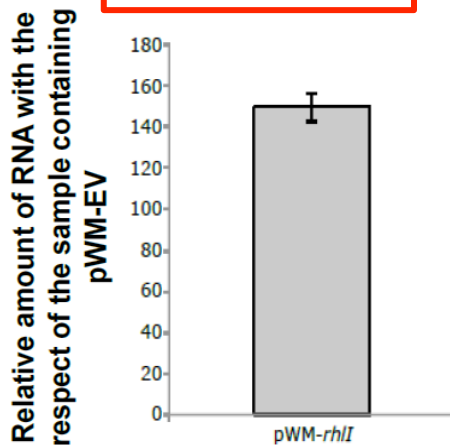
-  Kanamycin 200 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, shaking, low cell density.
-  Kanamycin 200 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, shaking, low cell density, depletion of 3OC₁₂-HSL.
-  Kanamycin 500 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, shaking, low cell density, depletion of 3OC₁₂-HSL.
-  Kanamycin 500 μ g/mL, 30 $^{\circ}$ C, static, high cell density, depletion of 3OC₁₂-HSL.

Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

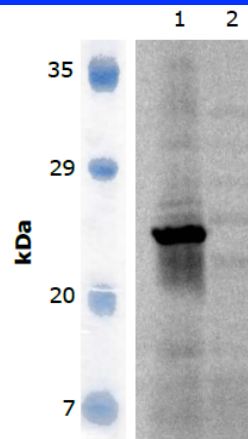
2) wet-lab experiments



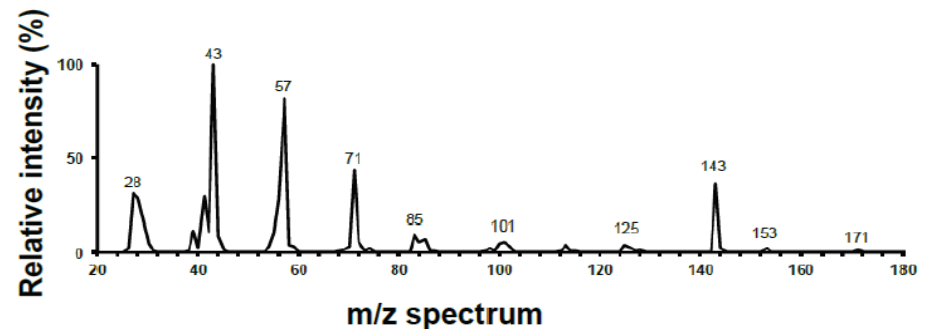
Transcription
of the *rhII* gene



Expression
of the RhII enzyme

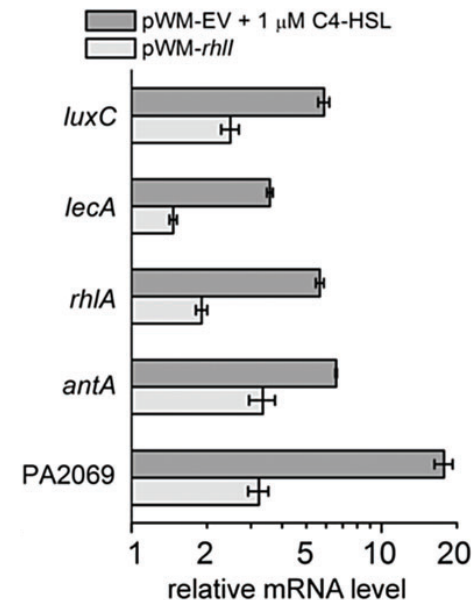
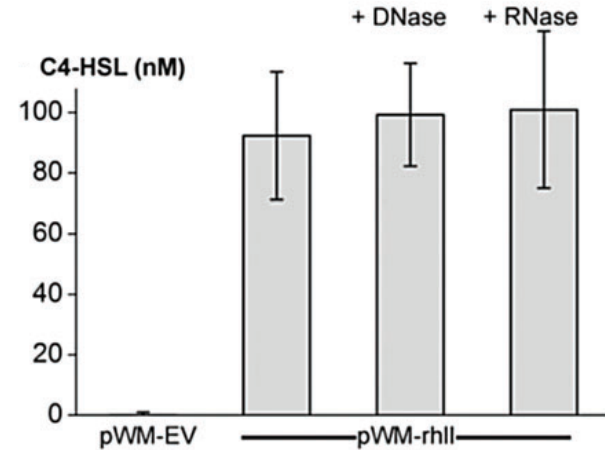
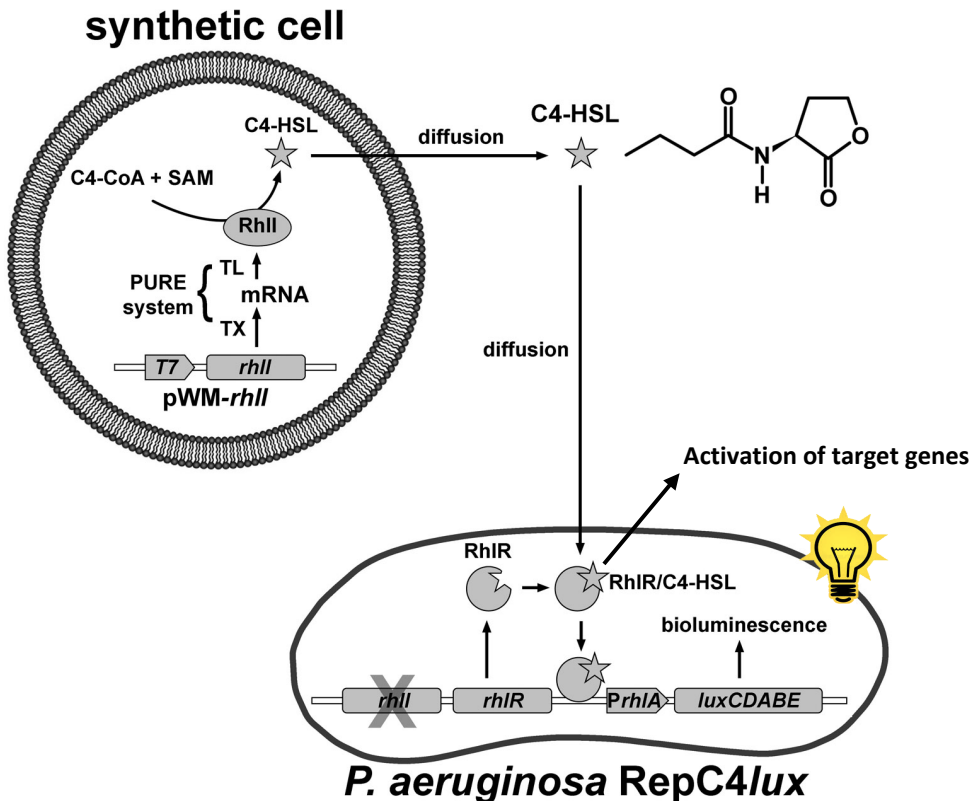


Synthesis
of the C4-HSL signal molecule

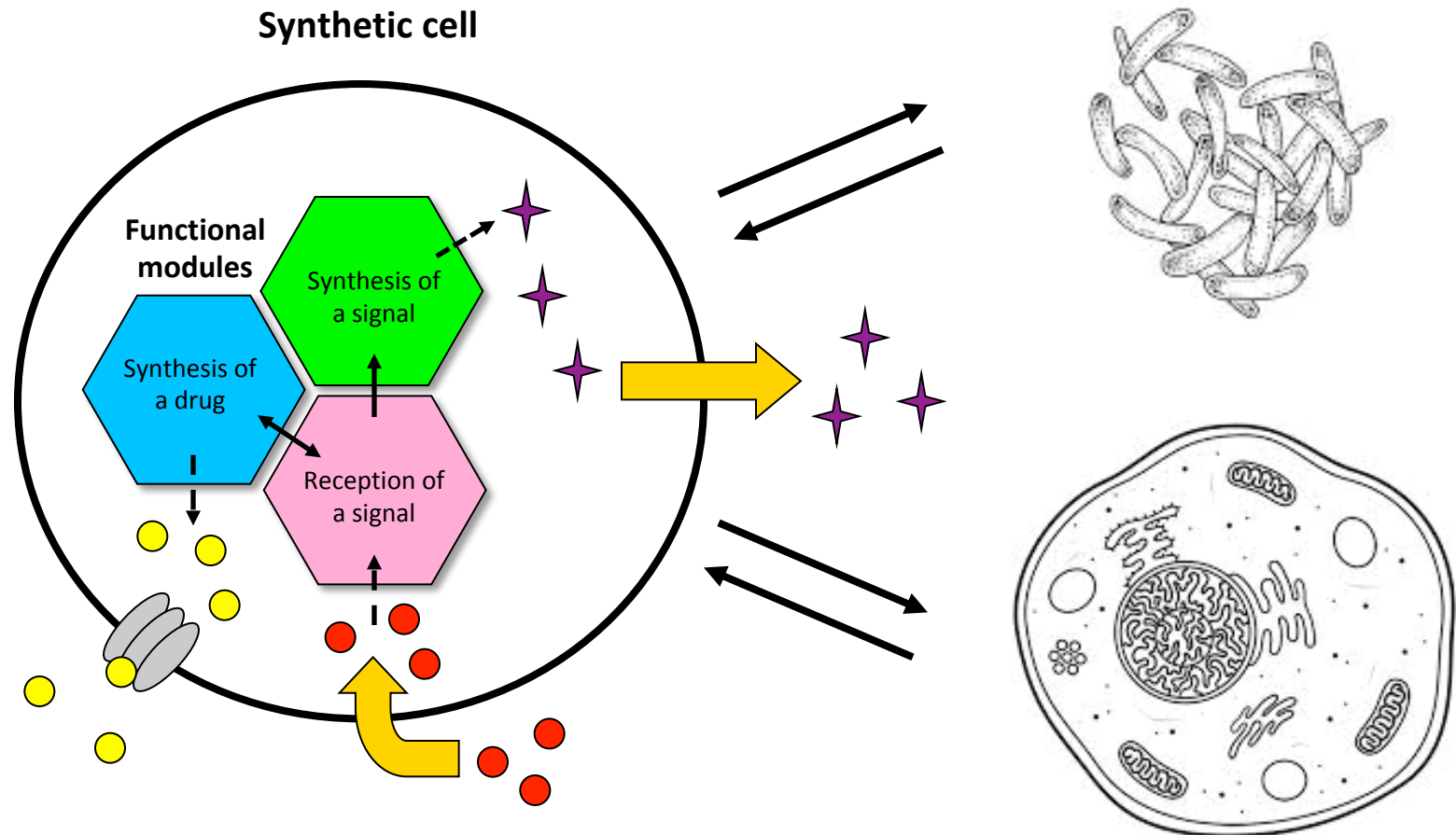


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria

2) wet-lab experiments

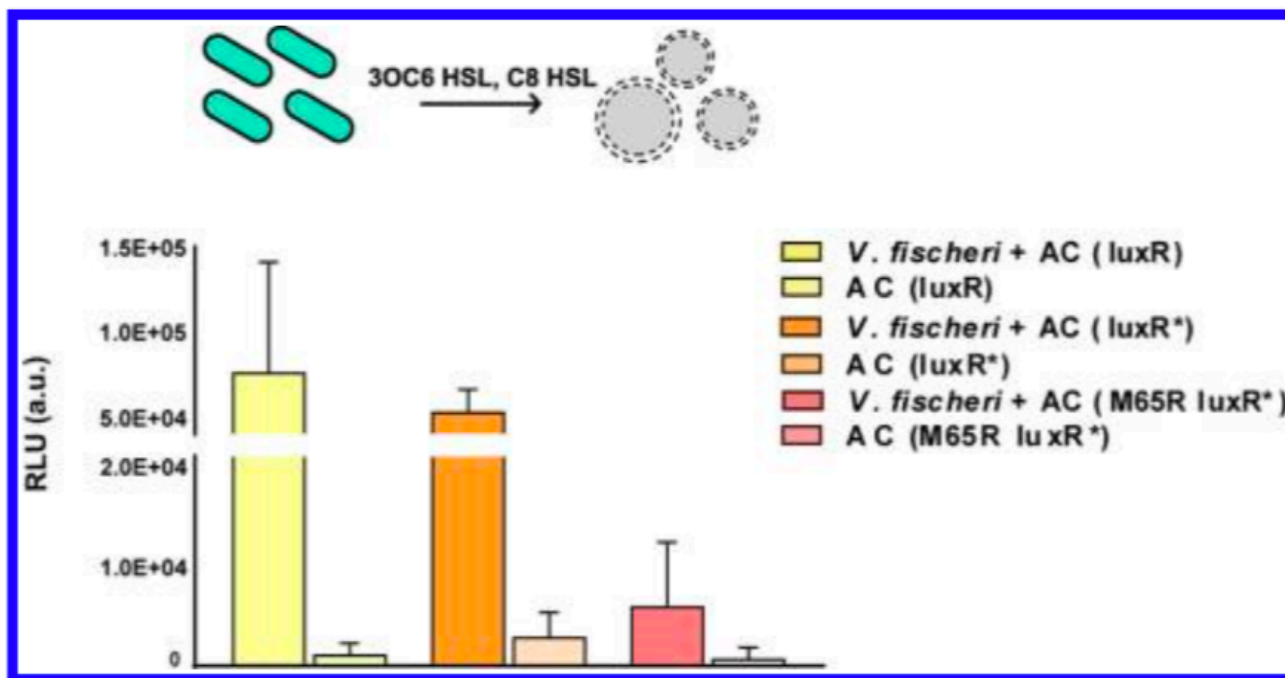


Generation of synthetic cells interfacing with bacteria to develop innovative drug delivery approaches

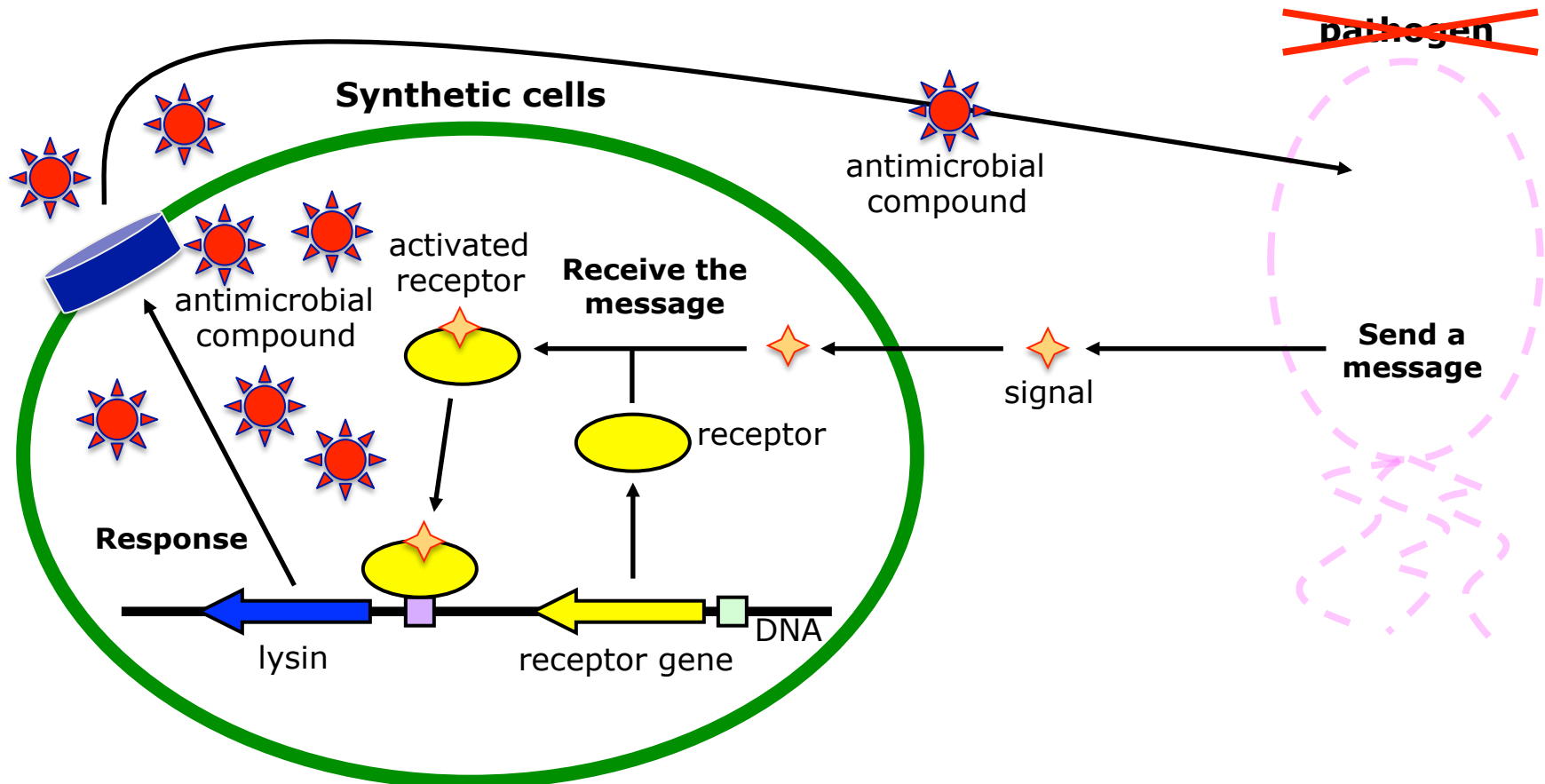


Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells

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



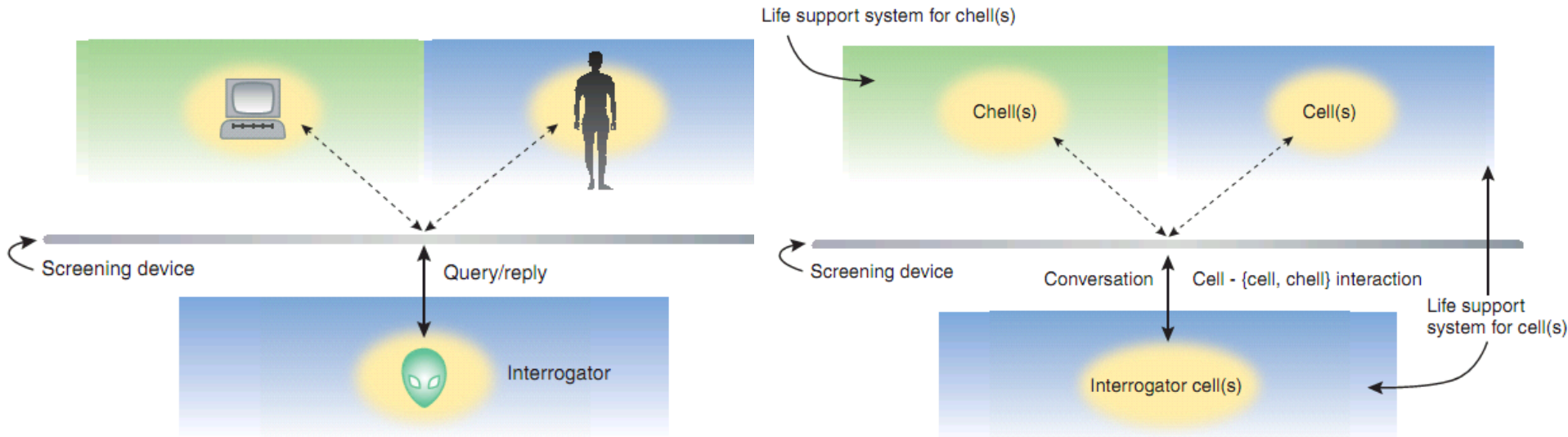
The Imitation Game

La generazione di cellule minime capaci di interagire con cellule naturali potrebbe anche avere interessanti ripercussioni dal punto di vista teorico-filosofico.

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.



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.
- Din MO, Danino T, Prindle A, Skalak M, Selimkhanov J, Allen K, Julio E, Atolia E, Tsimring LS, Bhatia SN, Hasty J (2016) Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery. *Nature* 536:81-85.
- Forbes NS (2010) Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10:785-794.
- 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.
- 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.
- 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.