

Ingeniería Genética II

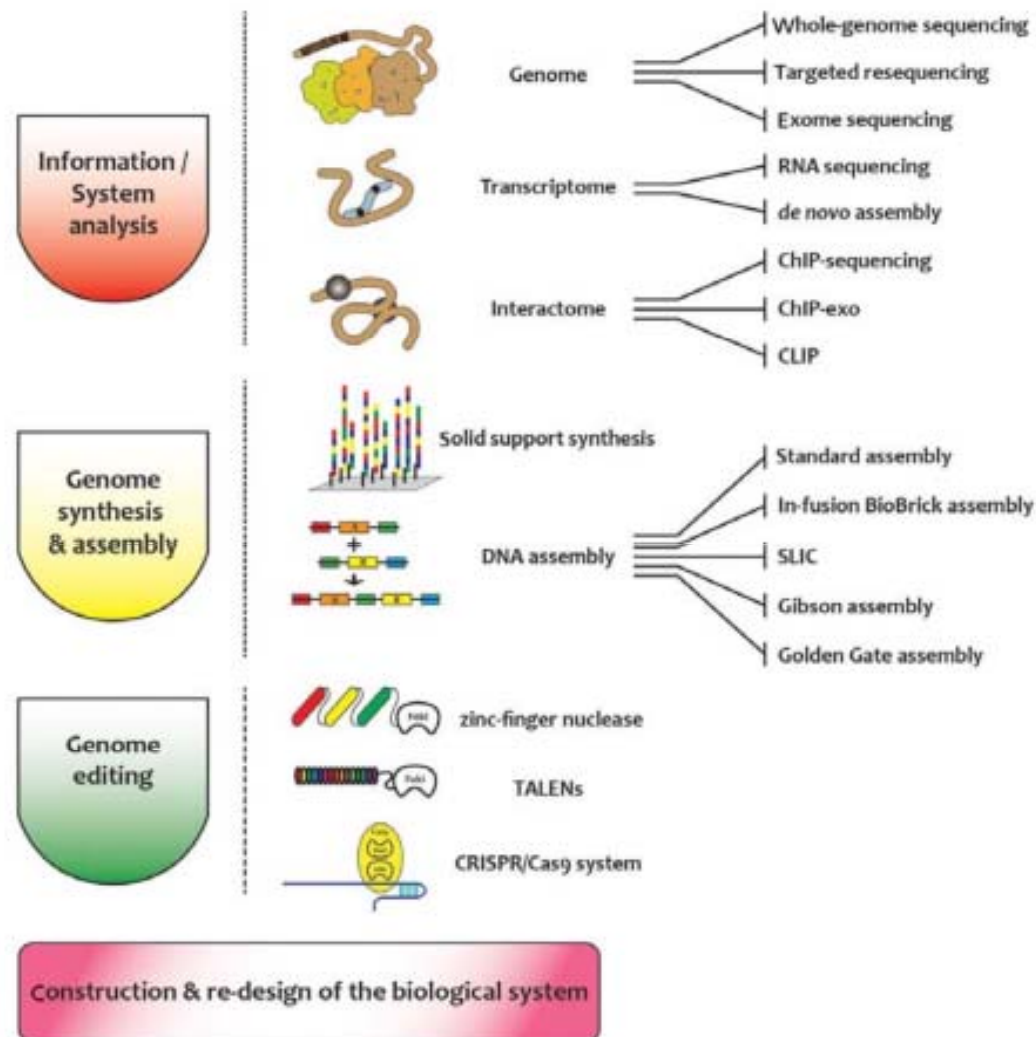
Unidad XIV

Biología sintética *Parte B*

Biología sintética

- La **biología sintética** es un **campo científico** que involucra el **diseño de nuevas funciones biológicas**, o el **rediseño de vías existentes**, para concretar **aplicaciones** para el ser **humano**.
- Su organización y armado requiere de **definir la función** y la **materia viva** donde se anidará.
- También, es importante conceptualizar que se necesitan **partes biológicas** (*biobricks*), las cuales deben conectarse ordenadamente para definir **dispositivos**, los cuales a su vez deben conectarse para construir circuitos complejos o **sistemas**.
- En vistas de ello, y dado que toda función biológica tiene su **biogénesis** en el **DNA**, se requieren de herramientas que faciliten su construcción.

Biología sintética



Biología sintética

- La **construcción de nuevos sistemas biológicos** requiere de etapas de **clonado molecular** para el armado de las secuencias codificantes.
- También, luego es necesario **incorporar** tales **clusters génicos** sobre **materia viva**.

Para optimizar las aplicaciones de biología sintética en materia viva

- existen dos aproximaciones centrales: **deleccionar la información genómica natural** que **no es vital**, o **sintetizar de novo genomas** y a través de ellos, a los organismos.

***¿Cuáles procedimientos de
clonado molecular se utilizan para
construir los circuitos génicos?***

Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado** y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA.
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:

Clonado
molecular
recombinogénico

- *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
- *Ensamblado in-fusion*
- *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
- *Ensamblado Gibson*
- *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

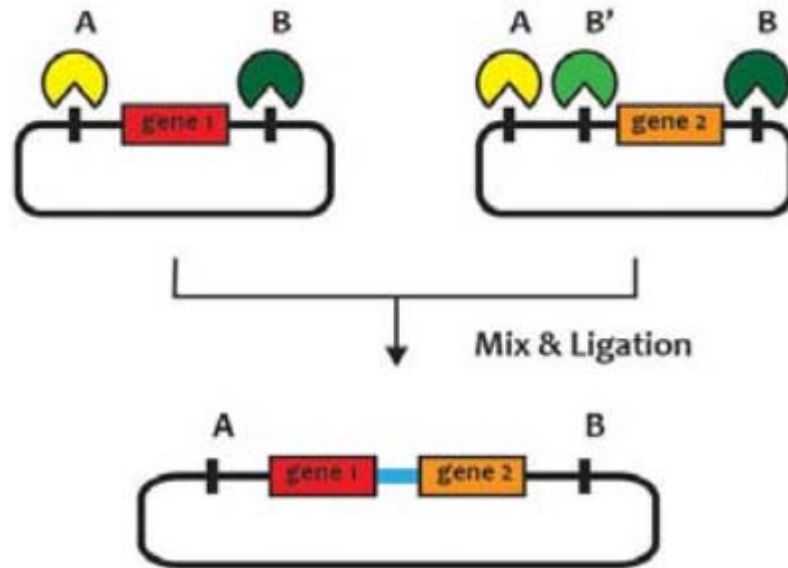
Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado** y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA.
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:
 - *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
 - *Ensamblado in-fusion*
 - *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
 - *Ensamblado Gibson*
 - *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

Clonado molecular circuitos

Ensamblado estándar



- Fragmentación con ER.

- Ligación con DNA ligasa de fragmentos con extremos compatibles

⌚ Restriction enzyme

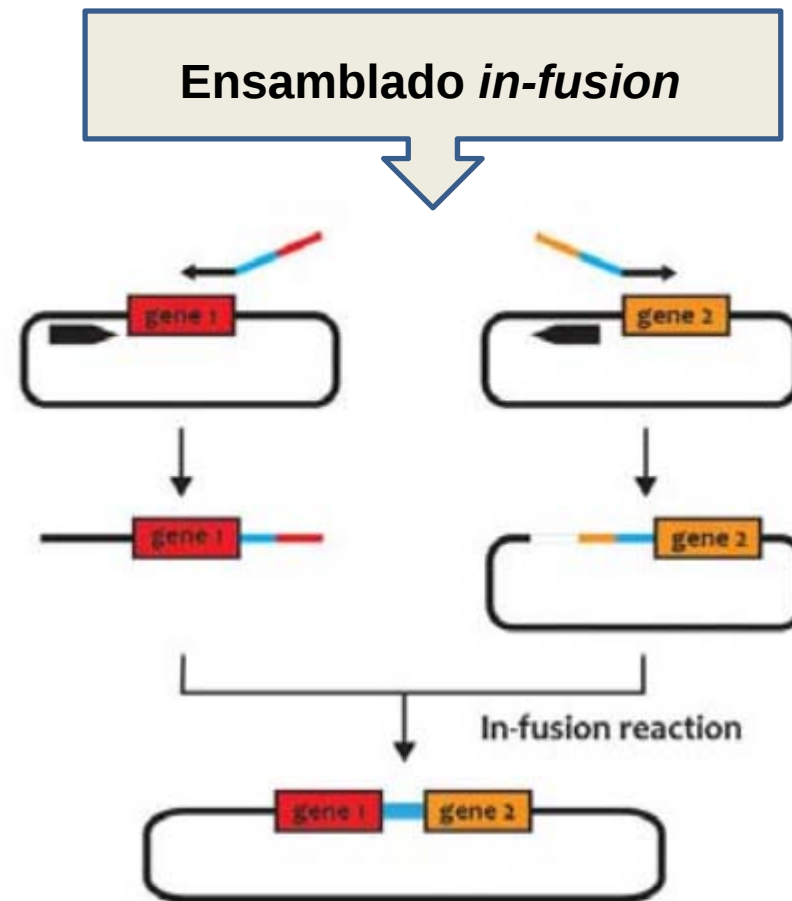
Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado** y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA.
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:
 - *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
 - *Ensamblado in-fusion*
 - *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
 - *Ensamblado Gibson*
 - *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

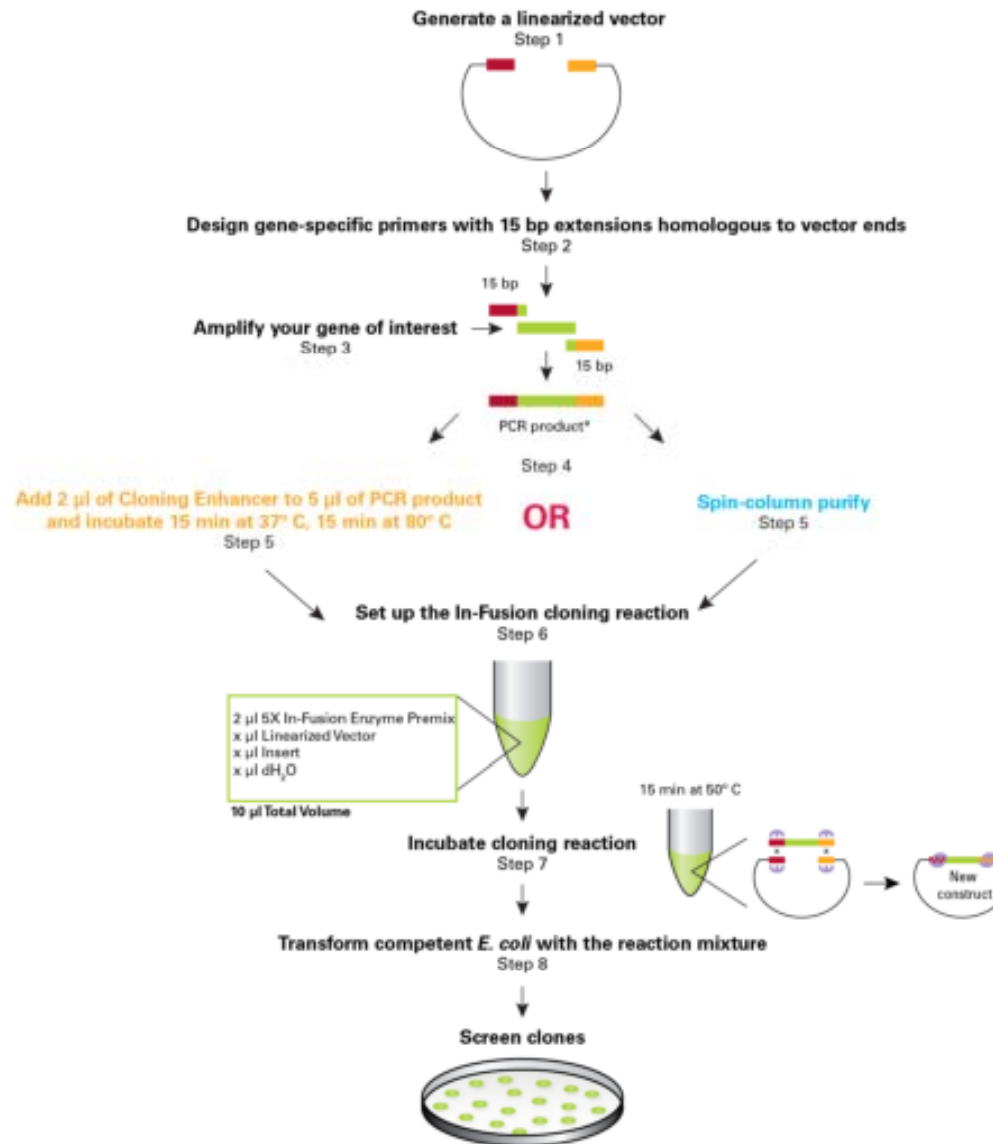
Clonado molecular circuitos



- Amplificación por PCR (15 nt de homología).
- Tratamiento con mezcla In-fusion.

Biología sintética

Clonado molecular circuitos



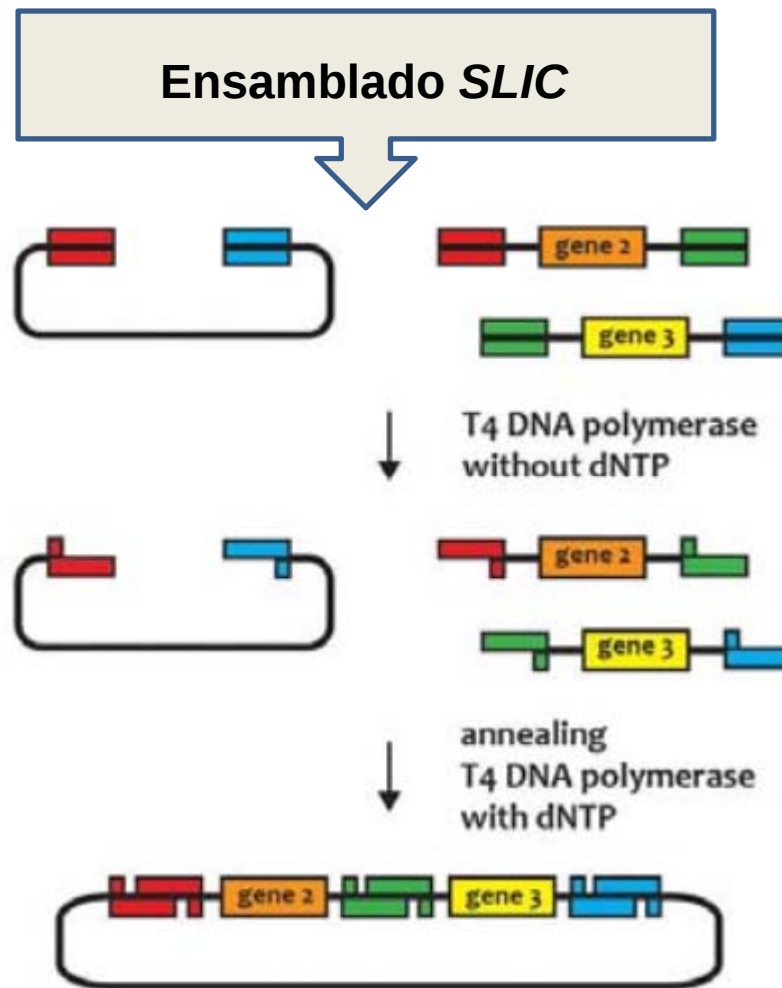
Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado**, y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA.
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:
 - *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
 - *Ensamblado in-fusion*
 - *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
 - *Ensamblado Gibson*
 - *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

Clonado molecular circuitos



- Amplificación por PCR (25 nt de homología).
- Tratamiento con T4 DNA polimerasa.
- *Annealing* y reparación

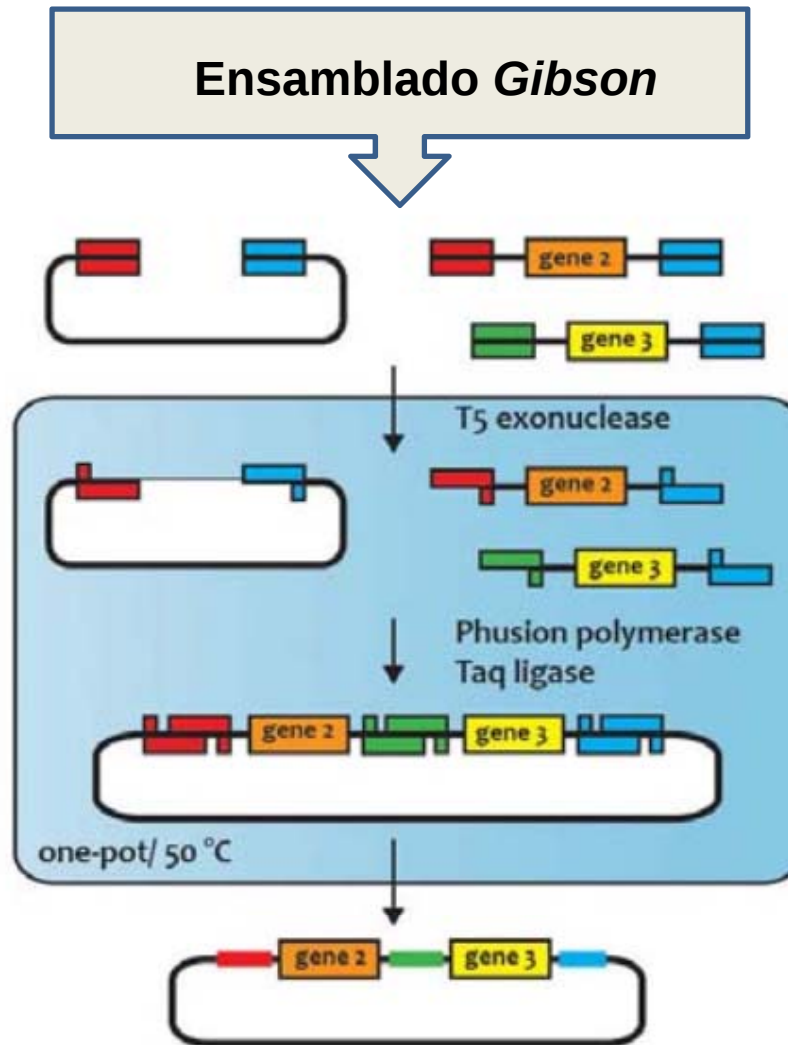
Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado** y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA..
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:
 - *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
 - *Ensamblado in-fusion*
 - *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
 - **Ensamblado Gibson**
 - *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

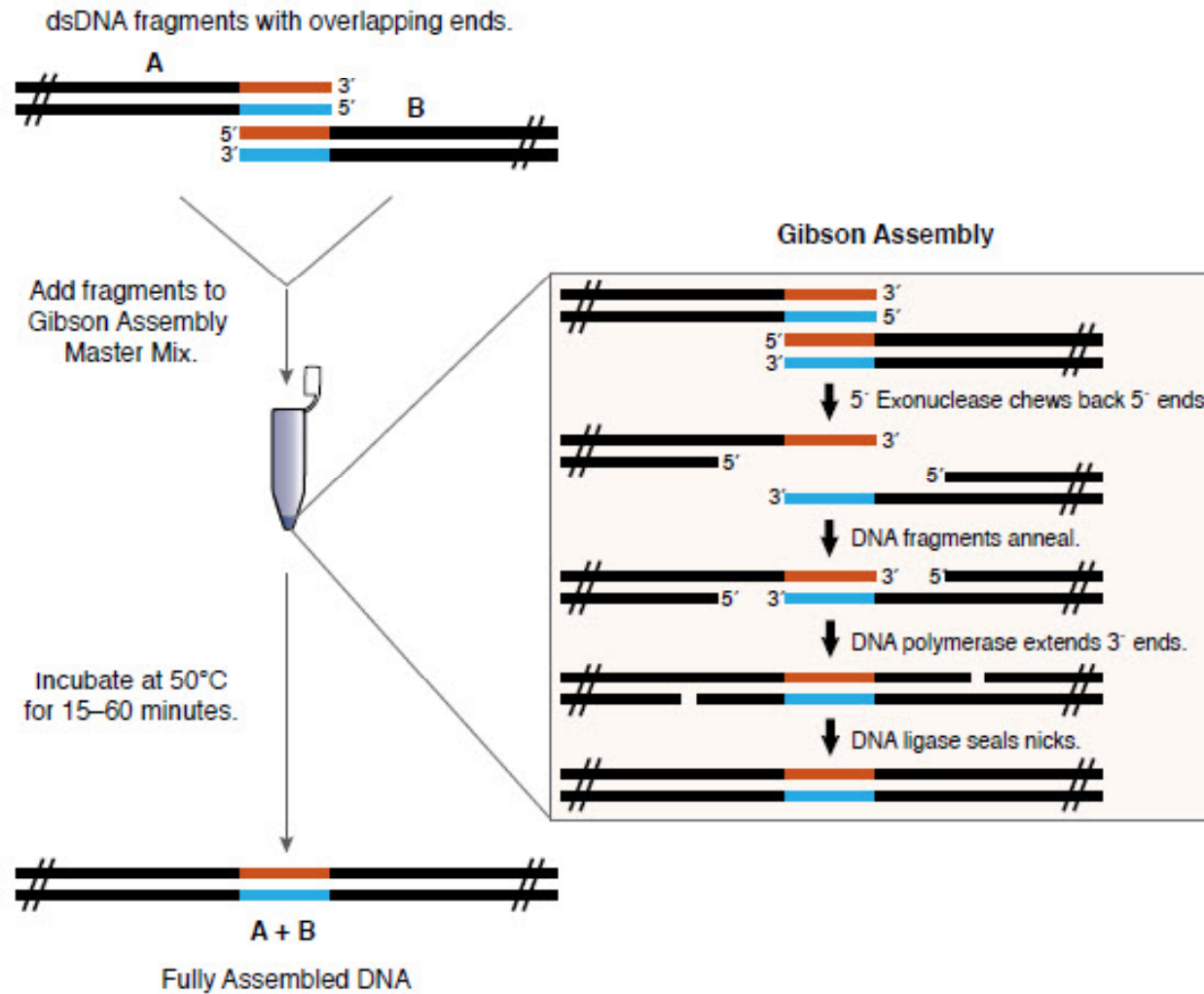
Clonado molecular circuitos



- Amplificación por PCR (15 nt de homología).
- Tratamiento con Gibson mix (.Exonucleasa T5, DNA pol y DNA ligasa)

Biología sintética

Clonado molecular circuitos



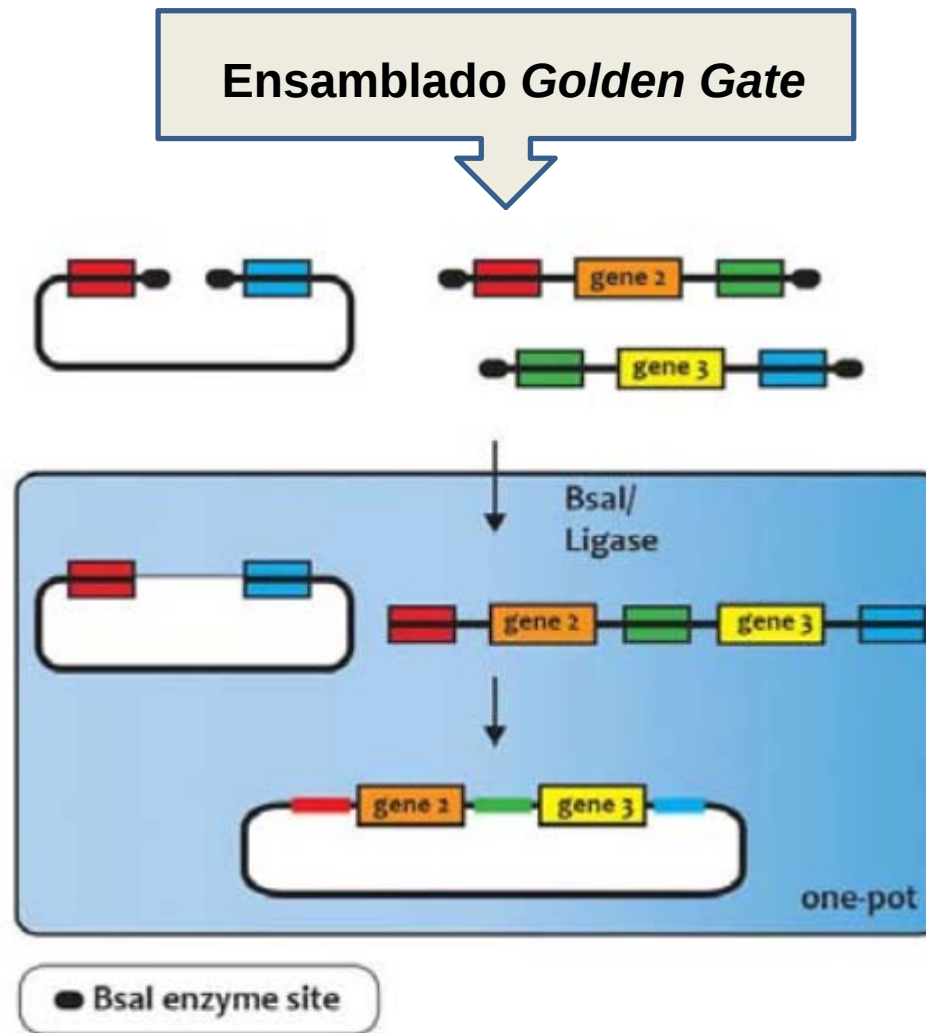
Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Una vez definido el **diseño** del **circuito genético**, debe decirse el procedimiento de **clonado molecular** apropiado para su constitución.
- Estos procedimientos también se denominan como **tecnologías de ensamblado** y requiere de contar con todos los *biobricks* en dsDNA.
- Existen **diferentes aproximaciones** metodológicas, entre las cuales destacan:
 - *Ensamblado estándar con ER y DNA ligasas*
 - *Ensamblado in-fusion*
 - *Clonado independiente de secuencia y ligasa (SLIC)*
 - *Ensamblado Gibson*
 - *Ensamblado Golden Gate*

Biología sintética

Clonado molecular circuitos



- Amplificación por PCR (15 nt de homología).

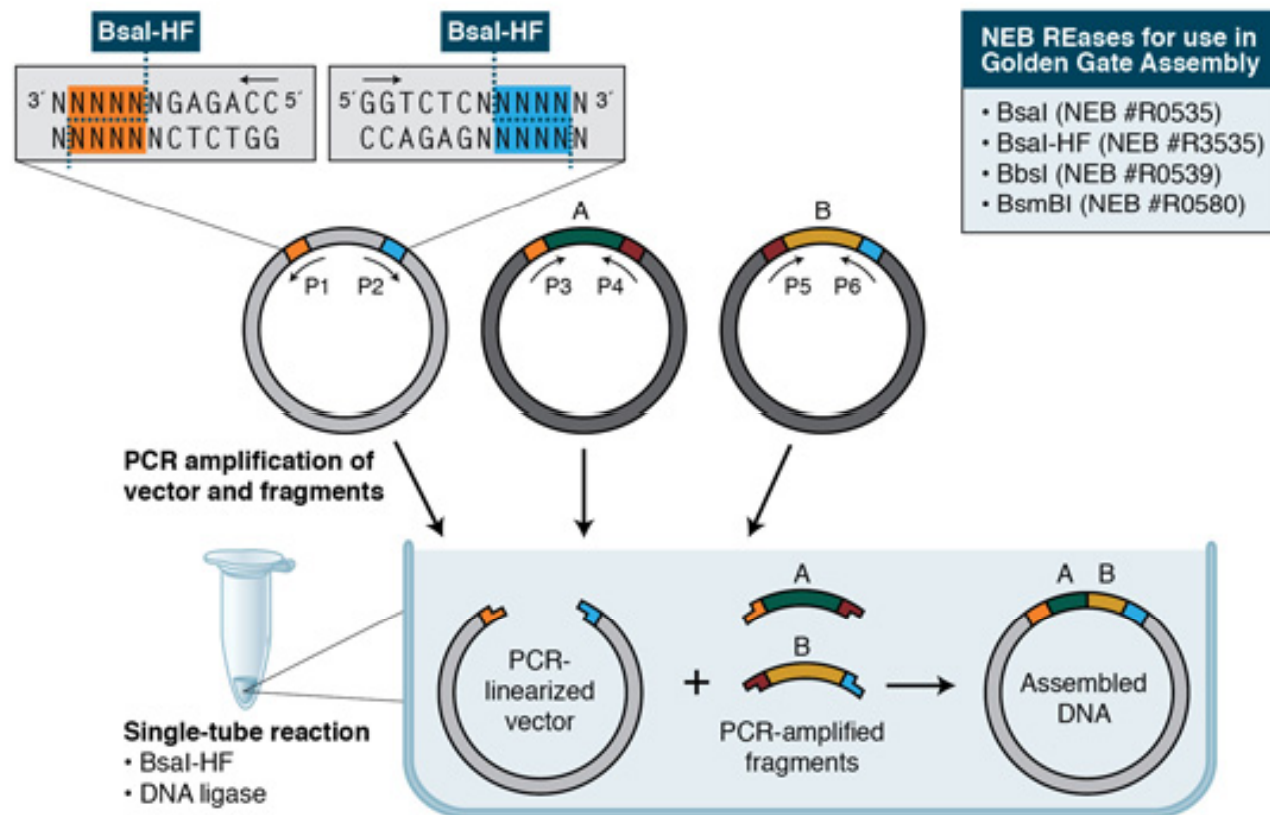
- Tratamiento ERIIS (BsaI) y DNA ligasa



GGTCTCN^NNNNN

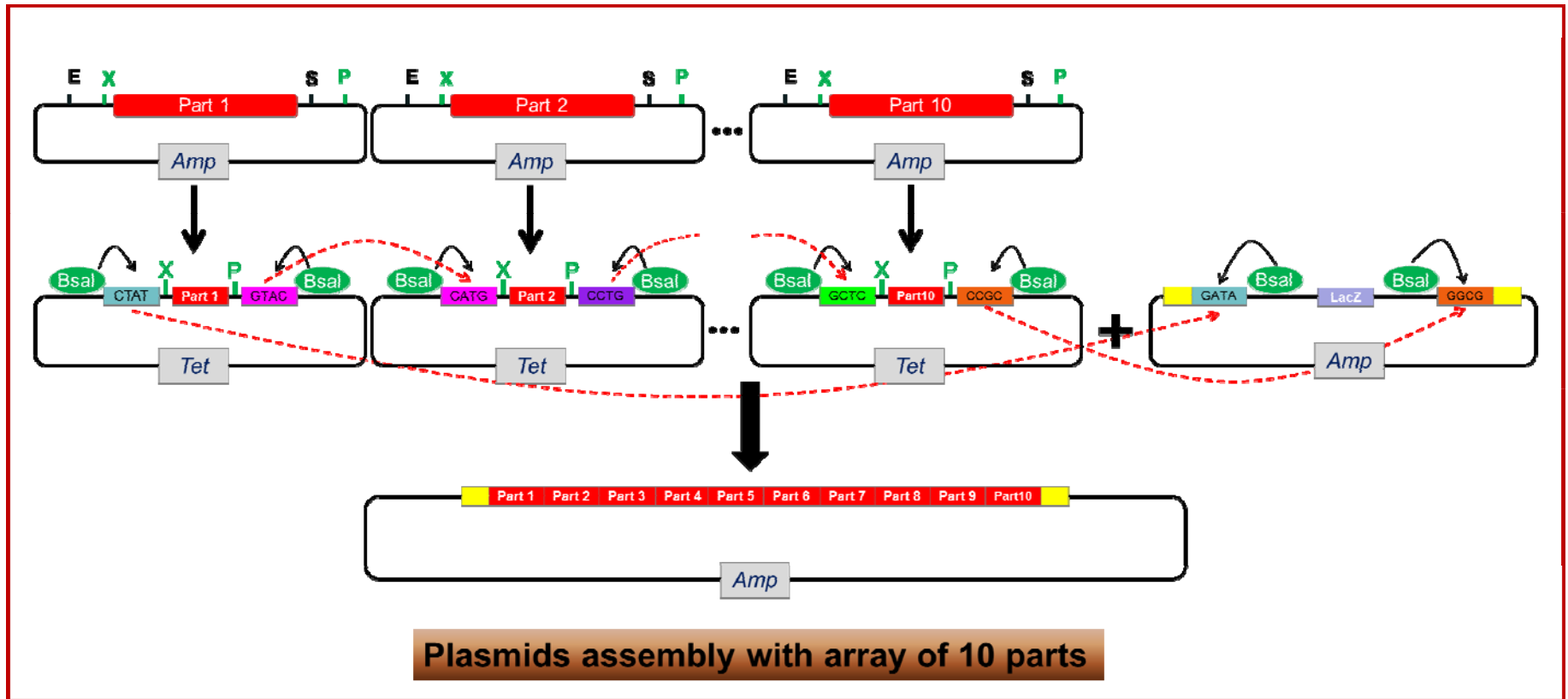
Biología sintética

Clonado molecular circuitos



Biología sintética

Clonado molecular circuitos



Biología sintética

Clonado molecular circuitos

- Los **procedimientos anteriores** pueden **utilizarse combinados**.

● **Actualmente**, existen **bibliotecas** de **biobricks** con diferentes sintaxis (promotores, RBS, UTRs varios, operadores, ORFs de reguladores o de actuadores y sensores, etc.) a partir de las cuales pueden ensamblarse circuitos genéticos.
- Algunos de estos *biobricks* son **universales**, mientras que otros son **facultativos** y algunos, **específicos** de hospedador.
- Una vez confeccionados los circuitos genéticos, éstos se pueden evaluar en formato de **plásmidos** dentro de la **materia viva** elegida para la función.
- **Finalmente**, validada la función, pueden **insertarse** dentro del **genoma** de la materia viva en cuestión

***¿Cuáles procedimientos existen
para deleccionar fragmentos de
genomas naturales?***

Biología sintética

Edición de genomas naturales

- Los **genomas naturales** presentan **información redundante**, entre la que se encuentran numerosos puntos de control para la diferente expresión de los fenotipos. En tanto, los **transposones** también podrían ser eliminados.
- Dado que los **organismos evolucionan sin un plan** (acumulan cambios genómicos por procesos de selección y deriva génica gracias a conseguir un éxito reproductivo diferencial), las secuencias de los genomas muestran vías muertas, otras en elaboración o regiones poco relevantes.
- En función de lo anterior, sería **plausible editar** la información contenida en un **genoma, eliminando lo irrelevante** o auxiliar, y dejando sólo lo esencial.
- Si bien es cierto que aún no sabemos el rol que cumple cada secuencia en un ser vivo, sí conocemos bastante sobre el contenido presente en ciertos organismos modelo.

Biología sintética

Edición de genomas naturales

- La idea de reducir **genomas** dejando lo **mínimo esencial** requiere de procedimientos experimentales de edición, y de un conocimiento acabado del rol de cada *locus*.
- Por ello, es necesario **revisar toda la literatura científica** para integrar el conocimiento genómico funcional que se tiene sobre distintos organismos.
- Por ejemplo, EcoCyc es una base de datos sobre el contenido informacional de *Escherichia coli* K12.

Biología sintética

Edición de genomas naturales

EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology

Ingrid M. Keseler^{1,*}, Amanda Mackie², Martin Peralta-Gil³, Alberto Santos-Zavaleta³, Socorro Gama-Castro³, César Bonavides-Martínez³, Carol Fulcher¹, Araceli M. Huerta³, Anamika Kothari¹, Markus Krummenacker¹, Mario Latendresse¹, Luis Muñoz-Rascado³, Quang Ong¹, Suzanne Paley¹, Imke Schröder^{4,5}, Alexander G. Shearer¹, Pallavi Subhraveti¹, Mike Travers¹, Deepika Weerasinghe¹, Verena Weiss³, Julio Collado-Vides³, Robert P. Gunsalus^{4,5}, Ian Paulsen² and Peter D. Karp^{1,*}

¹SRI International, 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025, USA, ²Department of Chemistry and Biomolecular Sciences, Macquarie University, Sydney, New South Wales 2109, Australia, ³Programa de Genómica Computacional, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 565-A, Cuernavaca, Morelos 62100, México, ⁴Department of Microbiology, Immunology, and Molecular Genetics and ⁵UCLA Institute of Genomics and Proteomics, University of California, Los Angeles, CA 90095, USA

Received September 15, 2012; Accepted October 4, 2012

Biología sintética

Edición de genomas naturales

← → ↺ ecocyc.org

**EcoCyc**
A member of the BioCyc database collection

LOGIN | Why Login? | Create New Account

Enter a gene, protein, metabolite or pathway...
Searching *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655

Quick Search | Gene Search
[change organism database](#)

Sites ▾ Search ▾ Genome ▾ Metabolism ▾ Analysis ▾ SmartTables ▾ Help ▾

EcoCyc Overview

EcoCyc is a scientific database for the bacterium *Escherichia coli* K-12 MG1655. The EcoCyc project performs [literature-based curation](#) of the entire genome, and of transcriptional regulation, transporters, and metabolic pathways.

New to EcoCyc? Take the [guided tour](#) of the EcoCyc.org Web site, watch our [free online instructional videos](#), or read our 2013 article: "[EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology](#)"

New User Guide >>

EcoCyc Renewal Application Not Funded

Letters of support sought by June 30 from NIH grantees and potential users of EcoCyc metabolic model.

Learn More

1

Tools

PortEco

Biología sintética

Edición de genomas naturales

Table 1. EcoCyc content and *E. coli* gene product functions

Data type	Number
Genes	4499
Gene products covered by a mini-review	3706
Gene products with GO terms with EXP evidence	2462
Enzymes	1485
Metabolic reactions	1577
Compounds	2363
Transporters	264
Transport reactions	348
Transported substrates	254
Transcription factors	188
Regulatory interactions	5827
Transcription initiation	3207
Transcription attenuation	20
Regulation of translation	114
Enzyme modulation	2468
Other	18
Literature citations	23 909

Biología sintética

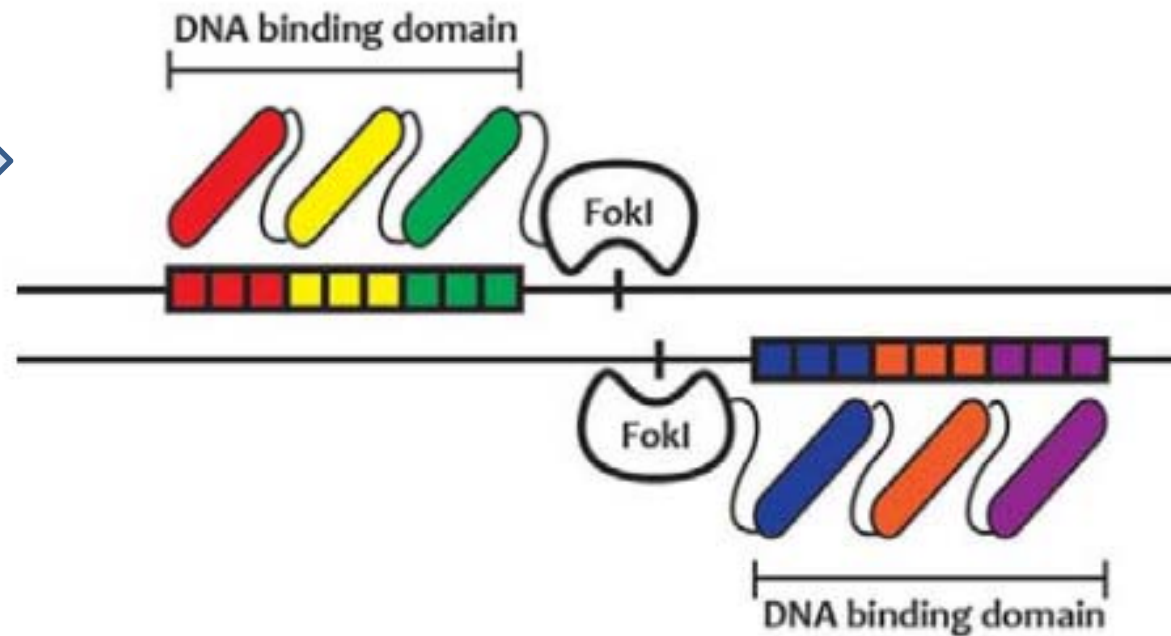
Edición de genomas naturales

- La **delección** de **secuencias** puede realizarse de una **manera dirigida** utilizándose actividad endonucleasa sitio específica.
- La introducción de **DSB** (*Double Strand Breacks*) por estas enzimas, estimula a la maquinaria de reparación, pudiéndose realizar un mecanismo **HDR** (Homologous DNA Repair) con un DNA *donor* suministrado *ad hoc*.
- De este modo, pueden controlarse delecciones precisas. **También** es oportuno valerse de la **integrasa Cre** y su secuencia diana ***loxP*** para la misma tarea.

Biología sintética

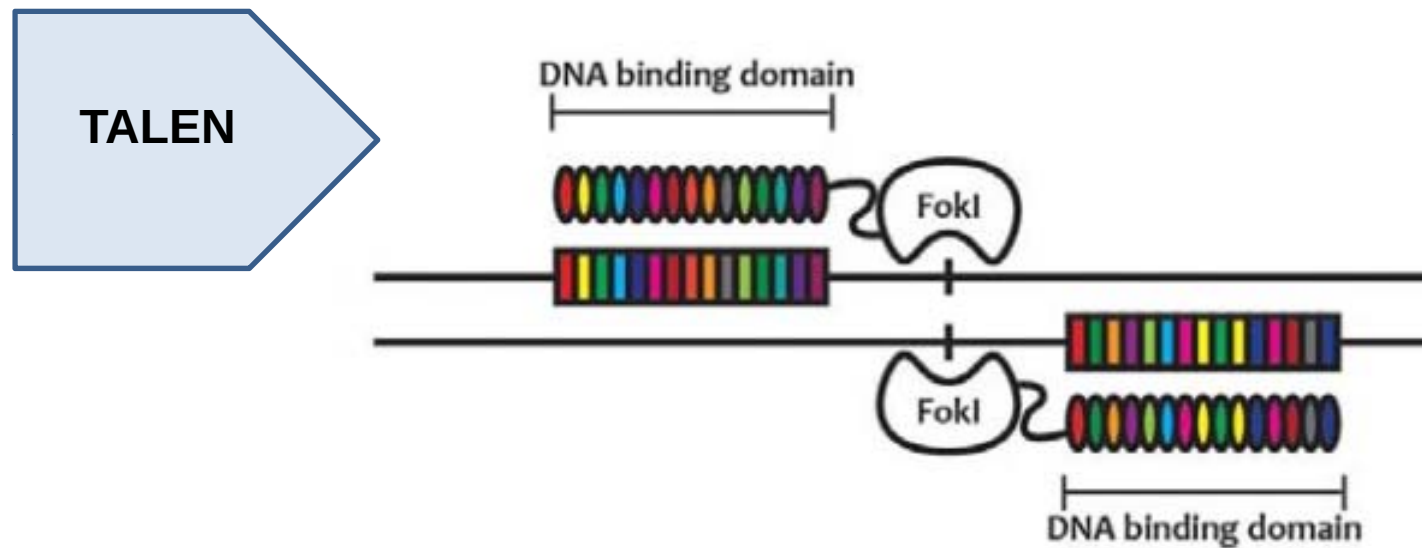
Edición de genomas naturales

Nucleasa
Zinc Finger



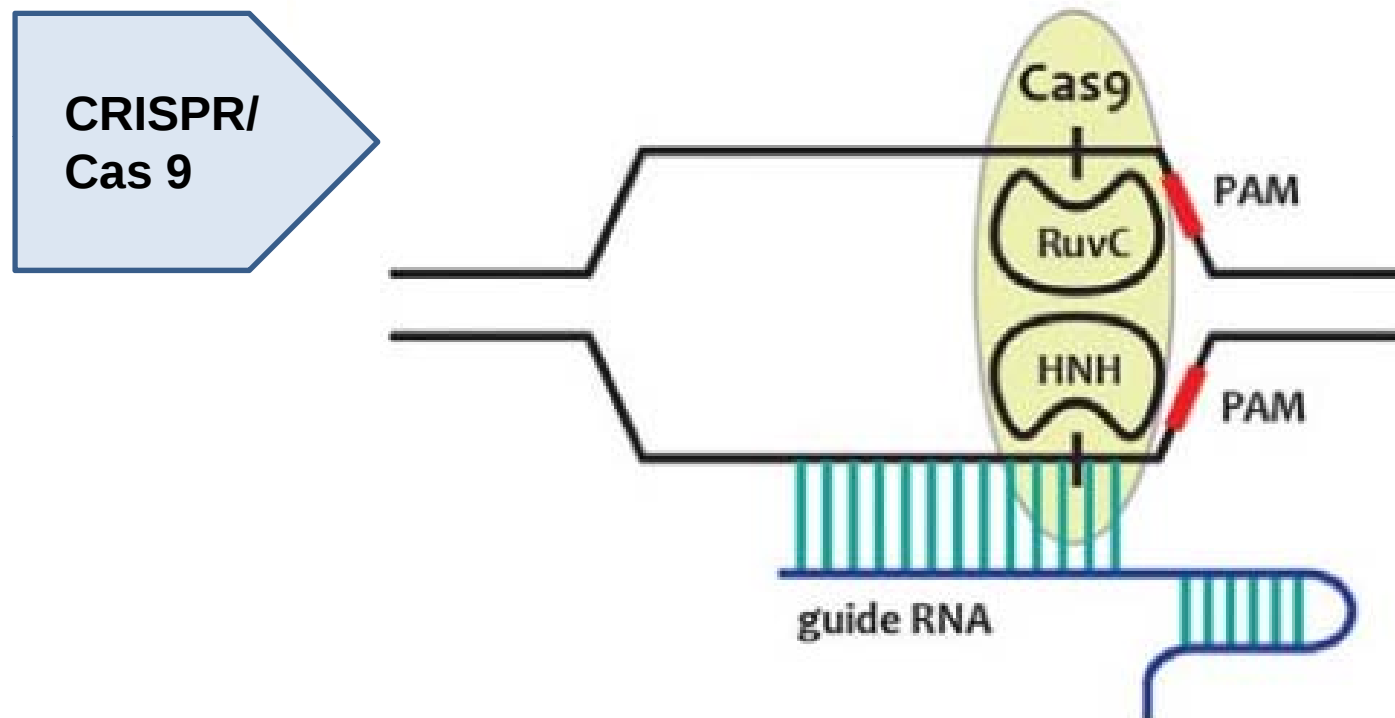
Biología sintética

Edición de genomas naturales



Biología sintética

Edición de genomas naturales



Biología sintética

Edición de genomas naturales

- La **delección** de **secuencias** también puede realizarse de una **manera azarosa**.
- Para este fin, se han desarrollado **procedimientos experimentales** que posibilitan reducir un genoma.
- Y para una mayor tasa de éxito, pueden **combinarse procedimientos dirigidos** y otros **al azar** para lograr **genomas mínimos**.
- Los genomas mínimos son una **base ideal** para utilizar como **plataformas** para **circuitos genéticos de diseño**, previamente ensamblados a partir de *biobricks*.

Biología sintética

Edición de genomas naturales

Chromosomal Deletion Formation System Based on Tn5 Double Transposition: Use For Making Minimal Genomes and Essential Gene Analysis

Igor Y. Goryshin,¹ Todd A. Naumann,¹ Jennifer Apodaca, and William S. Reznikoff²

Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA

In this communication, we describe the use of specialized transposons (Tn5 derivatives) to create deletions in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. These transposons are essentially rearranged composite transposons that have been assembled to promote the use of the internal transposon ends, resulting in intramolecular transposition events. Two similar transposons were developed. The first deletion transposon was utilized to create a consecutive set of deletions in the *E. coli* chromosome. The deletion procedure has been repeated 20 serial times to reduce the genome an average of 200 kb (averaging 10 kb per deletion). The second deletion transposon contains a conditional origin of replication that allows deleted chromosomal DNA to be captured as a complementary plasmid. By plating cells on media that do not support plasmid replication, the deleted chromosomal material is lost and if it is essential, the cells do not survive. This methodology was used to analyze 15 chromosomal regions and more than 100 open reading frames (ORFs). This provides a robust technology for identifying essential and dispensable genes.

[Supplemental material is available online at www.genome.org and is supplied as an extended table enumerating genes lost in two multiple round deletion strains ($\Delta 20-1$ and $\Delta 20-4$). These data are summarized in Table I.]

Biología sintética

Edición de genomas naturales

Emergent Properties of Reduced-Genome *Escherichia coli*

György Pósfai,^{1,2*} Guy Plunkett III,^{2,3,4} Tamás Fehér,¹ David Frisch,^{2,4} Günther M. Keil,⁵
Kinga Umenhoffer,¹ Vitaliy Kolisnychenko,^{1†} Buffy Stahl,² Shamik S. Sharma,^{6‡}
Monika de Arruda,² Valerie Burland,^{2,3} Sarah W. Harcum,⁷ Frederick R. Blattner^{2,3,4*}

With the use of synthetic biology, we reduced the *Escherichia coli* K-12 genome by making planned, precise deletions. The multiple-deletion series (MDS) strains, with genome reductions up to 15%, were designed by identifying nonessential genes and sequences for elimination, including recombinogenic or mobile DNA and cryptic virulence genes, while preserving good growth profiles and protein production. Genome reduction also led to unanticipated beneficial properties: high electroporation efficiency and accurate propagation of recombinant genes and plasmids that were unstable in other strains. Eradication of stress-induced transposition evidently stabilized the MDS genomes and provided some of the new properties.

Biología sintética

Edición de genomas naturales

Reducción del genoma de *Escherichia coli*



	MG1655	MDS12	MDS41	MDS42	MDS43
Total number of genes	4,434	4,011	3,731	3,730	3,691
Genome size (bp)	4,639,675	4,263,492	3,977,067	3,976,359	3,931,408
Replichore imbalance (bp)	30,517	141,360	139,331	138,623	183,574
Total no. genes deleted	0	423	703	704	743
Total bp DNA deleted	0	376,183	662,608	663,316	708,267
Percent of genome deleted	0	8.11%	14.28%	14.30%	15.27%

***¿Cuáles procedimientos existen
para sintetizar genomas
artificiales?***

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- Los **circuitos genéticos** para generar **aplicaciones de biología sintética** se pueden **introducir** en **genomas naturales** (silvestres o mínimos), o bien, en moléculas genómicas **artificiales** (ya sean segmentos o genomas enteros).
- La **construcción** de **genomas artificiales** se inició con la síntesis del genoma del **virus de la Polio** en el año **2002***.
- En el año **2008** se sintetizó el **primer gemoma** de un **organismo** (*Mycoplasma genitalium* JCVI-syn 1.0, 582.970 pb).
- En el año **2010**, se hizo el reporte de la **síntesis completa** del **genoma** de una **bacteria** (1,08 Mb; *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn 1.0), a partir del cual se generaron células vivas***.

*Cello, J., Paul, A.V., and Wimmer, E. (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science 297, 1016-1018.

** Gibson *et al.* (2008). Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a Mycoplasma genitalium Genome., 1215 (2008); **319 Science**

*** Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science 329, 52-56.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

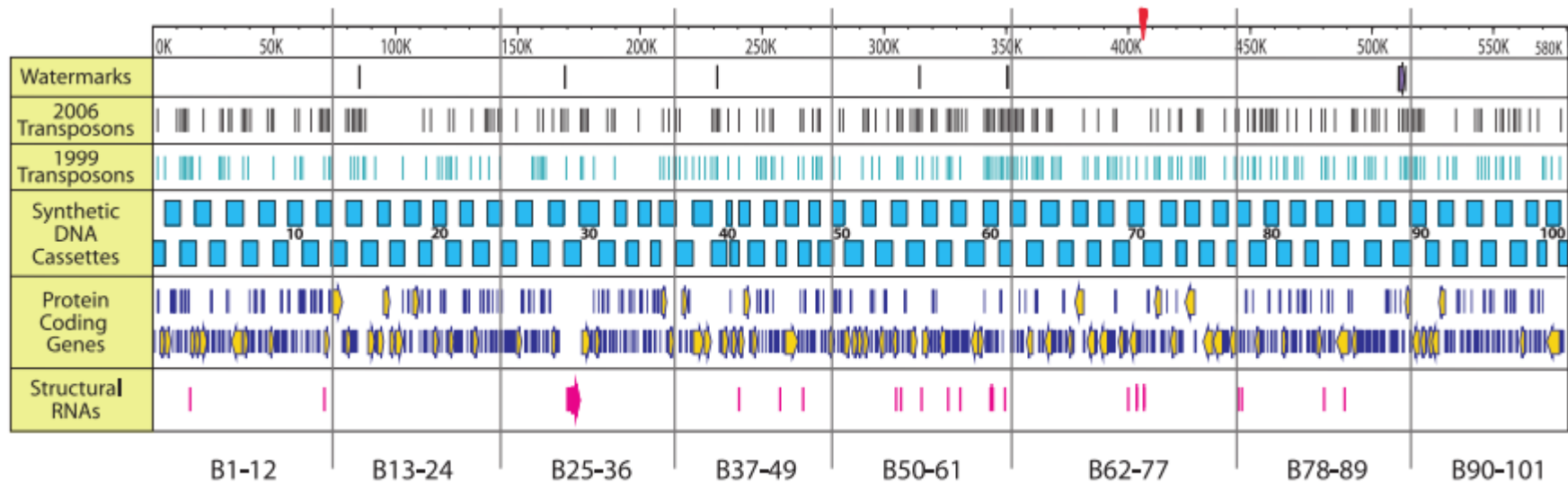
Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome

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*

We have synthesized a 582,970–base pair *Mycoplasma genitalium* genome. This synthetic genome, named *M. genitalium* JCVI-1.0, contains all the genes of wild-type *M. genitalium* G37 except MG408, which was disrupted by an antibiotic marker to block pathogenicity and to allow for selection. To identify the genome as synthetic, we inserted “watermarks” at intergenic sites known to tolerate transposon insertions. Overlapping “cassettes” of 5 to 7 kilobases (kb), assembled from chemically synthesized oligonucleotides, were joined by in vitro recombination to produce intermediate assemblies of approximately 24 kb, 72 kb (“1/8 genome”), and 144 kb (“1/4 genome”), which were all cloned as bacterial artificial chromosomes in *Escherichia coli*. Most of these intermediate clones were sequenced, and clones of all four 1/4 genomes with the correct sequence were identified. The complete synthetic genome was assembled by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, then isolated and sequenced. A clone with the correct sequence was identified. The methods described here will be generally useful for constructing large DNA molecules from chemically synthesized pieces and also from combinations of natural and synthetic DNA segments.

Biología sintética

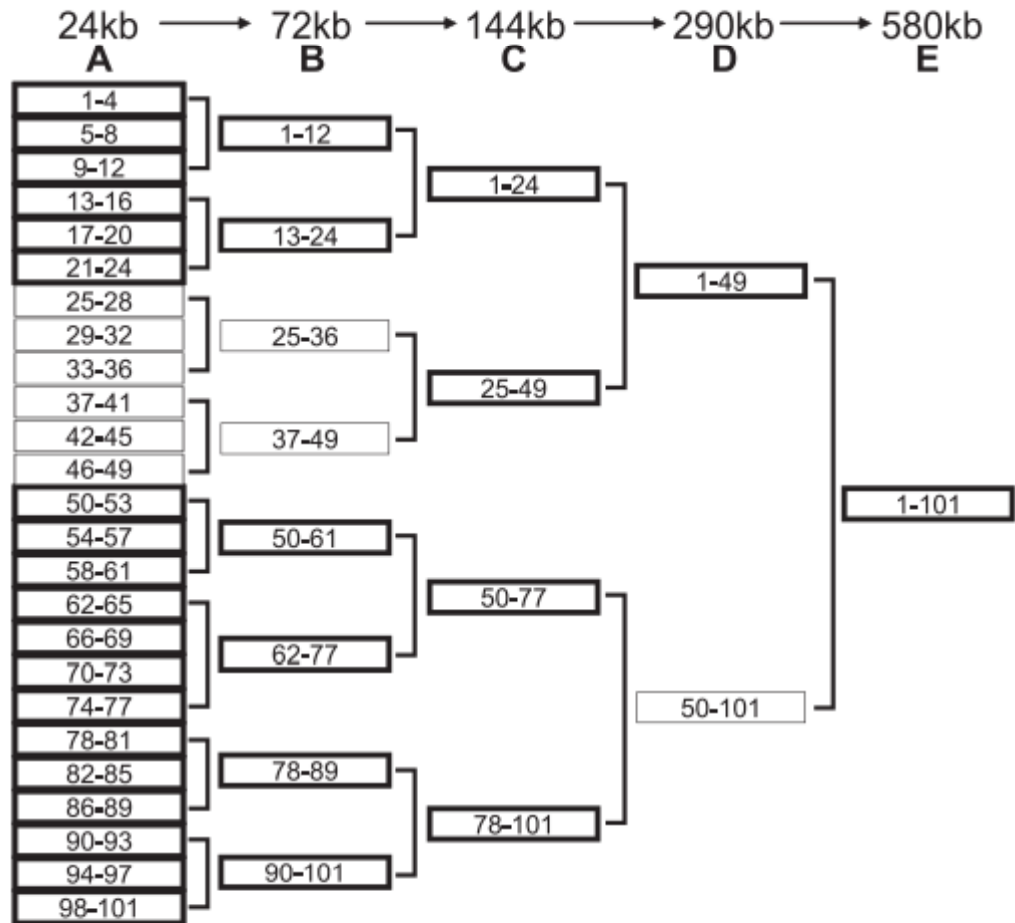
Construcción de genomas artificiales



Casetes sintetizados conteniendo la información genómica de *Mycoplasma genitalium*

Biología sintética

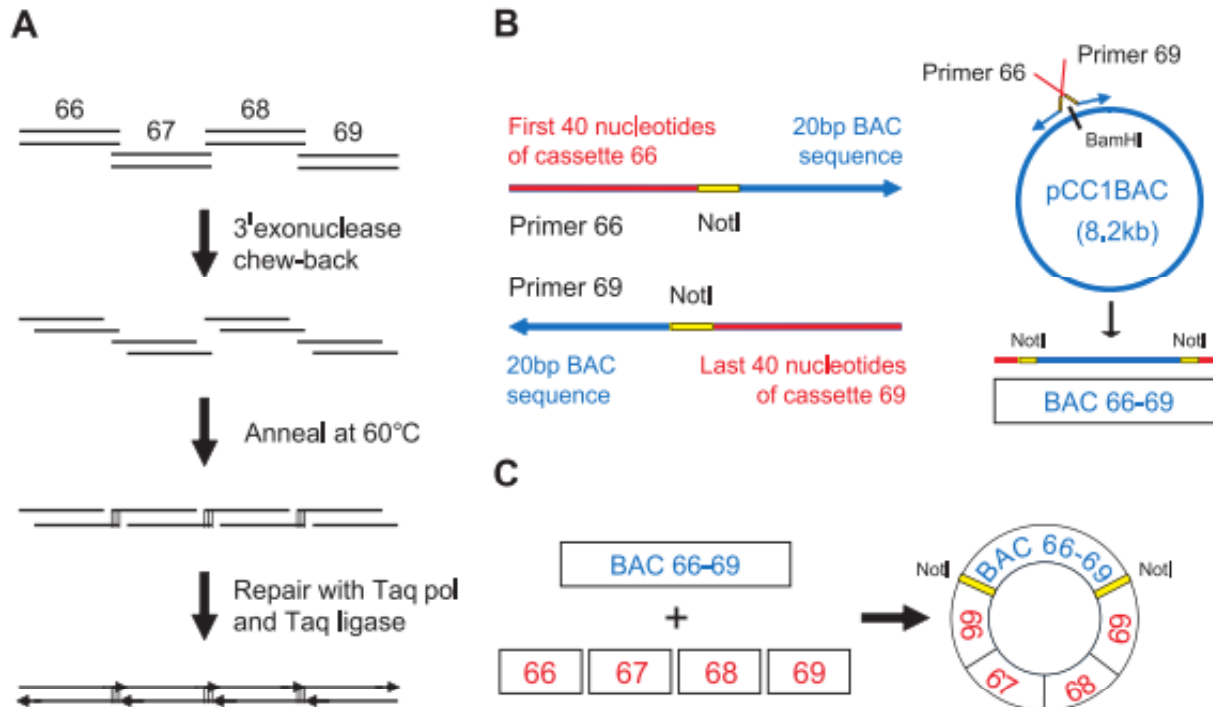
Construcción de genomas artificiales



Casetes sintetizados
conteniendo la información
genómica de *Mycoplasma
genitalium*

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales



Estrategia de ensamblado de los cassetes.

Fig. 3. Assembly of cassettes by in vitro recombination. **(A)** Diagram of steps in the in vitro recombination reaction, using the assembly of cassettes 66 to 69 as an example. **(B)** BAC vector is prepared for the assembly reaction by PCR amplification using primers as illustrated. The linear amplification product, after gel purification, is included in the assembly reaction of **(A)**, such that the desired assembly is circular DNA containing the four cassettes and the BAC DNA as depicted in **(C)**.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

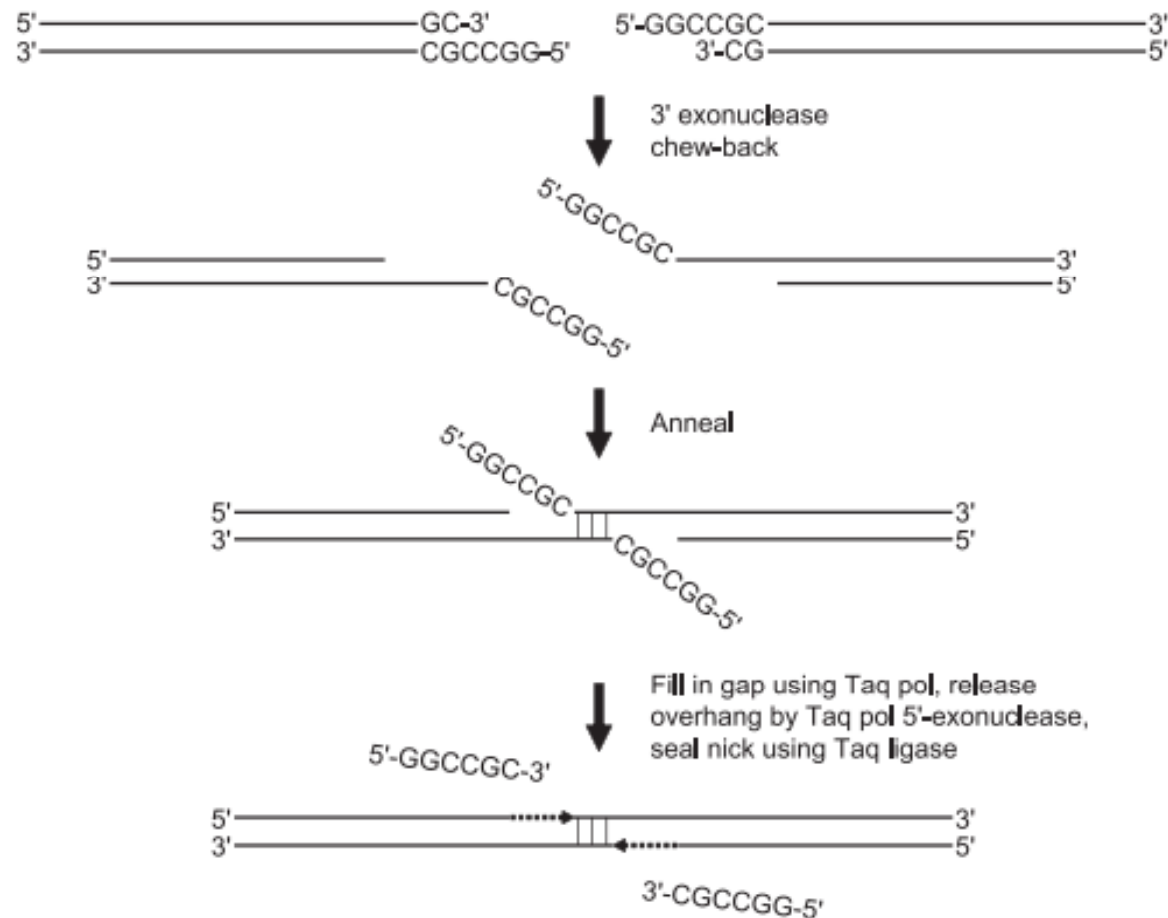
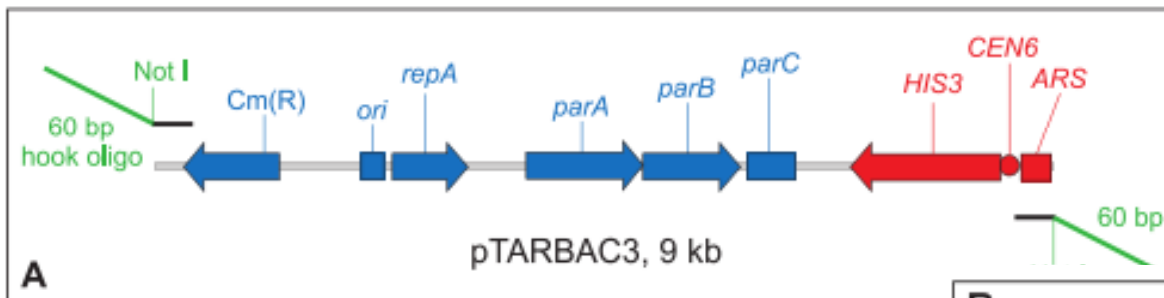


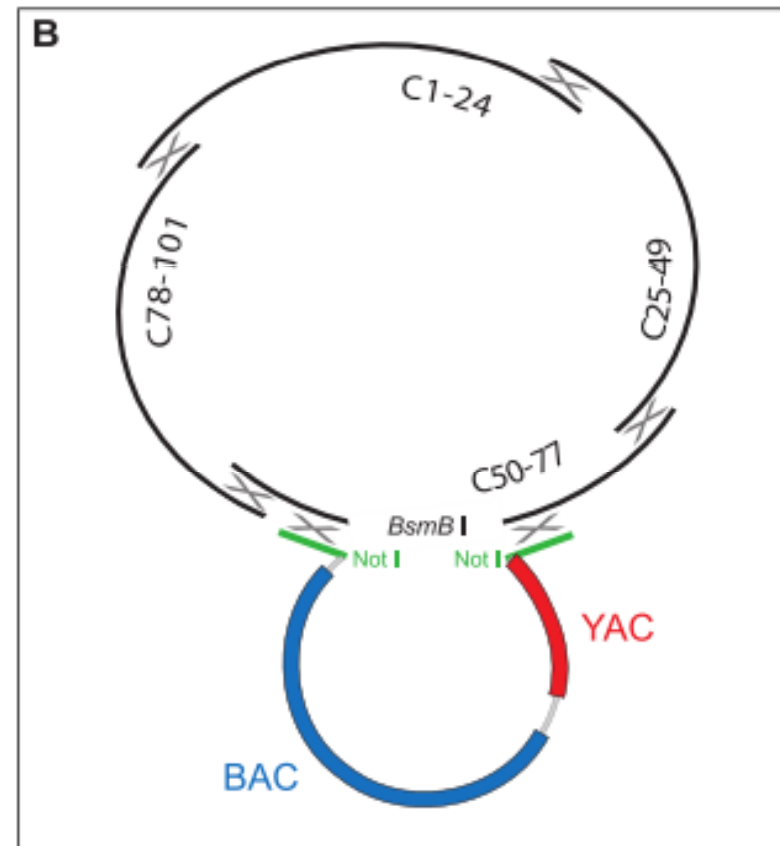
Fig. 5. Repair of annealed junctions containing nonhomologous 3' and 5' Not I sequences. The 3' GC nucleotides are removed during the chew-back reaction. In the repair reaction the 5'-GGCCGC Not I overhangs are removed by the 5'-exonuclease activity contained in the Taq polymerase.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales



- El **ensamblado final** se hizo por recombinación ***in vivo*** en levaduras.
- Dicho procedimiento se denomina **TAR Cloning** (*Transformation-associated recombination*)



Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

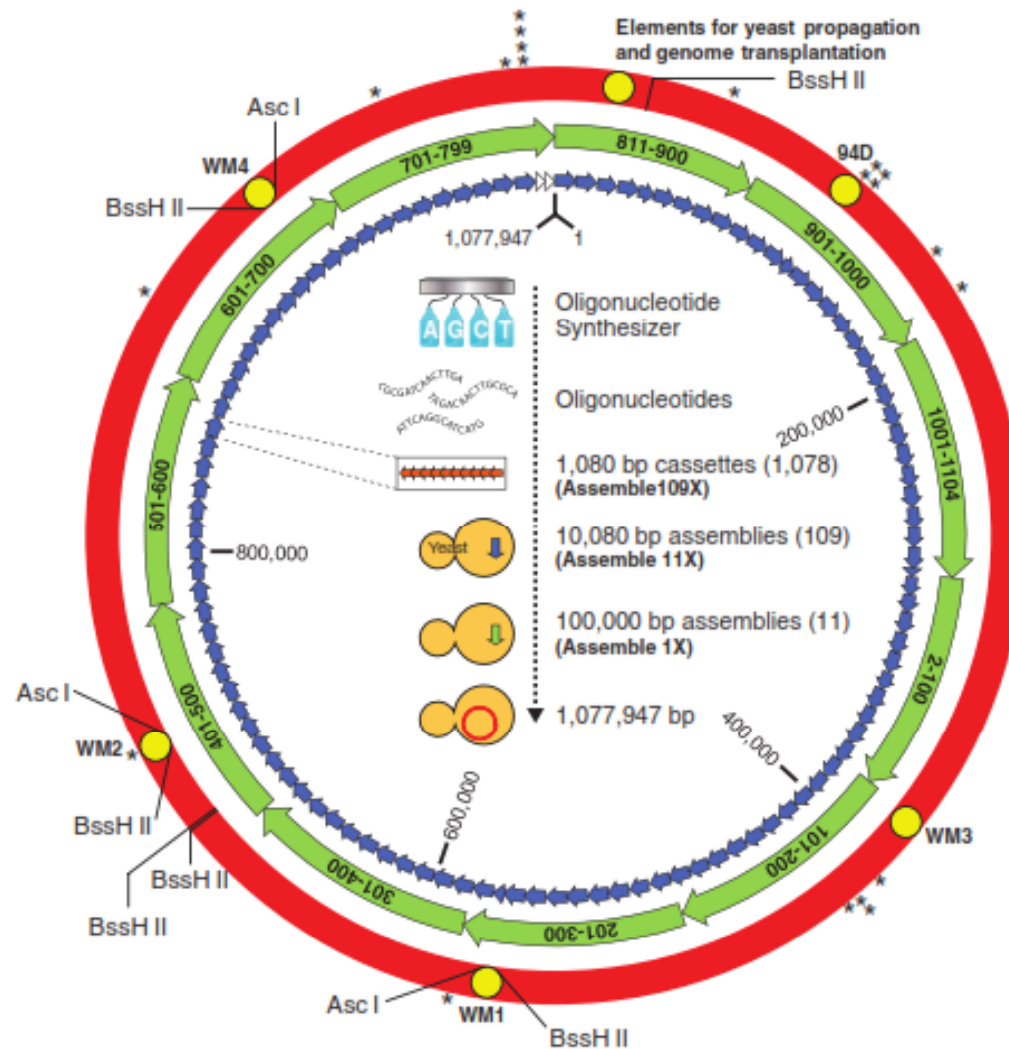
Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

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*}

We report the design, synthesis, and assembly of the 1.08–mega–base pair *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 genome starting from digitized genome sequence information and its transplantation into a *M. capricolum* recipient cell to create new *M. mycoides* cells that are controlled only by the synthetic chromosome. The only DNA in the cells is the designed synthetic DNA sequence, including “watermark” sequences and other designed gene deletions and polymorphisms, and mutations acquired during the building process. The new cells have expected phenotypic properties and are capable of continuous self-replication.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales



Genoma sintetizado como el de *Mycoplasma genitalium*

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- El **genoma sintetizado** luego fue **trasplantado** a una célula, procedimiento que habían puesto a punto previamente



Genome Transplantation in Bacteria: Changing One Species to Another

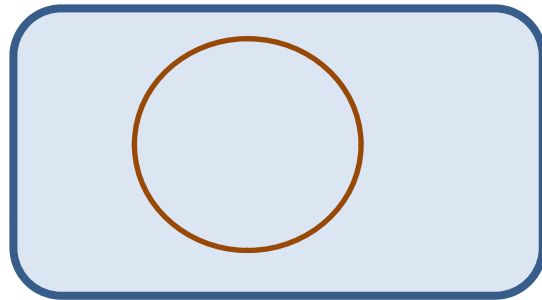
Carole Lartigue, John I. Glass,* Nina Alperovich, Rembert Pieper, Prashanth P. Parmar, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, J. Craig Venter

As a step toward propagation of synthetic genomes, we completely replaced the genome of a bacterial cell with one from another species by transplanting a whole genome as naked DNA. Intact genomic DNA from *Mycoplasma mycoides* large colony (LC), virtually free of protein, was transplanted into *Mycoplasma capricolum* cells by polyethylene glycol-mediated transformation. Cells selected for tetracycline resistance, carried by the *M. mycoides* LC chromosome, contain the complete donor genome and are free of detectable recipient genomic sequences. These cells that result from genome transplantation are phenotypically identical to the *M. mycoides* LC donor strain as judged by several criteria.

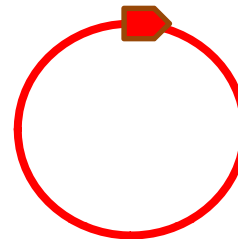
Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

Mycoplasma capricolum

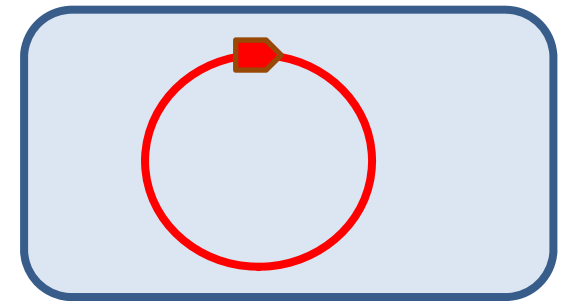
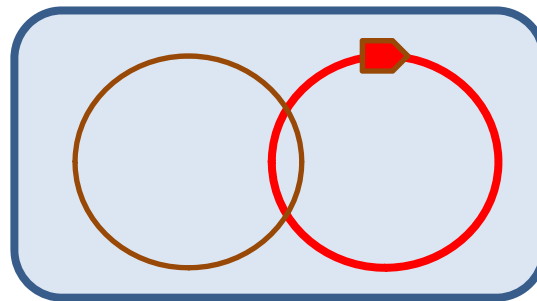


antR

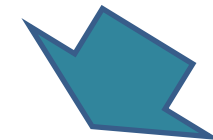
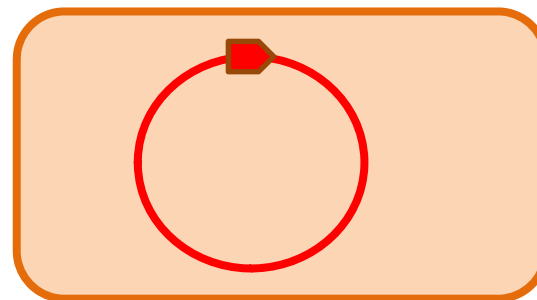


Genoma sintético
Mycoplasma mycoides

Transplante



Mycoplasma mycoides



Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- Las bacterias sintéticas son resistentes a antibióticos y presentan el gen *lacZ*.



Mycoplasma mycoides sintética

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- Análisis proteómico para corroborar la identidad.



Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome

A full list of authors and affiliations appears at the end of the article.

Abstract

Rapid advances in DNA synthesis techniques have made it possible to engineer viruses, biochemical pathways and assemble bacterial genomes. Here, we report the synthesis of a functional 272,871 bp designer eukaryotic chromosome, *synIII*, which is based on the 316,617 bp native *Saccharomyces cerevisiae* chromosome *III*. Changes to *synIII* include TAG/TAA stop-codon replacements, deletion of subtelomeric regions, introns, tRNAs, transposons and silent mating loci as well as insertion of loxPsym sites to enable genome scrambling. *SynIII* is functional in *S. cerevisiae*. Scrambling of the chromosome in a heterozygous diploid reveals a large increase in “a mater” derivatives resulting from loss of the *MATa* allele on *synIII*. The total synthesis of *synIII* represents the first complete design and synthesis of a eukaryotic chromosome, establishing *S. cerevisiae* as the basis for designer eukaryotic genome biology.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- ***Sacharomyces cerevisiae*** tiene un genoma de alrededor de **12 Mb**, distribuido en **16 cromosomas**.
- Se ha descrito que esta levadura posee alrededor de **6000 genes codificantes** de proteínas.
- **5000** de esos genes, se cree que son **individualmente no esenciales**.
- Lo que aún **no se sabe** es **cuántos** de esos genes pueden ser **simultáneamente eliminados** para propender a un **organismo eucariota** con **genoma mínimo**.
- Con vistas a conseguir el **objetivo anterior**, se **evaluó** la posibilidad de **diseñar y sintetizar** un **cromosoma** para **levaduras**.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

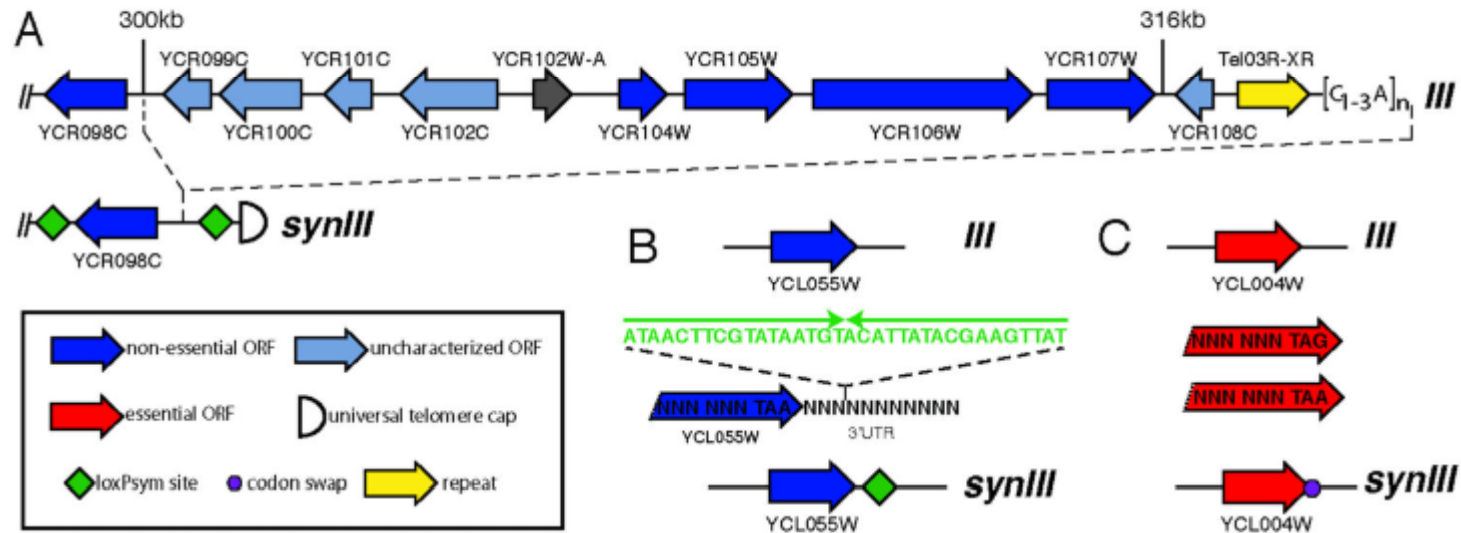


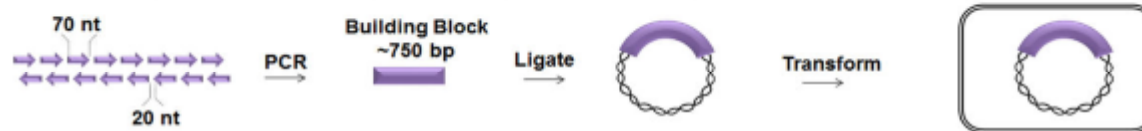
Fig. 1. SynIII design

Representative *synIII* design segments for loxP site insertion (A & B) and stop codon TAG to TAA editing (C) are shown. Green diamonds represent loxP sites embedded in the 3' UTR of non-essential genes and at several other landmarks. Fuchsia circles indicate synthetic stop codons (TAG recoded to TAA). Complete maps of designed *synIII* chromosome with common and systematic ORF names, respectively, are shown in Figures S1 & S2.

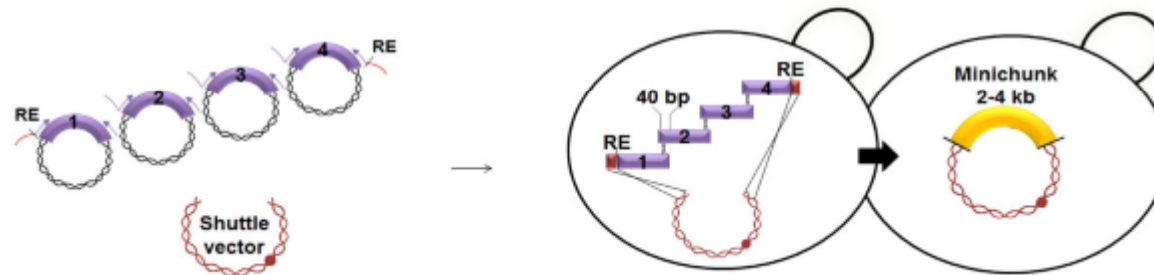
Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

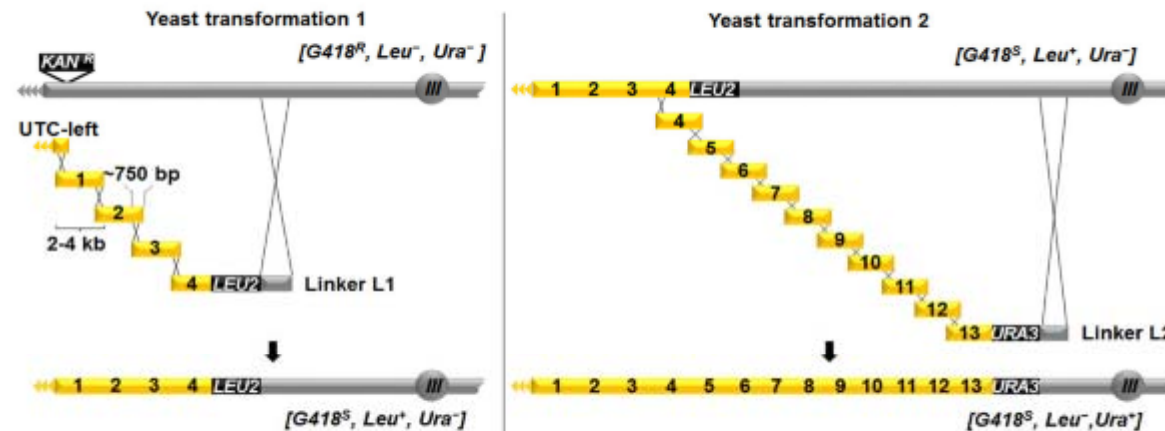
A Step 1: Synthesize Building Blocks (BBs) from oligonucleotides



B Step 2: Assemble 2-4 kb minichunks



C Step 3: Replace native III with minichunks



***¿Qué hay sobre el diseño de
nuevas moléculas informativas
que reemplacen el DNA en biología
sintética?***

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

- Dado que la **síntesis de células** con **genomas de diseño** parece ser un **futuro** relativamente **cercano**, generándose así nueva materia viva, se está **estudiando** la posibilidad de que la **información** se **almacene** en **polímeros diferentes al DNA**.
- De este modo, podría **evitarse** un **flujo horizontal** de información **entre** la **materia viva natural y la sintética**.
- Así es que ha surgido el **campo de investigación** que tiene como **objetivo generar ácidos nucleicos no-naturales** para biología sintética.
- En general, estos ácidos nucleicos se **denominan XNA**, por *xeno-nucleic acid*.

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

Table 1

Enzymatic XNA synthesis, reverse transcription and replication.

XNA	Synthesis (DNA → XNA)	Reverse transcription (XNA → DNA)	Replication (XNA → XNA)	Refs.
αS	TaqM1	TaqM1	TaqM1	[65]
CyDNA ^e	Pfu E10	Pfu E10	Pfu E10	[8]
fDNA	Pwo ^a	Pwo ^a	Pwo ^a	[9,10]
RNA	T7RP/TGK/M1-3	RTs	RdRPs	[38*,85]
2'F ^e	T7RP: Y639F, H784A ^b /TGK	RT521	n.d.	[34]
2'Ome ^e	T7RP: Y639F	Thermoscript TM ^c	n.d.	[36]
2'Seme ^e	T7RP: Y639V, H784G, E593G, V685A	n.d.	n.d.	[33,39]
2'N ₃	TGK	RT521	n.d.	[38*]
ANA	D4K	RT521(K)	n.d.	[90**]
FANA	D4K	RT521(K)	D4K/RT521K	[90**]
HNA	6G12	RT521(K)	RT521K ^f	[90**]
CeNA	6G12/C7	RT521(K)	6G12/RT521K ^f	[90**]
TNA	Therminator TM ^d /RT521	RT521	n.d.	[42,90**]
LNA	C7	RT521K	n.d.	[90**]

Commercially available polymerases: ^a(Roche), ^bDuraScribe[®] (Epicentre), ^c(Life technologies), ^d(New England Biolabs). Only >50 nt incorporations and full substitution considered except ^e(single (CyDNA, SeMe), double (2'F) or nearly full (2'Ome) nucleotide substitution) and ^f(<6 nts).

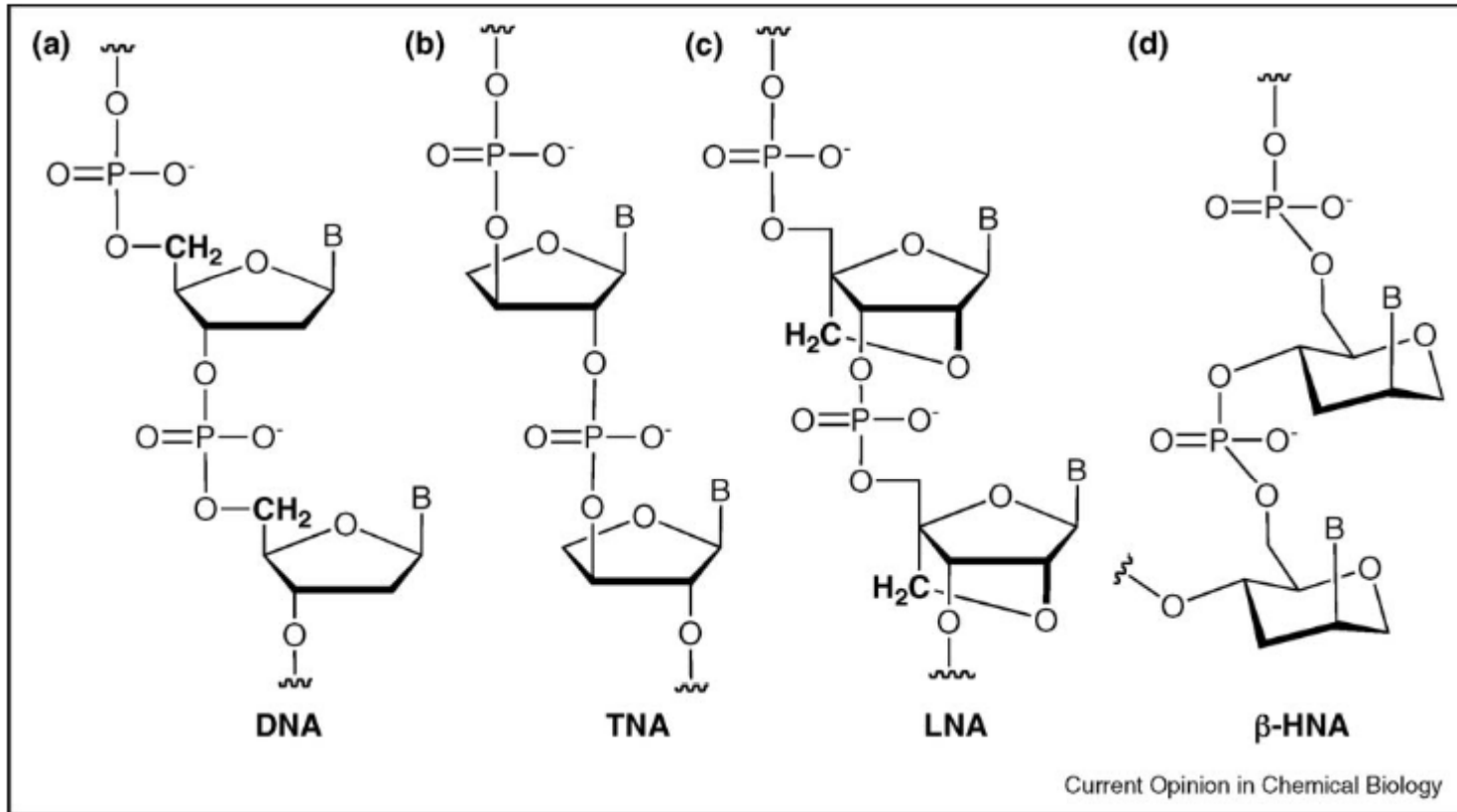
The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers

Vitor B Pinheiro and Philipp Holliger

Current Opinion in Chemical Biology 2012, **16**:245–252

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales



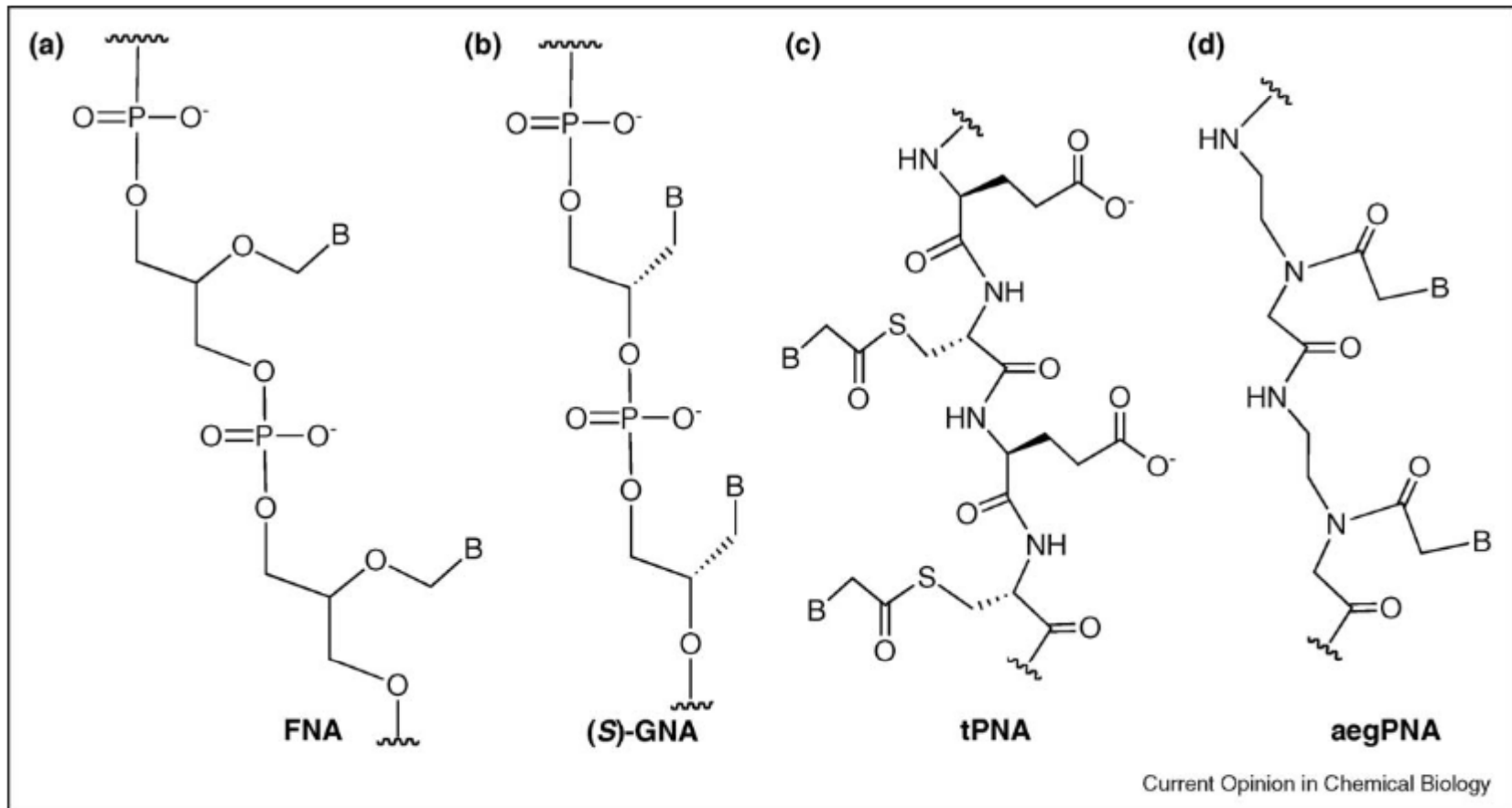
Non-natural nucleic acids for synthetic biology

Daniel H Appella

Current Opinion in Chemical Biology 2009, **13**:687–696

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales



Non-natural nucleic acids for synthetic biology

Daniel H Appella

Current Opinion in Chemical Biology 2009, **13**:687–696

Biología sintética

Construcción de genomas artificiales

A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet

Denis A. Malyshev¹, Kirandeep Dhama¹, Thomas Lavergne¹, Tingjian Chen¹, Nan Dai², Jeremy M. Foster², Ivan R. Corrêa Jr² & Floyd E. Romesberg¹

Organisms are defined by the information encoded in their genomes, and since the origin of life this information has been encoded using a two-base-pair genetic alphabet (A–T and G–C). *In vitro*, the alphabet has been expanded to include several unnatural base pairs (UBPs)^{1–3}. We have developed a class of UBPs formed between nucleotides bearing hydrophobic nucleobases, exemplified by the pair formed between d5SICS and dNaM (d5SICS–dNaM), which is efficiently PCR-amplified⁴ and transcribed^{4,5} *in vitro*, and whose unique mechanism of replication has been characterized^{6,7}. However, expansion of an organism's genetic alphabet presents new and unprecedented challenges: the unnatural nucleoside triphosphates must be available inside the cell; endogenous polymerases must be able to use the unnatural triphosphates to faithfully replicate DNA containing the UBP within the complex cellular milieu; and finally, the UBP must be stable in the presence of pathways that maintain the integrity of DNA. Here we show that an exogenously expressed algal nucleotide triphosphate transporter efficiently imports the triphosphates of both d5SICS and dNaM (d5SICSTP and dNaMTP) into *Escherichia coli*, and that the endogenous replication machinery uses them to accurately replicate a plasmid containing d5SICS–dNaM. Neither the presence of the unnatural triphosphates nor the replication of the UBP introduces a notable growth burden. Lastly, we find that the UBP is not efficiently excised by DNA repair pathways. Thus, the resulting bacterium is the first organism to propagate stably an expanded genetic alphabet.

