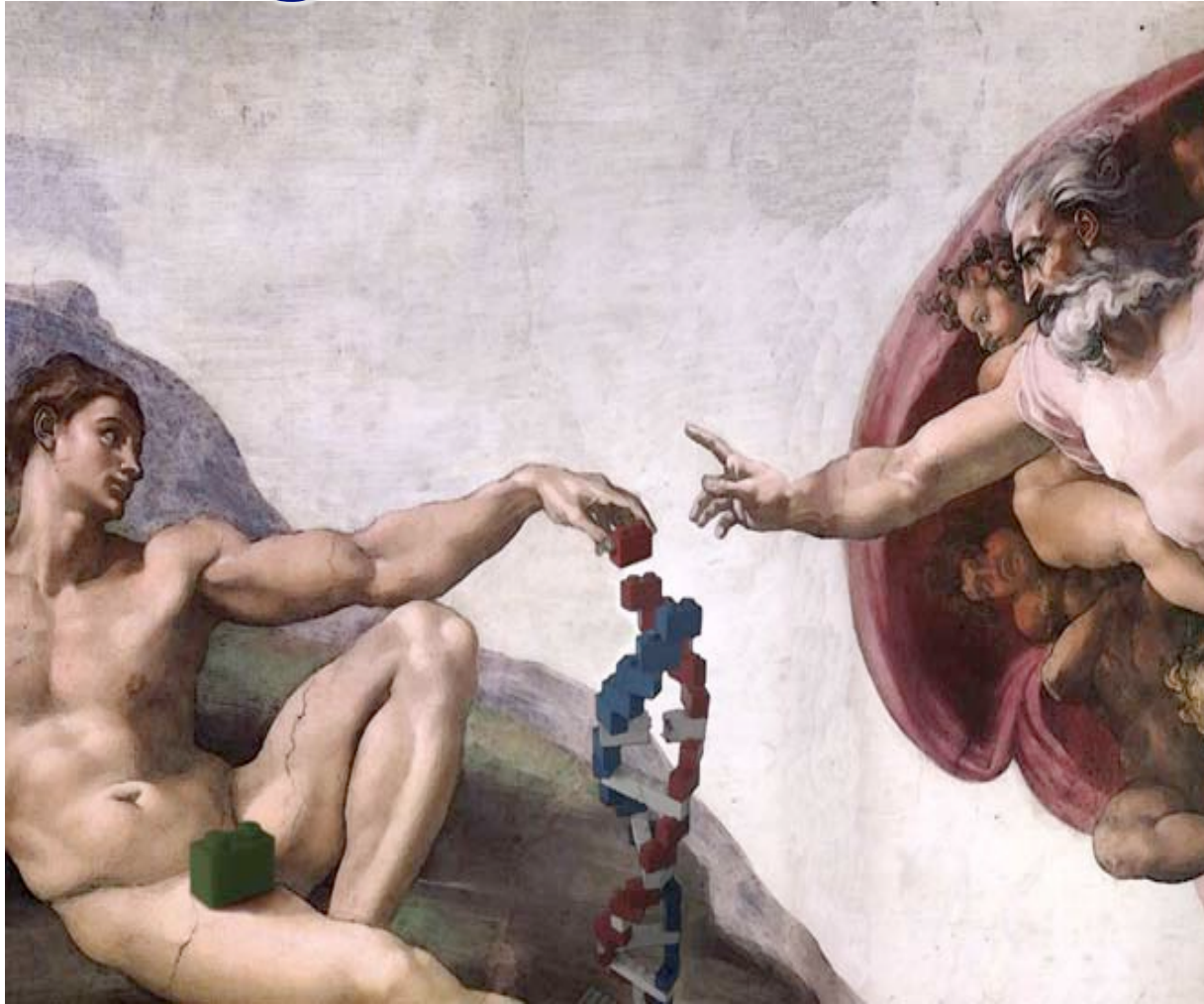


Biología Sintética



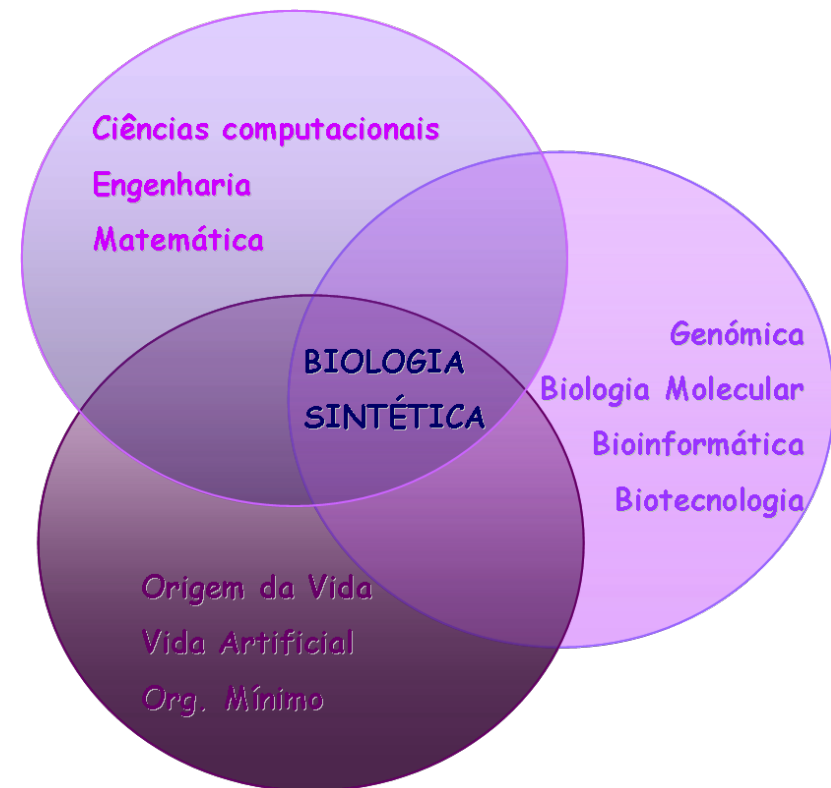
http://www.etcgroup.org/en/materials/publications.html?pub_id=602

Biologia sintética

Concepção e construção novas partes, módulos e circuitos que não existam no mundo natural e tb re-desenhar sistemas biológicos já existentes de modo a que estes desempenhem novas funções

Avanços na Biologia Sintética

- desenvolvimento de nanotecnologias,
- desenvolvimento nas técnicas de manipulação de átomos e moléculas
- estabelecimento de modelos computacionais
- síntese em larga escala de DNA



Últimos anos: síntese e utilização rotineira de oligonucleótidos para PCR (primers) ou como sondas (southern blot) → fragmentos < 200 bp e de cadeia simples

Actualmente: fragmentos 3-4kb e cadeia dupla; algumas empresas prometem até 40 kb (pelo menos 1 fragmento de 35 kb já foi produzido)

Sintetizadores de DNA ~10000 US\$

0.70-0.80 US\$ / base pair

Craig Venter → prod. sinteticamente as 5386 bp do vírus phix174
em 14 dias (alguns erros)

Síntese de DNA → reduz significativamente tempo necessário para produzir GMOs

Utilizando um computador, as seq. nucleotídicas disponíveis e encomendando fragmentos de DNA é teoricamente possível **construir genes** e até **genomas inteiros** → no futuro genomas simples poderão ser rotineiramente sintetizados ou reconfigurados de modo desempenharem **funções específicas**



Potenciais aplicações: prod. de energia, bio-remediação, indústria farmacêutica, agricultura etc.

Possibilidade de “ler” o código genético



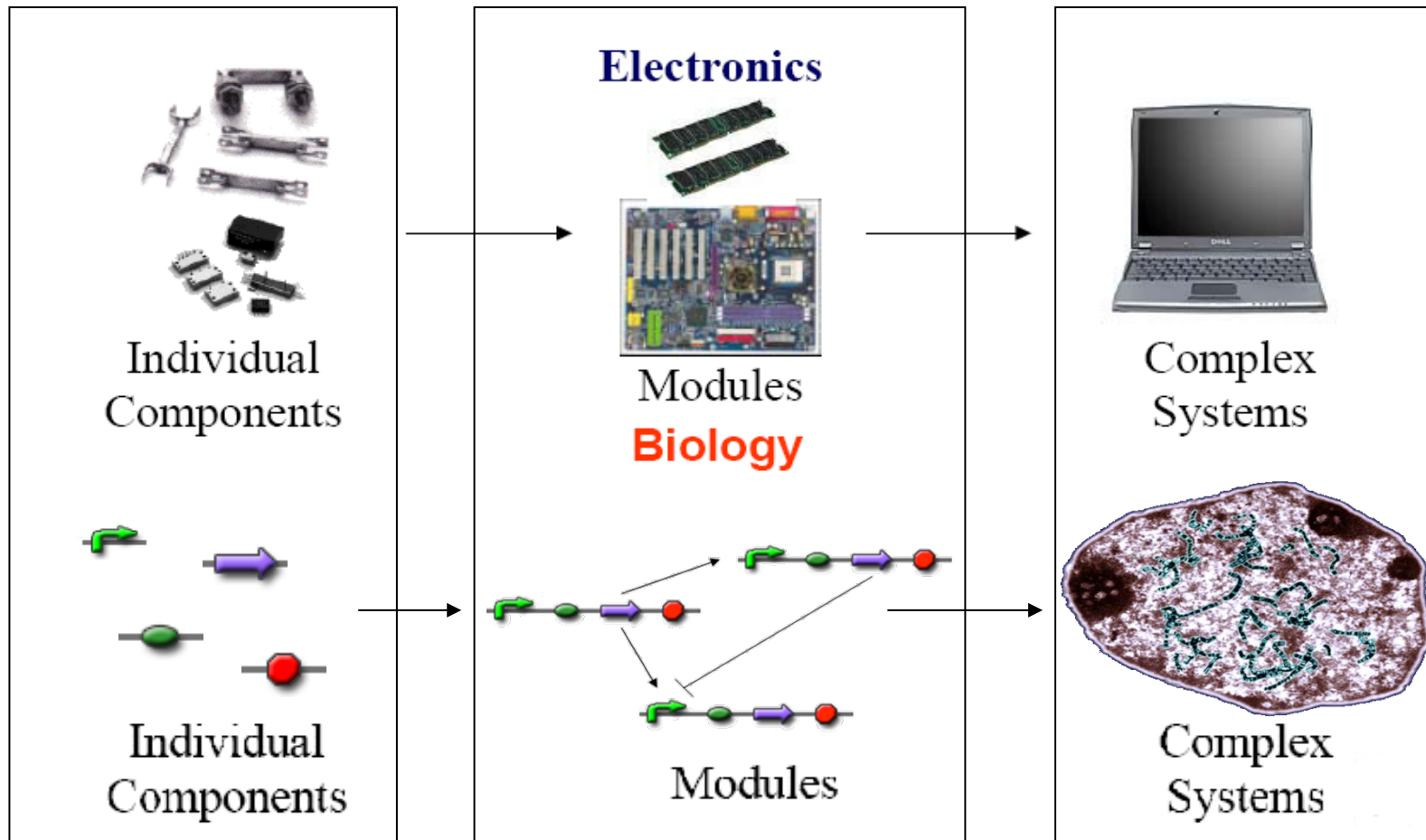
Possibilidade de “escrever” o código genético

(uma letra de cada vez)

Vida artificial

Problemas éticos → quase tantos como as potenciais aplicações; não há regulamentação específica

Partes padronizadas → módulos → circuitos → introduzidos num *chassis* → sistema complexo



Biologia sintética trabalha abaixo do nível do gene, ao nível do codão, identificando e modificando codões de modo a construir novos conjuntos de informação



64 codões (4^3) mas só 20 aminoácidos → possível escolher vários codões qd se quer exprimir um determinado aa (**optimização do codão**)

Ex. um det. codão pode funcionar melhor em bactérias e outro em plantas, embora ambas produzam o mm aa

Código genético não é tão linear como o código de um computador → genes actuam em **rede** produzindo proteínas que promovem ou suprimem a expressão de outros produtos génicos (sist. de regulação que controla a quantidade e/ou altura em que det. subst. é produzida)

Rede de regulação pode ser representada de modo ~ aos diagramas de circuitos electrónicos (em x de via metabólica temos **via genética**)

Para alterar uma via genética é nec. re-desenhar e alterar várias áreas diferentes e dp colocá-las num cromossoma sintético

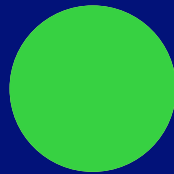
Partes padronizadas (*bio-legos*)



ex. promotor



ex. sensor



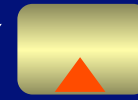
ex. Condições fisiológicas
níveis de nutrientes, etc.



ex. gene modificado



mRNA



proteína com local activo
modificado

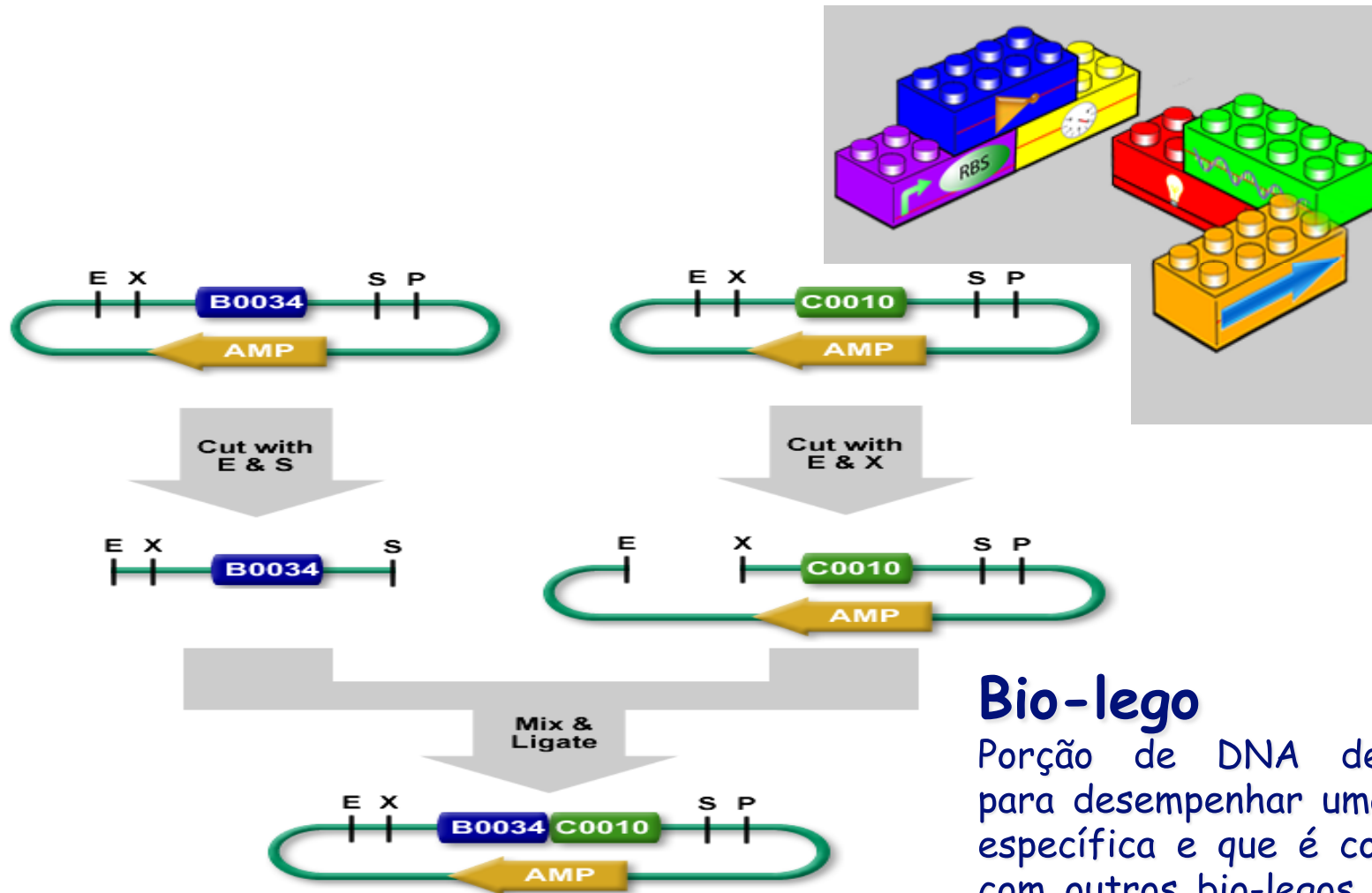
ou



proteína com 2
domínios catalíticos

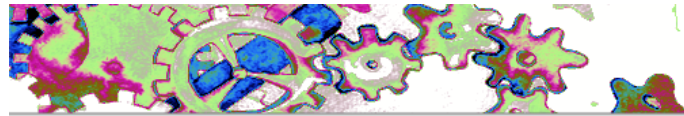
Outras: rbs, terminadores etc

BioBrick™ parts assembly



Bio-lego

Porção de DNA desenhada para desempenhar uma função específica e que é compatível com outros bio-legos de modo a poderem construir-se módulos e circuitos que dp serão integrados num *chassis*



Registry of Standard Biological Parts

<http://partsregistry.org/>

The screenshot displays three overlapping browser windows from the MIT Registry of Standard Biological Parts website. The top window shows the 'Main Page - Registry - Opera' with a search bar and navigation links. The middle window shows the 'Part Types - Registry - Opera' page. The bottom window shows the 'Part:BBa_I13207 - Registry - Opera' page, which includes a 'Catalog' sidebar, a 'jump to part' search bar, and a detailed view of the 'HSL/aiiA test construct'. The construct details include its length (4142 bp), a sequence diagram, and a list of subparts (tetR, luxR, luxP, EYFP, pBad/araC, aiiA, and B0010, B0012).

Part:BBa_I13207
Designed by Barry Canton

HSL/aiiA test construct
LuxR receiver circuit (driven by tet) with pBad controlling the expression of aiiA.
Useful for measuring the ability of aiiA (LVA+) to turn off the response of a tet driven receiver cell to exogenous HSL levels

Sequence and Features

Format	Subparts	Search	Length: 4142 bp	Context: Part only	Get selected sequence													
tetR	R0040	B0034	C0062	B0010	B0012	luxP	R0062	B0034	EYFP	E0030	B0010	B0012	pBad/araC	I0500	B0034	C0060	B0010	B0012

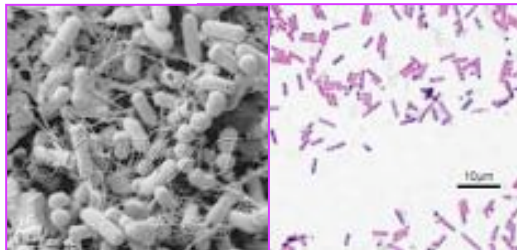
MIT - base de dados e repositório de partes biológicas padronizadas, de modo a que possam ser utilizadas por outros e montadas para gerar sistemas genéticos mais complexos (módulos e circuitos)

Chassis

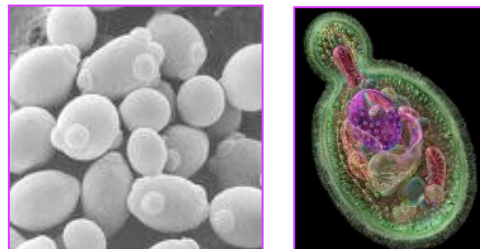
"The candidates for chassis should be well studied organisms with high throughput genomic and proteomic data available, minimalist in terms of the subset of genes that will allow retaining viability, and easy to engineer with the available molecular tools, becoming a versatile platform for multiple purpose applications"



Escherichia coli



Bacillus subtilis



Levedura (eucarionte)

Project acronym: BioModularH₂

Project full title: Engineered Modular Bacterial Photoproduction of Hydrogen

Proposal/Contract no.: 043340 Jan.07- July 2010



FP6-2005-NEST-PATH
Contract no.: 043340

Members of the consortium:

Instituto de Biologia Molecular e Celular (Portugal)

École Polytechnique (France)

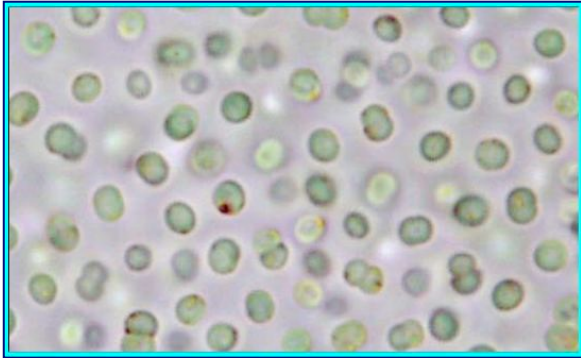
Universidad Politécnica de Valencia (Spain)

Uppsala Universitet (Sweden)

University of Sheffield (UK)

Weizmann Institute of Science (Israel)

Chassis fotoautotrófico



Synechocystis sp. PCC 6803

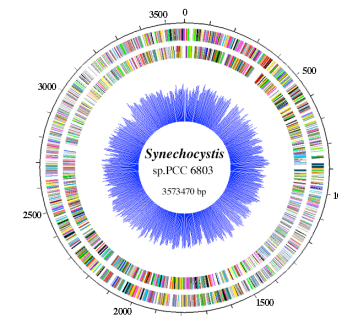
- cianobactéria unicelular não-fixadora de N_2
- genoma de tamanho reduzido
- naturalmente transformável
- bem estudada (1º genoma de cianobactérias a ser totalmente sequenciado)
- várias **ferramentas moleculares disponíveis**

Synechocystis sp PCC 6803 Chromosome 1

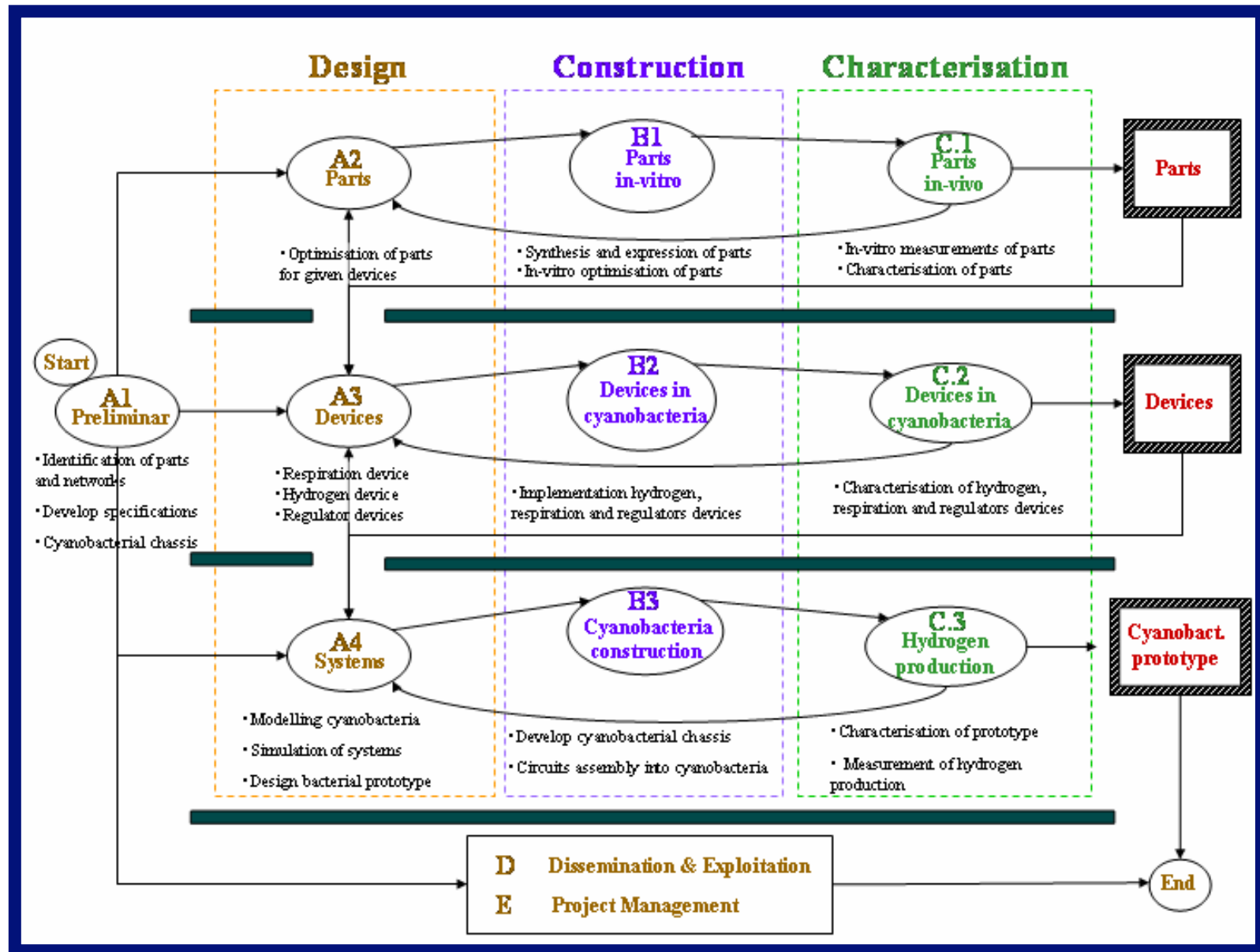
GC Content: 47

Phenotype: [Photosynthetic](#), [Ocean carbon cycle](#), [Motile](#),
[Photoautotroph](#), [Facultative](#)

Size 3573 Kb, 3168 orfs



Biomodular H₂

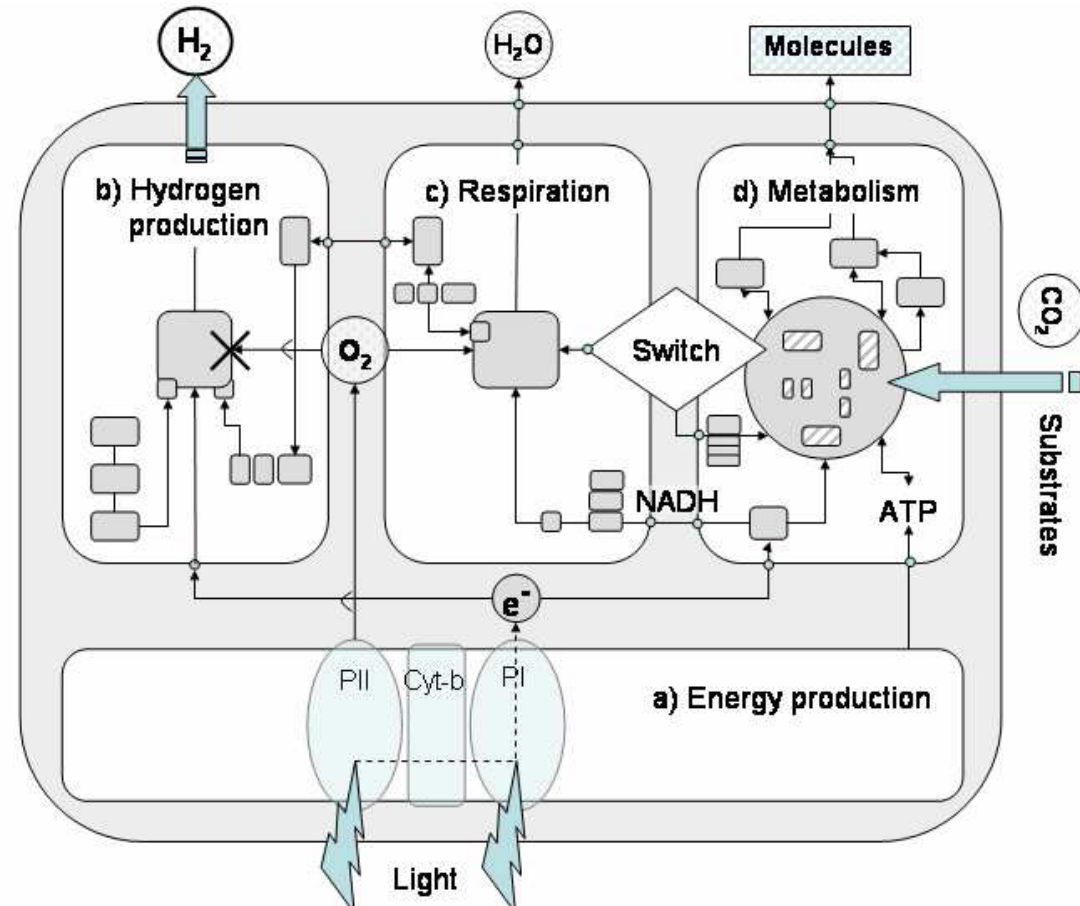


Análise *in silico*
Concepção computacional de partes
Concepção computacional de módulos

Síntese de partes
Montagem dos módulos
Preparação do *chassis*

Caracterização de partes e módulos
Incorporação no *chassis*
Avaliação do produto final

Objetivo final



***Chassis* cianobacteriano que conjuntamente com os módulos e circuitos introduzidos utilize eficazmente a energia solar para a produção de hidrogénio**

Partes e módulos → disponíveis para outras aplicações biotecnológicas

Junho 2004 → World 1st Synthetic Biology Conference

2 meses dp → 1º Dept. Biologia Sintética → Universidade da Califórnia

Principais áreas de investigação em Biologia Sintética:

- *genomas mínimos*
- *bio-legos*
- *células artificiais*
- *modificação das vias genéticas / metabólicas*
- *expansão do código genético*

Genomas mínimos:



Craig Venter: 1995 → seq. genoma de *Haemophilus influenzae*
2003 → 1º vírus sintético
genoma humano (CELERA)

TIGR (The Institute for Genomic Research) → projecto do genoma mínimo



número de genes necessários
para que um organismo sobreviva
em determinadas condições

Organismo modelo → bactéria *Mycoplasma genitalium* (causa inf. urinárias)
517 genes (580.000 bp)
inactivaram os genes 1 a 1 e concluíram que podia sobreviver
com cerca de metade dos genes

C. Venter → versão sintética do *M. genitalium* (*M. laboratorium*) para servir de chassis
para a produção de etanol ou H₂

B. subtilis → 217 genes dos 4100 podem ser inactivados

E. coli → estudo em curso

Scienceexpress

Research Article

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*}

Celula bacteriana controlada por um cromossoma sintético

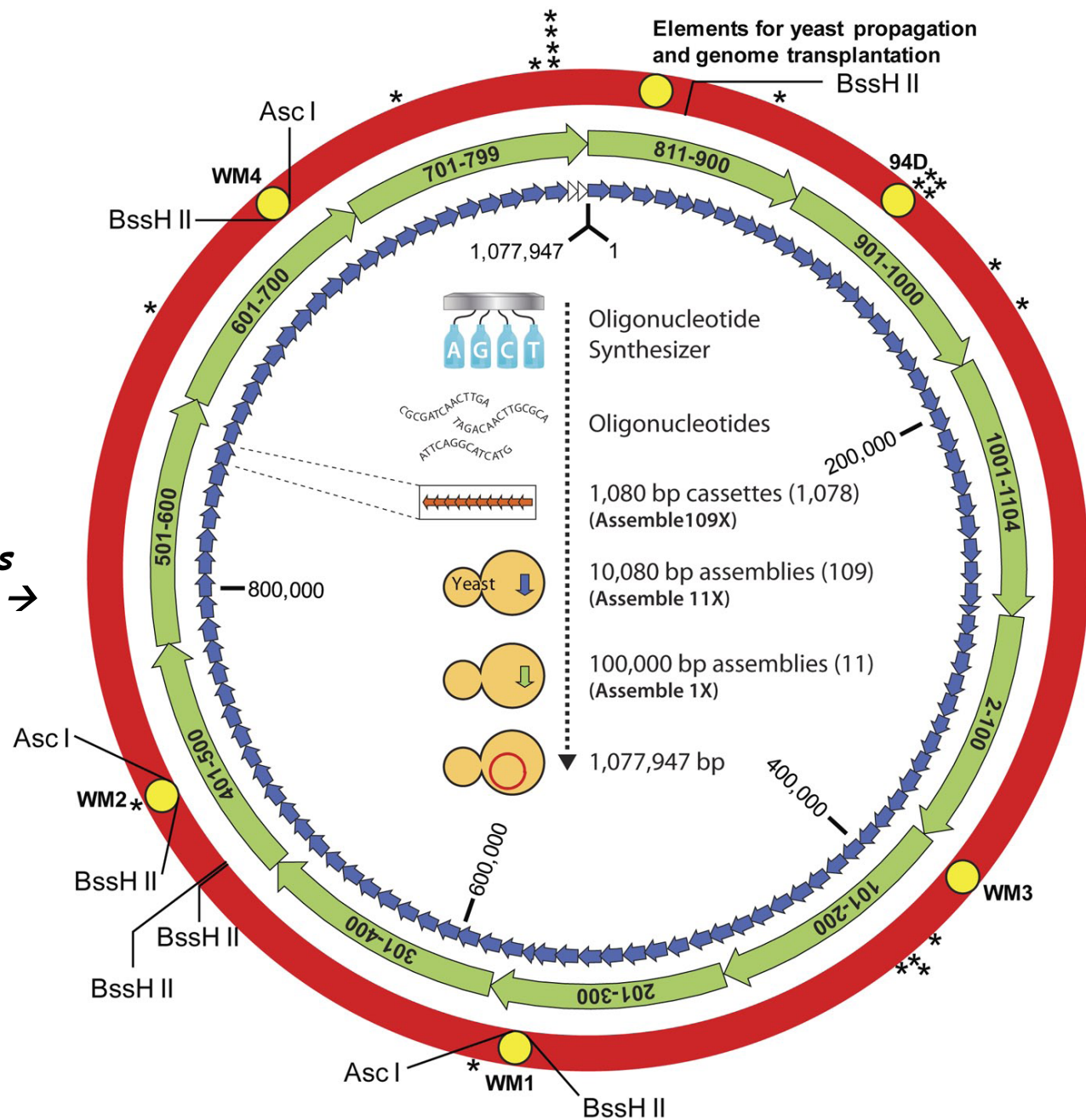
Síntese e montagem de um
genoma de 1 Mbp baseado em
Mycoplasma mycoides



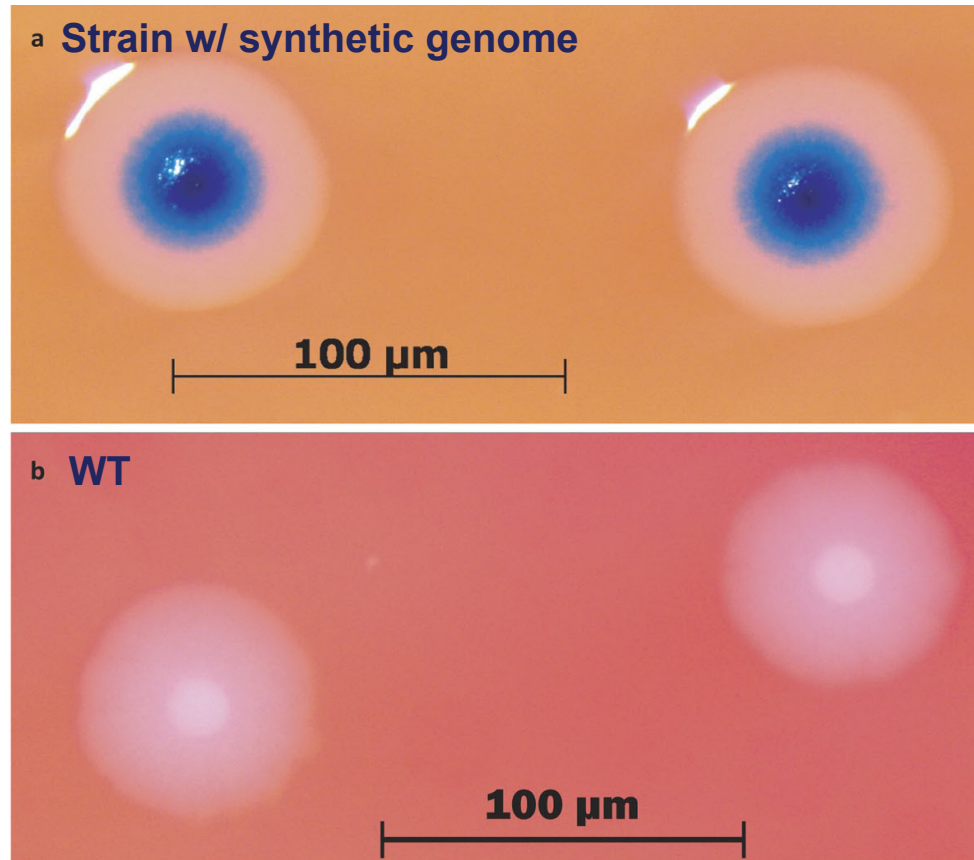
Cromossoma sintético (porções
1000 bp → 10.000 bp (10kb) →
100 kb → 1Mbp)



Inserido numa célula de *M.*
capricolum ao qual foi
retirado o DNA



Nova bactéria controlada
pelo cromossoma sintético
funciona e reproduz-se
(várias “marcas de água”)

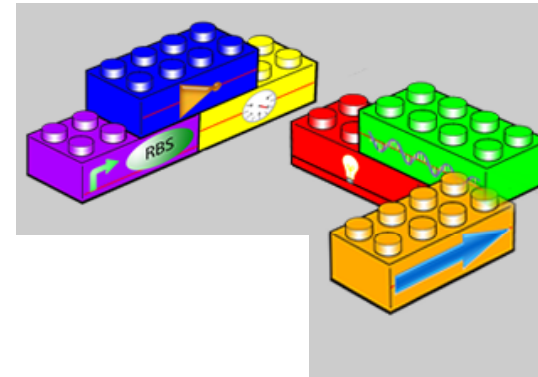


Bio-legos:

Drew Endy: Um organismo vivo é como um computador ou uma máquina composta por circuitos genéticos, nos quais o DNA é o *software* que pode ser "pirateado" (*hacked*).

Código genético é "confuso" e "redundante" → podem ser construídos sistemas biológicos mais simples a partir de peças (partes) que estão bem descritas e caracterizadas (cujo comportamento é previsível)

Tom Knight → BioBricks™ (partes padronizadas)



International Genetically Engineered Machine Competition

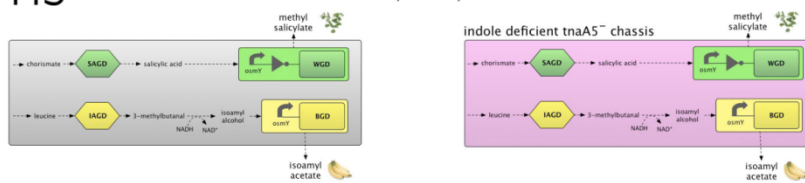
Várias equipas de alunos de todo o mundo competem para criar "*the coolest artificial life-form out BioBricks*"

eau d'e coli | mit igem 2006

Kate Broadbent, Andre Green,
Stephen Payne, Veena Venkatachalam,
Boyuan Zhu, Barry Canton, Austin Che,
Drew Endy, Jason Kelly, Tom Knight,
Reshma Shetty, Samantha Sutton

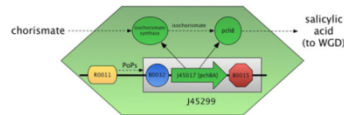
systems

the complete system



the devices

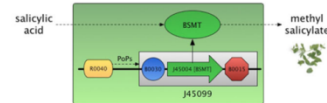
J45300 – Salicylic Acid Generating Device (SAGD):



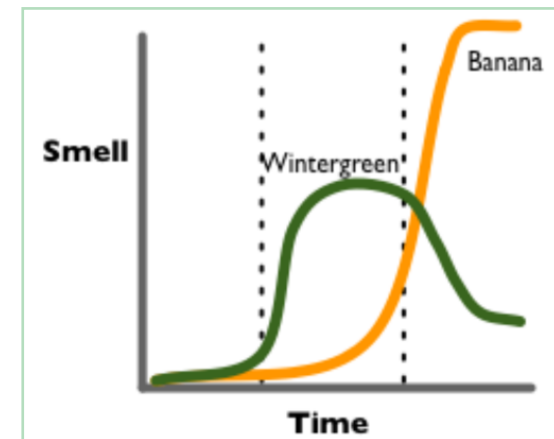
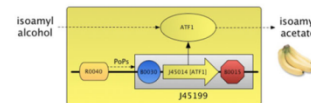
J45400 – Isoamyl Alcohol Generating Device (IAGD):



J45100 – Wintergreen Generating Device (WGD):



J45200 – Banana Generating Device (BGD):



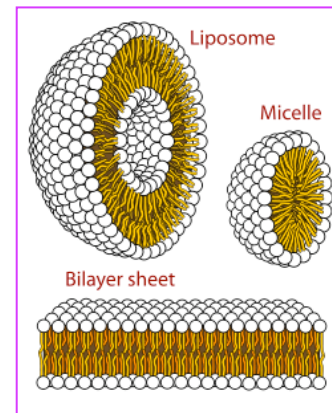
Outros ex. criar mecanismo suicida → cel q se divida + do q 200x → morte
(impedir a formação de tumores)

Células artificiais:

Steen Rasmussen → **Protocell**

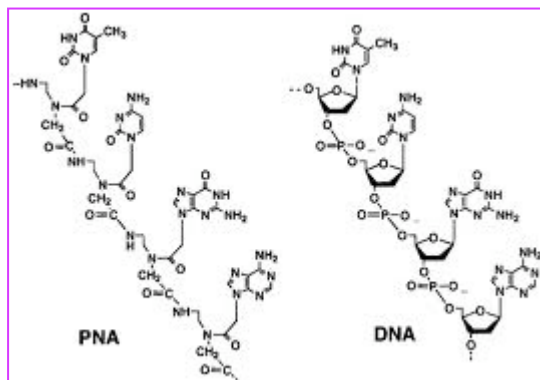
Requisitos da Protocell: metabolismo que capte e gere energia
molécula ~ ao DNA que armazene informação
membrana que delimite a célula

Membrana artificial → monocamada de lípidos



PNA (Peptide Nucleic Acid) em vez de DNA

PNA as mesmas bases que o DNA mas a estrutura é peptídica (mais seguro em termos de risco biológico)



Peter E. Nielsen (Univ. Copenhagen), Michael Egholm (Univ. Copenhagen), Rolf H. Berg (Risø National Lab) and Ole Buchardt (Univ. Copenhagen) in 1991 (*Science*, vol. 254 p 1497).

Extractos celulares substituídos por *PureSystems*:

- 36 enzimas
- ribossomas
- tRNAs
- co-factores

Components in PURESYSYSTEM

His-Tagged Transcription /Translation Factors

T7 RNA Polymerase

Initiation Factors (IF1 , IF2 , IF3)

Elongation Factors (EF-Tu , EF-Ts , EF-G)

Release Factors (RF1 , RF2 , RF3)

Ribosome Recycling Factor

20 Aminoacyl tRNA synthetases

Methionyl tRNA transformylase

E. coli Ribosome

E. coli tRNA

Energy Regeneration System

NTPs , Amino Acids , Salts , Buffer

Modificação das vias genéticas:

Jay Keasling → Modificação das vias genéticas/metabólicas de modo a produzir compostos de interesse comercial

isoprenóides - compostos de origem vegetal que devido à sua complexidade não são possíveis/rentáveis a síntese química e que quando directamente isolados das plantas são obtidos em quantidades diminutas.

equipa de Keasling particularmente interessada na **artemisinina** → potente droga anti-malária



Jay Keasling heads Berkeley Lab's new Synthetic Biology Department, the first of its kind in the world. In a preview of things to come, he and his research team are using genetic engineering techniques to create microbes that can mass-produce artemisin, which is rare in nature.

<http://www.lbl.gov/Science-Articles/Archive/sb-PBD-anti-malarial.html>

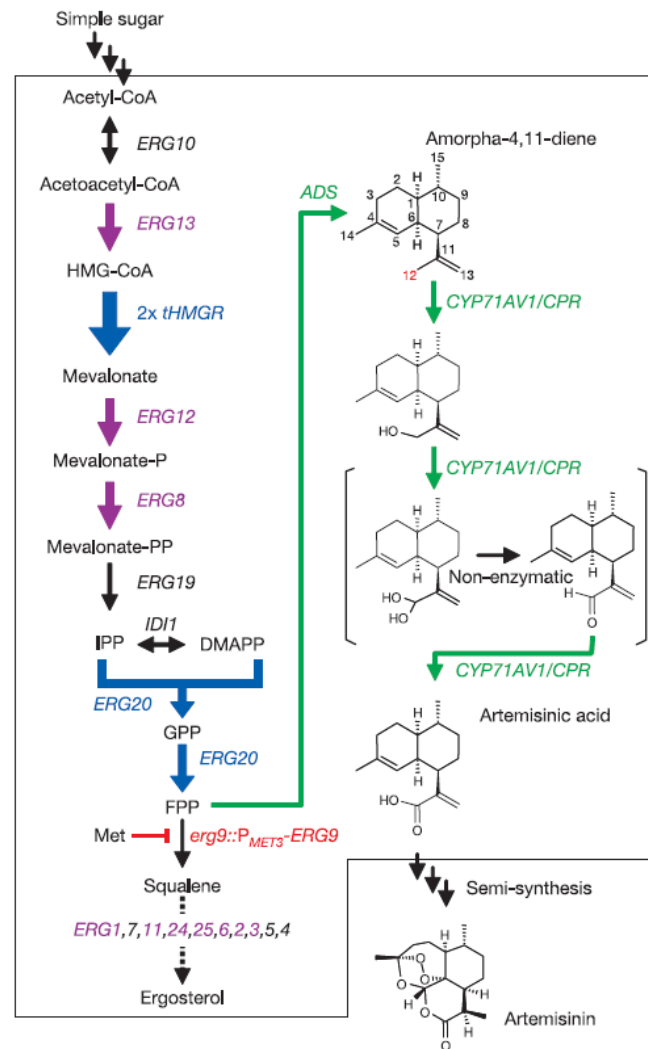


Figure 1 | Schematic representation of the engineered artemisinin acid biosynthetic pathway in *S. cerevisiae* strain EPY224 expressing *CYP71AV1* and *CPR*. Genes from the mevalonate pathway in *S. cerevisiae* that are directly upregulated are shown in blue; those that are indirectly upregulated by *upc2-1* expression are in purple; and the red line denotes repression of *ERG9* in strain EPY224. The pathway intermediates IPP, DMAPP and GPP are defined as isopentenyl pyrophosphate, dimethyl allyl pyrophosphate and geranyl pyrophosphate, respectively. Green arrows indicate the biochemical pathway leading from farnesyl pyrophosphate (FPP) to artemisinic acid, which was introduced into *S. cerevisiae* from *A. annua*. The three oxidation steps converting amorphaadiene to artemisinic acid by *CYP71AV1* and *CPR* are shown.

A equipa de Keasling sintetizou vários genes que em conjunto com outros já existentes na levedura (*chassis*) vão originar uma nova via para a produção de ácido artimisinico → artemisinina

•Ro, D.-K., Paradise, E. M. *et al.* (2006), Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940-943.

Expansão do código genético (*alien genetics*):

Steven Benner → Modelos de como a vida poderá funcionar utilizando sistemas genéticos não naturais

Moléculas diferentes, mas que como o DNA reproduzem e transmitem a informação genética.

Ex. DNA com 2 bases nucleotídicas artificiais

Conseguiu criar molécula com "6 letras" e dp desenvolveu uma polimerase capaz de a copiar → esta molécula poderá eventualmente suportar a vida noutros planetas

"DNA expandido" menos risco que o DNA normal

Tb já foi possível codificar aminoácidos a partir conj. de 4 nucleótidos (em x de tripletos) → nº de codões passa de 64 → 256

Canton, B. *et al.* (2008). Refinement and standardization of Synthetic biological parts and devices. *Nature Biotechnology*, 26: 787-793

Deplazes, A. (2009). Piecing together a puzzle. *EMBO Reports*, 10: 428-432.

Serrano, L. (2007). Synthetic Biology: promises and challenges. *Molecular Systems Biology*, 3: 158.

Tucker, J. B. & Zilinskas, R. A. (2006). *The promise and perils of synthetic biology*. *The New Atlantis - A Journal of Technology and Society*, 12: 25-45.

Special report: *Synthetic biology* (2006). *The Economist*, Sept. 2nd, 2006.

BioEssays 4 (April 2010). Special issue: Synthetic Biology.
www.bioessays-journal.com

<http://partsregistry.org>

<http://bbf.openwetware.org/>

http://www.etcgroup.org/en/materials/publications.html?pub_id=602

<http://www.thenewatlantis.com/docLib/TNA12-TuckerZilinskas.pdf>

<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=39&id=474>

<http://www.youtube.com/watch?v=XIuh7KDRzLk>

