



Elaborado por:
Dr. Fernando Guzman Chavez
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)

Fundamentos de edición genética por CRISPR/Cas9 mediante el uso de la tecnología de Cell-Free

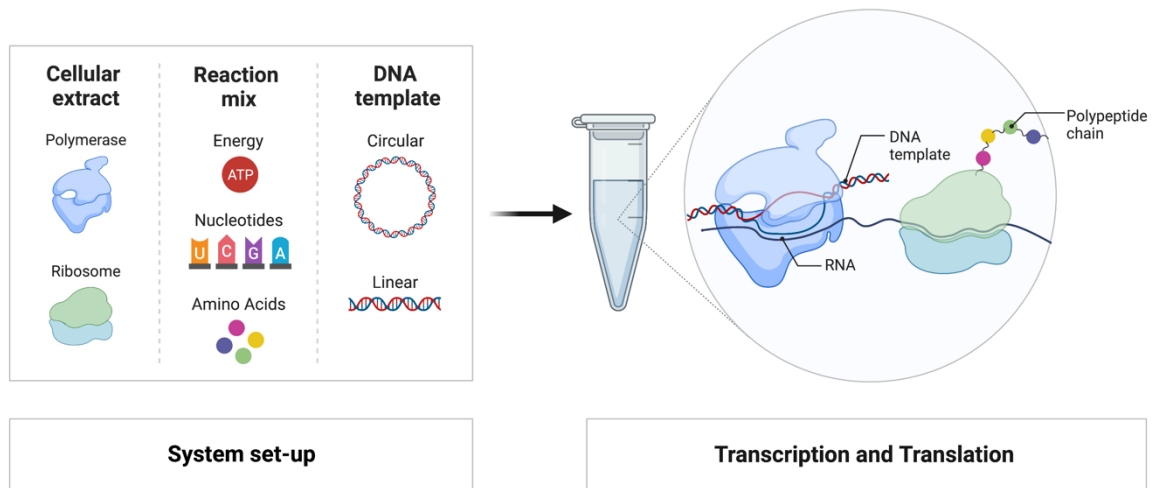
Introducción

La **Biología Sintética** (SynBio) es un campo de investigación que aplica los principios básicos de la ingeniería en el (re)diseño efectivo de organismos vivos y sistemas de tipo biológico a fin de generar un conjunto de resultados deseados dando nuevas soluciones a los problemas globales de salud, agricultura, cambio climático y manufactura de productos de alto valor, lo que ha ampliado las fronteras de las ciencias bioquímicas, biotecnológicas y biomédicas a largo de ya dos décadas de exitosos resultados, (Hanczyc, 2020; Gallup et al., 2021). Esto ha logrado posicionar a la SynBio como el eje principal en la innovación dentro de la bioeconomía aumentando su dimensión comercial, desde la ingeniería de organismos como alternativas verdes a procesos industriales convencionales o simplemente mediante la producción de reactivos de alto valor utilizados en la investigación científica, la academia y la industria (El Karoui, et al., 2019). Dicho éxito se debe principalmente a que desde sus orígenes la biología sintética ha tenido como base la estandarización de partes biológicas con el fin de i) reusarlas y ii) ensamblar fácilmente nuevas moléculas de ADN, permitiendo la ingeniería de modelos biológicos bajo los principios de **Diseñar-Construir-Probar-Aprender**.

El inicio de la tercera década de la biología sintética (2021-2030), trae consigo nuevos retos que deberán ser abordados con los avances previamente desarrollados en la ingeniería de cepas automatizada, el descubrimiento metagenómico, la ingeniería metabólica, la evolución dirigida (Premio Nobel de 2018), el diseño de circuitos genéticos y la edición del genoma (Premio Nobel de 2020), con el fin de desarrollar nuevas plataformas biológicas sintéticas para escenarios fuera del laboratorio con un enfoque en tres principales espacios de aplicación: bioproducción, biodetección y suministro de reactivos (Brooks & Alper, 2021). En este sentido los sistemas libres de células (**cell-free systems; CFS**) han evolucionado como plataformas claves para aplicaciones de biología sintética. Originalmente, los sistemas libres de células fueron concebidos como herramientas para la síntesis *in vitro* de proteínas utilizando la maquinaria molecular extraída de lisados celulares (ribosomas y factores de transcripción auxiliares). Además de la maquinaria de transcripción-traducción, los CFS requieren de un adecuado suministro de elementos claves, tales como aminoácidos, sales, agentes de hacinamiento, nucleótidos trifosfato (NTPs), un ambiente homeostático y un sistema de regeneración de ATP (Guzman-Chavez et al., 2022).

Debido a la naturaleza abierta de los CFS, esta tecnología es sujeta de modificaciones para su programación *ac hoc*, lo que permite, por ejemplo, la adición de moléculas o proteínas que mejoran el rendimiento en circuitos genéticos o la producción de la proteína de interés. Asimismo, la adición estequiométrica directa del ADN codificante (en forma de plásmido o ADN lineal) de la proteína blanco a los a las reacciones de CFS, hace posible el diseño conceptual *in silico* del flujo de trabajo desde la síntesis y amplificación química (PCR) de la molécula de ADN de interés hasta la reacción CF sin necesidad de marcadores selectivos o pasos de clonación que involucren células. Tal simplicidad permite la creación rápida de prototipos de herramientas moleculares y rompe las limitaciones de la biología sintética basada en células completas, tales como problemas de bioseguridad asociadas a células modificadas, la toxicidad de las proteínas de interés en el hospedero elegido, el entrecruzamiento de señales entre el metabolismo del huésped y el producto deseado, su almacenamiento y distribución en cadena fría, entre otros (Tinagar et al., 2019).

TXTL: A Cell-Free Transcription/Translation System



En los últimos años los sistemas libres de células han ganado particular atención como plataformas abiertas que facilitan el estudio de circuitos genéticos, la cristalización de proteínas, el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido, la aceleración del descubrimiento de nuevos productos naturales e incluso como herramientas modernas para la enseñanza (e. g. entender cómo funciona la tecnología de edición genética CRISPR/Cas9) y para la conquista espacial, por citar algunas de sus aplicaciones (Stark, et al, 2019; Moore et al., 2021).

Referencias

Brooks SM, Alper HS. Applications, challenges, and needs for employing synthetic biology beyond the lab. *Nat Commun.* 2021 Mar 2;12(1):1390. doi: 10.1038/s41467-021-21740-0. PMID: 33654085; PMCID: PMC7925609.

El Karoui M, Hoyos-Flight M, Fletcher L. Future Trends in Synthetic Biology-A Report. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Aug 7;7:175. doi: 10.3389/fbioe.2019.00175. PMID: 31448268; PMCID: PMC6692427

Gallup, O., Ming, H., Ellis, T.: Ten future challenges for synthetic biology. *Eng. Biol.* 2021. 5(3), 51– 59 . <https://doi.org/10.1049/enb2.12011>

Guzman-Chavez F, Arce A, Adhikari A, Vadhin S, Pedroza-Garcia JA, Gandini C, Ajioka JW, Molloy J, Sanchez-Nieto S, Varner JD, Federici F, Haseloff J. Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access. *ACS Synth Biol.* 2022 Mar 18;11(3):1114-1128. doi: 10.1021/acssynbio.1c00342. Epub 2022 Mar 8. PMID: 35259873; PMCID: PMC9098194.

Hanczyc MM. Engineering Life: A Review of Synthetic Biology. *Artif Life.* 2020 Spring;26(2):260-273. doi: 10.1162/artl_a_00318. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32271630.

Moore SJ, Lai HE, Chee SM, Toh M, Coode S, Chengan K, Capel P, Corre C, de Los Santos EL, Freemont PS. A *Streptomyces venezuelae* Cell-Free Toolkit for Synthetic Biology. *ACS Synth Biol.* 2021 Feb 19;10(2):402-411. doi: 10.1021/acssynbio.0c00581. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33497199; PMCID: PMC7901020.

Stark JC, Huang A, Hsu KJ, Dubner RS, Forbrook J, Marshalla S, Rodriguez F, Washington M, Rybnicky GA, Nguyen PQ, Hasselbacher B, Jabri R, Kamran R, Koralewski V, Wightkin W, Martinez T, Jewett MC. BioBits Health: Classroom Activities

Exploring Engineering, Biology, and Human Health with Fluorescent Readouts. *ACS Synth Biol.* 2019 May 17;8(5):1001-1009. doi: 10.1021/acssynbio.8b00381. Epub 2019 May 7. PMID: 30925042.

Tinafar A, Jaenes K, Pardee K. Synthetic Biology Goes Cell-Free. *BMC Biol.* 2019 Aug 8;17(1):64. doi: 10.1186/s12915-019-0685-x. PMID: 31395057; PMCID: PMC6688370