

Trabajo de Fin de Grado

Biología Sintética en Cianobacterias

M^a Julia Barrau Párraga

Junio 2022



Facultad de Biología

Dpto. de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

Universidad de Sevilla



ÍNDICE

Resumen.....	pág. 1
Introducción.....	pág. 2
Objetivos.....	pág. 4
Materiales y métodos.....	pág. 4
Resultados.....	pág. 5
Breve historia de la biología sintética.....	pág. 5
Las cianobacterias.....	pág. 8
Historia.....	pág. 8
Biodiversidad y ecología.....	pág. 9
Bioquímica y fisiología	pág. 9
Las cianobacterias como chasis microbianos.....	pág. 10
Herramientas en biología sintética de cianobacterias.....	pág. 11
Plásmidos.....	pág. 11
Partes genéticas/biológicas.....	pág. 13
Promotores.....	pág. 14
RBS.....	pág. 16
Terminadores.....	pág. 17
Reporteros.....	pág. 17
Marcadores de resistencia.....	pág. 18
Riboswitches.....	pág. 19
CRISPR.....	pág. 21
CRISPR-Cas9 y Cas12a.....	pág. 21
CRISPRi.....	pág. 22
Aplicaciones de la biología sintética en cianobacterias.....	pág. 23
Conclusiones.....	pág. 24
Bibliografía.....	pág. 26

RESUMEN

Las cianobacterias, presentan características con gran potencial que las convierten en nuevos organismos modelo para la industria biotecnológica, así como para la investigación y el desarrollo de alternativas más rentables y sostenibles que las que se han usado hasta la fecha.

En este trabajo se ha hecho una revisión bibliográfica de la biología sintética en cianobacterias que muestra un gran avance en poco tiempo. Sin embargo, todavía es necesario un mayor esfuerzo para esclarecer muchos aspectos que permitan su uso de manera óptima.

Para la redacción de este trabajo se han seleccionado las herramientas más comunes utilizadas atendiendo a los principios que definen a la biología sintética, como la estandarización o la modularidad. Entre ellas, se describen los plásmidos modulares, la caja de partes genéticas, como los promotores o los *riboswitches* y la tecnología CRISPR. Se discuten pros y contras entre los métodos utilizados, así como diferentes resultados entre las distintas cepas, siendo unas más idóneas que otras dependiendo de la finalidad en cada caso.

ABSTRACT

Cyanobacteria show features indicating their great potential as new model organisms for the biotechnology industry, as well as for the research and development of more profitable and sustainable alternatives than those used to date.

This work is a bibliographic review of synthetic biology in cyanobacteria, which shows a great advance in a short time. However, a greater effort is still needed to clarify many aspects that allow their optimal use.

For the writing, the most common tools used have been selected that follow the principles that define synthetic biology, such as standardization or modularity. Among them, modular plasmids, the box of genetic parts, such as promoters, riboswitches or CRISPR technology are described. Pros and cons of their use are discussed, as well as variability of results between different strains, some being more suitable than others depending on the purpose in each case.

INTRODUCCIÓN

El término biología sintética da nombre a una disciplina emergente de la Biología en plena expansión. Podría definirse como “vida artificial”, una definición bastante sencilla sobre la que no hay consenso en la actualidad. Sin embargo, sí podemos atribuir a esta disciplina su vocación hacia el diseño de sistemas biológicos que no se encuentran en la naturaleza y una serie de rasgos determinados que provienen de la adopción de herramientas y aportaciones de áreas como la ingeniería o la biotecnología. Existen varias formas de aplicar la biología sintética: por un lado, desde un punto de vista similar a la química biomimética, utilizando moléculas no naturales para generar comportamientos y funcionalidades nuevas; por otro lado, desde un enfoque más ingenieril, mediante el intercambio de partes naturales conocidas para generar sistemas con funciones no naturales (Benner & Sismour, 2005). En definitiva, se busca obtener modelos con un enfoque general, evitando planteamientos de carácter individualista o específico. Basándose en conceptos como la estandarización, la modularidad, la abstracción o el desacoplamiento se pretende crear una nueva vía de avance científico que permita progresar en los diferentes retos actuales [Figura 1] (Endy, 2005; Sengupta et al., 2018).

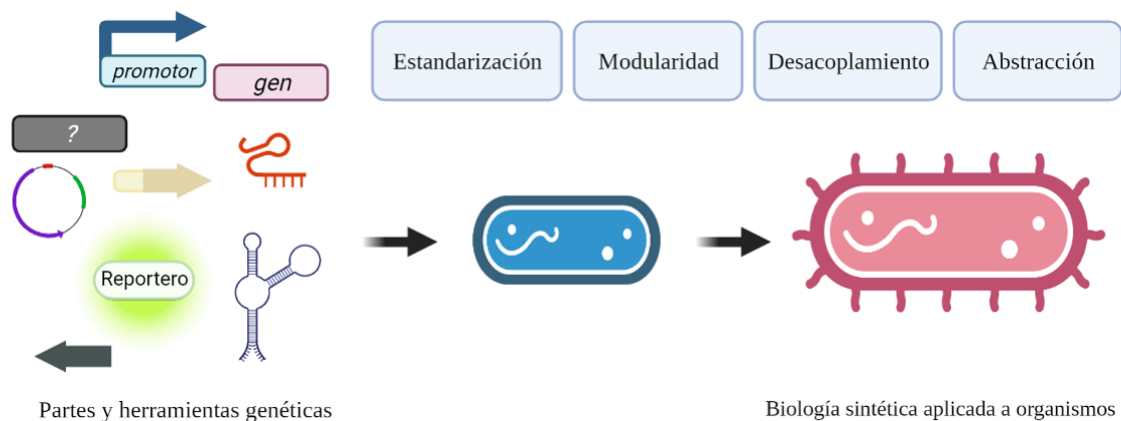


Figura 1. Esquema representativo de los pasos para trabajar en biología sintética a partir de partes genéticas y herramientas en bacterias. Creación propia en BioRender.com

La biología sintética nutre a varios ámbitos: en primer lugar, al ámbito aplicado, ya que pretende perfeccionar, optimizar y rediseñar los sistemas biológicos para generar nuevas funcionalidades deseadas, así como para dar solución a problemas estancados o aquellos considerados inabordables a los que la simple observación, análisis y herramientas actuales no pueden dar respuesta (Benner & Sismour, 2005); en segundo lugar, contribuye a la ampliación del conocimiento sobre la composición y reglas que rigen los sistemas

vivos en el biología básica, derivado de la investigación intrínseca de los ensayos. Asimismo, podría dilucidar cuestiones sobre el origen de la vida y sobre los pasos hacia su complejidad estructural y funcional. Es en esta cuestión donde muchas investigaciones sobre biología sintética ponen el punto de mira, es decir, en la búsqueda de esos bloques esenciales y claves que permitan la construcción y el diseño de los sistemas biológicos.

Desde un principio el desarrollo de la biología sintética ha sido en organismos bien conocidos como pueden ser *Escherichia coli* (bacteria), *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) o microalgas (eucariotas fotosintéticos), cuyos resultados no son extrapolables en muchos casos al grupo de organismos objeto de este trabajo, las cianobacterias. Las cianobacterias son bacterias Gram negativas fotoautótrofas, con características deseables para su uso como modelos en biología sintética. El conocimiento en la actualidad sobre estos procariontes es considerable y su potencial en biología sintética es enorme. No obstante, hasta el momento sus aplicaciones en biología sintética quedan lejos de las de otros organismos convencionales (Vavitsas et al., 2021).

Las cianobacterias son organismos que podrían ayudar a solucionar algunas de las amenazas a las que la sociedad se enfrenta en la actualidad, como la aparición de enfermedades emergentes, la escasez de alimentos y de agua potable, el avance del cambio climático y sus consecuencias indeterminadas, el problema de los contaminantes y su biorremediación, etc. (Way et al., 2014). Es por ello que su desarrollo podría ser clave para un futuro incierto lleno de retos a los que los científicos deberemos dar solución o alternativas en las próximas décadas, en muchos casos en tiempo récord.

METODOLOGÍA

La metodología utilizada ha sido de carácter bibliográfico mediante la búsqueda de recursos digitales en bases de datos y otros centros de información, usando el buscador Google.

Buscadores y bases de datos:

- Google y Google scholar
- PubMed
- ScienceDirect
- Scopus
- Springer

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión del estado actual de la biología sintética en cianobacterias.

RESULTADOS

Breve historia de la biología sintética

La biología sintética es una de las últimas disciplinas en biología que se ha ido consolidando en estos últimos años. No obstante, su desarrollo se basa en multitud de avances científicos que han tenido lugar fundamentalmente durante el presente y el pasado siglo [Figura 2]. Probablemente, las primeras referencias se remontan a comienzos del S. XX, una época en la que el debate sobre el enigma del origen de la vida estaba en su apogeo. El término fue mencionado por primera vez en 1912 por Leduc en su publicación “*La Biologie Synthétique*”, donde se trataba de la posibilidad de crear vida artificial a partir de sustratos físico-químicos y además, sostenía que este acercamiento era un modo novedoso y poderoso de abordar la investigación sobre la vida. Otros autores con una perspectiva similar serían Burke (1906), que experimentó con radio para producir formas “medio vivas” que desataron mucha controversia; o Loeb (1899), con sus estudios sobre partenogénesis artificial que buscaban, además, el conocimiento de los fenómenos fisiológicos y su control (Schmidt et al., 2009). En las sucesivas décadas, destacan las publicaciones de Delbrück (1949), en las que describió un modelo de dos estados enzimáticos en sistemas bioquímicos, y los estudios sobre el operón *lac* de *E. coli* de Jacob y Monod (1961), que permitieron postular la existencia de circuitos moleculares que coordinaban la respuesta de una célula con su entorno (Cameron et al., 2014; Gardner & Hawkins, 2013).

El desciframiento del código genético en los años 60 del siglo pasado permitió, junto a otros avances (uso de enzimas de restricción y de vectores plasmídicos, la secuenciación de Sanger, o la PCR) la aparición de la ingeniería genética en los años 70 y 80. En esta época, que se conoció como *la era del ADN recombinante*, se generaron las primeras bacterias modificadas por ingeniería genética, volviendo a aparecer el término biología sintética como sinónimo de bioingeniería (Benner & Sismour, 2005). A partir de 1990, la secuenciación automatizada de ADN permitió secuenciar multitud de genomas entre ellos el de *E. coli* (1997). También se consiguió la cuantificación de macromoléculas como el ARN o proteínas mediante técnicas masivas, dando lugar a la explosión de la generación *ómica*. Como consecuencia, nació la biología de sistemas, que intentaba aunar todos estos nuevos conocimientos e integrarlos con las técnicas computacionales permitiendo, de esta forma, una nueva visión de la biología como un conjunto de módulos jerarquizados interconectados mediante redes (Cameron et al., 2014). Este nuevo enfoque, daba lugar a

un punto de unión entre la biología y la ingeniería que podría ser explotado junto con las herramientas genéticas y moleculares.

La bioinformática y la computación también compartían con la biología el concepto de la “programabilidad”, donde el ADN contenía la información codificada necesaria para el funcionamiento celular, así como para sus elementos reguladores; los genes, los promotores y las proteínas podrían ser los análogos de unidades de memoria, interruptores o sensores (Gardner & Hawkins, 2013). De esta manera, los conceptos de abstracción, modularidad y desacoplamiento que comenzaron a definir a la biología sintética podían ser abordados (Endy, 2005). Es a partir de entonces cuando esta nueva rama empieza a ser reconocida por la comunidad científica.

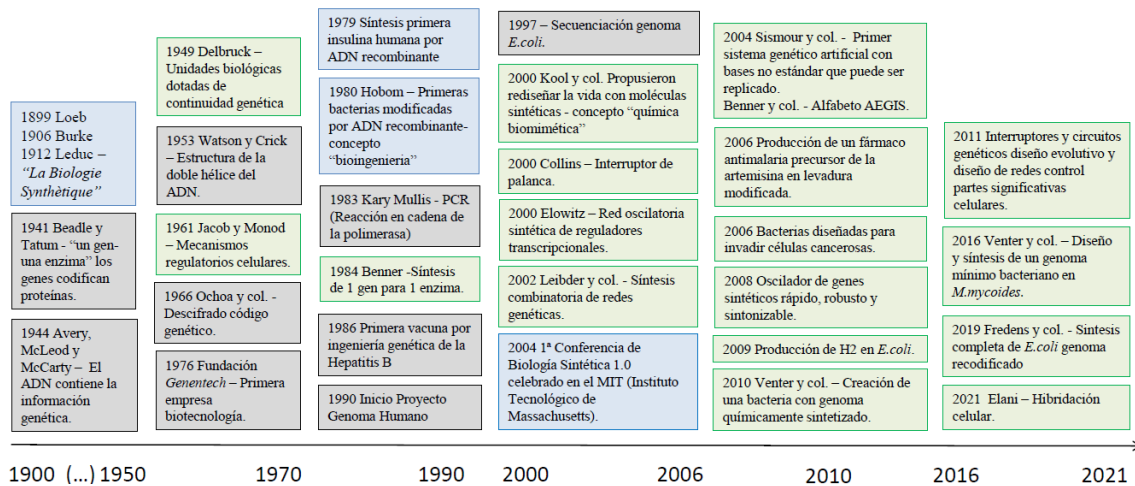


Figura 2. Cronograma de los diferentes eventos que han ido conformando la biología sintética. Descubrimientos científicos clave (negro), menciones e indicios de biología sintética como ciencia (azul) e hitos propios de la biología sintética (verde). Estos hitos hacen referencia a la biología sintética en general y han sido probados en modelos heterótrofos, principalmente. Extraído de las revisiones: Benner & Sismour, 2005; Cameron et al., 2014 y Gardner & Hawkins, 2013.

Desde el inicio del S. XXI, científicos como Eric Kool, en el 2000 volvieron a hacer referencia a la biología sintética como “química biomimética” para describir la síntesis de moléculas orgánicas no naturales que funcionan en los sistemas vivos (Geyer et al., 2003). Se comenzaron a desarrollar multitud de circuitos como el modelo de bio-interruptor de Collins y col. [Figura 3], donde se expresaban represores de inhibición mutua (Cameron et al., 2014).

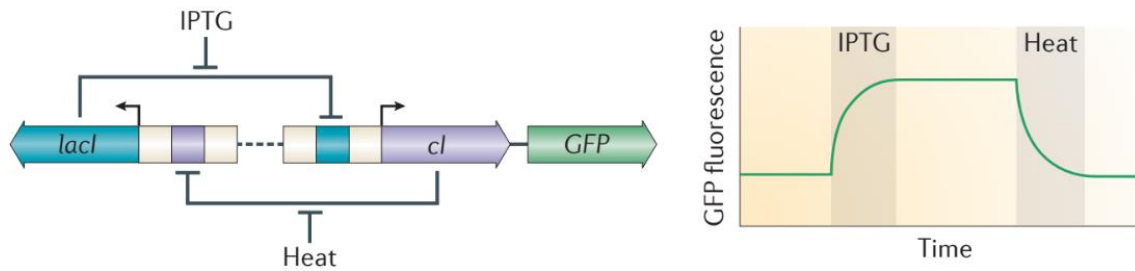


Figura 3. Bio-interruptor. Consta de un circuito biestable con dos genes (*cl* y *lacI*) que se reprimen entre sí y cada uno se activa en presencia de un estímulo concreto; la molécula IPTG inhibe la unión de LacI al ADN y el calor impide que el regulador CI actúe como represor. Extraído de la figura 2.a de Cameron et al. 2014.

Durante esta década se produjeron avances de forma rápida, aunque también es cierto que el progreso en determinados aspectos se vio limitado por la falta de herramientas adecuadas y otras limitaciones técnicas (Cameron et al., 2014). Sin embargo, la biología sintética continuó avanzando con grandes resultados con el desarrollo de circuitos sintéticos que permitieron la producción de hidrógeno en *E. coli* (Waks & Silver, 2009) o la producción de ácido artemisínico, un precursor de la artemisina (fármaco contra la malaria) a partir de la introducción de genes y la desviación metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* (Ro et al., 2006).

Los estudios de Benner y colaboradores han sido destacables. Desde que en 1984 consiguieron por primera vez la síntesis artificial de un gen que codificaba para una enzima, en los posteriores años explotaron la biología sintética a nivel de la química orgánica artificial con buenos resultados (Hoshika et al., 2019). Otro enfoque de la biología sintética han sido la reprogramación del genoma desde cero. En 2010, Venter y colaboradores crearon una célula bacteriana controlada por un genoma sintético (Gibson et al., 2010) y en 2016 consiguieron la creación del primer genoma mínimo sintético en *Mycobacterium mycoides* (Hutchison et al., 2016). En esta línea, en 2019, se obtienen resultados similares pero en este caso con la sustitución del genoma de *E. coli* por otro recodificado (Fredens et al., 2019). En un artículo reciente se muestra el avance de esta perspectiva donde se crean cepas de *E. coli* con un genoma artificial y un código genético comprimido por la eliminación de varios codones. Este trabajo posibilitaría reasignar los codones eliminados a aminoácidos artificiales lo que haría a esta cepa invulnerable a ataques virales (Robertson et al. 2021).

Recientemente, en 2021 surge una ampliación de perspectivas de la biología sintética hacia el concepto de interconexión entre células sintéticas y células vivas. Se pretende crear un híbrido a partir de la composición de partes vivas y artificiales para aprovechar

el poder de la biología y permitir un control a distintos niveles desde lo molecular o celular hasta lo multicelular. Se proponen tres mecanismos para llevarlo a cabo: la hibridación de poblaciones, la hibridación integrada y la hibridación en red [Figura 4] (Elani, 2021).

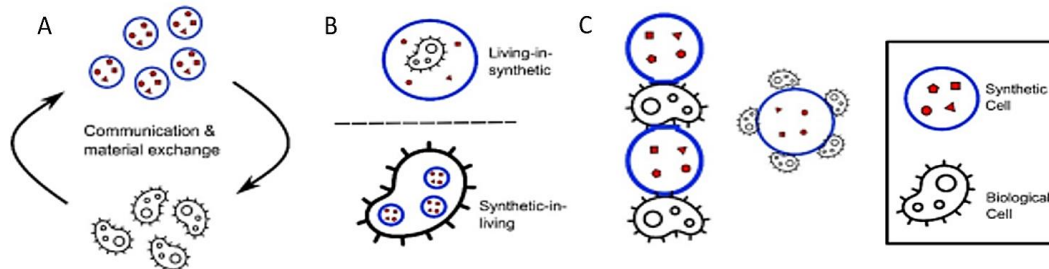


Figura 4. Esquema de los tipos de hibridación celular en biología sintética. **A.** Hibridación de poblaciones: las células biológicas y sintéticas establecen comunicación intercambiando información y moléculas en el espacio. **B.** Hibridación integrada: Las células artificiales se encuentran integradas en las vivas o viceversa funcionando a modo de orgánulos celulares. **C.** Hibridación en red: Las células artificiales y vivas funcionan por separado pero una unión física las mantiene conectadas como una red o tejido. Extraído de la figura 2 de Elani, 2021.

Los resultados mencionados son una muestra del progreso histórico de la biología sintética. Con el desarrollo reciente de nuevas herramientas, esta disciplina avanza hoy de manera exponencial.

LAS CIANOBACTERIAS

Historia

Las cianobacterias son un grupo de organismos clave en la historia de la vida en la Tierra. Su registro fósil más antiguo data de hace 3500 millones de años. En este período, la Tierra se caracterizaba por tener un ambiente extremo y carente de oxígeno. En este contexto surgen las cianobacterias, los primeros organismos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, liberando O₂ que entró a formar parte de la atmósfera del planeta. Esta transición al mundo aerobio resultó un punto de inflexión con consecuencias tan destacables como la extinción en masa de las anteriores formas de vida anaerobias o la formación de la capa de ozono que protege de los rayos UV del sol, permitiendo que las formas de vida que surgieron en el agua pudiesen colonizar el medio terrestre. Las cianobacterias también son los precursores evolutivos de los cloroplastos de las plantas y algas, y en definitiva, han contribuido en gran medida a la vida tal y como la conocemos hoy (Dworkin et al., 2006).

Biodiversidad y ecología

Las cianobacterias se agrupan en un único filo – *Cyanobacteria* – con una enorme variedad de formas de vida capaces de ocupar cualquier nicho del planeta. Estos organismos tienen un papel ecológico fundamental en los principales ciclos biogeoquímicos. Algunas viven en los océanos en aguas oligotróficas y se calcula que son las responsables de entre el 11-50% de la producción primaria en estas zonas. De hecho, resultan relevantes en la producción de O₂ y la fijación de CO₂ y N₂ atmosférico a escala planetaria (Vavitsas et al., 2021). Otras cianobacterias viven en agua dulce, en lagos hipersalinos o aguas eutrofizadas por vertidos ricos en nutrientes, generando en este caso afloramientos perjudiciales para otros organismos por la liberación de toxinas. En ambientes terrestres también podemos encontrarlos en relaciones simbióticas con otros organismos siendo muy importantes aquellas que tienen lugar con algunas plantas y que resultan de gran interés para la agricultura. Existen también algunas especies de cianobacterias extremófilas que viven en aguas termales a temperaturas de 73°C, elevadas concentraciones de sulfuro de hidrógeno o en alta montaña, expuestas a fuertes radiaciones UV, entre otros (García-Pichel, 2009).

Bioquímica y fisiología

El metabolismo de las cianobacterias se basa en la fotosíntesis oxigénica, en la cual se asimila el CO₂ en materia orgánica utilizando la energía solar, y el H₂O como donador de electrones liberando como producto O₂. En algunas cianobacterias la energía solar es captada por los ficobilisomas que contienen ficobiliproteínas que absorben a distintas longitudes de onda y cuya regulación optimiza la captura de luz según la disponibilidad (“adaptación cromática complementaria”) (García-Pichel, 2009). Es la utilización de energía solar y el uso de CO₂ como fuente de carbono, lo que hace a las cianobacterias unos organismos muy atractivos para la industria sostenible.

No obstante, las cianobacterias muestran un metabolismo muy diverso, con especies capaces de vivir en condiciones heterotróficas mediante la respiración o fermentación de una amplia variedad de compuestos. Esta amplia diversidad metabólica a explorar es otro de los atractivos de la cianobacterias desde un punto de vista aplicado (Dworkin et al., 2006; García-Pichel, 2009). Además, estos organismos producen metabolitos secundarios diversos, cuya función biológica se desconoce en la mayor parte de los casos,

pero que son de enorme interés por su potencial aplicación en biomedicina u otros campos. Otros metabolitos como son los pigmentos, las vitaminas, los aminoácidos o los ácidos grasos presentan gran valor industrial. Con las herramientas de biología sintética las cianobacterias podrían ser optimizadas para la producción rentable de estos metabolitos o para ser dirigidas hacia la producción heteróloga de otros bioproductos como los hidrocarburos o alcoholes. Por otro lado, las cianobacterias presentan reservas de carbono en forma de gránulos de polihidroxibutirato (PHB), un polihidroxialcanoato que puede ser utilizado para la síntesis de plásticos y derivados biodegradables (Santos-Merino et al., 2019).

Finalmente, en ausencia de compuestos de nitrógeno algunas cianobacterias tienen la capacidad de fijar el N_2 de la atmósfera. Este proceso es incompatible con la fotosíntesis oxigénica debido a que la enzima que cataliza la fijación de N_2 , la nitrogenasa, resulta inactivada irreversiblemente en presencia de O_2 . Distintas especies han desarrollado diferentes estrategias para compatibilizar ambos procesos. Entre ellas, destaca la formación de heterocistos por parte de algunas cianobacterias multicelulares filamentosas. El heterocisto se forma por un proceso de diferenciación celular que da lugar a una célula que no realiza la fotosíntesis y cuyo metabolismo está dirigido a la fijación de nitrógeno. Estas características del heterocisto podrían resultar interesantes para procesos metabólicos que requieran estar aislados del O_2 . Por ejemplo, la actividad de las hidrogenasas, enzimas que producen H_2 , que necesitan un ambiente anaerobio (Wegelius et al., 2018).

Otra característica interesante observada en cianobacterias es la presencia de ritmos circadianos. Estos ciclos duran unas 24 horas y constituyen un proceso altamente regulado. La capacidad que se ha descrito de modular los ritmos circadianos podría explotarse, por ejemplo, para la construcción de osciladores genéticos cianobacterianos (Nakahira et al., 2013).

Las cianobacterias como chasis microbianos

La búsqueda de chasis biológicos en la era actual de la biotecnología resulta esencial para encontrar modelos que permitan satisfacer las distintas demandas. Las cianobacterias presentan características que las hacen atractivas respecto a otros modelos clásicos.

En comparación con las levaduras (*S. cerevisiae*) y bacterias (*E. coli*) típicas heterótrofas, la capacidad de las cianobacterias de realizar fotosíntesis oxigénica y/o fijación de N₂ a partir de sustratos inorgánicos (agua, luz y gases atmosféricos), supone una gran ventaja por su rentabilidad y sostenibilidad. Además, se han descrito algunas especies que son manipulables genéticamente. Por contra, las cianobacterias en general, crecen más lentamente que dichos organismos heterótrofos y, por tanto, el rendimiento en la producción de metabolitos por unidad de tiempo puede ser menor. Además, la falta de herramientas genéticas y la poliploidía de muchas cepas ralentizan o imposibilitan la ingeniería genética. Desde una perspectiva industrial, aunque resultan ser buenos chasis, los medios existentes para el cultivo en biorreactores a gran escala no son suficientes para hacer posible o rentable su utilización a día de hoy. Dentro del grupo de los organismos fotosintéticos donde encontramos las plantas y algas, las cianobacterias cuentan a su favor con una mayor eficiencia en la captura y conversión de la energía solar y un crecimiento más rápido, además, a diferencia de las plantas, no requieren grandes terrenos para su cultivo (Khan et al., 2019; Vavitsas et al., 2021).

A pesar del atractivo y del enorme potencial de las cianobacterias, como se explicará a continuación, aún queda un largo camino que recorrer para la utilización de estos organismos como chasis microbianos.

HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA SINTÉTICA EN CIANOBACTERIAS

Plásmidos

El uso de plásmidos como vectores en biología sintética es una herramienta versátil ya que permite un diseño específico, además de contar con una fácil introducción por transformación, electroporación o conjugación. Comúnmente, los plásmidos pueden ser integrativos o replicativos. Los integrativos, son plásmidos que no pueden replicarse en la cianobacteria (suicidas) a los que se les clona un fragmento del genoma de ésta para facilitar su integración por recombinación homóloga. Los replicativos portan un origen de replicación cianobacteriano funcional que puede ser específico de una cepa en concreto o para varias estirpes (Chen et al., 2016).

En concreto, el desarrollo de plásmidos modulares resulta una estrategia en biología sintética con gran potencial. Para construir estos plásmidos se utilizan sistemas de ensamblaje de distintas partes o módulos (Taton et al., 2014). Estos módulos pueden ser

principalmente cuatro: i) el origen de replicación en *E. coli*, ii) un módulo de origen de replicación o de integración en cianobacterias, iii) un marcador de selección a antibióticos y iv) otro módulo variable donde introducir nuestra construcción de interés [Figura 5.A]. El módulo de replicación en cianobacterias puede estar basado en plásmidos con amplio rango de huéspedes, como el RSF1010 de *E. coli*, o bien provenir de plásmidos endógenos cianobacterianos (Huang et al., 2010). Cada módulo puede ser editado partiendo de bibliotecas de componentes intercambiables para crear plásmidos diferentes. De esta forma, por ejemplo, pueden probarse en distintas cepas la compatibilidad de los orígenes de replicación cianobacterianos o pueden introducirse genes que codifiquen compuestos de interés para su producción, entre otras aplicaciones. Para crear estos plásmidos se parte de fragmentos que se ensamblan in vitro y se introducen en cianobacterias [Figura 5.B] (Taton et al., 2014).

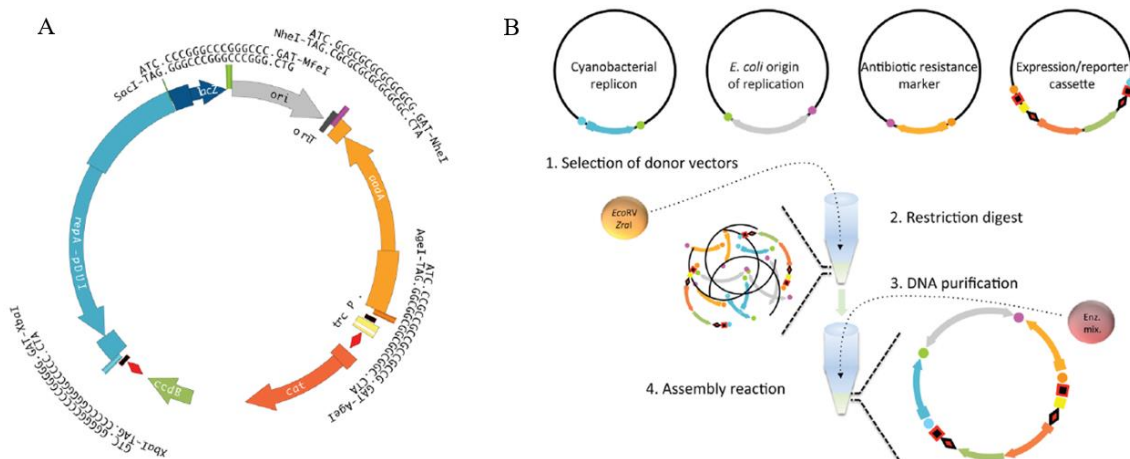


Figura 5. A. Esquema de un plásmido modular con los diferentes módulos ensamblados: Módulo de origen de replicación de *E. coli* (gris), módulo de origen de replicación en cianobacteria (azul), módulo de marcador de resistencia a antibiótico (naranja) y módulo variable (verde-rojo-amarillo). B. Resumen del proceso para la creación del plásmido modular. Extraído de la Figura 1 de Taton et al., 2014.

Cuando se prueban los plásmidos introducidos se deben analizar una serie de características que definirán su idoneidad. Entre ellas, está la compatibilidad de su uso y eficiencia en otras cepas, la compatibilidad con otros plásmidos nativos, la estabilidad, y la posibilidad de recuperar los replicativos para comprobar su integridad y añadir modificaciones si se desea.

En un estudio basado en los plásmidos endógenos pCA2.4 y pCB2.4 de *Synechocystis sp.* PCC 6803, junto con el replicón de *E. coli* pSC101 y distintos componentes, se obtuvieron diferentes variantes de vectores lanzadera modulares (pSOMA), creando una biblioteca de distintos plásmidos pSOMA. Mediante fluorescencia con GFP se comprobó que el

nivel de expresión variaba entre las construcciones [Figura 6.A]. Igualmente, se pudo comprobar que la compatibilidad para un mismo plásmido varía entre las cepas y no se correlaciona con la cercanía filogenética. Además, en cepas filamentosas presenta diferencias de fluorescencia entre filamentos distintos y también entre las células de un mismo filamento [Figura 6.B]. También se observó que algunos plásmidos eran ortogonales y por tanto, pueden ser introducidos a la vez en el mismo huésped (Opel et al., 2022).

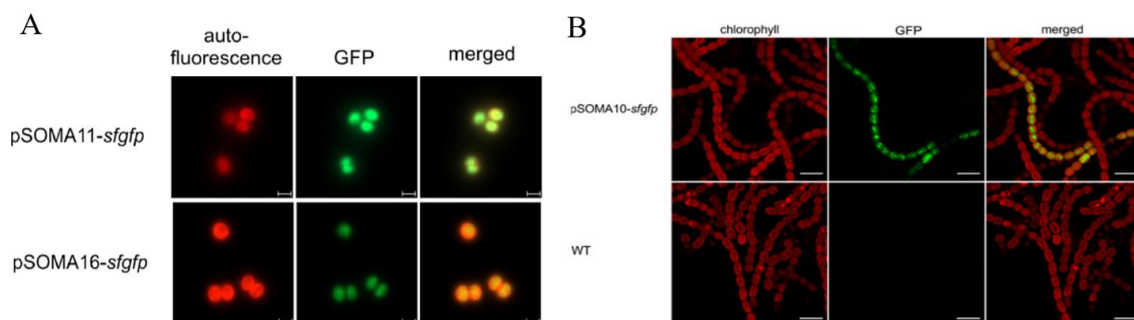


Figura 6. Expresión del gen reportero *gfp* en microscopía de fluorescencia. **A.** En los plásmidos pSOMA11-sfgfp y pSOMA16-sfgfp en *Synechocystis sp. PCC 6803*, por separado. **B.** En el plásmido pSOMA10-sfgfp en *Anabaena sp. PCC 7120*, por separado. Imágenes modificadas de la figura 3.B y la figura 6 de Opel et al., 2022.

Por otro lado, a la hora de elegir plásmidos nativos resultan más prometedores los pequeños, debido a su mejor manejo y eficacia en las transformaciones. Por ejemplo, el plásmido pANS de *Synechococcus elongatus* PCC 7942, del que se aprovecharon sus elementos imprescindibles para generar, aplicando el método anterior, los plásmidos sintéticos pAM4787 y pAM4788. Se comprobó, por un lado, que resulta esencial la curación de los plásmidos nativos para evitar eventos de recombinación homóloga y, por otro lado, se demostró que la expresión del gen de GFP introducido en pAM4787 era mayor que cuando éste se introducía en pANL (plásmido nativo grande) o en el cromosoma (Chen et al., 2016).

Partes genéticas

Como se ha visto, contar con una biblioteca de partes biológicas bien caracterizadas resulta fundamental para trabajar en biología sintética. Esta idea dio lugar al estándar de BioBricks (“Registro de piezas biológicas estándar”) (Shetty et al., 2008).

Desde entonces, ha funcionado como un registro en crecimiento de secuencias de ADN para diferentes piezas genéticas, de origen nativo o sintético, que comparten una interfaz común. De esta forma, pueden ensamblarse con facilidad entre ellas e introducirse en los

organismos de estudio para ver su viabilidad y en última instancia, optimizarlos (Huang et al., 2010). Para más información <https://biobricks.org/>.

Algunas de las partes más importantes son:

- **Promotores**

Los promotores son una de las partes mejor estudiadas en genética bacteriana. Son esenciales para que ocurra la transcripción de los genes, por lo que constituyen una parte importante en el diseño de circuitos genéticos, por ejemplo, para la producción de un metabolito de interés. Los promotores nativos son el resultado de la evolución del organismo que se está utilizando como chasis y pueden ser de interés para la biología sintética. Los promotores no nativos son promotores introducidos, ya sean nativos de un organismo distinto (heterólogos), o sintéticos. Estos últimos son construcciones de diseño y elaboración artificial (Ferreira et al., 2018). Atendiendo al tipo de regulación de los promotores, los encontramos: constitutivos o inducibles. Los promotores constitutivos se definen como aquellos que muestran un nivel de expresión invariable en todas las condiciones. Por otro lado, los promotores inducibles, que en principio presentan mayor utilidad en biología sintética, muestran un nivel de expresión variable en respuesta a señales específicas. En cianobacterias, se han descrito diversos tipos de promotores, especialmente en las especies más estudiadas como las unicelulares *Synechococcus elongatus* PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803 y la filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120 (Mitschke et al., 2011; Wang et al., 2012).

Los promotores nativos tienen la ventaja de responder a las señales ambientales de forma natural. Entre los cianobacterianos, los más utilizados han sido los relacionados con los procesos fotosintéticos como son PpsbA1 o PpsbA2 (fotosistema II), PrbcL (subunidad grande de la RubisCO) o PcpbB (ficocianina), entre otros (Vavitsas et al., 2019) [Tabla 1]. Algunos de estos promotores proporcionan un nivel de expresión particularmente alto y han sido utilizados para la producción de productos químicos de interés (Liu & Pakrasi, 2018; Wang et al., 2012). No obstante, hay que tener en cuenta que estos promotores están integrados en las rutas metabólicas del organismo por lo que pueden no ser de utilidad cuando se requiere tener un control aislado del sistema (Ferreira et al., 2018). Los promotores que responden a metales, como el PnrsB (níquel) son robustos y útiles para ciertas aplicaciones como la creación de biosensores, sin embargo, no son adecuados para su uso a gran escala al presentar toxicidad (Vavitsas et al., 2021).

Promotor	Origen	Tipo	Inductor/Represor	Referencias
PpsbA2	Nativo	Inducible	Luz/-	(Englund et al., 2016; Li et al., 2018)
PcpcB	Nativo	Inducible	CO2/Luz intensa	(Sengupta et al., 2019)
PnrsB	Nativo	Inducible	Níquel	(Englund et al., 2016)
PcoaT	Nativo	Inducible	Cobalto/-	(Englund et al., 2016; Behle et al., 2020)
Ptre	Heterólogo (E. coli)	Inducible	IPTG/LacI	(Ferreira et al., 2018; Li et al., 2018)
PBAD	Heterólogo (E. coli)	Inducible	L-arabinosa/-	(Cao et al., 2017; Immethun et al., 2017)
PrhaBAD	Heterólogo (E. coli)	Inducible	Ramnosa/-	(Kelly et al., 2018; Behle et al., 2020)
PvanCC	Heterólogo (E. coli)	Inducible	Vanillato/-	(Taton et al., 2017; Behle et al., 2020)
PL03	Sintético	Inducible	Anhidrotetraciclina/-	(Ferreira et al., 2018; Behle et al., 2020)
PT7pol	Heterólogo (Fago T7)	Constitutivo	-	(Ferreira et al., 2018)
PrnpB	Nativo	Constitutivo	-	(Ferreira et al., 2018)
Pcpc560	Sintético	Constitutivo	-	(Ferreira et al., 2018; Li et al., 2018; Liu & Pakrasi, 2018)

Tabla 1. Ejemplos de promotores usados en biología sintética de cianobacterias. Las referencias pertenecen a las publicaciones más recientes que contienen trabajos con ese promotor. Creación propia en Microsoft PowerPoint.

En algunos casos se han podido introducir promotores no nativos en *Synechocystis* PCC 6803 y *S. elongatus* PCC 7942 como los promotores de *E. coli* inducibles por L- arabinosa (PBAD), ramnosa (PrhaBAD) o vanillato (PvanCC) (Behle et al., 2020; Kelly et al., 2018; Taton et al., 2017). A la hora de introducir promotores heterólogos, debe tenerse en cuenta que existen diferencias estructurales de la ARN polimerasa de cianobacterias respecto otros organismos, ya que ello puede dar problemas de compatibilidad en la transcripción (Behle et al., 2020). A su vez, promotores fuertes de otros organismos como *E. coli*, donde se esperan eficiencias similares, pueden responder de forma variable al probarlos en cianobacterias [Figura 7] (Ferreira et al., 2018).

Finalmente, la aplicación de la biología sintética para la creación de promotores sintéticos, permite el diseño específico de éstos además de evitar los riesgos asociados a la regulación natural de las cepas. Por ejemplo, en un estudio a partir del promotor PT7pol del fago T7, crearon tres promotores modificados mediante mutaciones puntuales y la adición del operador LacI, introduciéndose en *Synechocystis sp.* PCC 6803 [Figura 8.A]. Los resultados mostraron una expresión inferior respecto al promotor de referencia PrnpB (ribonucleasa P) aunque con diferencias respecto a PT7pol sin modificar [Figura 8.B] (Ferreira et al., 2018). Por otra parte, el promotor superfuerte Pcpc560 descrito en *Synechocystis sp.* PCC 6803, está formado por dos promotores de la ficocianina C (PcpcB) y 14 sitios de unión a factores de transcripción (TFBS). Este diseño permitió en este estudio, la sobreexpresión de genes heterólogos a un nivel de hasta un 15% más que el alcanzado en *E. coli* (Zhou et al., 2014).

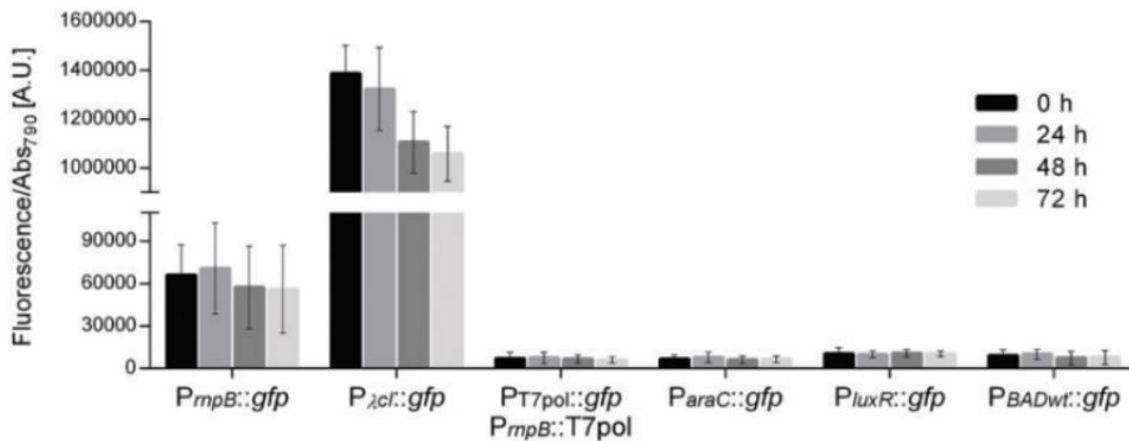


Figura 7. Caracterización de diferentes promotores heterólogos introducidos en *Synechocystis sp.* PCC 6803 expresando la proteína GFP. Se incluye *PrnpB* nativo como referencia. Extraído de la figura 3 de Ferreira et al., 2018.

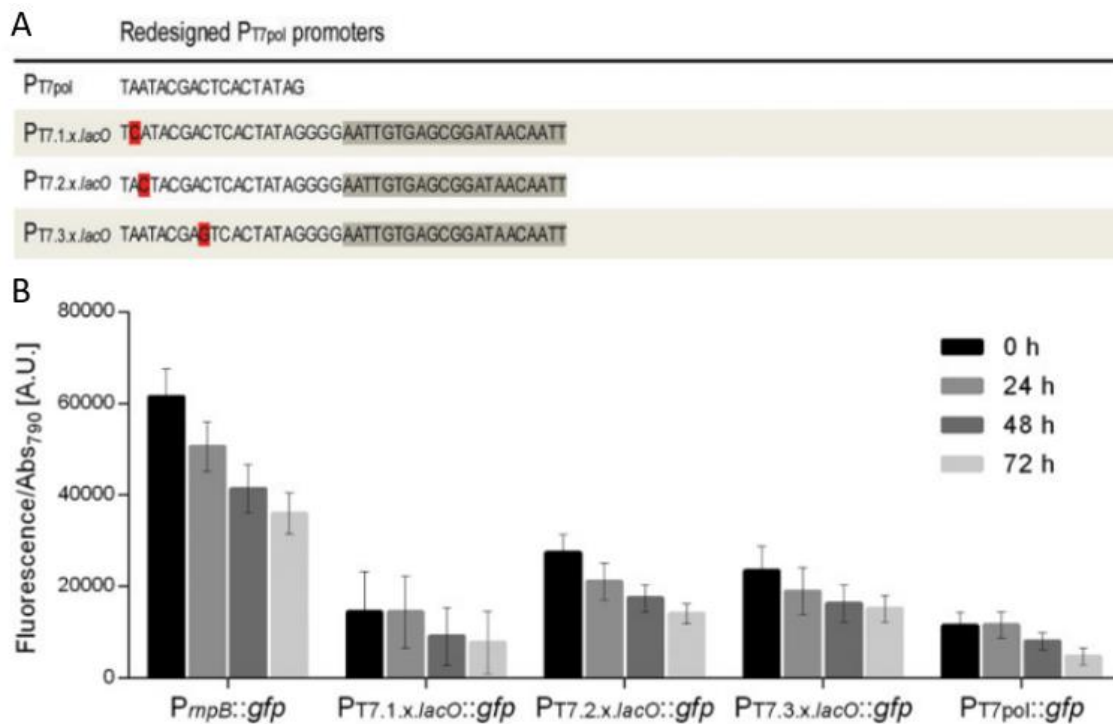


Figura 8. A. Secuencias de tres promotores resultantes a partir del rediseño del promotor *PT7pol*. Mutaciones puntuales (rojo) y operador *Lac O* (gris). Se indica *PT7pol* original como referencia. B. Resultados de la expresión de los tres promotores rediseñados *PT7.1*, *PT7.2* y *PT7.3* mediante la medida de la fluorescencia de GFP y bajo expresión constitutiva de la ARN pol. de *T7*. Se incluye *PT7pol* y *PrnpB* sin modificar como referencias. Extraído de figuras 5.a y 6, respectivamente de Ferreira et al. 2018.

- **RBS – (Ribosome Binding Site)**

Los RBS (sitios de unión al ribosoma) son elementos cuya secuencia y posición influyen en los niveles de expresión génica a nivel traduccional, a través del reclutamiento de los ribosomas. Se han caracterizado multitud de secuencias RBS que han sido registradas en BioBricks, entre ellas, 20 secuencias nativas pertenecientes a *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Liu & Pakrasi, 2018).

La combinación promotor-RBS es una herramienta interesante para lograr mejores patrones de expresión, sin embargo, se han observado incompatibilidades que sugieren mecanismos postranscripcionales todavía no conocidos. Además, se ha observado que la eficacia de los RBS depende del gen al que acompaña. Una estrategia reciente que ha permitido mejorar el diseño de los RBS, fue la llevada a cabo por Wang et al. tras dilucidar que los RBS en cianobacterias presentan diferencias con los de *E. coli* y poseen tres regiones que contribuyen individualmente a su eficacia (Wang et al., 2018). Además, los resultados de algunos trabajos sugieren que aún se desconocen muchos aspectos de cómo la manipulación del RBS o secuencias adyacentes puede influir sobre la expresión (Taton et al., 2014)

- **Terminadores**

Los terminadores son secuencias que detienen el avance de la ARN polimerasa y determinan el fin de la transcripción. En biología sintética resultan esenciales para evitar que la expresión de un gen de interés afecte a las secuencias aguas abajo. Los terminadores del gen *rbcS* (RubisCO) de *Synechocystis sp. PCC 6803* y del operón *rrnB* (ARNr) de *E. coli*, ambos independientes de Rho, han sido los únicos utilizados hasta ahora en trabajos de biología sintética en cianobacterias. Algunos terminadores no son totalmente eficaces para detener la transcripción, por lo que pueden aplicarse para modular el nivel de expresión de genes situados en tándem en operones artificiales. A pesar de los avances realizados hasta ahora, es necesario aún explorar nuevos terminadores, crear bibliotecas y analizar su eficacia para conseguir una modulación fina de la terminación de la transcripción (Liu & Pakrasi, 2018).

- **Reporteros**

Los genes reporteros son otros componentes importantes para el desarrollo de circuitos en biología sintética, éstos aportan información delatando la expresión de un gen, la localización de una proteína o las interacciones entre éstas. Los más clásicos fueron enzimas de actividad detectable, pero los actualmente más extendidos y no invasivos son las proteínas fluorescentes y la luciferasa bacteriana. En el caso de las cianobacterias, la elevada fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos en amplias zonas del espectro limita el uso de algunas proteínas fluorescentes, como por ejemplo, mCherry (rojo). A pesar de ello, se han utilizado con éxito algunos, ya que los picos de emisión de la clorofila no solapan con la de los fluoróforos como la proteína GFP (verde). A su vez, se han

desarrollado derivados mutantes mejorados como GFPmut2, GFPmut3B, Cerulean, mVenus o mTurquoise, entre otros (Huang et al., 2010). La elevada estabilidad de la GFP y sus derivados puede ser una desventaja cuando se desea una lectura transcripcional a tiempo real. Para aumentar su inestabilidad se han generado variantes con secuencias C-terminales que las marcan para su degradación y disminuyen su vida media. Por otro lado, el sistema bioluminiscente basado en el operón *lux* y la proteína luciferasa de *Photorhabdus luminescens*, de corta vida media, ha sido utilizado sobre todo para el estudio de los promotores regulados por el reloj circadiano (Wang et al., 2012).

- **Marcadores de resistencia**

Los marcadores son elementos indispensables para seleccionar cepas modificadas. Desde siempre los más utilizados han sido los de resistencia a antibióticos, como la estreptomicina, kanamicina o cloranfenicol, entre otros. A pesar de su utilidad en biología sintética, el potencial riesgo de su transferencia de forma accidental a otras bacterias, limita su idoneidad para usos a gran escala. Por otro lado, las manipulaciones genéticas secuenciales se ven además restringidas por el número limitado de marcadores de resistencia, lo que hace deseable el desarrollo de nuevos marcadores seleccionables. La creación de cepas manipuladas que no conservan marcadores en su genoma, es una alternativa que permitiría a priori realizar modificaciones secuenciales sin limitación (Wang et al., 2020).

Las técnicas para generar cepas manipuladas sin marcadores se habían desarrollado décadas atrás y se basan en la introducción de mutaciones mediante dos eventos secuenciales de recombinación (Cai & Wolk, 1990). Para ello es necesaria la contraselección de un gen, como por ejemplo *sacB* de *Bacillus*, que se encuentra en el plásmido con el que se realiza la manipulación. Este gen resulta tóxico para las bacterias en presencia de sacarosa en el medio de cultivo. De esta forma se seleccionan las células en las que hayan tenido lugar dos eventos de recombinación [Figura 9].

El problema del método anterior se encuentra en que hay cepas de cianobacterias silvestres incapaces de crecer en sacarosa, como por ejemplo *Synechocystis sp.* PCC 6803, a no ser que se use su mutante GT. Es por ello que, por un proceso similar, se ha utilizado el promotor nativo inducible por níquel para expresar un gen heterólogo de *E. coli* que

codifica una endorribonucleasa (MazF) contraseleccionable que inhibe la síntesis proteica (Cheah et al., 2013).

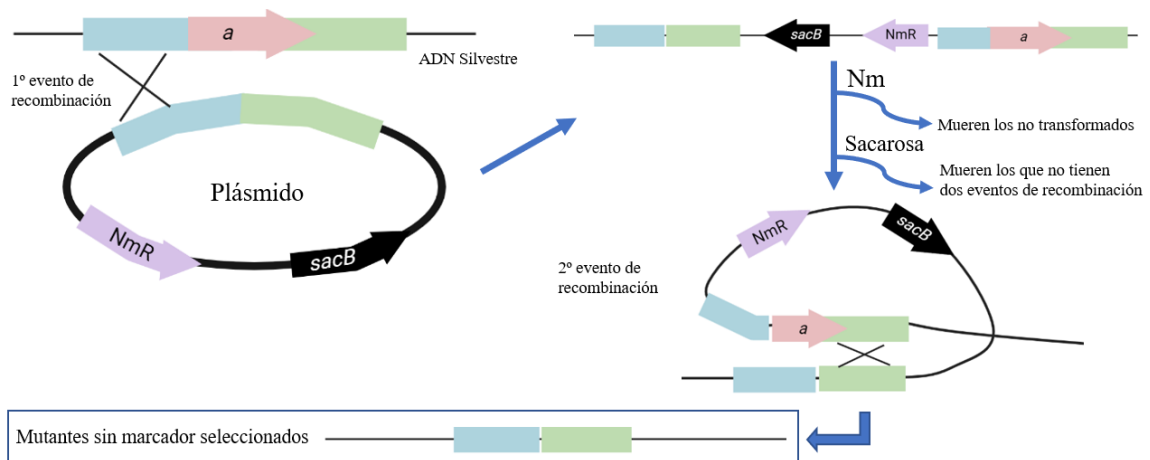


Figura 9. Técnica de doble recombinación para generación de cepas sin marcador mediante la contraselección del gen *sacB* de *Bacillus*. En primer lugar, se introduce un plásmido con secuencias homólogas a las adyacentes al gen *a* a deletionar junto con un marcador de resistencia (en este caso, *NmR* para neomicina) y el gen *sacB*. Tras el cultivo en presencia de antibiótico se seleccionan los recombinantes simples y posteriormente, tras el cultivo con sacarosa, se seleccionan los dobles recombinantes, que no portan ningún marcador. Creación propia en BioRender.com

Sin embargo, hoy en día, en muchos casos los sistemas sin marcadores suelen realizarse mediante CRISPR, sin necesitar genes de contraselección (Behler et al. 2018) (ver apartado CRISPR, página 21)

- **Riboswitches**

Los ribointerruptores (riboswitches) son segmentos en la región 5'UTR del ARNm con una secuencia reguladora y una secuencia aptámero de unión a diversas moléculas. La interacción con estos ligandos modifica la estructura secundaria del ARNm en la región reguladora, permitiendo modular la expresión de la proteína a nivel transcripcional o traduccional. En el primer caso, la región reguladora forma una estructura terminadora independiente de Rho que interfiere con la ARN polimerasa y detiene la transcripción. En el segundo caso, la región RBS no se encuentra disponible para la unión del ribosoma e impide la traducción (Nakahira et al., 2013). En biología sintética se usan ribointerruptores artificiales cuya secuencia aptámero se diseña para responder ante determinados metabolitos o ARN reguladores no codificantes. Entre las ventajas de los ribointerruptores respecto a otros elementos se encuentran la alta modularidad, el tiempo de respuesta rápido o el amplio rango fisiológico, que evita los problemas de toxicidad, así como la posibilidad de utilizar riboswitches ortogonales para regular genes de forma simultánea e independiente (Santos-Merino et al., 2019).

Los riboswitches pueden llegar a presentar rangos de activación de hasta 190 veces, siendo el riboswitch- E* para teofilina de los más óptimos, que a su vez, es modulable por las concentraciones del inductor. Además, la utilización del inductor teofilina, de origen vegetal, resulta económico para procesos industrializados (Nakahira et al., 2013).

En 2018, se diseñaron dos riboswitches transcripcionales que responden a teofilina (theo) y 2-aminopurina (2-AP) o adenina (Ade), respectivamente. Los resultados en *Anabaena sp.* PCC 7120 mostraron la flexibilidad de estas partes genéticas ya que su introducción en plásmidos replicativos (pCA021 y pCA022), junto con secuencias RBS intactas o modificadas, respectivamente, permitían modular la expresión de los genes. Además, se confirmó la compatibilidad e independencia de los dos riboswitches [Figura 10] (Higo et al., 2018b).

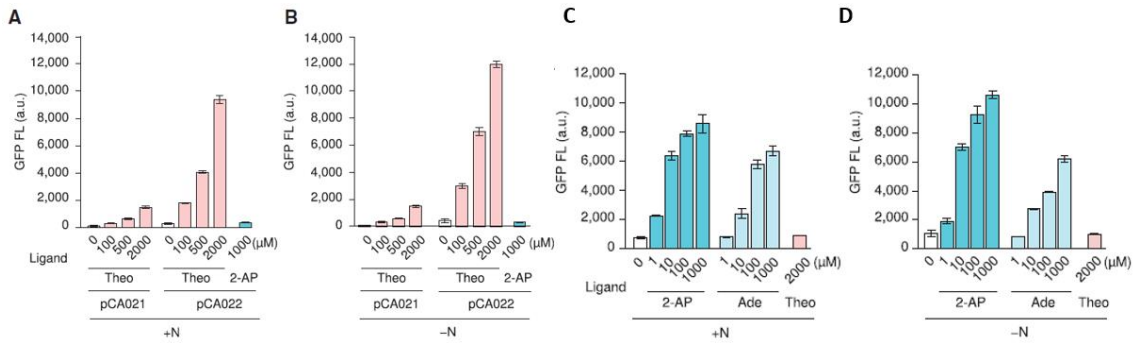


Figura 10. Expresión de GFP mediante dos riboswitches transcripcionales en *Anabaena sp.* PCC 7120. **A y B.** Expresión del riboswitch de teofilina en los plásmidos pCA021 y pCA022 con la secuencia RBS intacta y modificada, respectivamente; en presencia de compuestos de nitrógeno (A) o ausencia (B). **C y D.** Expresión del riboswitch de adenina con inductor 2-aminopurina (2-AP) o adenina (Ade), en presencia de compuestos de nitrógeno (C) o ausencia (D). Extraído de las figuras 1 y 3 de Higo et al. 2018b).

Los riboswitches pueden combinarse con cualquier promotor, lo que permite que mediante la utilización de promotores específicos pueda regularse la expresión de forma espacio-temporal. Por ejemplo, el uso de promotores específicos de heterocistos (PnifB) o de células vegetativas (PrbcL) para expresar GFP bajo la acción de los riboswitches de theo y 2-AP, permitió la inducción de genes que se expresan en distintos tipos celulares y en momentos diferentes [Figura 11] (Higo et al., 2018b).

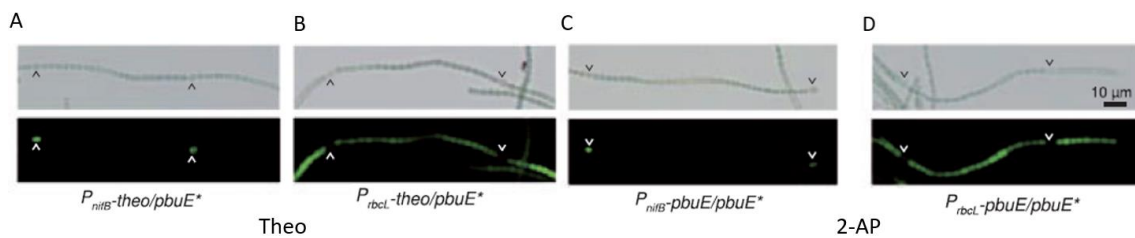


Figura 11. Expresión de GFP diferencial de los riboswitches theo/pbuE*, para teofilina y pbuE*/pbuE*, para 2-aminopurina, en células vegetativas y heterocistos a partir del uso de los promotores específicos PrbcL (células vegetativas) y PnifB (heterocistos), respectivamente. Extraído y modificado de la figura 5 de (Higo et al., 2018b).

Sería interesante la generación de riboswitches sintéticos sensibles a inductores deseados, así como la realización de un cribado de riboswitches nativos de cianobacterias para ampliar su biblioteca (Nakahira et al., 2013).

CRISPR

El sistema CRISPR-Cas es un mecanismo de defensa adaptativo que se encuentra de forma natural en muchos organismos, incluidas las cianobacterias. Sirve para evitar la invasión de virus o ADN exógeno. El sistema se compone de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) por secuencias espaciadoras que se corresponden con ADN exógeno, generalmente viral. La transcripción y maduración de estas secuencias produce ARNcr (ARN CRISPR) que formará un complejo con la proteína Cas, una endonucleasa con actividad catalítica en sus dominios HNH y RuvC, dirigiéndola a la diana de ADN complementario (con la nueva invasión viral), para producir un corte e inactivar al virus. La identificación del objetivo es por una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif) correspondiente a nucleótidos específicos en los extremos del genoma viral. Las cianobacterias cuentan con dos tipos de sistemas CRISPR nativos, los de clase I y clase II. Sin embargo, en biología sintética no se utilizan los sistemas nativos sino construcciones diseñadas (Pattharaprachayakul et al., 2020).

La utilización de CRISPR en biología sintética se basa en el diseño de un ARN guía (ARNg) con secuencias complementarias al ADN a editar por la endonucleasa Cas. Estos ARNg junto con el gen de la proteína Cas introducidos en plásmidos, tras su expresión, se unirán y dirigirán a la secuencia diana en el cromosoma donde la proteína Cas realizará un corte de doble cadena. Estos cortes pueden ser reparados por la maquinaria celular mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HDR), a partir de un molde. En estas reparaciones suelen producirse errores con gran frecuencia por lo que de esta manera se consigue la inactivación del gen diana. Por otro lado, si aportamos el molde (la secuencia espaciadora) durante la reparación, se puede conseguir la inserción de esta secuencia [Figura 12] (Yao et al., 2016).

En uno de los primeros estudios que utilizaron CRISPR-Cas9 en cianobacterias, se vio que éste podría ser útil para la edición de un solo locus o para deleciones grandes. Se introdujo en *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 un vector con la proteína heteróloga Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Se utilizaron dos tipos de plásmidos que pretendían silenciar el gen *nblA* cuya proteína degrada los ficobilisomas en ausencia de nutrientes

nitrogenados, dando lugar a colonias no blanqueadas. Los resultados mostraron que la expresión transitoria de Cas9, es mejor que la expresión permanente que provoca toxicidad (Wendt et al., 2016). Debido a las limitaciones de CRISPR-Cas9 en cianobacterias se ha aplicado el sistema CRISPR-Cas12a (también llamado Cpf1) que no provoca toxicidad. Se construyó un vector (pSL2680) a partir del plásmido de amplio rango de huéspedes RSF1010, para la introducción de Cas12a y diferentes ARNg para generar varias mutaciones en *Synechococcus* UTEX 2973. Se observó que el sistema funciona eficazmente para la generación de cepas sin marcadores, aunque la curación del sistema CRISPR-Cas12a aún está por conseguir (Ungerer & Pakrasi, 2016).

Finalmente, CRISPR de interferencia (CRISPRi), es una variante sintética que utiliza proteínas Cas desactivadas (dCas) de forma que, aunque son guiadas y se unen al ADN diana, no lo cortan, sino que bloquean a la ARN polimerasa inhibiendo la transcripción (Qi et al., 2013). Este sistema tiene la ventaja de que la represión es reversible a partir de la fusión de un activador en la proteína Cas y la ARN polimerasa. En cianobacterias CRISPRi ha sido introducida con éxito para la represión de genes esenciales o para reprimir simultáneamente varios genes (Yao et al., 2016). En *Anabaena* sp. PCC 7120, se consiguió reprimir el gen esencial *glnA* (glutamina sintetasa) para redirigir el metabolismo hacia la producción de amonio (Higo et al., 2018a).

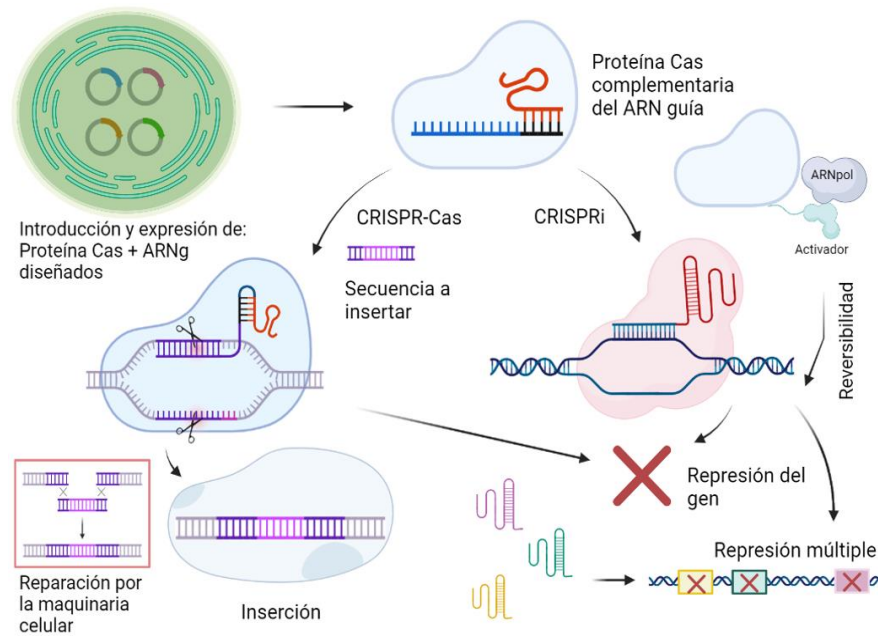


Figura 12. Esquema representativo de CRISPR-Cas y CRISPRi, en biología sintética mediante la introducción y expresión de ARN guías y proteínas Cas diseñadas complementarias. En CRISPR-Cas, además, puede introducirse una secuencia de inserción deseada. En CRISPRi, la proteína Cas no es funcional y produce la inactivación del gen. Puede darse represión múltiple mediante la introducción de varios ARN guías. Creación en BioRender.com

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA EN CIANOBACTERIAS

Dentro de las aplicaciones de la biología sintética en cianobacterias, además de ser potentes organismos modelo en investigación, destaca la producción de diversos compuestos a gran escala. Para ello, por un lado, se pueden desviar las rutas metabólicas hacia la síntesis de moléculas de interés. Por ejemplo, para la síntesis de biocombustibles, dentro de la ruta del carbono pueden ser puntos de control interesantes; la vía glucolítica para producir etanol o isobutanol, la vía de síntesis de ácidos grasos para la producción de acetona o 1-butanol entre otros [Figura 13] (Sahasrabuddhe et al., 2022).

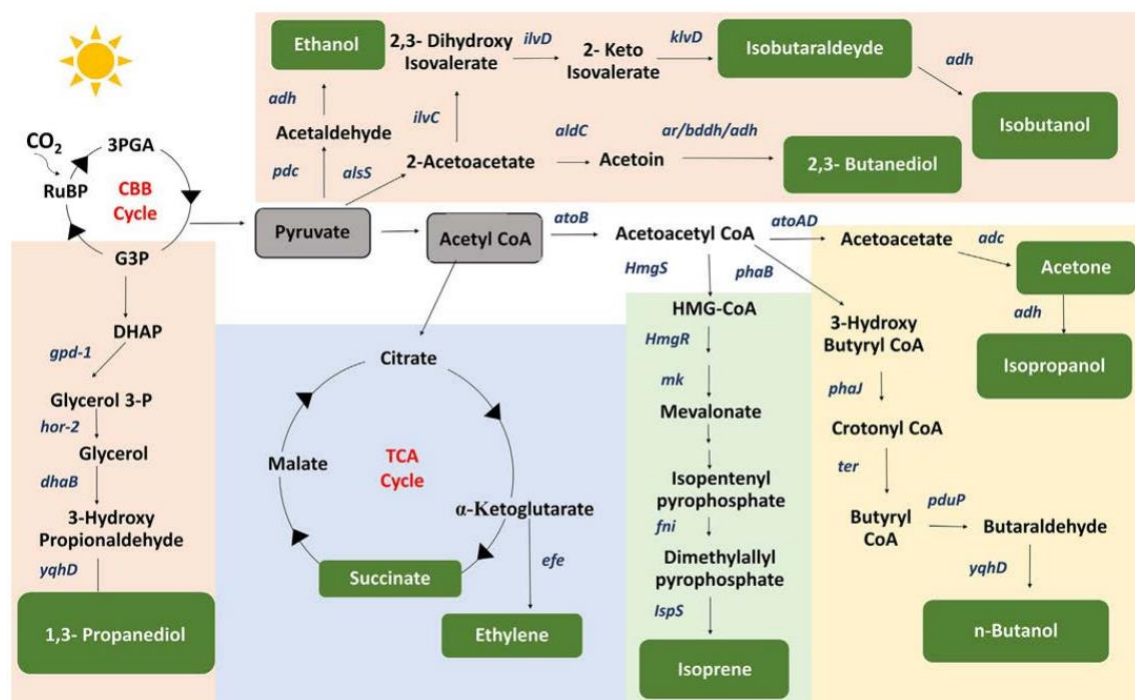


Figura 13. Esquema de producción de diferentes compuestos como potenciales biocombustibles a partir de diferentes vías metabólicas nativas o heterólogas. En los recuadros grises se encuentran el piruvato y el Acetil-CoA como nodos importantes. En los recuadros verdes los potenciales biocombustibles. Extraído de la figura 4 de Sahasrabuddhe et al., 2022.

Por otro lado, se puede optar por la producción heteróloga o sintética bien establecida de compuestos de interés en huéspedes compatibles, de manera que sea más eficiente, a la vez que económica y sostenible que las cepas heterótrofas actuales (Khan et al., 2019).

También resulta interesante para la industria alimentaria, farmacéutica o de materiales, la producción de azúcares como el glucógeno o la sacarosa, el ácido láctico o el 3-hidroxi propionato, un precursor de homo- y heteropolímeros para la síntesis de bioplásticos o acrilamida.

Finalmente, la biomasa generada durante los procesos de producción puede ser reutilizada u optimizada con los requerimientos nutricionales deseados para su uso como fertilizante en agricultura o alimento para el ganado (Santos-Merino et al., 2019).

CONCLUSIONES

La perspectiva de la biología sintética ha hecho posible un avance notable en investigación, al contribuir con alternativas novedosas y aportar una nueva forma de trabajar y abordar los problemas. Con ello, permite solucionar desafíos estancados e implementar un sistema de trabajo más rápido y sencillo, al reducir los parámetros y contar con estándares a la carta previamente caracterizados. En definitiva, dependiendo del contexto, unos diseños serán más óptimos que otros permitiendo ajustar a cada caso el modelo deseado.

La aplicación de la biología sintética en cianobacterias resulta de enorme interés al poder proporcionar alternativas distintas a las de otros modelos clásicos utilizados con anterioridad. En la actualidad, se busca la optimización de los modelos y alternativas más eficientes. Cada vez son más atractivos aquellos basados en energías renovables como la luz solar, no sólo por ser más sostenibles, sino porque abaratan los costes. Las cianobacterias cumplen estos requerimientos, ya que además de ser procariotas y fotoautótrofas, muchas cepas fijan N₂ o presentan multitud de metabolitos secundarios interesantes, así como relojes endógenos, entre otras particularidades.

Una de las herramientas más versátiles son los plásmidos modulares, que cumplen los principios de estandarización y modularidad gracias al intercambio de piezas (módulos) fácilmente. Por otro lado, la recopilación y la utilización de partes genéticas que funcionen igual en todos los modelos permitirá trabajar de forma más efectiva y traslacional. Respecto a la tecnología CRISPR, CRISPR-Cas y CRISPRi, se presentan como alternativas prometedoras para una edición genética rápida de cianobacterias, aunque su aplicación en estos microorganismos todavía está en desarrollo. Para un avance más rápido, las herramientas *in silico*, los modelos matemáticos, el desarrollo de métodos de ensamblaje, junto con la unificación de los avances en bases de datos comunes, serían de gran ayuda.

Si bien es cierto, el conocimiento de la biología de las cianobacterias es amplio, todavía es necesario un avance en la genética de estos organismos y las vías metabólicas subyacentes. El estudio en profundidad de las cepas clásicas resolvería gran parte de las incógnitas, y permitiría enfocar los esfuerzos hacia otras especies cianobacterianas con diferentes metabolismos y estructuras. Todo ello ampliaría no sólo la caja de partes genéticas y herramientas, sino la existencia de otras alternativas y otros modelos de interés.

A su vez, la aplicación de los resultados exitosos debe ir acompañados de responsabilidades éticas, así como controles de calidad y seguridad lo más ajustados a la realidad, para evitar posibles problemas. Al estar trabajando con organismos vivos, el componente evolutivo y la capacidad escasa de predicción con la que se cuenta pueden tener efectos no deseados en los diseños.

Finalmente, los resultados hasta hoy han sido prometedores y podrían ser clave ante la necesidad de nuevas alternativas y soluciones. Dado que en los organismos heterótrofos clásicos como *E. coli* o *S. cerevisiae* se han conseguido grandes éxitos, solo será cuestión de tiempo que la biología sintética en cianobacterias alcance tales resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Behle, A., Saake, P., Germann, A. T., Dienst, D., & Axmann, I. M. (2020). Comparative Dose-Response Analysis of Inducible Promoters in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 9(4), 843–855. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00505>
- Benner, S. A., & Sismour, A. M. (2005). Synthetic biology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 7, pp. 533–543). <https://doi.org/10.1038/nrg1637>
- Cai, Y., & Wolk, C. P. (1990). Use of a Conditionally Lethal Gene in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 To Select for Double Recombinants and To Entrap Insertion Sequences. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 172, Issue 6). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014). A brief history of synthetic biology. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Issue 5, pp. 381–390). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3239>
- Cheah, Y. E., Albers, S. C., & Peebles, C. A. M. (2013). A novel counter-selection method for markerless genetic modification in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology Progress*, 29(1), 23–30. <https://doi.org/10.1002/btpr.1661>
- Chen, Y., Taton, A., Go, M., London, R. E., Pieper, L. M., Golden, S. S., & Golden, J. W. (2016). Self-replicating shuttle vectors based on pANS, a small endogenous plasmid of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(12), 2029–2041. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000377>
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (Eds.). (2006). *The Prokaryotes*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3>
- Elani, Y. (2021). Interfacing Living and Synthetic Cells as an Emerging Frontier in Synthetic Biology. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 60, Issue 11, pp. 5602–5611). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/anie.202006941>
- Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. In *Nature* (Vol. 438, Issue 7067, pp. 449–453). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature04342>
- Ferreira, E. A., Pacheco, C. C., Pinto, F., Pereira, J., Lamosa, P., Oliveira, P., Kirov, B., Jaramillo, A., & Tamagnini, P. (2018). Expanding the toolbox for *Synechocystis* sp. PCC 6803: Validation of replicative vectors and characterization of a novel set of promoters. *Synthetic Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/synbio/ysy014>
- Fredens, J., Wang, K., de la Torre, D., Funke, L. F. H., Robertson, W. E., Christova, Y., Chia, T., Schmied, W. H., Dunkelmann, D. L., Beránek, V., Uttamapinant, C., Llamazares, A. G., Elliott, T. S., & Chin, J. W. (2019). Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature*, 569(7757), 514–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5>
- García-Pichel. (2009). Cyanobacteria. In: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, third ed. Academic Press, pp. 107–124, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00250-9>.

- Gardner, T. S., & Hawkins, K. (2013). Synthetic Biology: Evolution or revolution? A co-founder's perspective. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 17, Issue 6, pp. 871–877). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.09.013>
- Geyer, C. R., Battersby, T. R., & Benner, S. A. (2003). Nucleobase Pairing in Expanded Watson-Crick-like Genetic Information Systems. *Structure*, *11*(12), 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.11.008>
- 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., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z.-Q., Segall-Shapiro, T. H., ... Craig Venter, J. (2010). *Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome* (Vol. 17).
- Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y., Ehira, S., & Hisabori, T. (2018). Application of CRISPR Interference for Metabolic Engineering of the Heterocyst-Forming Multicellular Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant and Cell Physiology*, *59*(1), 119–127. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx166>
- Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y., & Hisabori, T. (2018). Spatio-Temporal Gene Induction Systems in the Heterocyst-Forming Multicellular Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant and Cell Physiology*, *59*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx163>
- Hoshika, S., Leal, N. A., Kim, M. J., Kim, M. S., Karalkar, N. B., Kim, H. J., Bates, A. M., Watkins, N. E., SantaLucia, H. A., Meyer, A. J., DasGupta, S., Piccirilli, J. A., Ellington, A. D., SantaLucia, J., Georgiadis, M. M., & Benner, S. A. (2019). Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science*, *363*(6429), 884–887. <https://doi.org/10.1126/science.aat0971>
- Huang, H. H., Camsund, D., Lindblad, P., & Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research*, *38*(8), 2577–2593. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq164>
- Hutchison, C. A., Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B. J., Ma, L., Pelletier, J. F., Qi, Z. Q., Richter, R. A., Strychalski, E. A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K. S., Smith, H. O., ... Venter, J. C. (2016). Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, *351*(6280). <https://doi.org/10.1126/science.aad6253>
- Kelly, C. L., Taylor, G. M., Hitchcock, A., Torres-Méndez, A., & Heap, J. T. (2018). A Rhamnose-Inducible System for Precise and Temporal Control of Gene Expression in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, *7*(4), 1056–1066. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00435>
- Khan, A. Z., Bilal, M., Mehmood, S., Sharma, A., & Iqbal, H. M. N. (2019). State-of-the-art genetic modalities to engineer cyanobacteria for sustainable biosynthesis of biofuel and fine-chemicals to meet bio-economy challenges. In *Life* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life9030054>

- Liu, D., & Pakrasi, H. B. (2018). Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0897-8>
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W. R., & Muro-Pastor, A. M. (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20130–20135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112724108>
- Nakahira, Y., Ogawa, A., Asano, H., Oyama, T., & Tozawa, Y. (2013). Theophylline-dependent riboswitch as a novel genetic tool for strict regulation of protein expression in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant and Cell Physiology*, 54(10), 1724–1735. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct115>
- Opel, F., Siebert, N. A., Klatt, S., Tüllinghoff, A., Hantke, J. G., Toepel, J., Bühler, B., Nürnberg, D. J., & Klähn, S. (2022). Generation of Synthetic Shuttle Vectors Enabling Modular Genetic Engineering of Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, [acssynbio.1c00605](https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00605). <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00605>
- Patharaprachayakul, N., Lee, M., Incharoensakdi, A., & Woo, H. M. (2020). Current understanding of the cyanobacterial CRISPR-Cas systems and development of the synthetic CRISPR-Cas systems for cyanobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109619>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Ro, D. K., Paradise, E. M., Quellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C. Y., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., & Keasling, J. D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440(7086), 940–943. <https://doi.org/10.1038/nature04640>
- Sahasrabuddhe, D., Sengupta, A., Sengupta, S., Mishra, V., & Wangikar, P. P. (2022). Cyanobacteria as a renewable resource for biofuel production. In *Advanced Biofuel Technologies* (pp. 475–499). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-88427-3.00006-4>
- Santos-Merino, M., Singh, A. K., & Ducat, D. C. (2019). New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033>
- Schmidt, M., Kelle, A., Ganguli-Mitra, A., & de Vriend, H. (2009). Synthetic biology: The technoscience and its societal consequences. In *Synthetic Biology: The Technoscience and Its Societal Consequences*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2678-1>

- Sengupta, A., Pakrasi, H. B., & Wangikar, P. P. (2018). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 13, pp. 5457–5471). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9046-x>
- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5>
- Taton, A., Ma, A. T., Ota, M., Golden, S. S., & Golden, J. W. (2017). NOT Gate Genetic Circuits to Control Gene Expression in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 6(12), 2175–2182. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00203>
- Taton, A., Unglaub, F., Wright, N. E., Zeng, W. Y., Paz-Yepes, J., Brahamsha, B., Palenik, B., Peterson, T. C., Haerizadeh, F., Golden, S. S., & Golden, J. W. (2014). Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Research*, 42(17). <https://doi.org/10.1093/nar/gku673>
- Ungerer, J., & Pakrasi, H. B. (2016). Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep39681>
- Vavitsas, K., Kugler, A., Satta, A., Hatzinikolaou, D. G., Lindblad, P., Fewer, D. P., Lindberg, P., Toivari, M., & Stensjö, K. (2021). Doing synthetic biology with photosynthetic microorganisms. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 624–638. <https://doi.org/10.1111/ppl.13455>
- Waks, Z., & Silver, P. A. (2009). Engineering a synthetic dual-organism system for hydrogen production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1867–1875. <https://doi.org/10.1128/AEM.02009-08>
- Wang, B., Eckert, C., Maness, P. C., & Yu, J. (2018). A Genetic Toolbox for Modulating the Expression of Heterologous Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synthetic Biology*, 7(1), 276–286. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00297>
- Wang, B., Wang, J., & Meldrum, D. R. (2012). Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00344>
- Wang, F., Gao, Y., & Yang, G. (2020). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria for improved chemicals production. In *Bioengineered* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1208–1220). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1837458>
- Way, J. C., Collins, J. J., Keasling, J. D., & Silver, P. A. (2014). Integrating biological redesign: Where synthetic biology came from and where it needs to go. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1, pp. 151–161). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.039>
- Wegelius, A., Li, X., Turco, F., & Stensjö, K. (2018). Design and characterization of a synthetic minimal promoter for heterocyst-specific expression in filamentous cyanobacteria. *PLoS ONE*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203898>
- Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H., & Pakrasi, H. B. (2016). CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus*

elongatus UTEX 2973. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0514-7>

Yao, L., Cengic, I., Anfelt, J., & Hudson, E. P. (2016). Multiple Gene Repression in Cyanobacteria Using CRISPRi. *ACS Synthetic Biology*, 5(3), 207–212. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00264>

Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhu, Y., Bao, G., Zhang, Y., Li, Y., & Ma, Y. (2014). Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04500>