

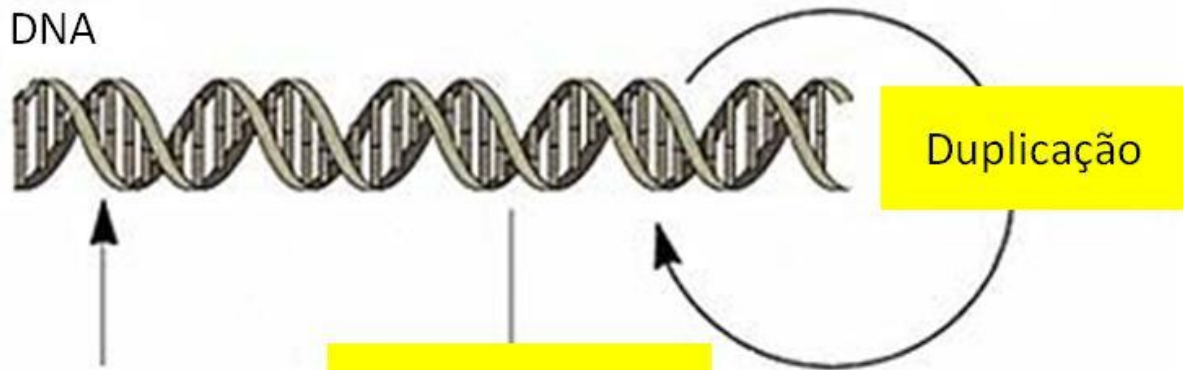
Estudos das *ômicas*:

- ✓ Genômica;
- ✓ Transcriptômica;
- ✓ Metagenômica

Aula 7

DOGMA DA GENÉTICA MOLECULAR

Genoma



Transcriptase Reversa

Transcriptoma



Tradução

Proteoma

Proteína

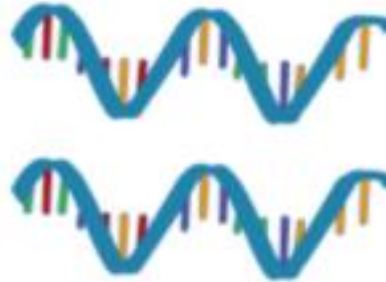


DOGMA DA GENÉTICA MOLECULAR

Genômica



Transcriptômica



Proteômica



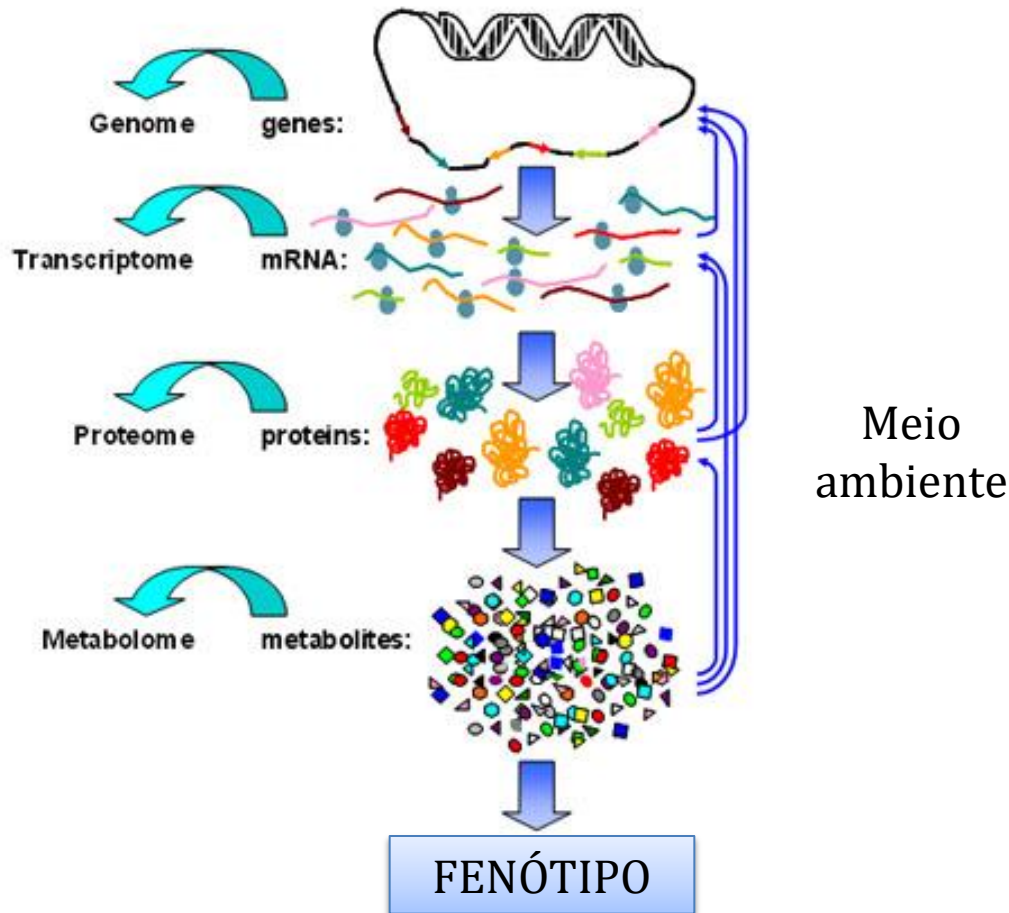
> Replicase polyprotein 1ab, P19811
MATFSATGFG GSFVRDWSLD LPDACE-
HGAG LCCEVDGSTL CAECFRGCEG M

Regiões codantes, introns,
exons, regiões regulatórias

mRNA, e todas as versões
de *splicing* alternativos

Proteínas
(aminoácidos)

Avanços tecnológicos dos últimos anos permitiram o surgimento de uma nova era nas pesquisas: **A Era das Ômicas.**



Em um organismo somente o genoma permanece constante, independente do estágio de desenvolvimento, tecido e ou condição ambiental!

conjunto de todas as características observáveis – que são influenciadas tanto por seu genótipo quanto pelo ambiente



Diferentes estímulos podem afetar diretamente o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma.

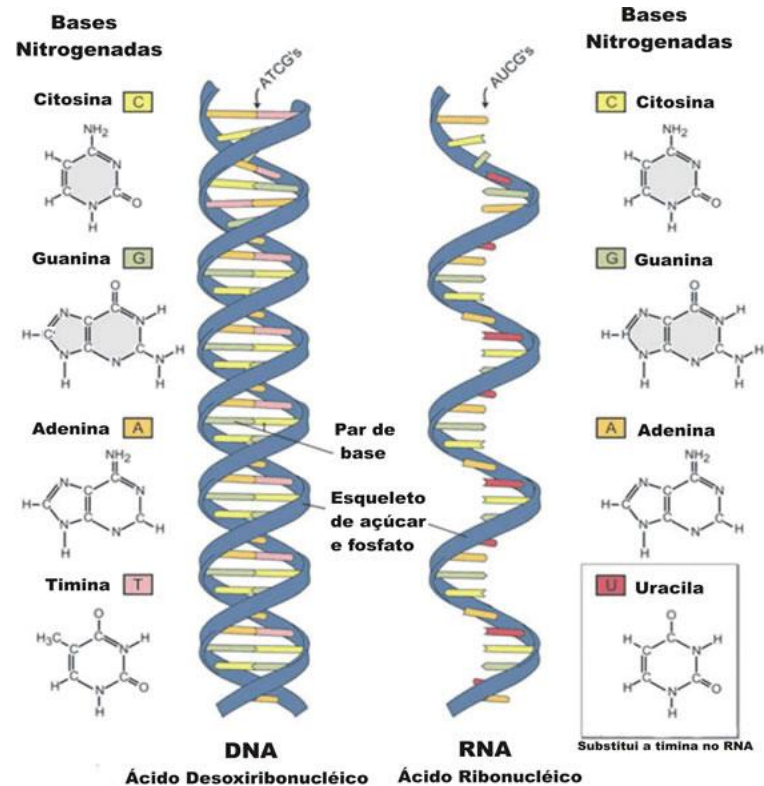


DNA E RNA:

1- O que são?

2- Qual a estrutura?

São ácidos nucleicos, encontrados em todas as células. Esses estão envolvidos na transmissão de **caracteres hereditários** e na produção de proteínas

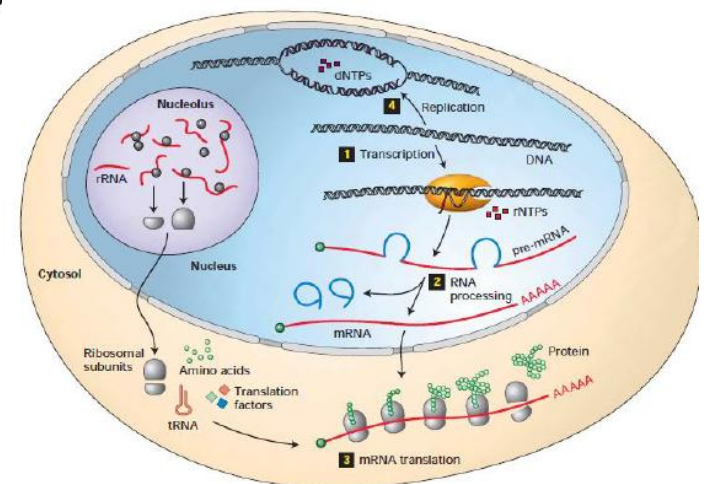
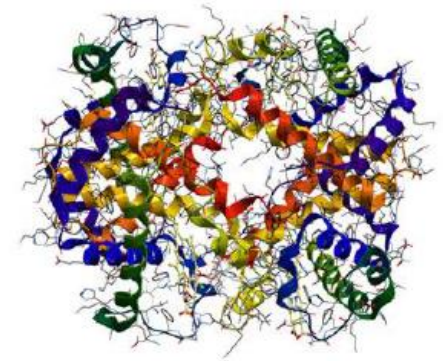
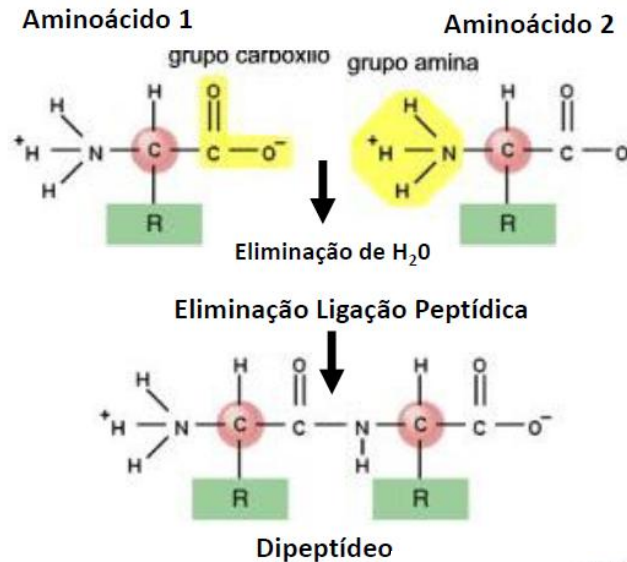


Proteínas:

1- O que são?

2- Qual a estrutura?

São moléculas orgânicas de estrutura complexa e Massa Molecular elevada. São sintetizados pelos organismos vivos através de ligações peptídicas covalentes entre aminoácidos. Funções: Enzimas, anticorpos, componentes estruturais.

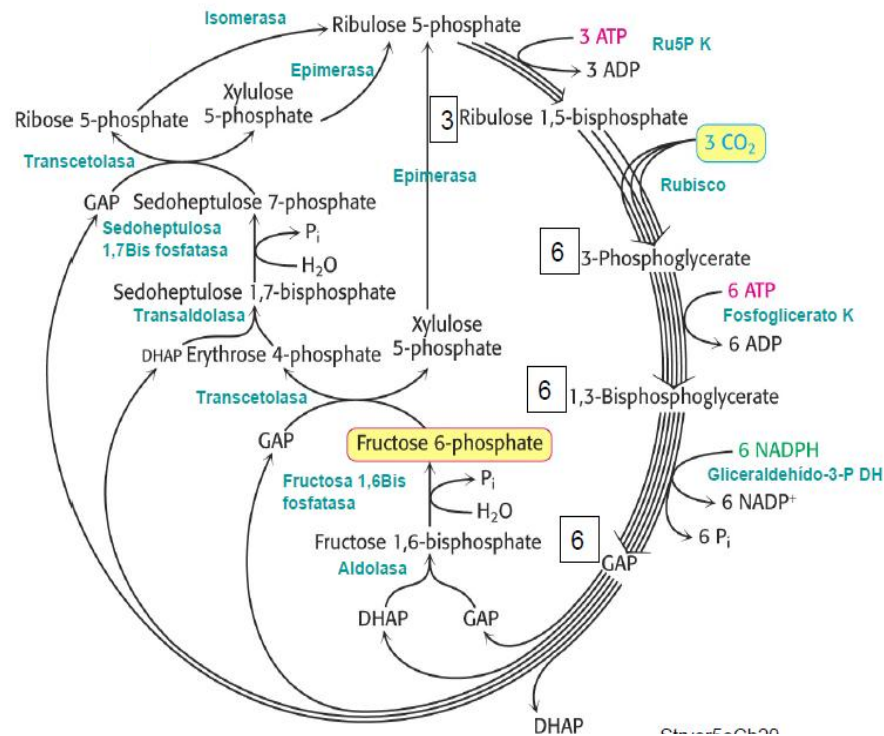
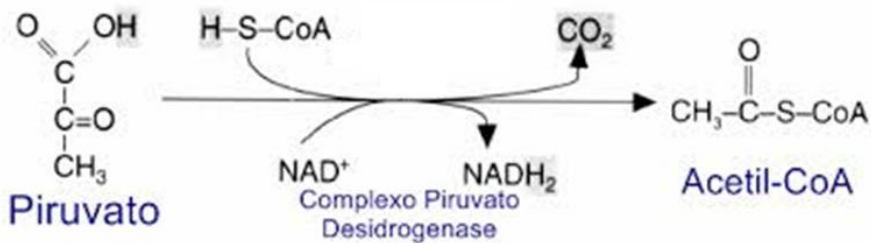


Metabólitos: 1- O que são?

2- Qual a estrutura?

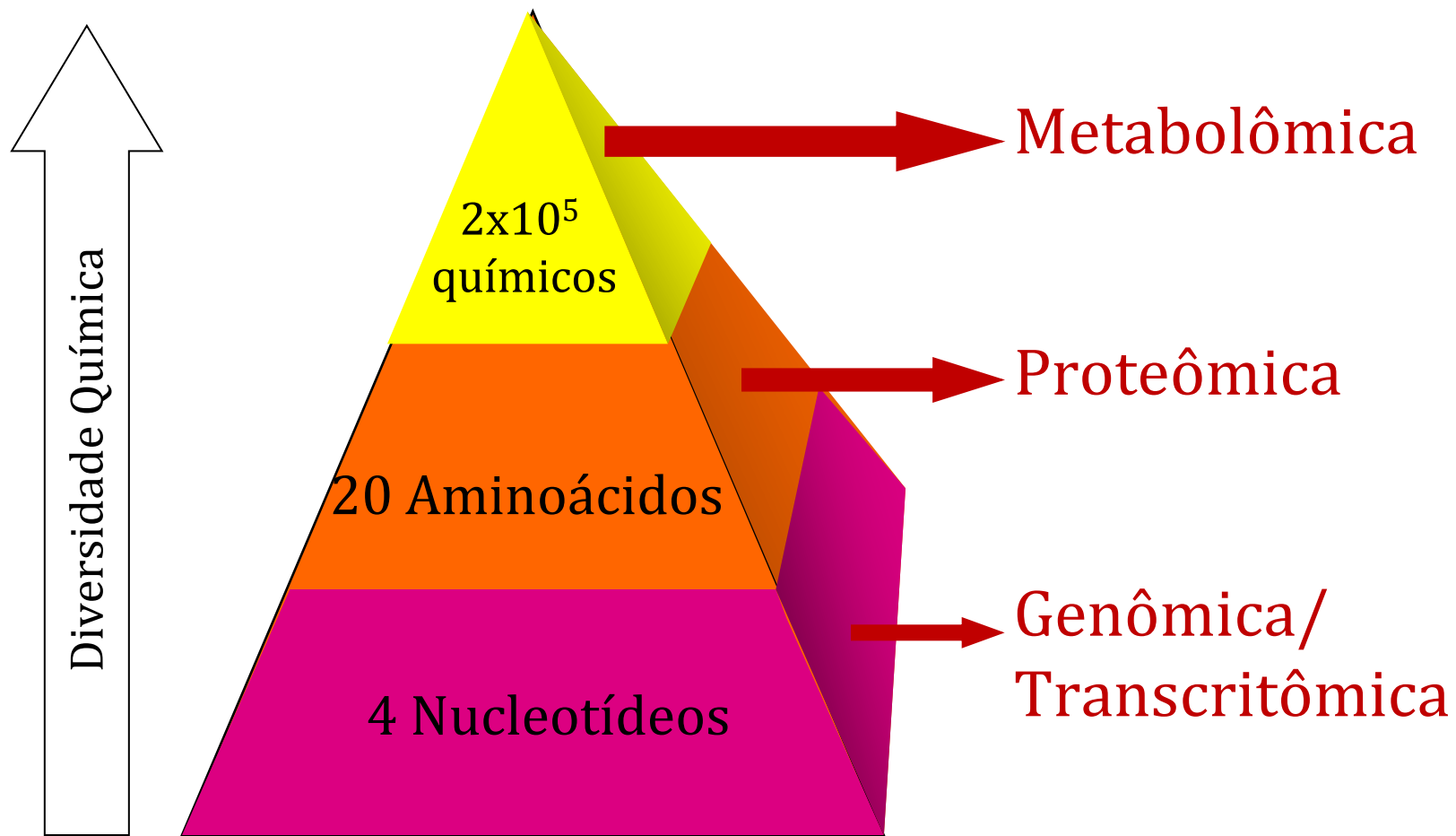
Carboidratos
Alcoois
Aminoácidos
Ácidos orgânicos
Lipídios

Metabólitos são os intermediários (substratos, cofatores) e produtos do metabolismo!



Ciclo de Calvin

DIFICULDADE DOS ESTUDOS DAS "ÔMICAS"



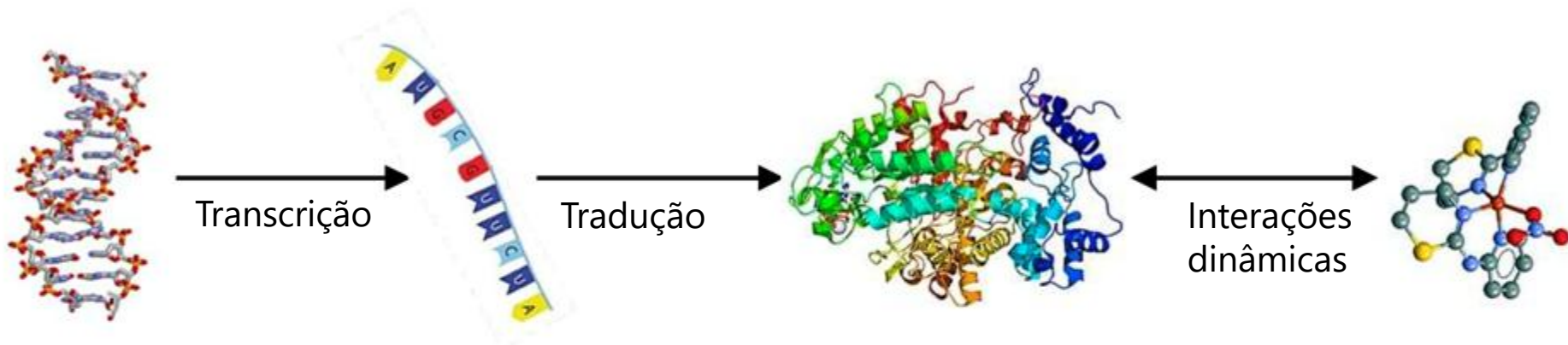
A pirâmide da vida

Genômica
DNA

Transcriptômica
mRNA

Proteômica
proteínas

Metabolômica
metabólitos



Informação genética

Vias metabólicas

Genótipo

Fenótipo

SEQUÊNCIA

ESTRUTURA

FUNÇÃO

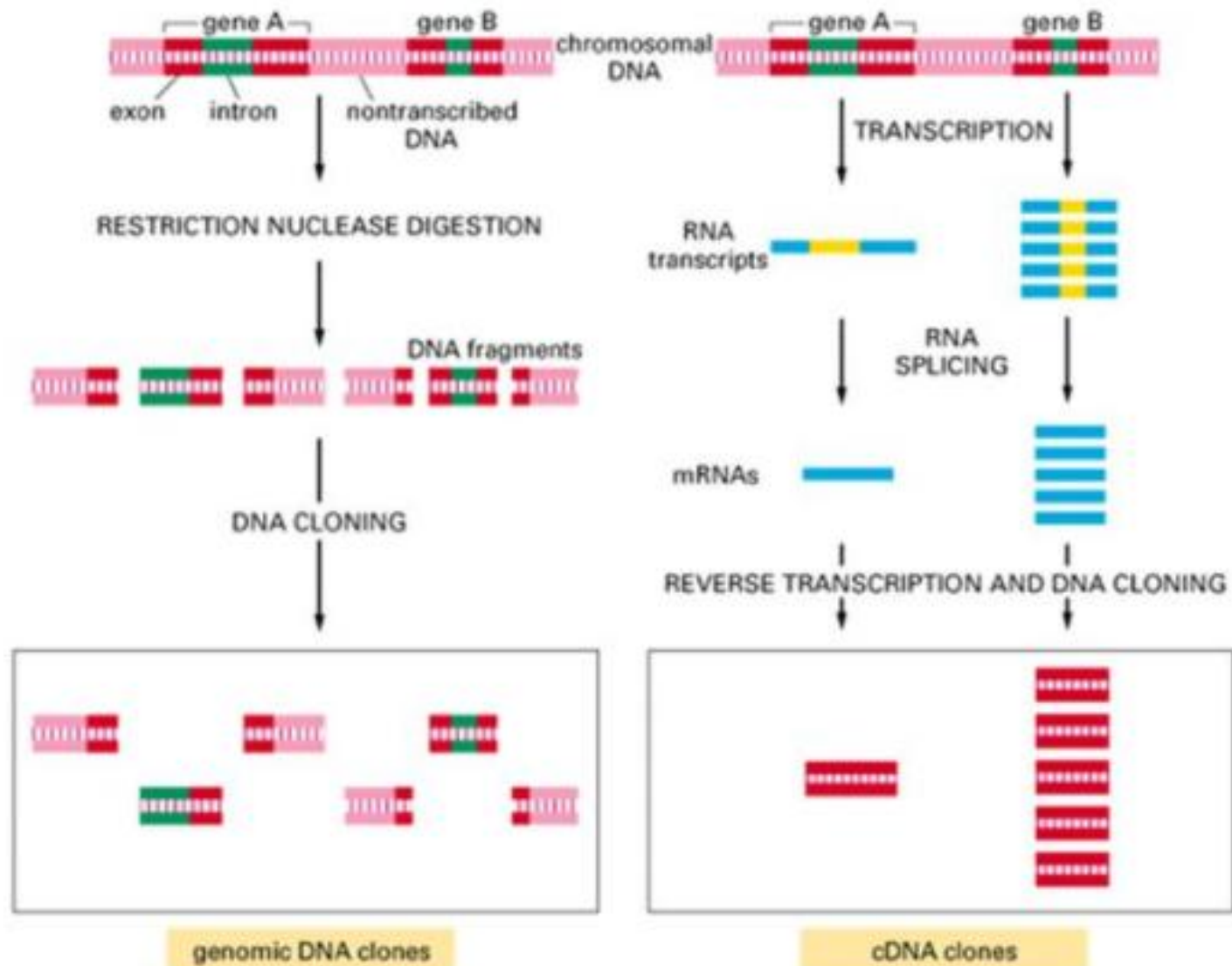
MAS COMO EU ESTUDO O GENOMA E TRANSCRIPTOMA?



SEQUENCIAMENTO DE DNA

- ✓ **Genômica:** coleção de clones de DNA representando o genoma de um organismo.
- ✓ **cDNA (Transcriptômica):** coleção de clones com insertos de DNA complementar (cDNA), sintetizados a partir de moléculas de mRNA de uma célula → ou seja, os genes que são expressos.

GENÔMICA X TRANSCRIPTOMICA



mRNA



Cauda poli (A)

SÍNTESE DE cDNA

TTTTTT

Primer oligo (dT)



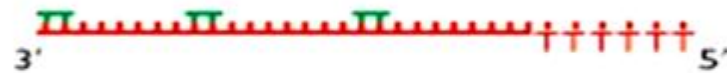
Síntese da primeira fita de DNA pela transcriptase reversa

RNA



Ribonuclease H degrada RNA

DNA



Síntese da segunda fita de DNA pela DNA polimerase I



Finalização da síntese da segunda fita de DNA



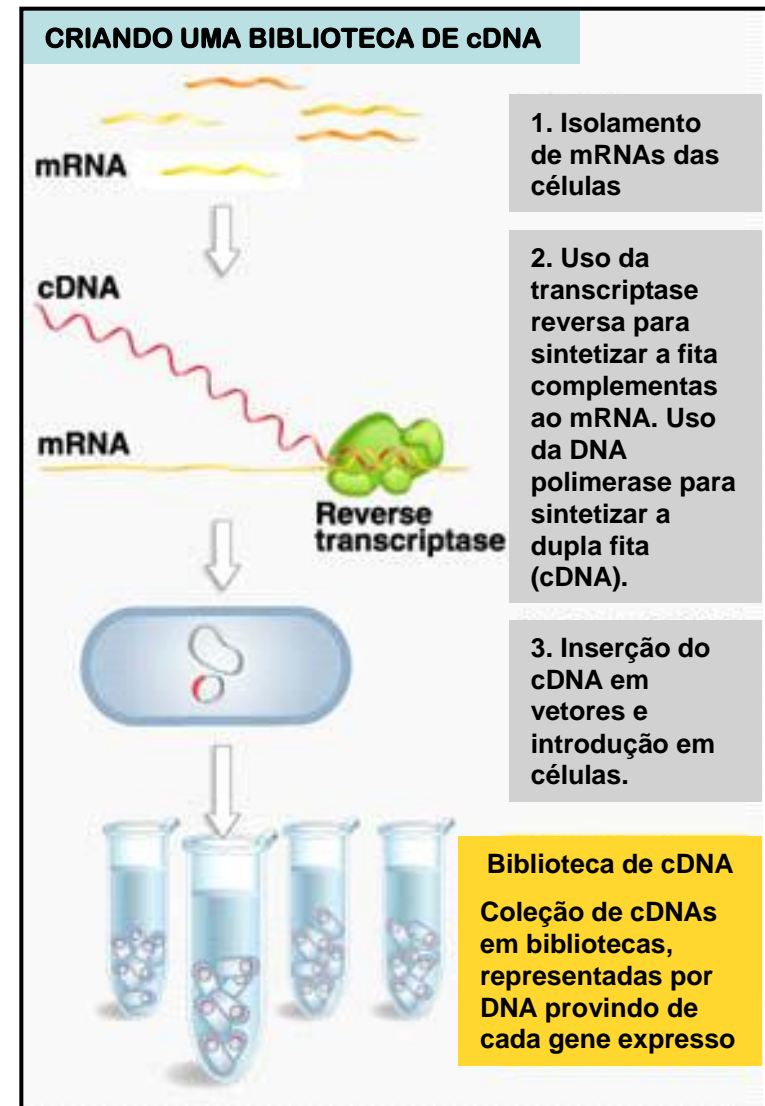
CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA

Esquema básico para construção de uma biblioteca de cDNA

Etapas:

- 1) Extração de **mRNA**
- 2) Síntese de **cDNA**
- 3) Ligação em vetores
- 4) Inserção em bactérias
- 5) Multiplicação (clones)

Vantagem: somente os genes expressos são selecionados.



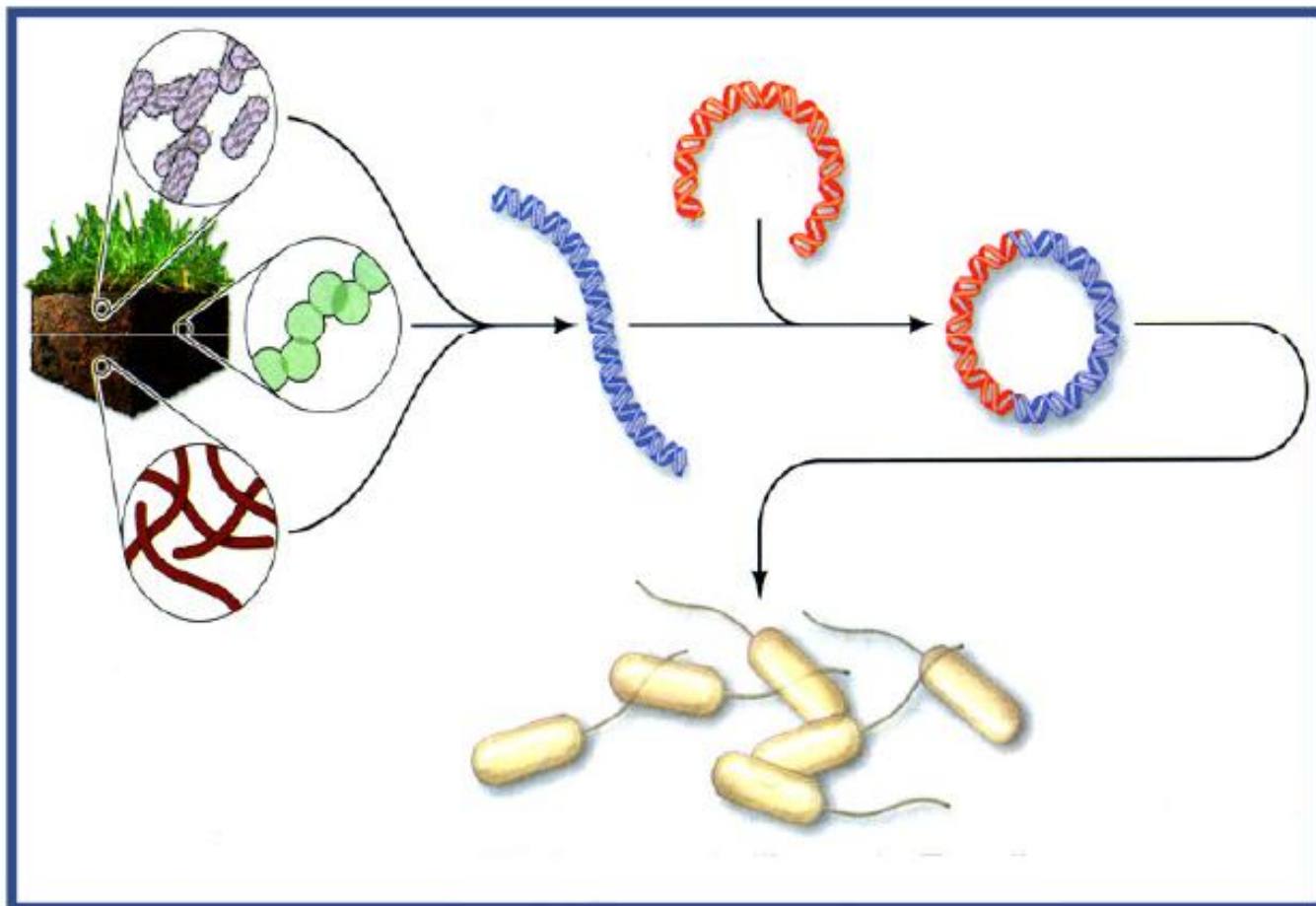
Qual é a melhor estratégia sequenciar DNA ou de cDNA?



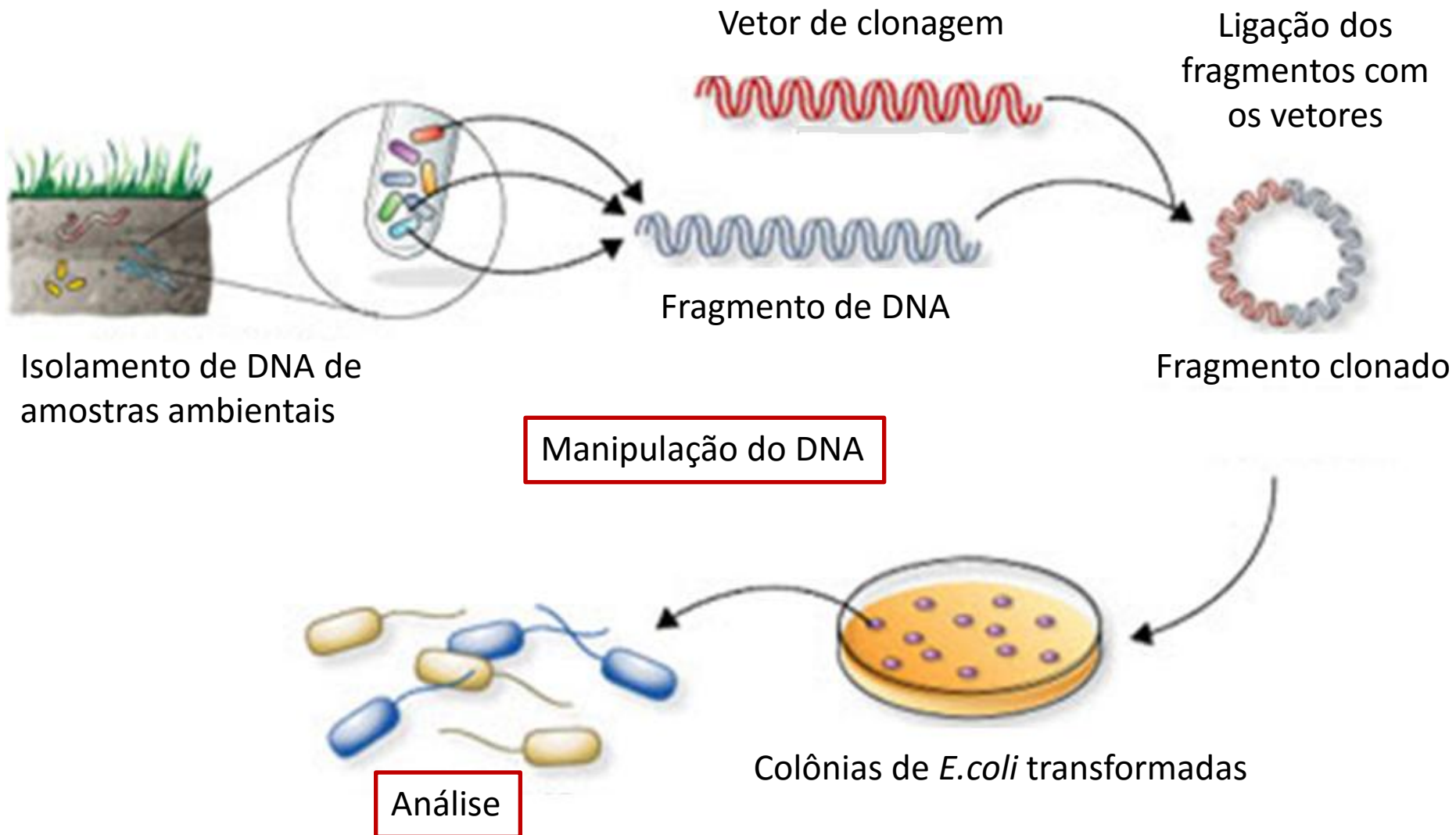
Depende de seu objetivo!

METAGENÔMICA

Metagenoma é o nome dado ao **genoma** coletivo da **microbiota** total encontrada em um determinado **habitat**.



CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA



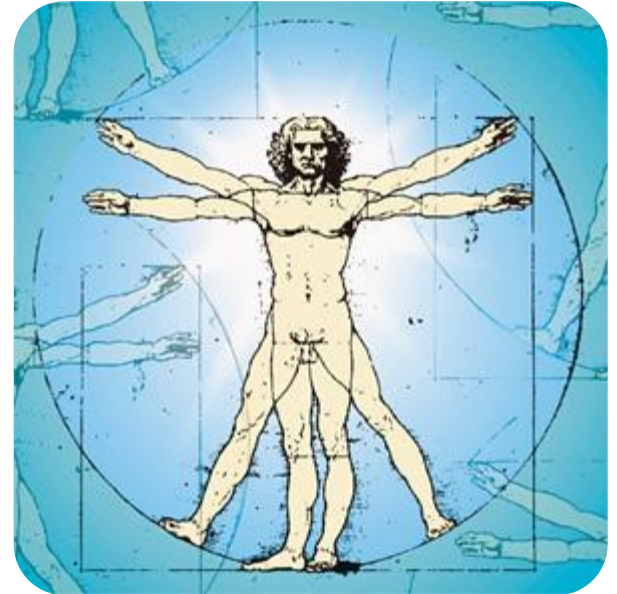
COMPLEXIDADE MICROBIANA



***10⁹ células micrbianas
por grama***

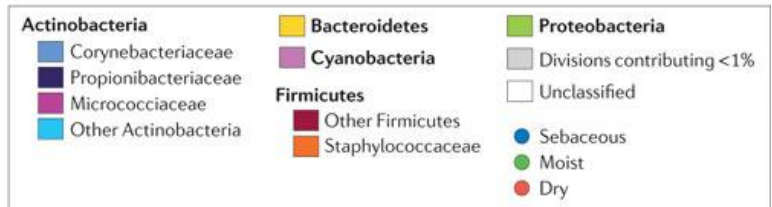
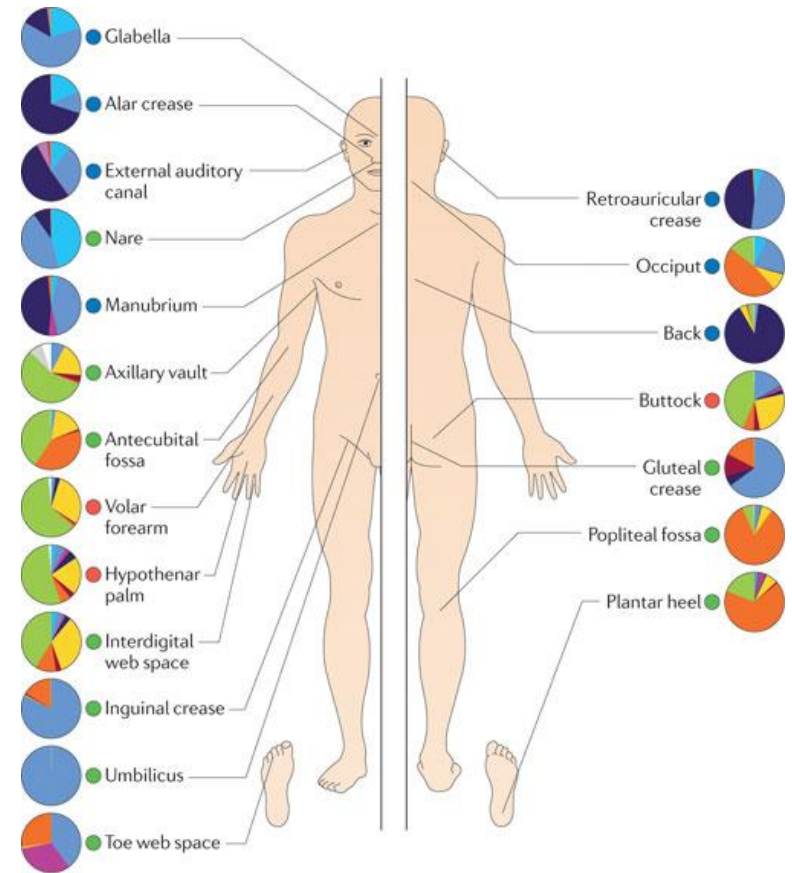


***10⁸ células
microbianas por mL***

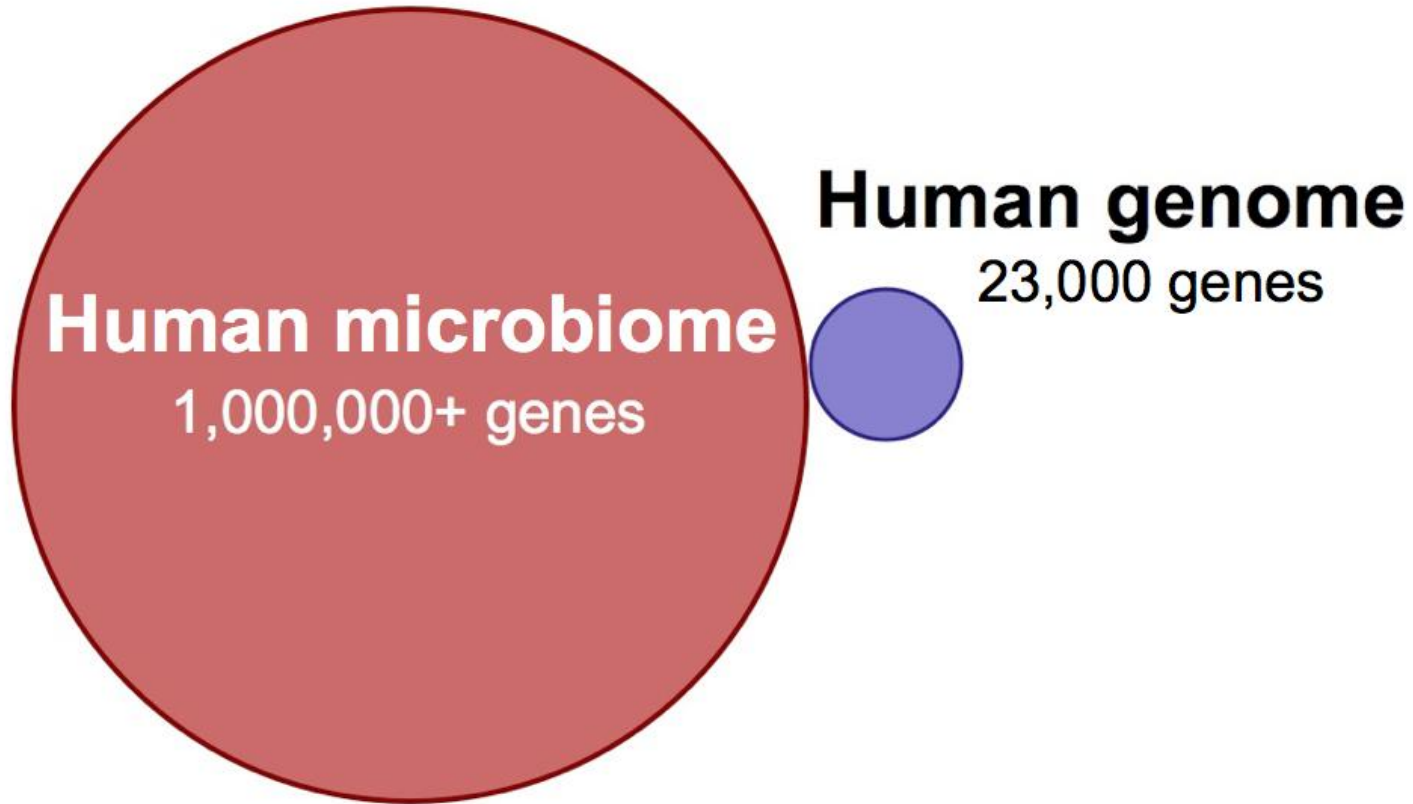


***Mais células microbianas do
que células humanas***

MICROBIOMA



MICROBIOMA



MICROBIOMA



MICROBIOMA



 earth
microbiome project





como obter as Sequências??

TECNOLOGIAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE DNA

Tecnologias de primeira geração:

- **Método Maxam & Gilbert (1977)***
 - *Método de degradação química*
- **Método Sanger (1977)**
 - *Método enzimático, dideoxi ou de término da cadeia*
 - Síntese enzimática de uma fita complementar de DNA, cujo crescimento é interrompido pela adição de um dideoxinucleotídeo (ddNTP)

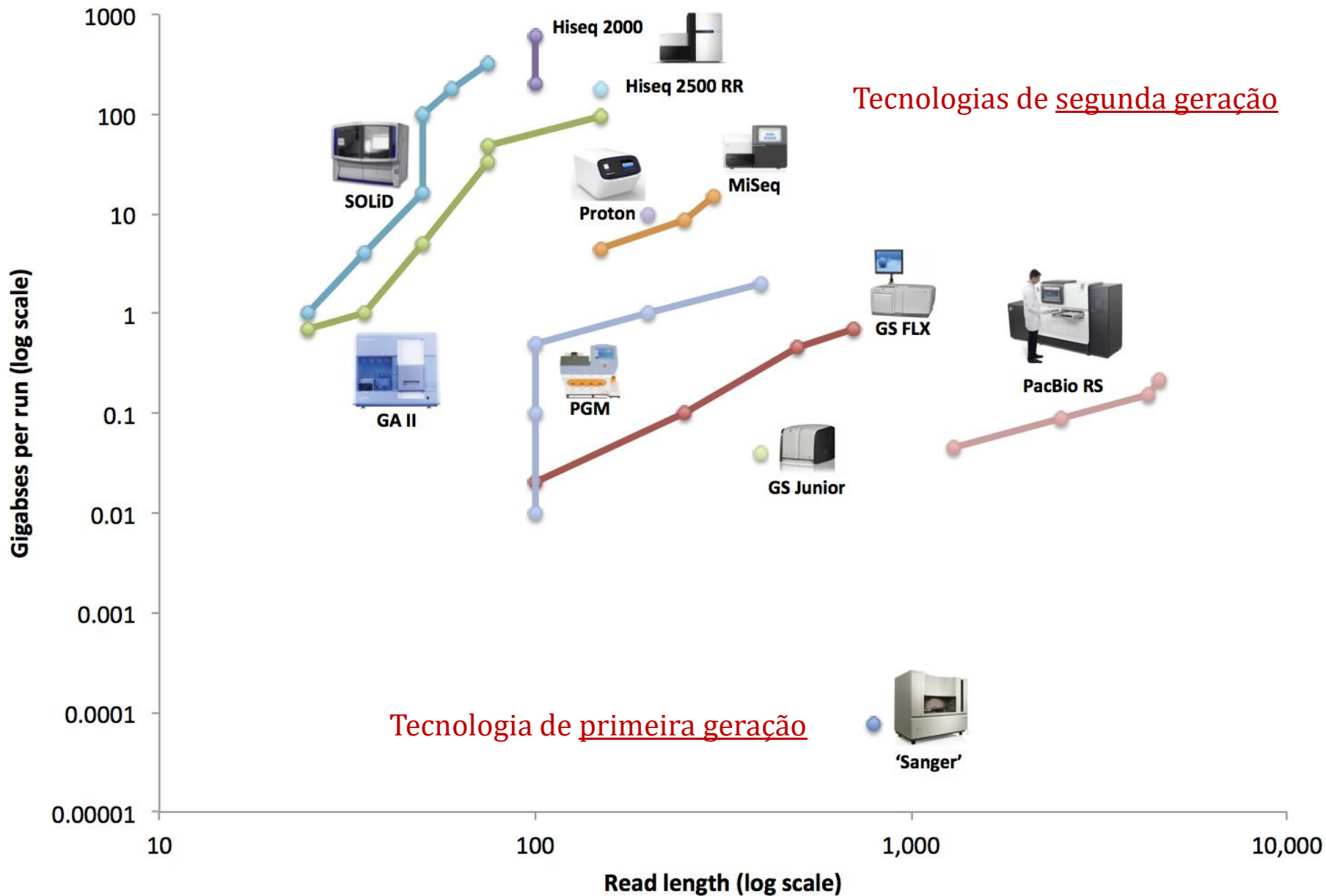


Frederick Sanger

Prêmio Nobel em Química (1980)

*Produtos tóxicos e perigosos à saúde, além da dificuldade de automatização, essencial para o sequenciamento de um genoma completo.

Developments in High Throughput Sequencing



ETAPAS DO SEQUENCIAMENTO DE DNA

Preparação do DNA



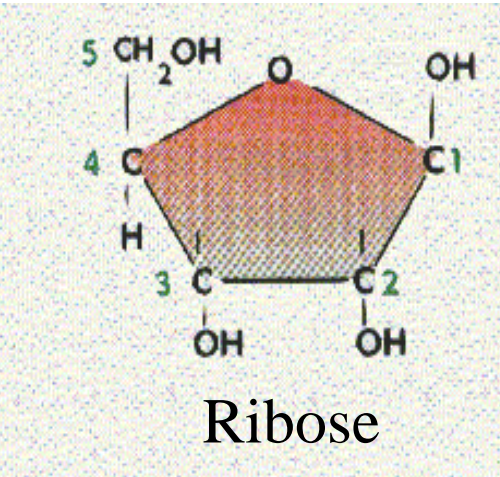
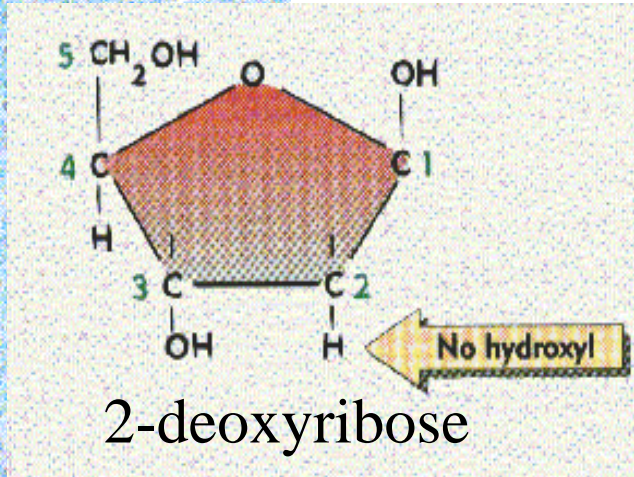
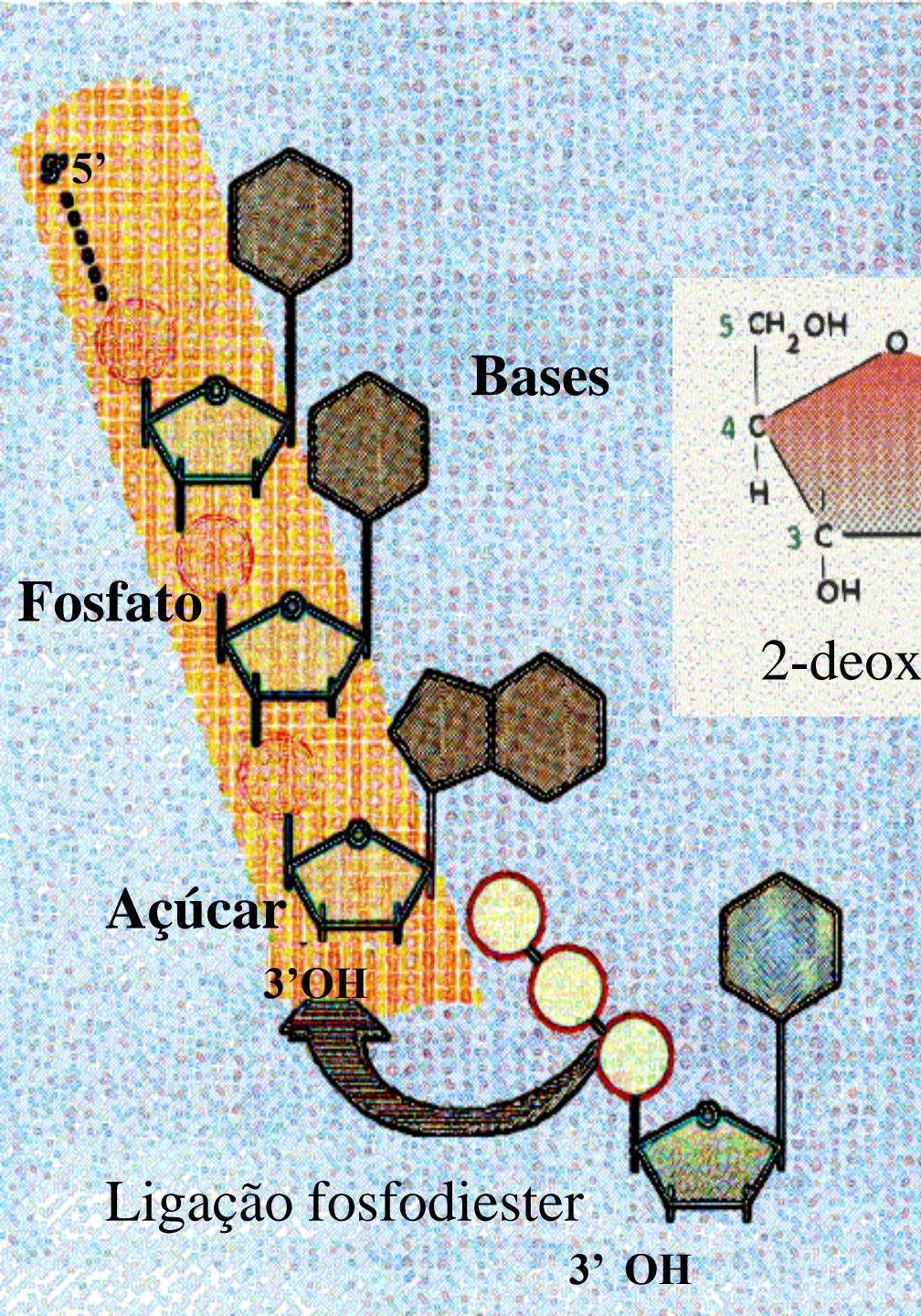
Reação de sequenciamento



Eletroforese capilar

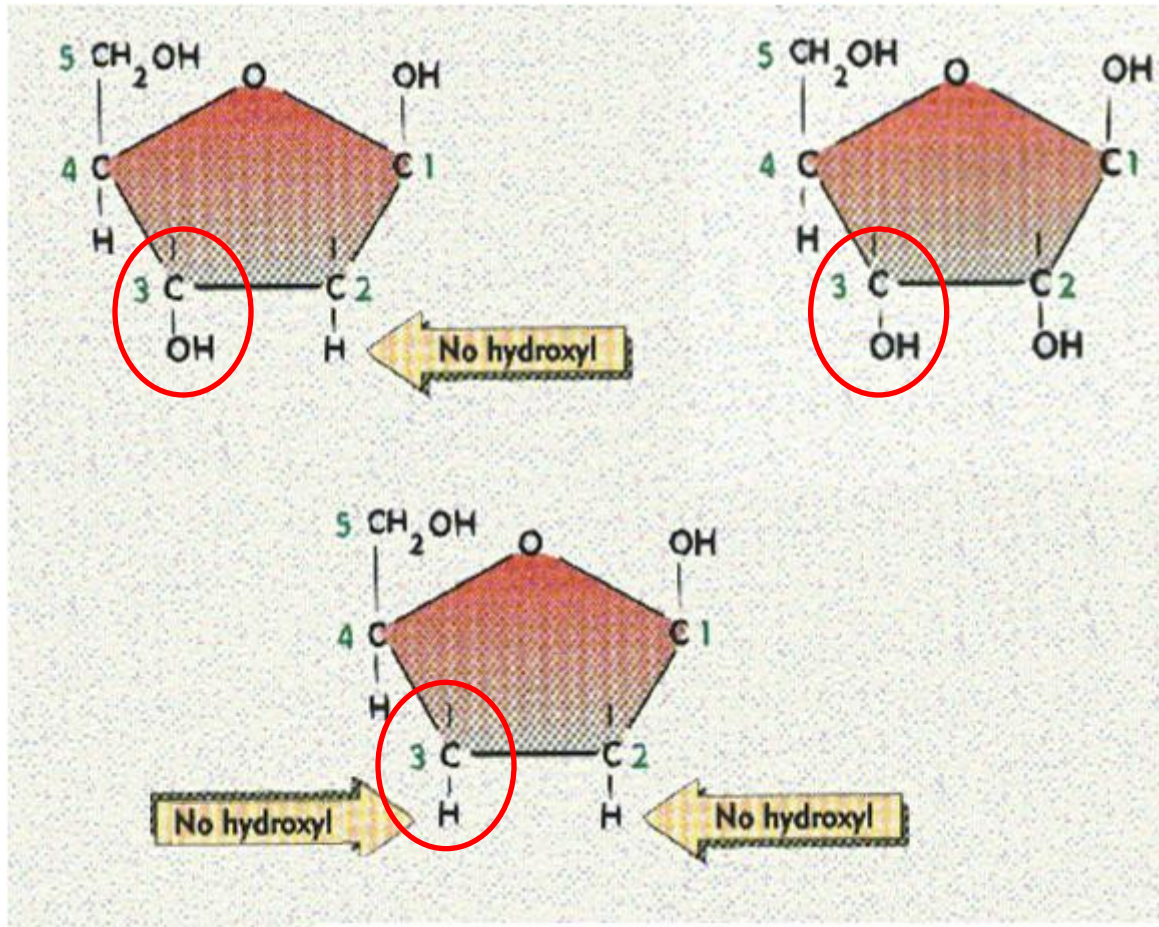


Análise computacional



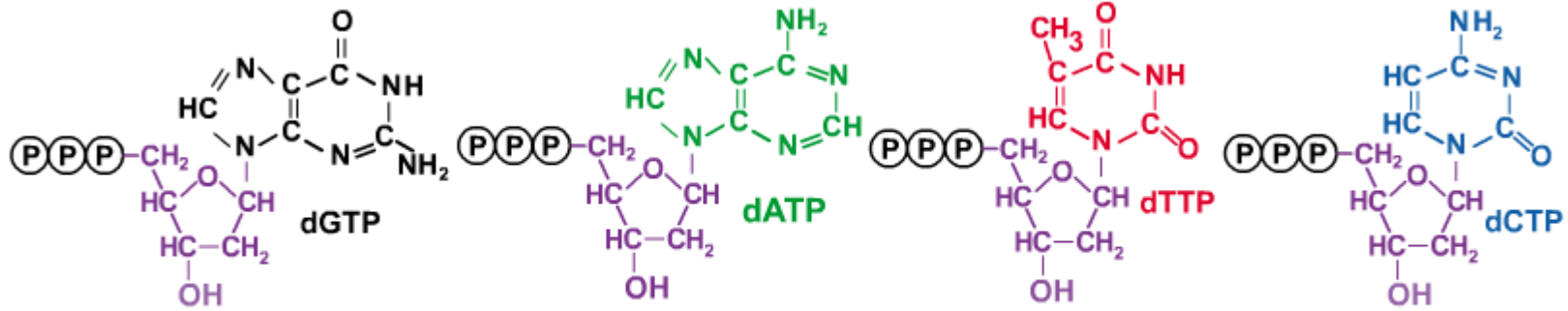
DESOXIRIBOSE

RIBOSE



DIDESOXIRIBOSE

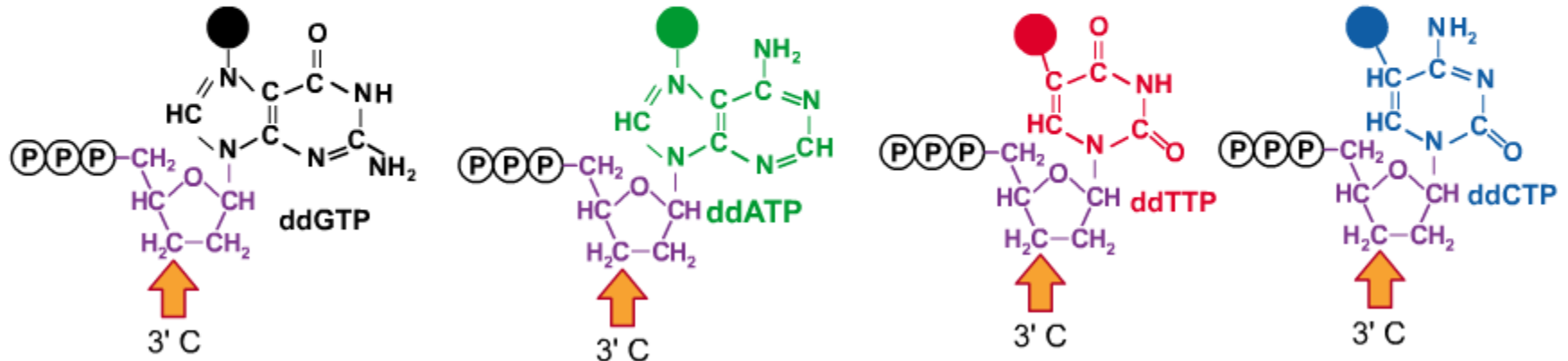
NUCLEOTÍDEOS dNTPs



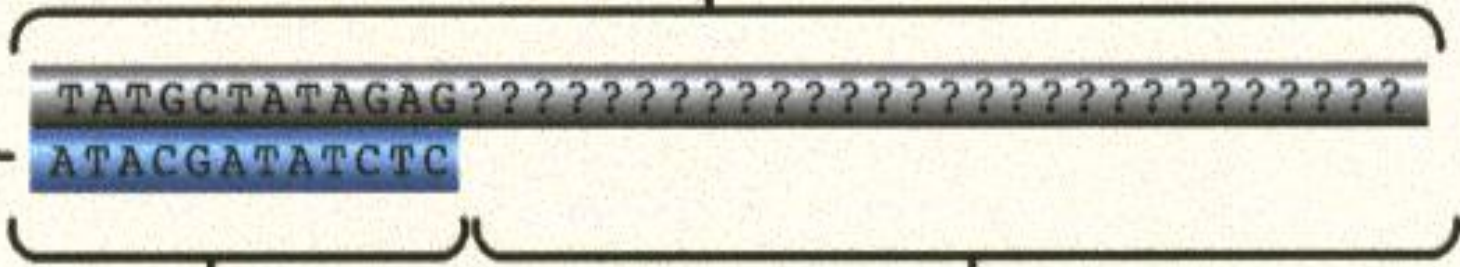
NUCLEOTÍDEOS ddNTPs (TERMINADORES)

CORANTE FLUORESCENTE

FALTA 3' OH



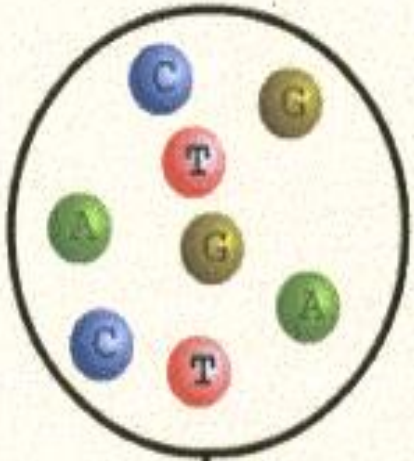
DNA



Primer

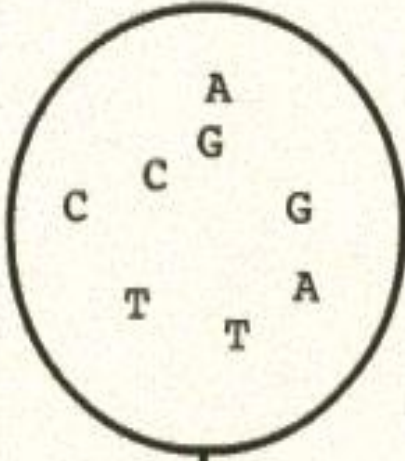
Sequência conhecida

Sequência desconhecida

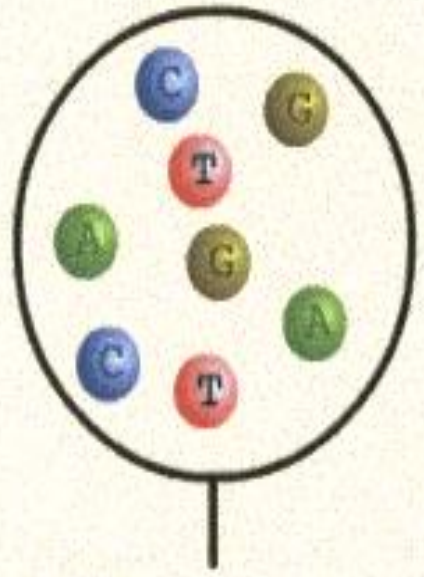


Terminadores

DNA polimerase

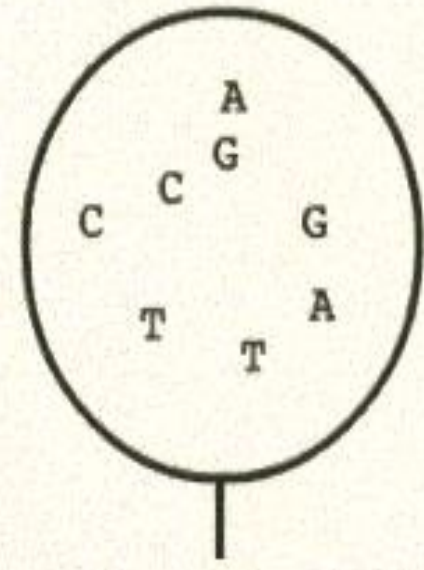


Nucleotídeos



Terminadores

DNA polimerase



Nucleotídeos

TATGCTATAGAG????????????????????

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTTTA A

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCT A

ATACGATATCTCGACTCT G

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTT T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA T T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTTTAAGGCA T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTTTA A

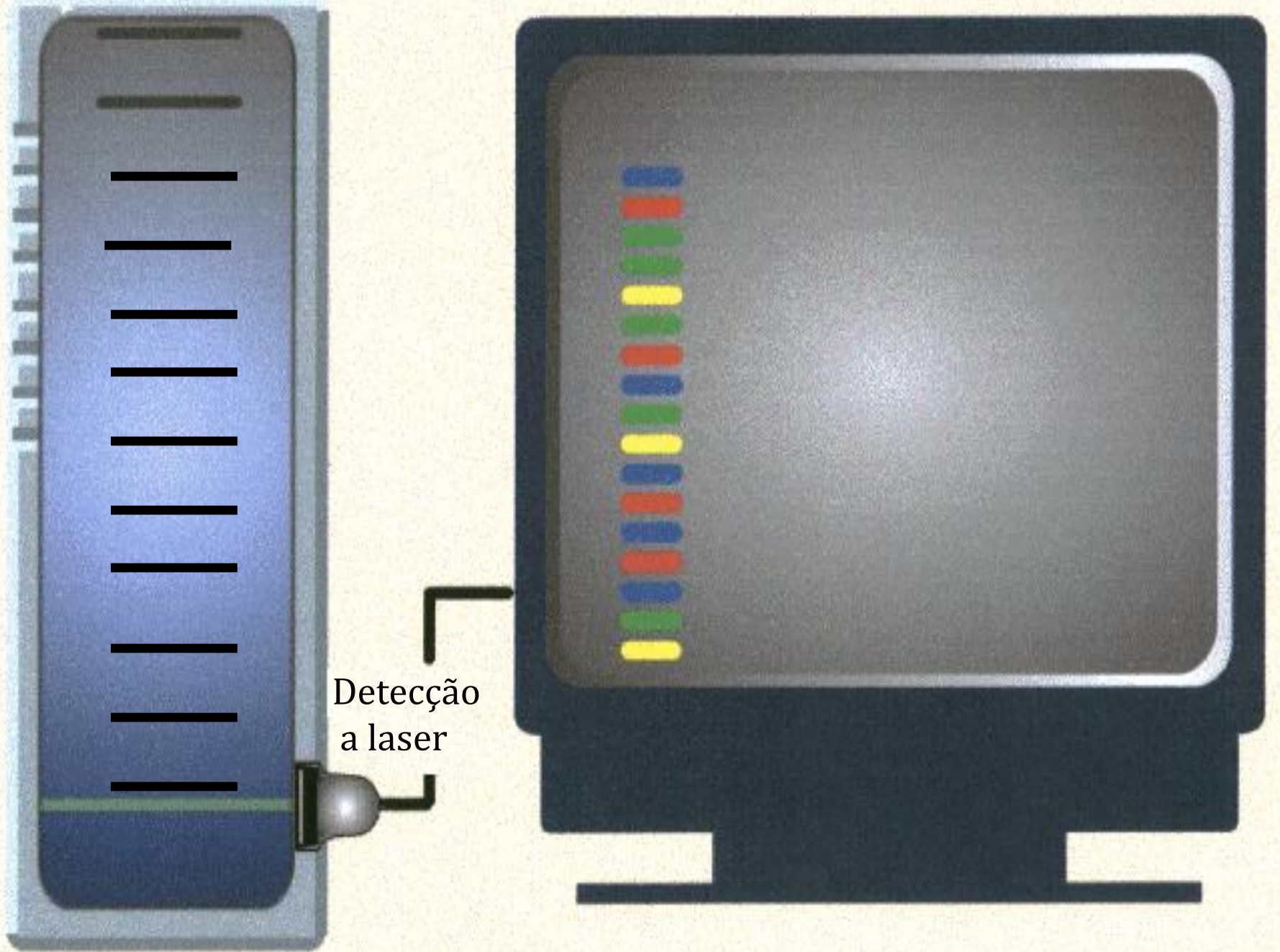
ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAG A

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTT T

ATACGATATCTCGACTCTCGA G

ATACGATATCTCGACTCT T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA TCTTTAAGG C

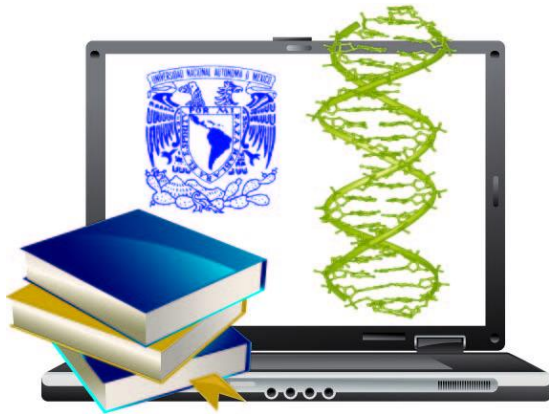


Deteccão
a laser

1875
1880
1885
1890
1895
1900
1905
1910
1915
1920
1925
1930
1935
1940
1945
1950
1955
1960
1965
1970
1975
1980
1985
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035
2040
2045
2050
2055
2060
2065
2070
2075
2080
2085
2090
2095
2100

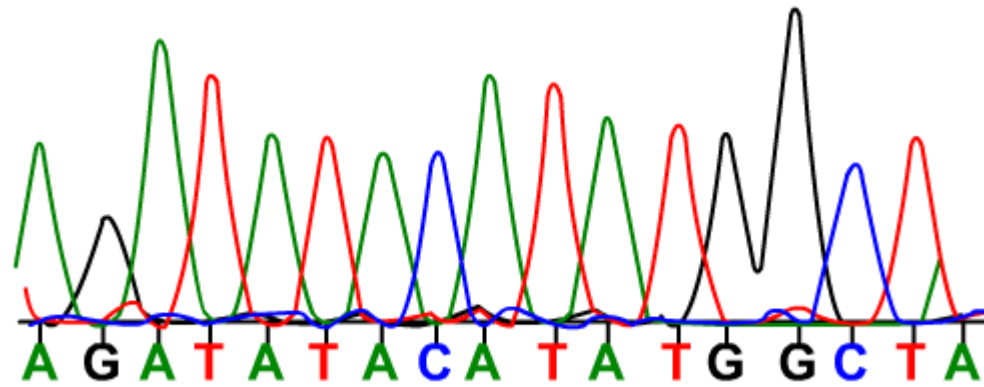


4 | Support Link Type Text is profile: Query Text



↑ quantidade de informação gerada → metadado

Bioinformática: métodos computacionais, matemáticos e estatísticos para organizar, analisar e visualizar os dados obtidos de maneira integrada



ACTTGACGTAGCTAC
AGCTACGTTACCTATAGGTACGTTAC
TACGTTACGGAGGCTATCGCGAT
TCGCGATGAGATCAAA

FRAGMENTOS DE DNA SEQUENCIADOS

ACTTGACGTAGCTAC
AGCTACGTTACCTATAGGTACGTTAC
TACGTTACGGAGGCTATCGCGAT
TCGCGATGAGATCAAA

ACTTGACGTAGCTACGTTACCTATAGGTACGTTACGGAGGCTATCGCGATGAGATCAAA

ACTTGACGTAGCTACGTTACCTATAGGTACGTTACGGAGGCTATCGCGATGAGATCAAA

FRAGMENTOS COMPLETOS

VISUALIZANDO O PROCESSO...

<http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/pages/bcs-main.asp?v=category&s=00010&n=09000&i=09010.05&o=|00510|00610|00520|00530|00540|00560|00570|00590|00600|00700|00710|00010|00020|00030|00040|00050|01000|02000|03000|04000|05000|06000|07000|08000|09000|10000|11000|12000|13000|14000|15000|16000|17000|18000|19000|20000|21000|22000|23000|99000|&ns=456>

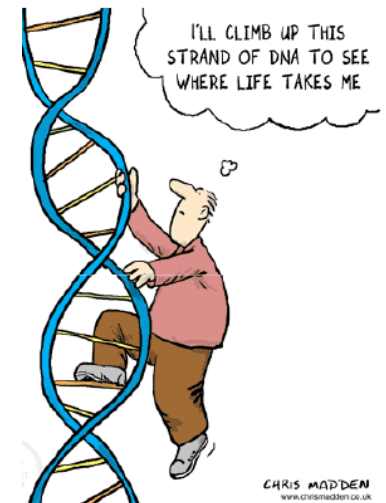
<http://www.dnalc.org/resources/animations/cycseq.html>

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html>



ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceito de ômicas;
2. Construção de biblioteca genômica
3. Construção de biblioteca cDNA
4. Estudos por metagenômica
5. Sequenciamento por Sanger
6. Novas técnicas de sequenciamento



DEFININDO ALGUNS CONCEITOS

Genoma: toda a informação hereditária de um organismo que está codificada em seu DNA (ou, em alguns vírus no RNA). Isto inclui tanto os genes como as sequências não-codificadoras.

Transcriptoma: conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Portanto, ele é o reflexo direto da expressão dos genes.

Proteoma: conjunto de todas as proteínas em uma célula, organela fluido biológico, tecido ou organismo em um dado momento.

Metaboloma: conjunto de todos os metabólitos em uma célula, fluido biológico, tecido ou organismo.