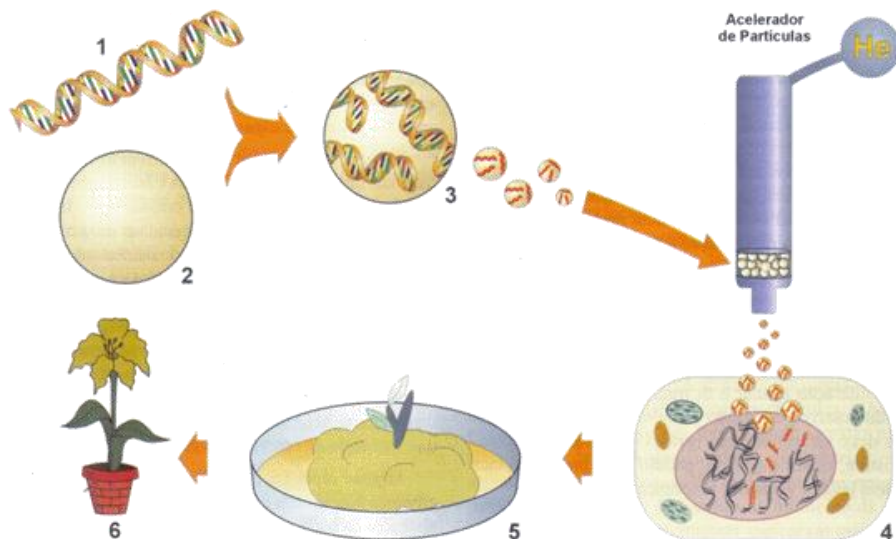


MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Aula 8

LGN0232 – Genética molecular



Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

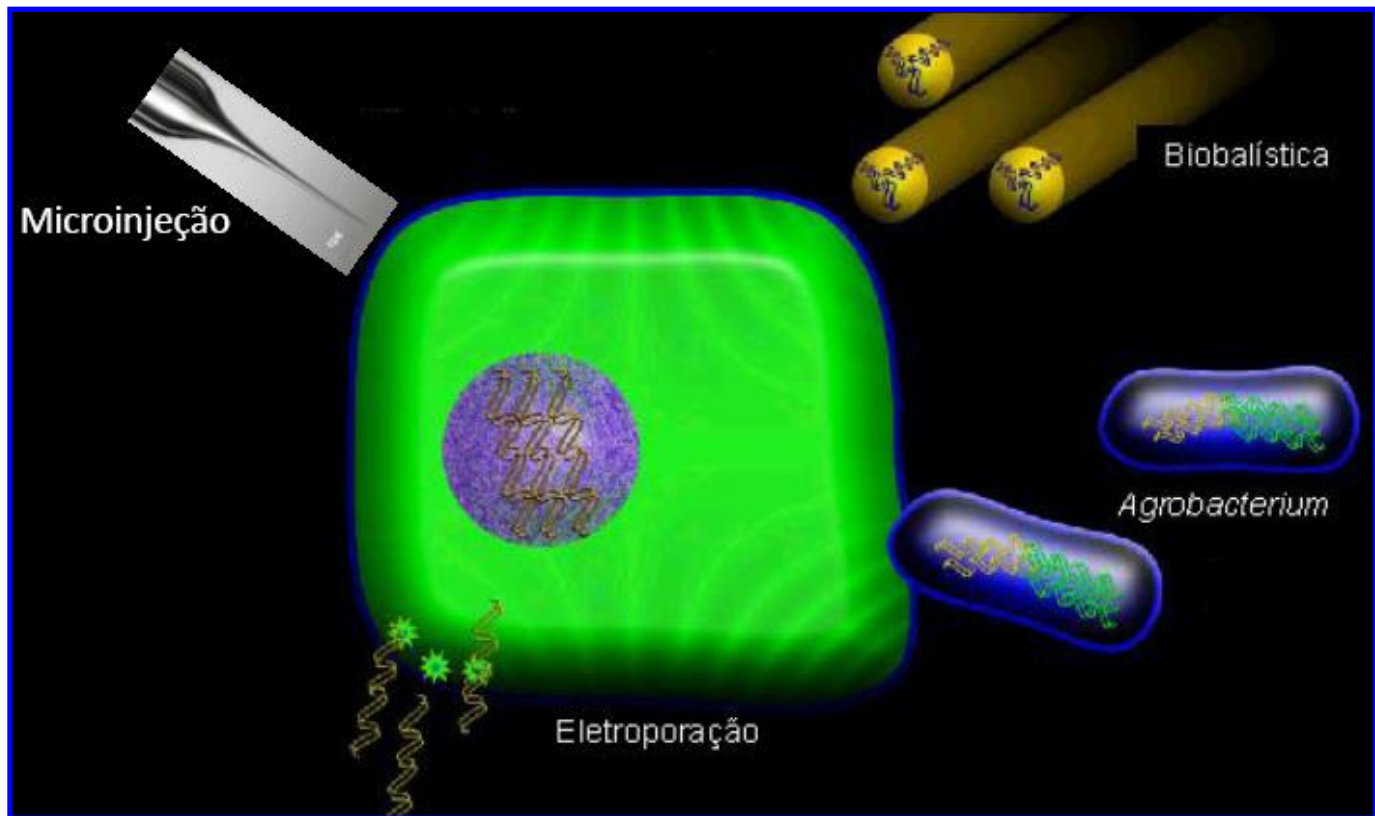


CONCEITOS IMPORTANTES

- O processo de introdução de sequências (genes) de interesse em organismos chama-se **transformação genética**;
- O gene sendo transferido para o organismo é chamado de **transgene**;
- Organismos com modificações genéticas que recebem um **transgene** são denominados de **transformados** ou **transgênicos**;
- Denominação mais ampla = **Organismos Geneticamente Modificados (OGM)**;

NÃO É TODO OGM QUE É UM TRANSGÊNICO!

MÉTODOS DE INTRODUÇÃO DE DNA NA CÉLULA



Altamente dependente do organismo!

ENGENHARIA GENÉTICA EM PLANTAS

OGMs = Organismos Geneticamente Modificados, ou

GMOs = Gene



Culturas resistentes



- soja
- milho
- canola
- outros

Culturas resistentes à insetos

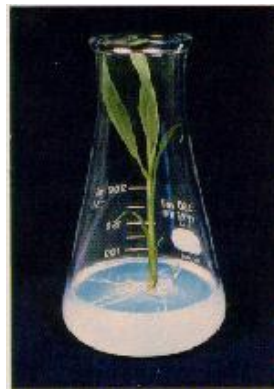
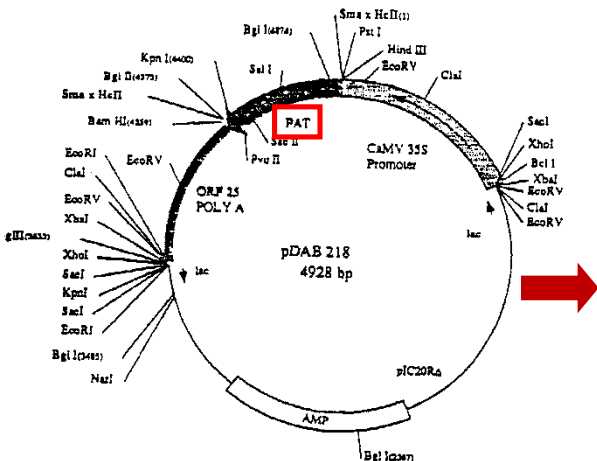


- algodão
- batata
- milho

http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database

ETAPAS PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

- Seleção de tecido vegetal competente para propagação ou regeneração,
- Método de transferência do gene de interesse (biológico ou físico),
- Identificação de células transformadas por seleção,
- Regeneração de plantas a partir de células transformadas,
- Plantas transgênicas analisadas para confirmar presença do transgene - herança e estabilidade,
- Plantas transgênicas avaliadas para *performance* no campo.



EM SÍNTESE:

Construção sintética do transgene



Introdução do DNA dentro da célula vegetal



Seleção



Regeneração da planta



Totipotência = capacidade de regeneração da planta a partir de uma única célula



Confirmação



Melhoramento



CONSTRUÇÃO SINTÉTICA DO TRANSGENE

A característica de interesse pode e deve ser
engenheirada...



Precisa conter no mínimo:

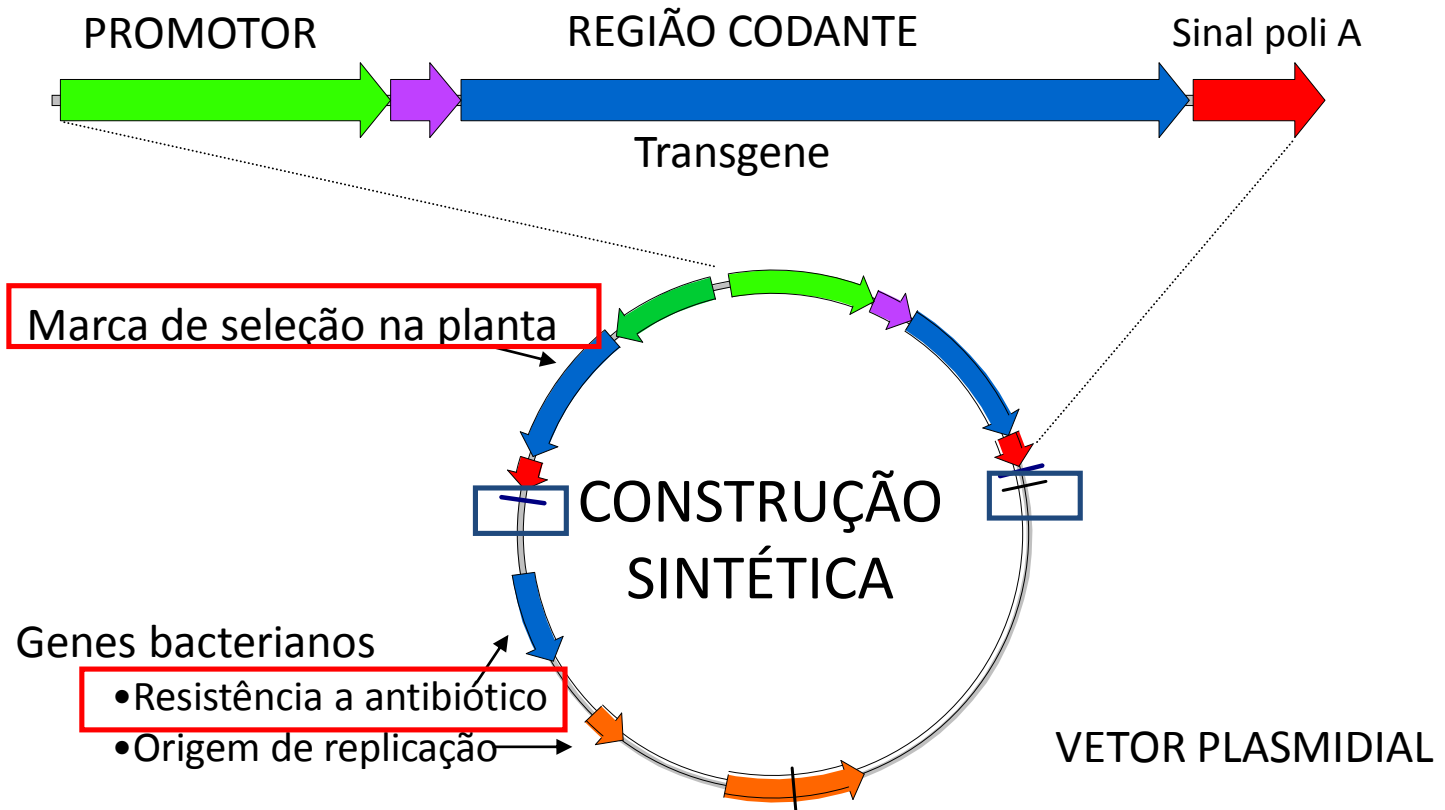
1. Gene de interesse

- A região de interesse e seus elementos controladores

2. Marca de seleção

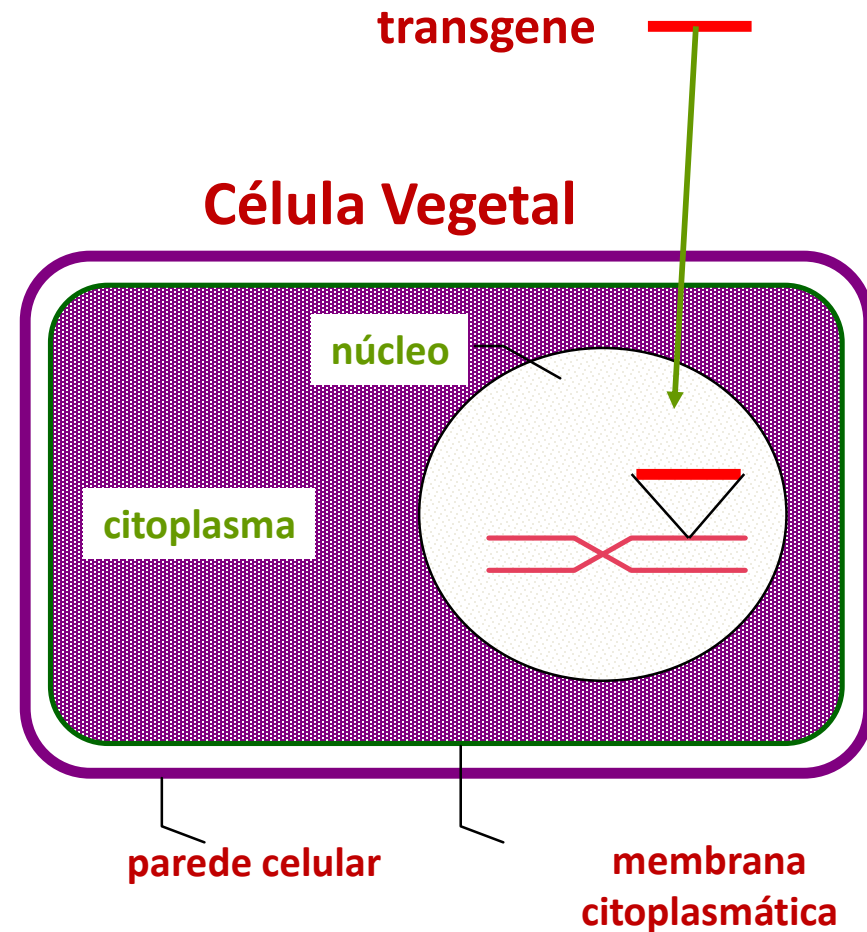
- Diferencia plantas transformadas e não transformadas

CONSTRUINDO O TRANSGENE



TRANSFERINDO DNA PARA CÉLULAS DE PLANTAS

1. DNA pode ser transferido para a célula vegetal por **meio biológico** (via *Agrobacterium*) ou **físico** (bombardeamento com micropartículas),
2. DNA deve cruzar várias barreiras,
3. DNA deve se integrar ao cromossomo no núcleo da célula vegetal,
4. Cada célula transformada é única,
5. Número de células transformadas é mínimo.



MÉTODOS PARA A INTRODUÇÃO DO TRANSGENE NA PLANTA

Agrobacterium

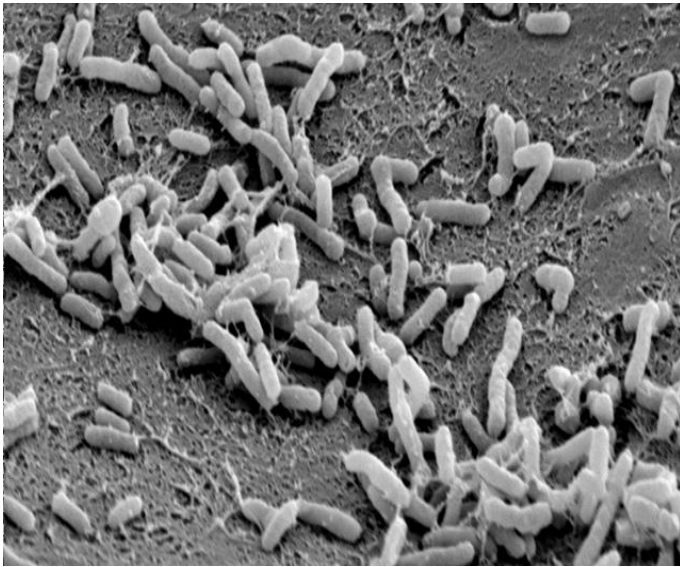
- Bactéria do solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta;
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta;

Bombardeamento

- Partículas de ouro ou tungstênio são cobertas com DNA e aceleradas em direção ao tecido da planta (hélio comprimido);
- As partículas perfuram a parede celular e penetram dentro da célula;
- Utilizado quando não é possível por incompatibilidade biológica o uso de *Agrobacterium* - em monocotiledôneas.

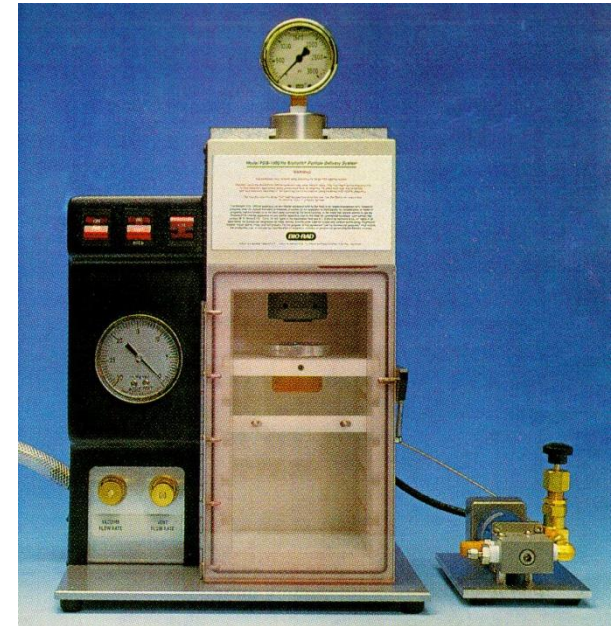
MÉTODOS BIOLÓGICO X FÍSICO

Agrobacterium tumefaciens



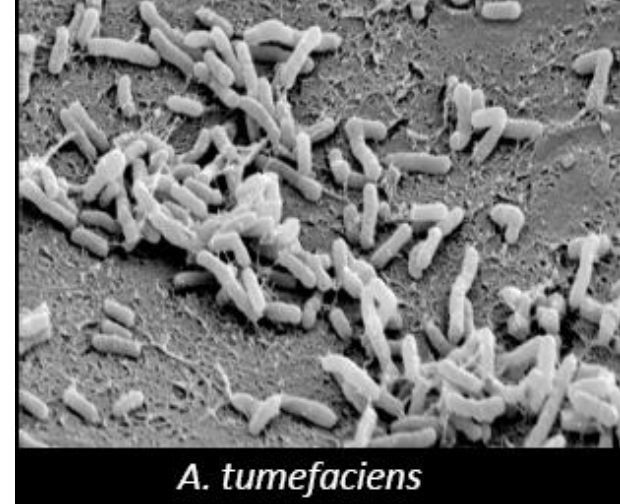
Propriedade natural da bactéria *Agrobacterium* de transferir DNA para dentro da célula da planta.

Bombardeamento de microprojéteis
“Biolística” ou “gene gun”

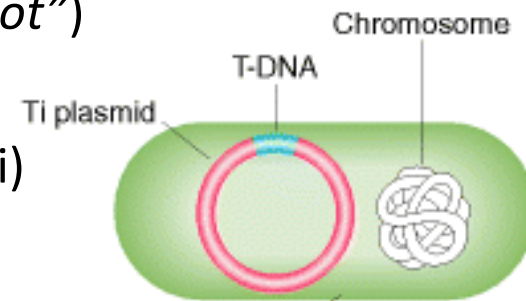


Partículas são cobertas de DNA e atiradas para dentro da célula da planta.

Agrobacterium tumefaciens



- Bactéria de solo Gram-negativa, tipo bacilo;
 - Causa galha da coroa (“*crown gall*”): videira, maçã, etc.;
 - Afeta mais dicotiledôneas e pouco monocotiledôneas;
 - Família Rhizobiaceae.
-
- Outras espécies:
 - *Agrobacterium rhizogenes* -raiz em cabeleira (“*hairy root*”)
 - *Agrobacterium radiobacter* - não tumorogênica (sem Ti)





GALHA DA COROA



Planta ferida

- Libera substâncias que atraem a agrobactéria;
- Ativa genes da região de virulência;

Contato planta-bactéria

- As bactérias sintetizam microfibrilas de celulose para favorecer a formação de agregados de células bacterianas em volta do tecido vegetal ferido;

Inserção do T-DNA

- o T-DNA integrado ao genoma vegetal é expresso de forma estável ;
- A síntese de auxinas e citocininas (oncogenes) levam a planta a um desbalanço hormonal;

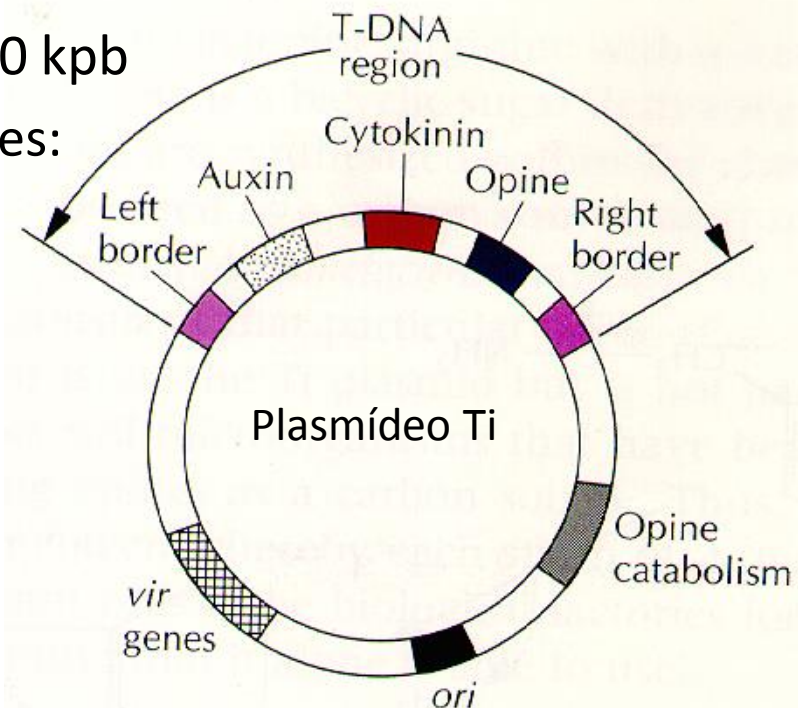
Síntese de Opina

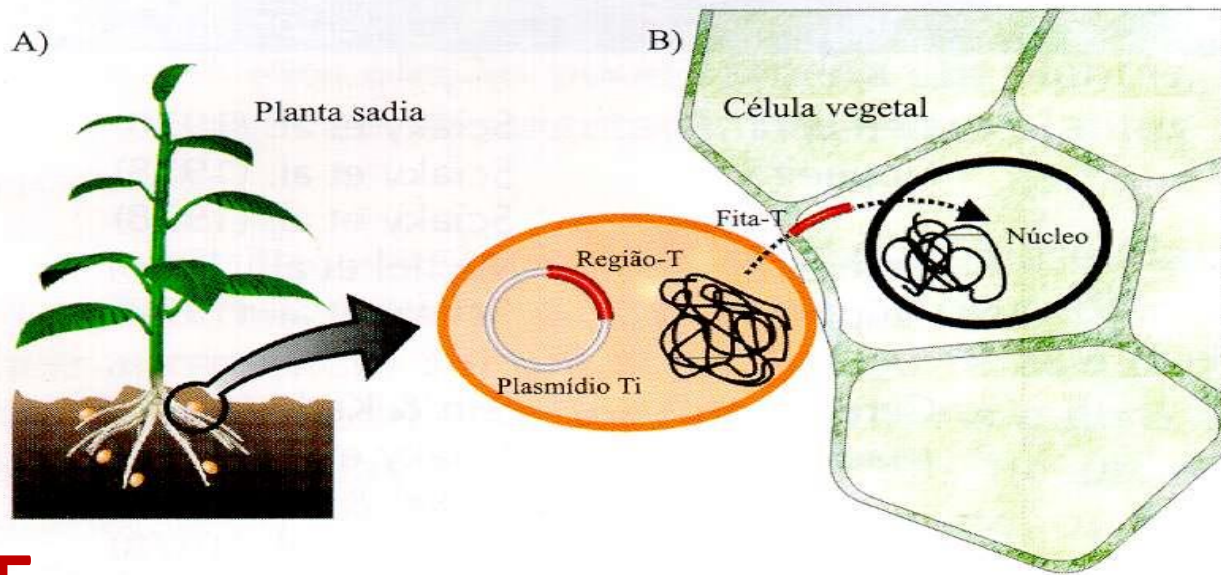
- Quanto mais a célula da planta se divide maior é a produção de opina e o nicho da agrobactéria se torna extremamente favorável;
- Somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar a opina produzida como fonte de energia, carbono e nitrogênio;

APESAR DE SUA ORIGEM PROCARIOTA, A EXPRESSÃO DOS GENES PRESENTES NO T-DNA SÓ É POSSÍVEL POR SEREM OS SINAIS DE REGULAÇÃO DESSES GENES RECONHECIDOS PELO SISTEMA DE TRANSCRIÇÃO EUCARIOTA VEGETAL!!

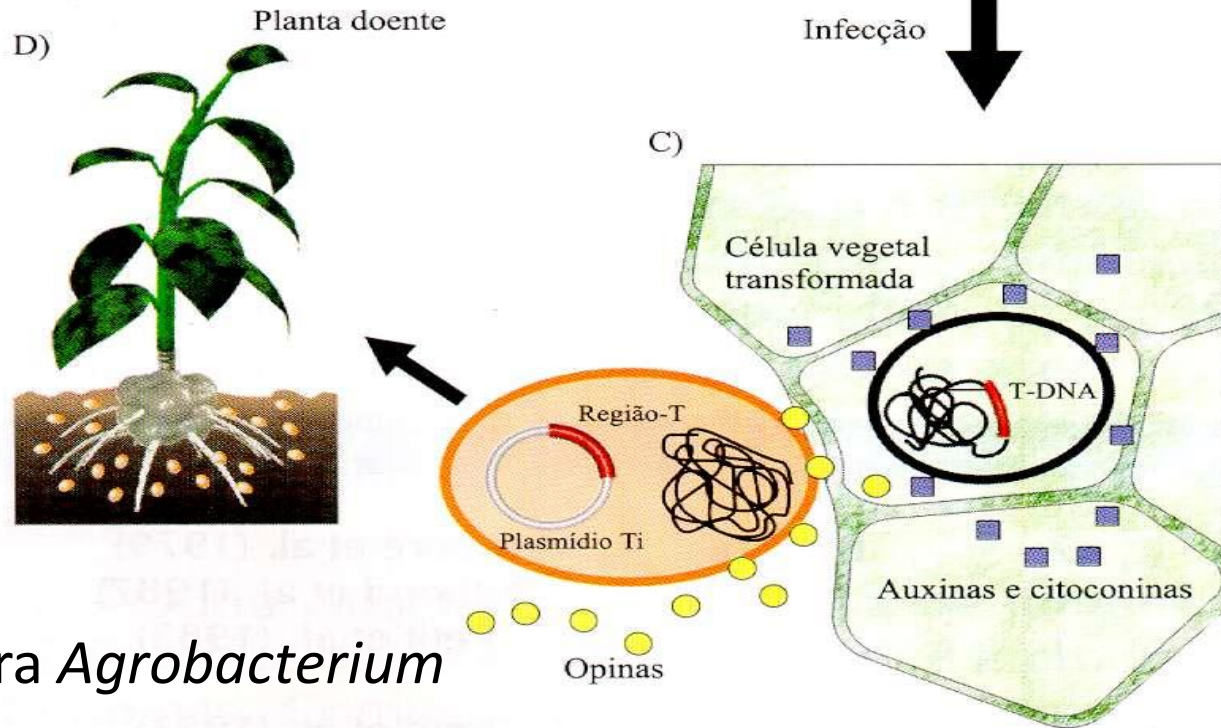
Agrobacterium

- Infecção natural – ferimentos;
- Quimiotactismo - fenóis, açúcares, amino ácidos;
- Expressão de genes da bactéria transferidos e integrados de forma estável ao genoma vegetal
- Formação de tumores;
- Capacidade tumorigênica - plasmídeo Ti =
 - **Ti = Tumor Inducing** - 150 a 250 kpb
- Regiões do plasmídeo **Ti** importantes:
 - **região T-DNA - Transfer DNA**
 - **região vir - genes de virulência**





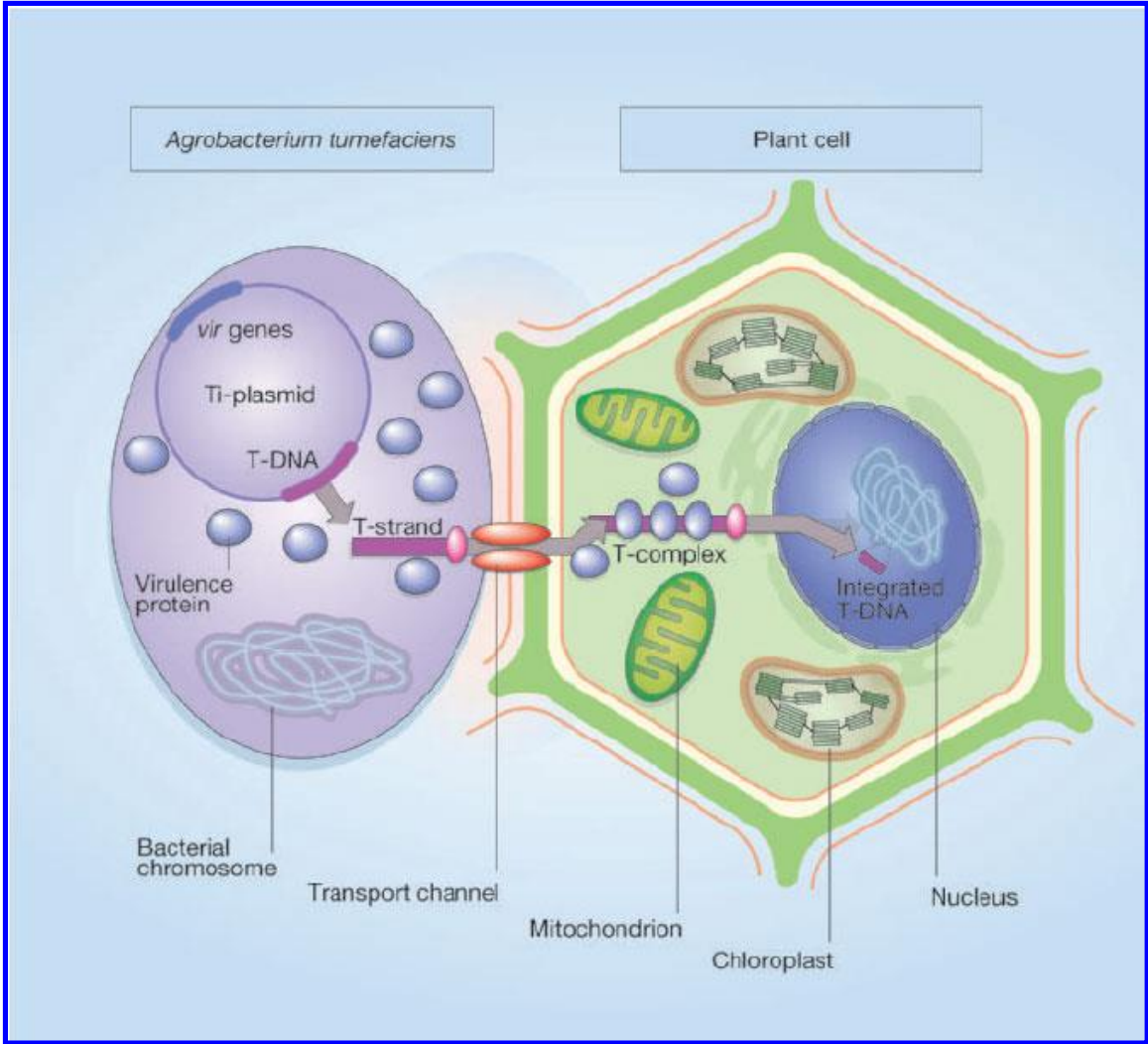
Infecção



**PATOGENICIDADE
NATURAL DE *A.
tumefaciens***

Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

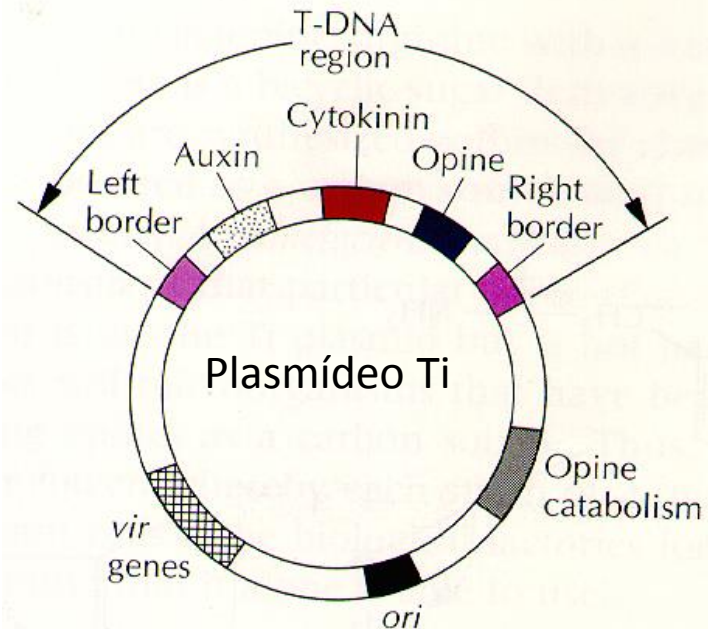
PATOGENICIDADE NATURAL DE *A. tumefaciens*



Agrobacterium

Região T-DNA

- Tamanho: de 12 a 24 kb
- Limitada por seqüências repetidas = bordas
 - bordas direita (RB) e esquerda (LB) - delimitam T-DNA
- Contém genes de síntese de reguladores de crescimento (hormônios vegetais) e de opinas
- Transferem genes para direcionar metabolismo para manutenção da *Agrobacterium*



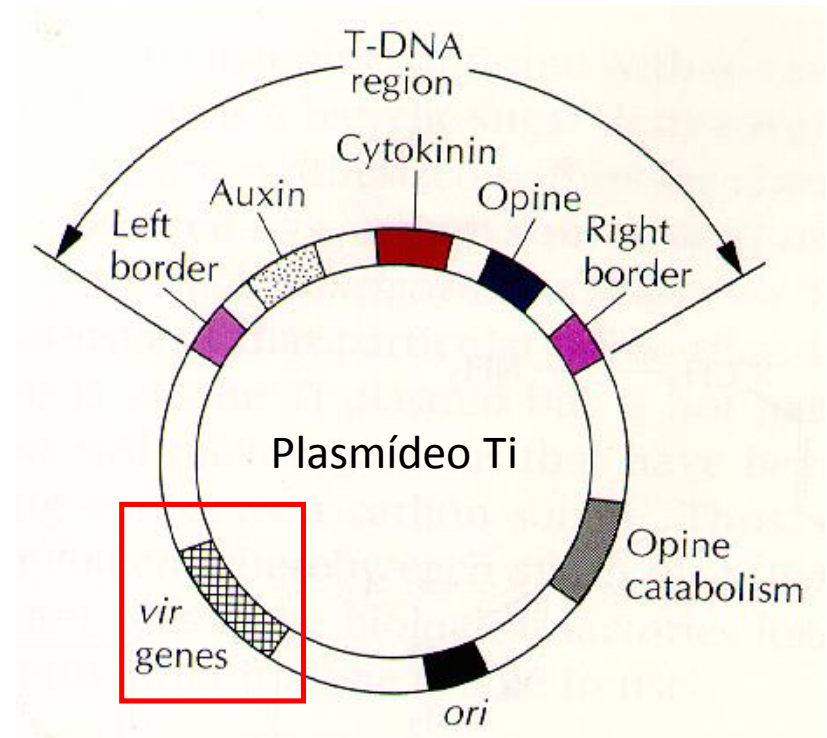
Agrobacterium

Região *vir*

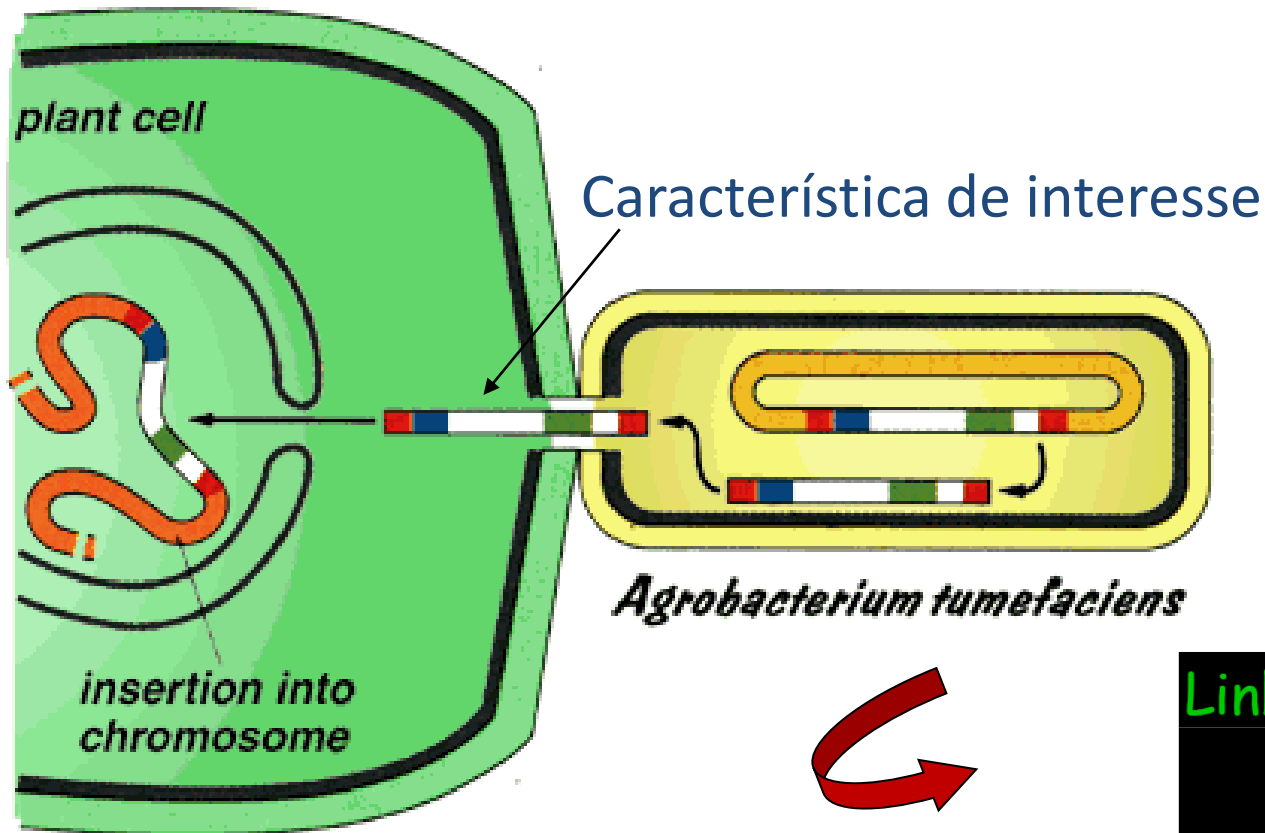
- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA

Região *vir* é suficiente para transferir qualquer T-DNA - reconhece bordas

Gene indutores de tumores podem ser retirados e substituídos no T-DNA



TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE



Elementos essenciais ao processo de transferência

Linhagem desarmada

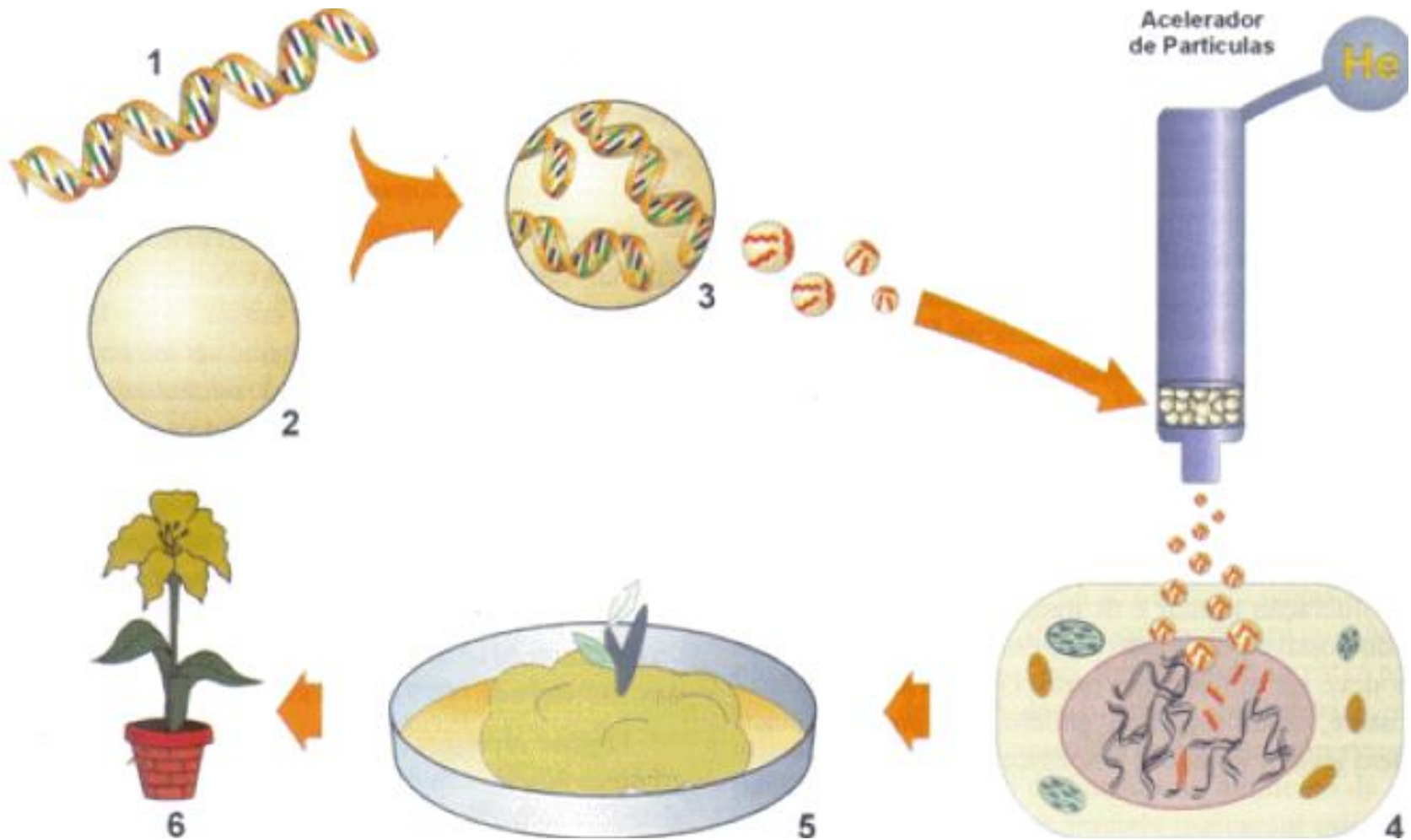


Transgene de interesse

Bordas 25pb T-DNA

Região vir funcional

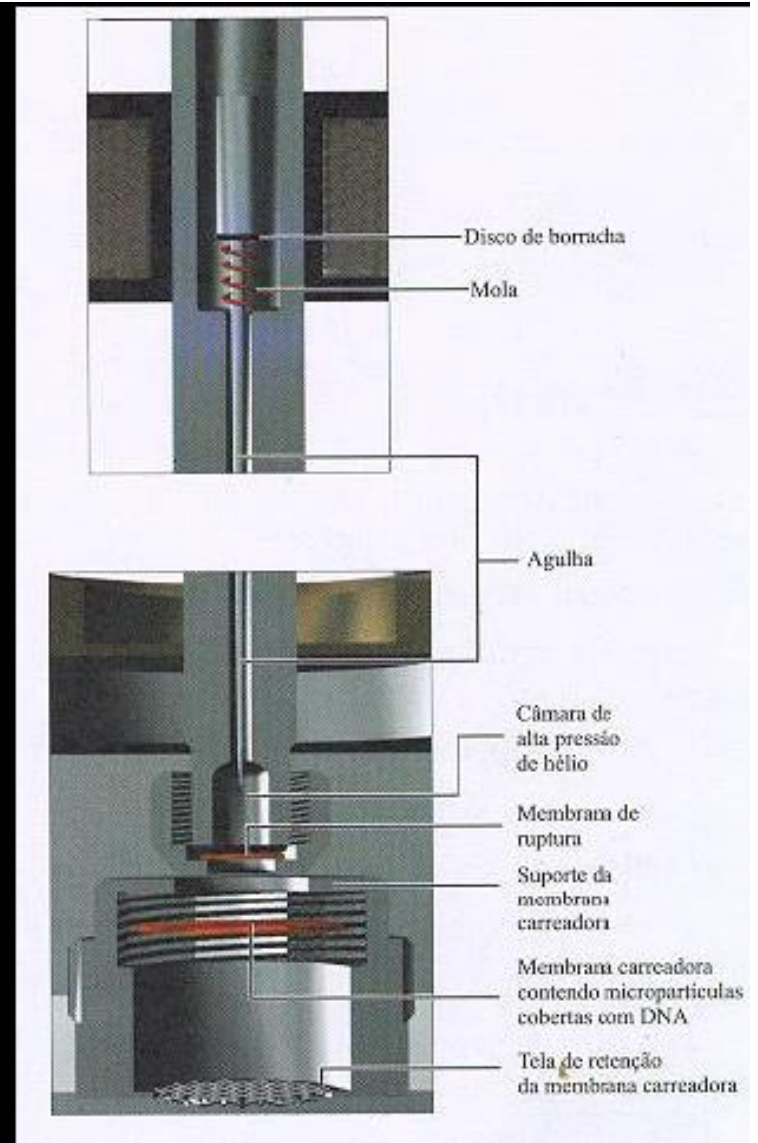
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



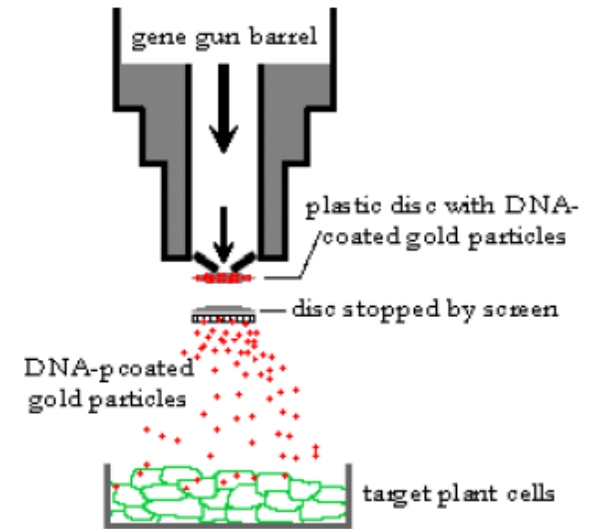
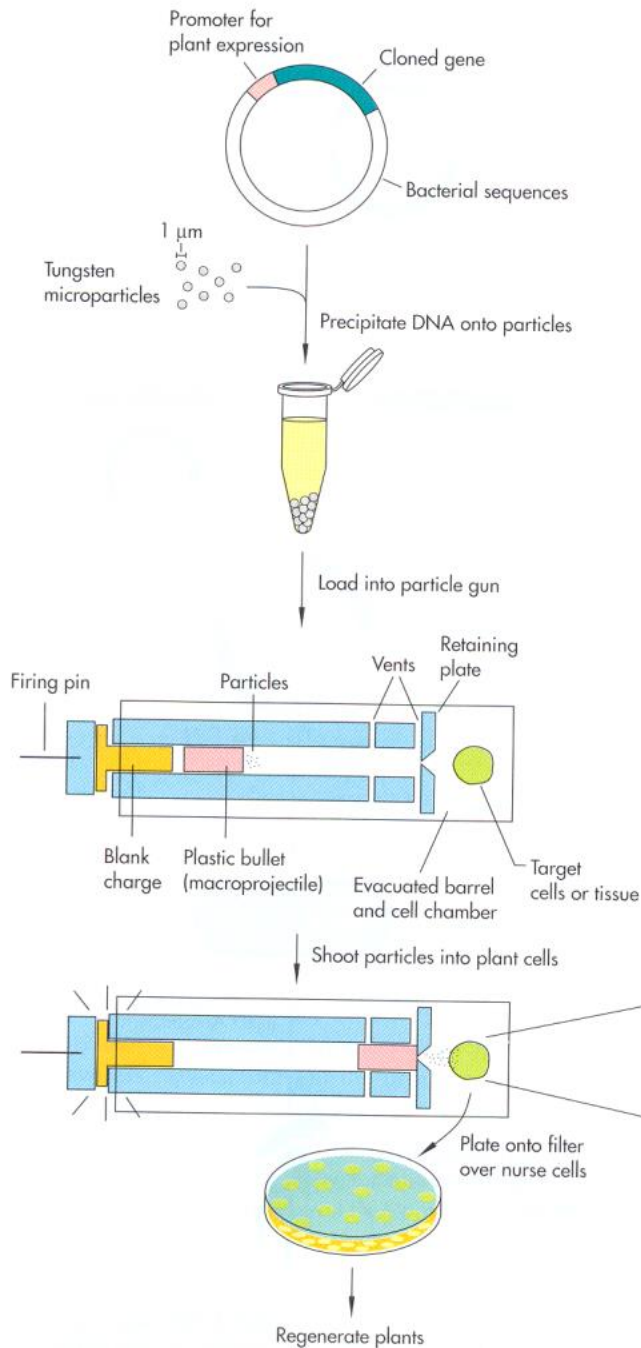
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



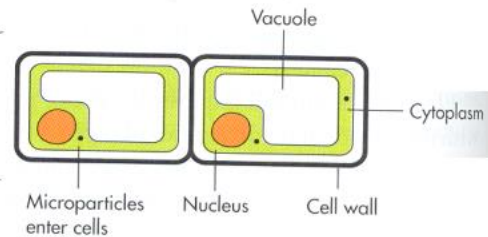
Bombardeador



TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO - BIOBALÍSTICA



Gene gun method



TRANSFORMAÇÃO – CÉLULA ALVO

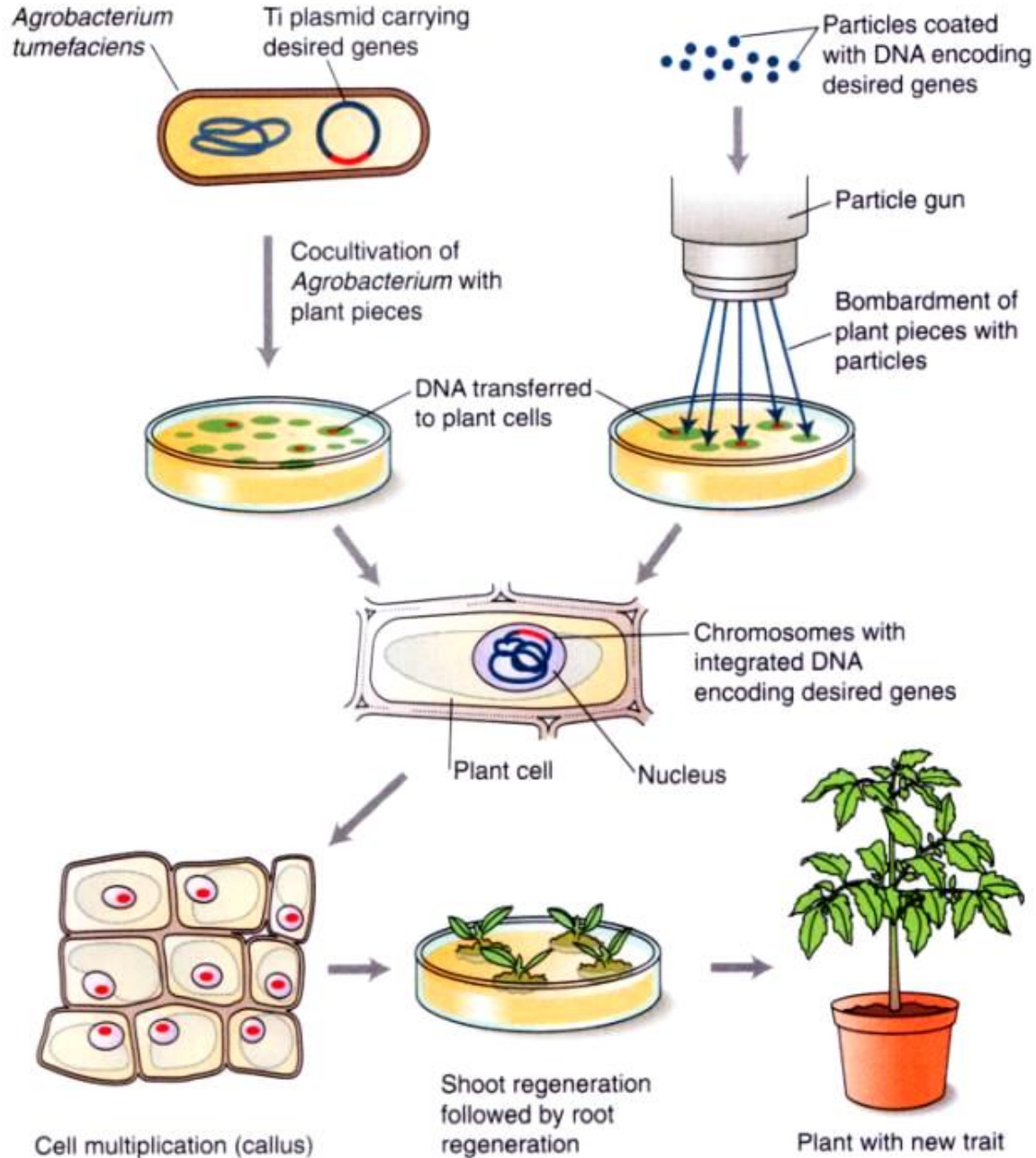
Todos os protocolos de transformação introduzem o DNA nas células de plantas em cultura de tecidos

- ✓ Cultura de tecidos permite a regeneração de plantas férteis a partir de uma única célula;
- ✓ Grande número de células alvo na forma de calo;
- ✓ Estabelecimento, manutenção e regeneração de plantas é bastante trabalhoso e com um alto grau de dificuldade;
- ✓ Métodos estão limitados a alguns genótipos, geralmente de variedades não comerciais;
- ✓ Pode introduzir mutações não desejáveis.



Agrobacterium method

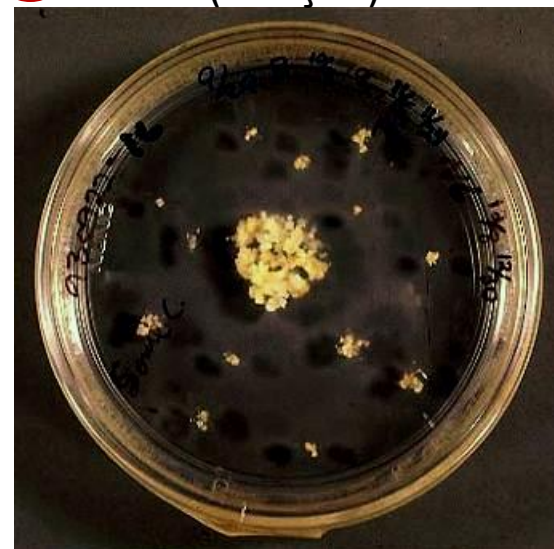
Particle gun method



TRANSFORMAÇÃO – SELEÇÃO

- ✓ 1 em 1.000 células terá o DNA integrado no genoma na planta;
- ✓ Células transformadas são marcadas pela co-introdução de um gene de resistência a agentes seletivos;
- ✓ Células transformadas são selecionadas pela morte de células não transformadas pelo agente seletivo;
- ✓ 2 principais agentes seletivos:
 - antibióticos
 - herbicidas
- ✓ Marcadores seletivos auxiliam os passos seguintes de estudos sobre a herança do transgene.

Células em cultura
(seleção)



Ensaio resistência à herbicida
transgênico não-transgênico
Resistente Susceptível



TRANSFORMAÇÃO – SELEÇÃO E CONFIRMAÇÃO

Gene de seleção

Antibiótico:

Canamicina
Higromicina

Herbicida:

Glifosato

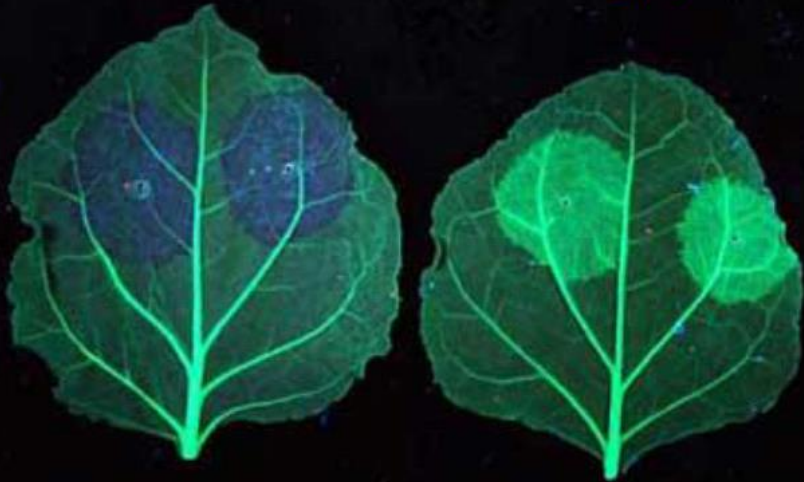
Genes repórters:

GFP, mRFP, CFP, YFP, mCherry etc
GUS
Luciferase



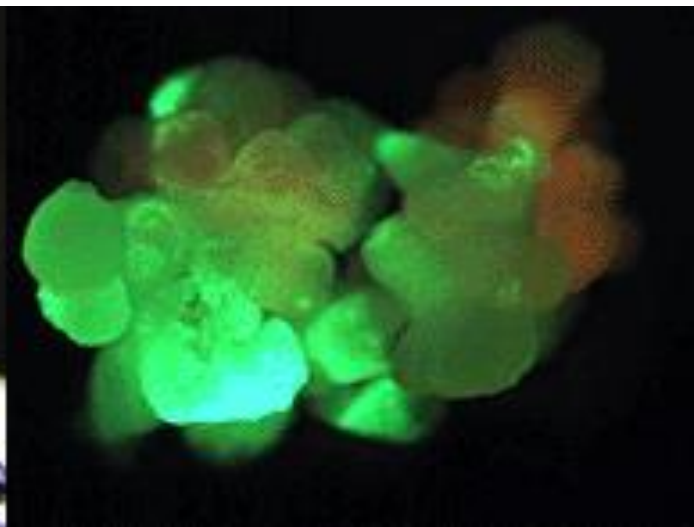
GUS

GFP

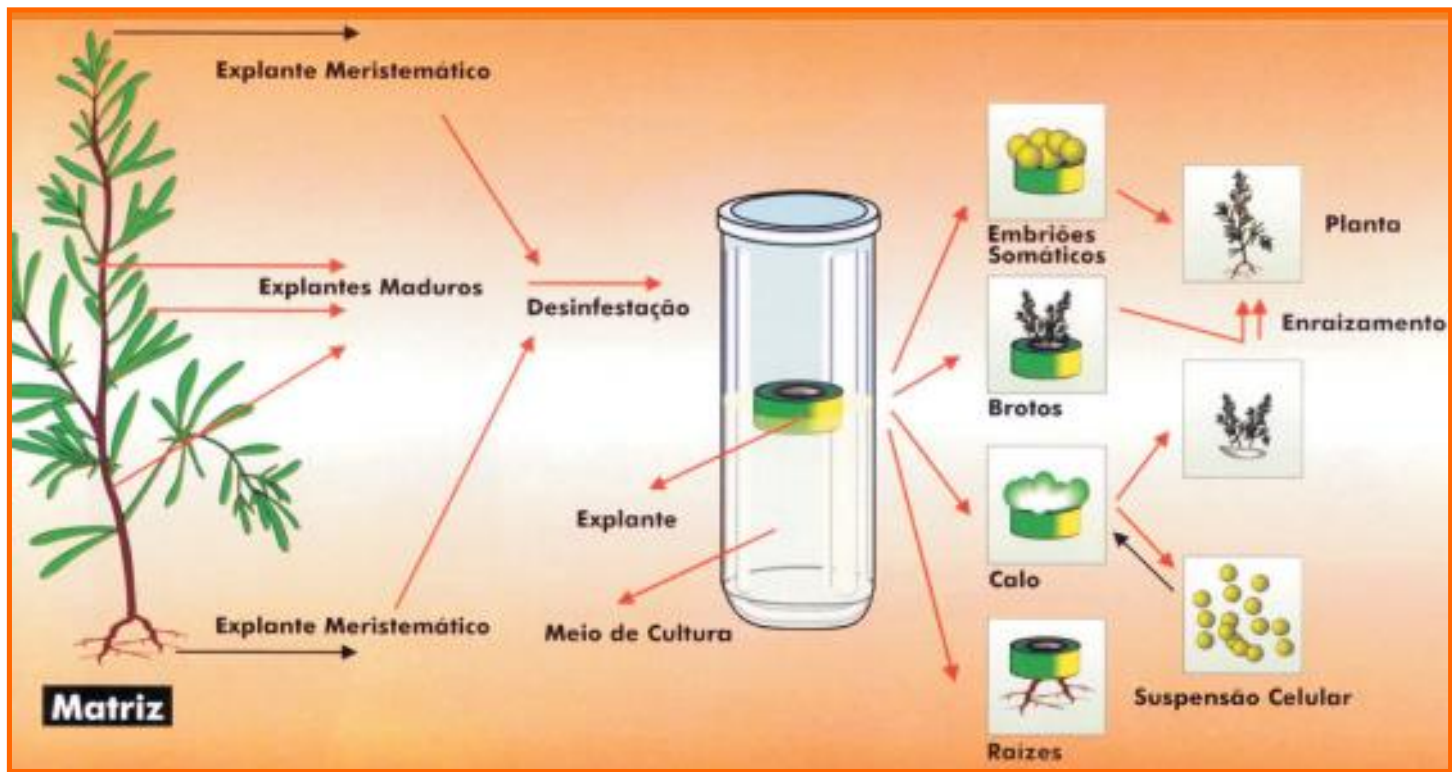


Folhas de *N. benthamiana*

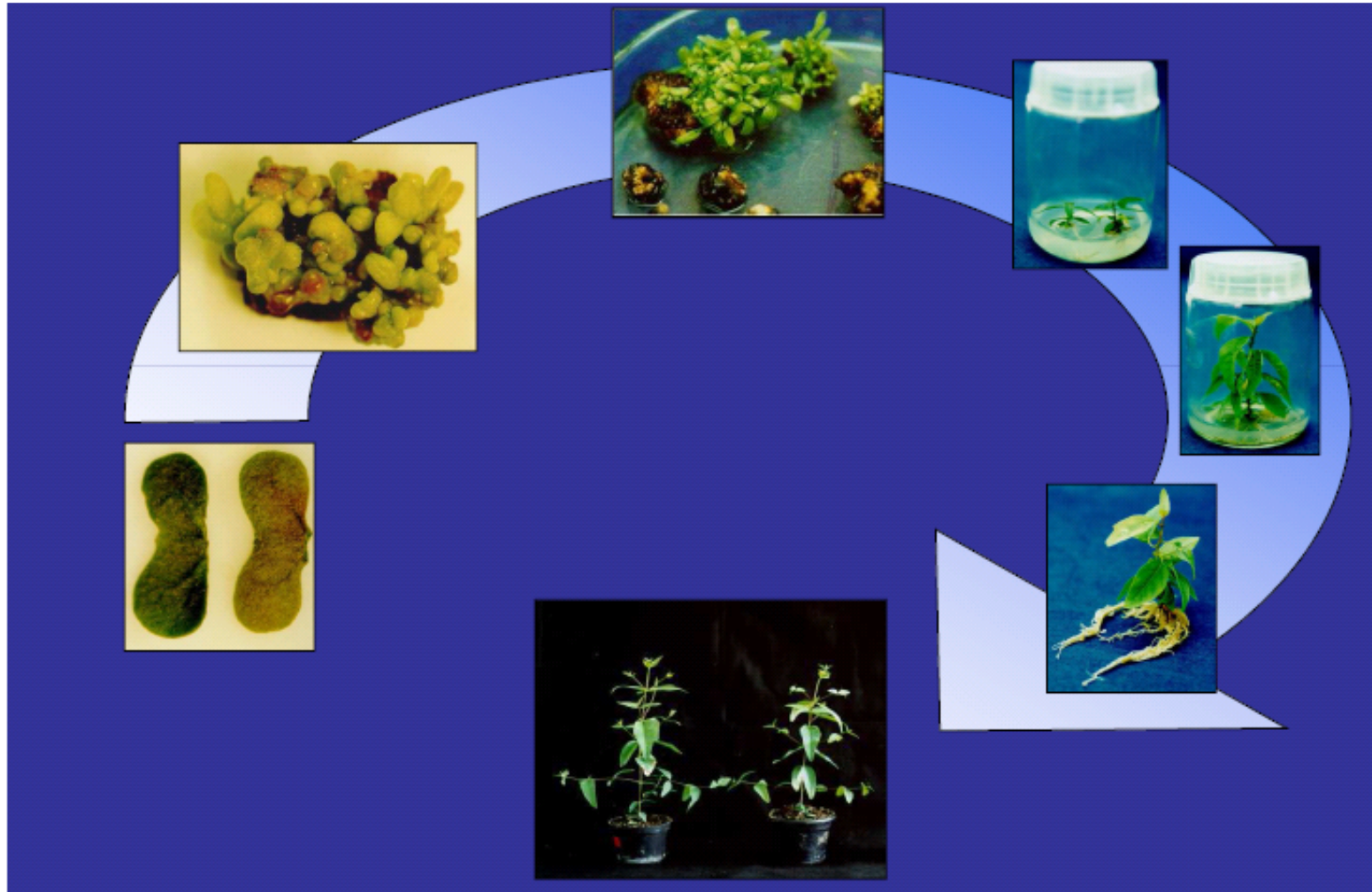
TRANSFORMAÇÃO – CONFIRMAÇÃO



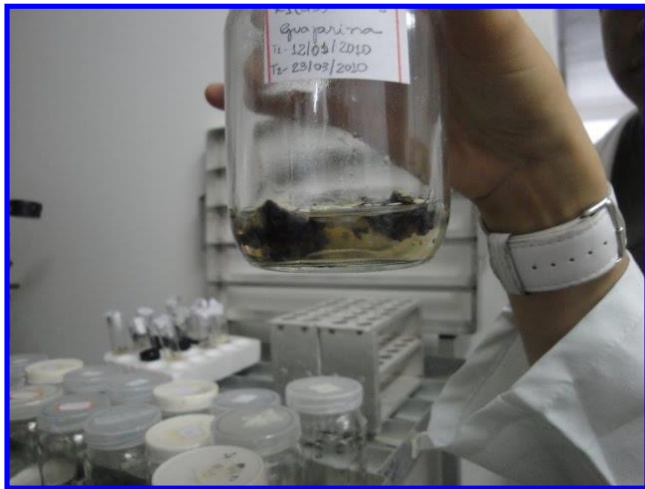
PRINCÍPIOS DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS



REGENERAÇÃO DEPENDE DO EXPLANTE...



ETAPAS NO LABORATÓRIO



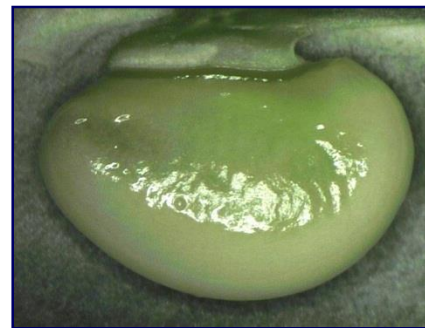
Planta regenerada



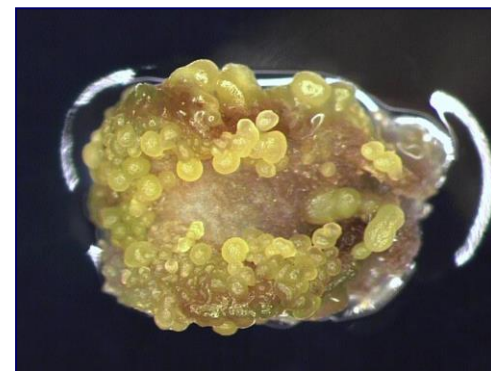
Germinação



Cultura de tecidos de soja



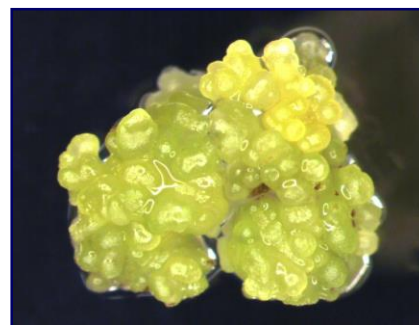
Sementes imaturas



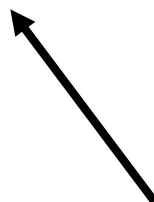
Desenvolvimento



Proliferação



Indução



Com o auxílio da
engenharia genética

Pelos métodos
clássicos

Fonte de Genes

Plantas, Bactérias,
Fungos e Vírus
▽
Identificação, Isolamento,
síntese de genes
▽
Transferência de
genes para células
▽
Regeneração de
plantas

Plantas da mesma
espécie ou relacionadas
▽
Avaliação de caracteres
importantes

V
A
R
I
A
Ç
Ã
O



Hibridização

▽
Avaliação

Testes quantitativos

Testes qualitativos

Selecção

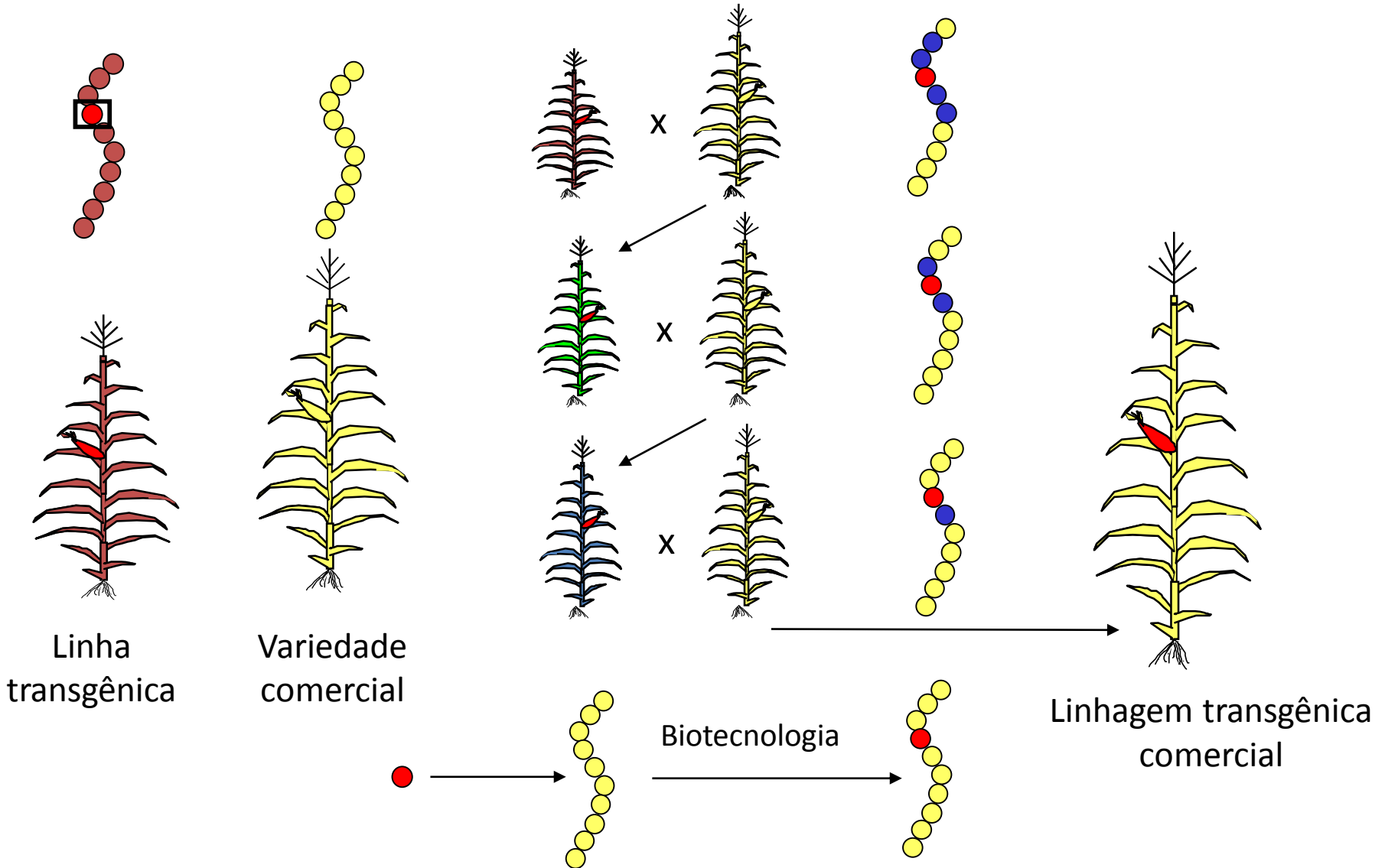
▽
Avaliação Final

▽
Variedade Comercial

S
E
L
E
Ç
Ã
O

CONSTRUÇÃO DA VARIEDADE TRANSGÊNICA

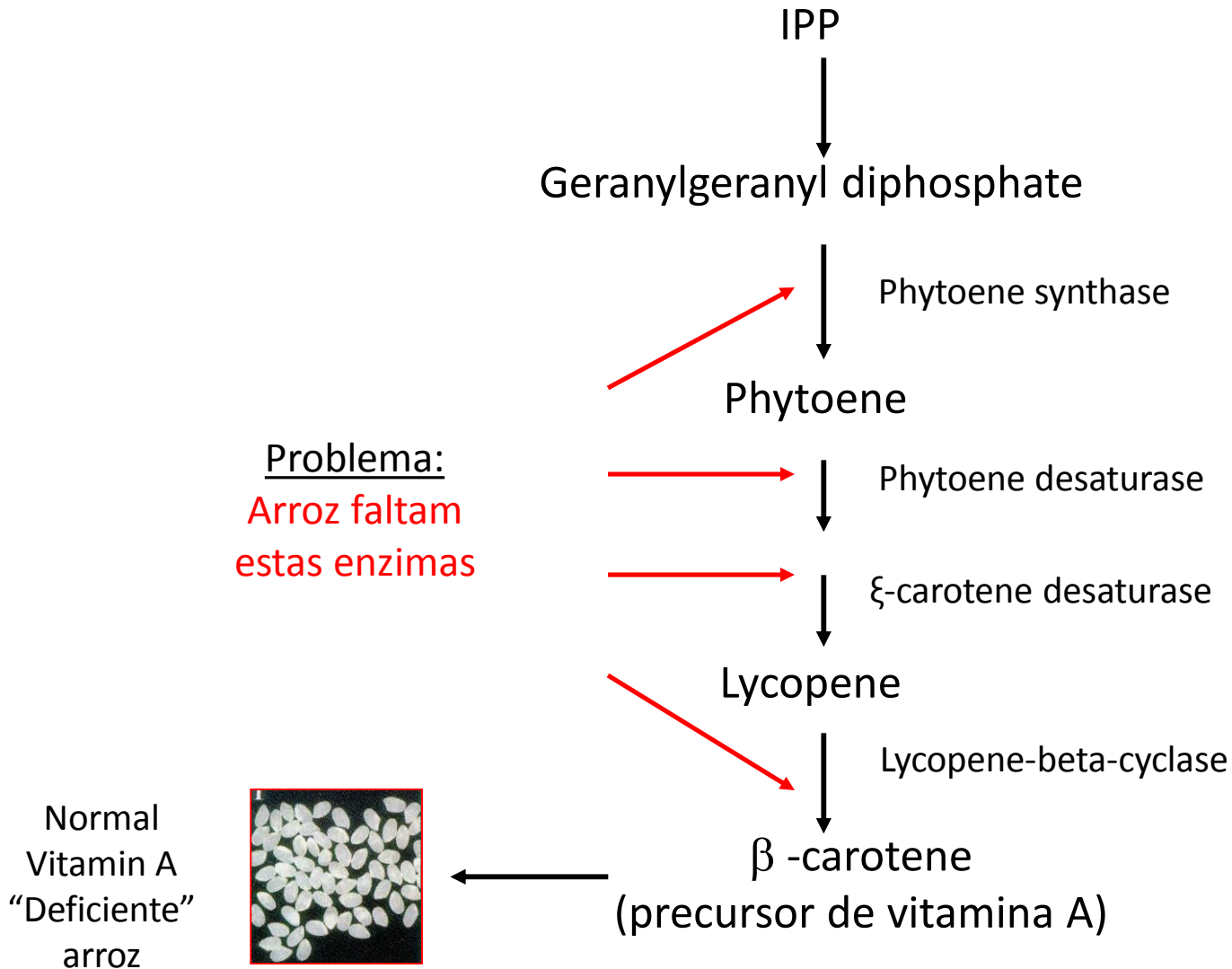
Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)



The Golden Rice Story

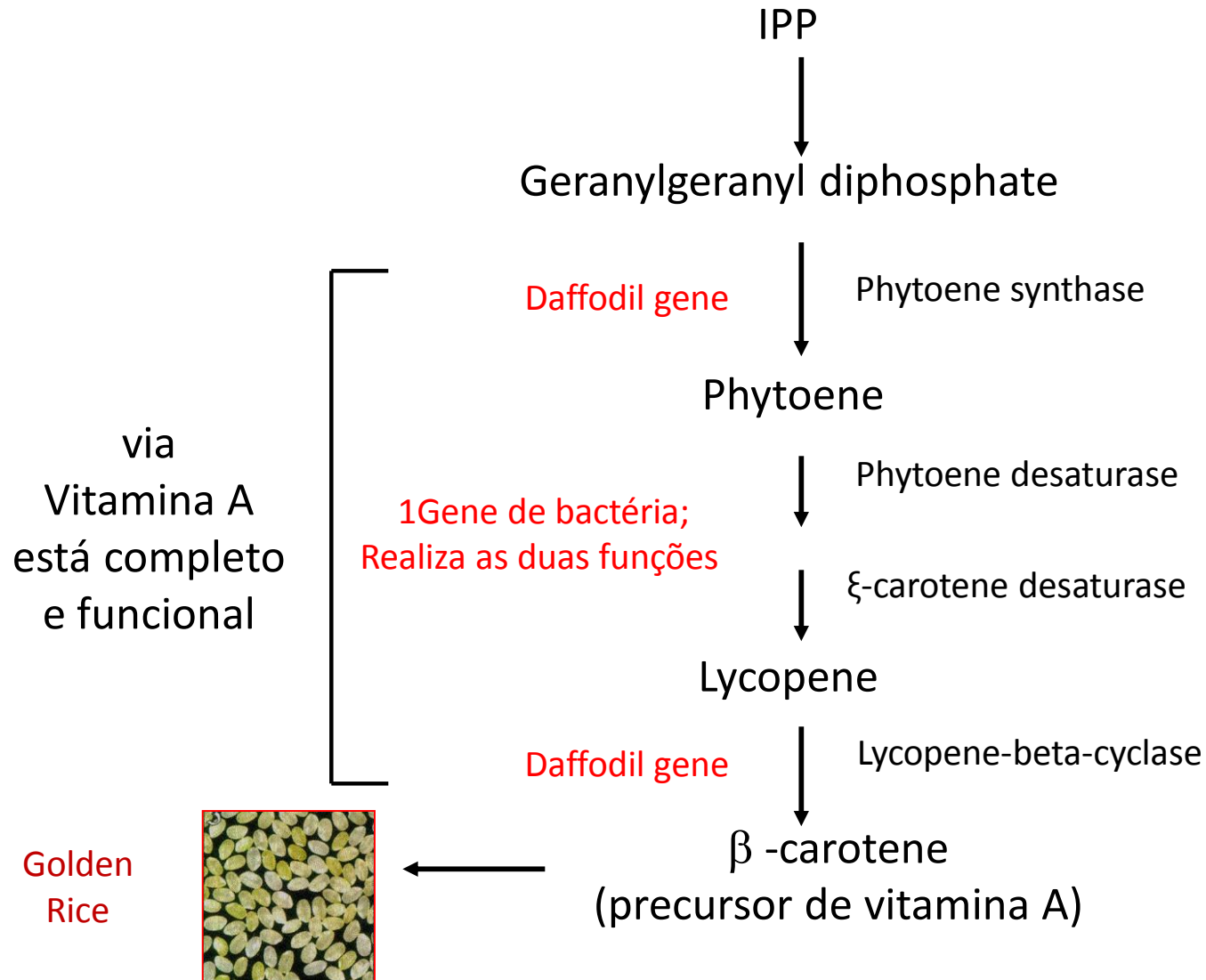
- Deficiência em vitamina A é um problema importante de saúde pública
 - Causa cegueira
 - Influencia na severidade de diarreias e sarampo
- >100 milhões de crianças tem este problema
- Para muitos países a infra-estrutura não existe para entregar pílulas de vitaminas
- Melhorar o conteúdo de vitamina A em cereais parece uma alternativa atrativa

Via do β -Caroteno em Plantas



The Golden Rice

Adicionar os genes da via do β -Caroteno



Teste Final dos Transgêncios

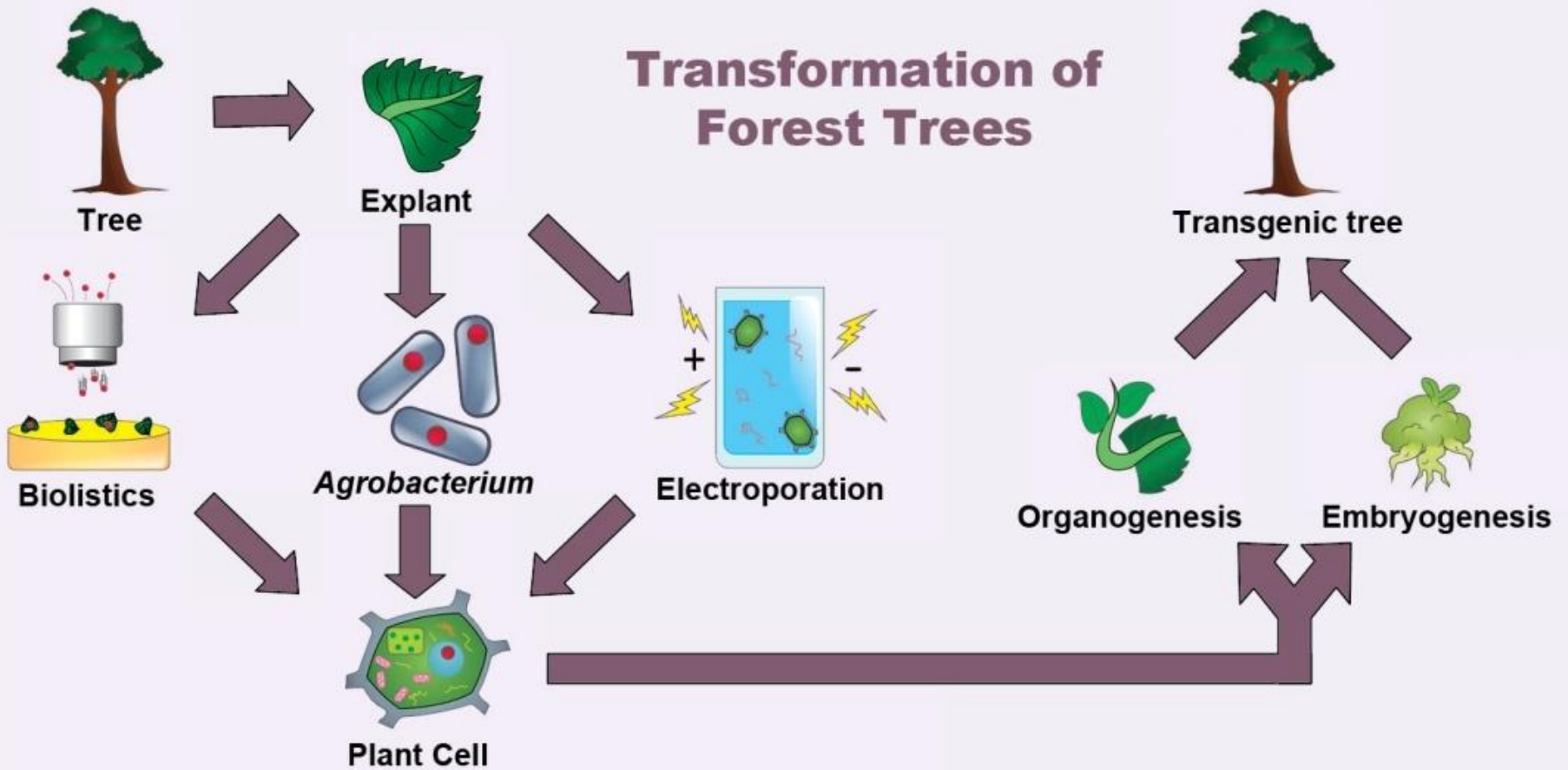
Aceitação do consumidor!!!

Milho RoundUp Ready



Antes

Depois



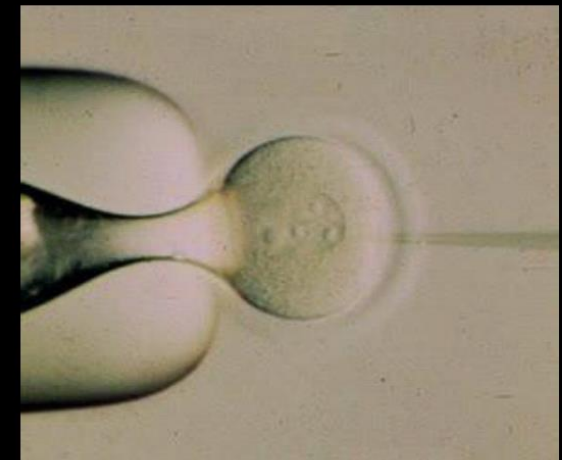
TRANSFORMAÇÃO DE ANIMAIS

Microinjeção

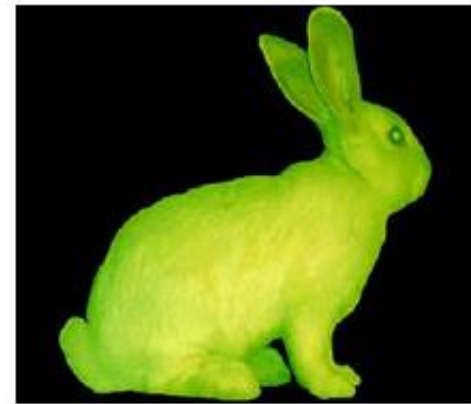
Por meio de agulhas microscópicas é injetado DNA no núcleo da célula alvo

- rotina para transformação de célula animais
 - utiliza micromanipulador
 - oneroso, complexo e demorado

Transformação via Microinjeção



EXPRESSÃO DO GENE DA GFP EM ANIMAIS



Coelho transgênico obtido por expressão do gene da GFP⁸

ANIMAIS TRANSGÊNICOS

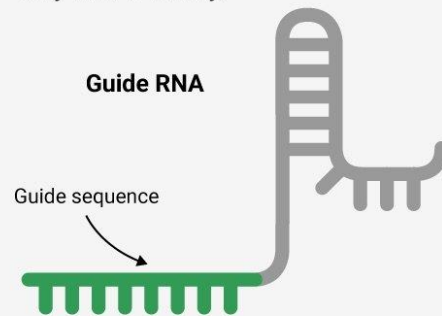


Carne “light” - ômega 3

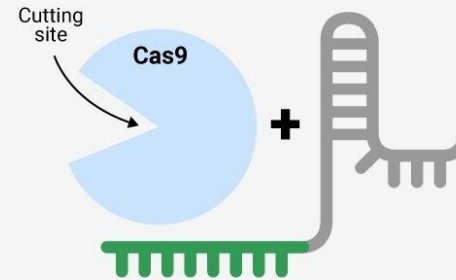
FIQUE DE OLHO, NOVAS TÉCNICAS VEM SURGINDO!

EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

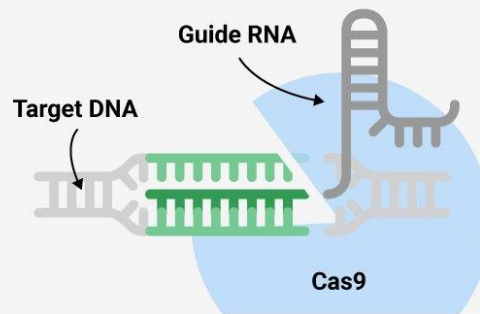
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA they want to modify.



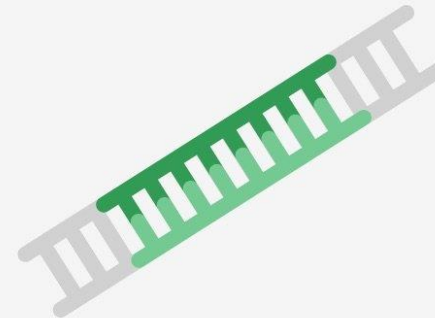
- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 3** The guide RNA homes in on the target DNA sequence, and Cas9 **cuts it out**. Once their job is complete, the guide RNA and Cas9 leave the scene.



- 4** Now, another piece of DNA is swapped into the place of the old DNA, and **enzymes repair the cuts**. Voilà, you've edited the DNA!



SOURCES: Nature News; Carl Zimmer

BUSINESS INSIDER

Técnica de edição de genoma promete revolucionar a ciência

Tweet



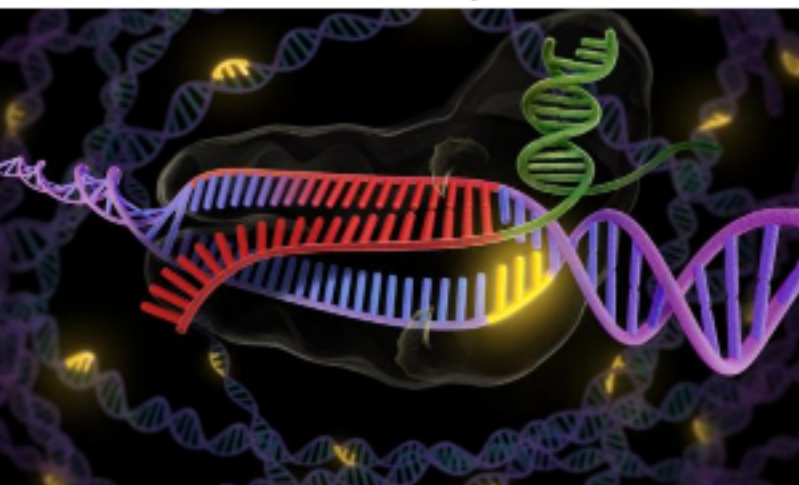
Compartilhar

46

G+1



Fonte: Jennifer Doudna/UC Berkeley



CRISPR, do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, é uma tecnologia de edição de genoma que permite identificar genes de interesse, no DNA de qualquer espécie, e modificá-lo de acordo com as necessidades da pesquisa, sem a inclusão de genes de outras espécies.

Segundo o pesquisador Alexandre Nepomuceno, da Embrapa Soja (Londrina, PR), um dos pioneiros na utilização do CRISPR na Empresa, essa tecnologia é relativamente nova – começou a ser utilizada na agricultura em 2014.

Antes não existiam ferramentas de edição de genoma, mas eram muito complexas. O CRISPR é mais acessível. Qualquer laboratório com treinamento adequado tem a capacidade de usar essa ferramenta para editar um genoma", explica o pesquisador.

De acordo com ele, o CRISPR funciona como um corretor ortográfico. "Por exemplo: no caso de uma doença genética, fruto de uma mutação nas bases nitrogenadas da cadeia de DNA, é possível corrigir isso por meio dessa ferramenta".

Alexandre Nepomuceno explica que o sistema CRISPR é composto por substâncias químicas: uma molécula de RNA e uma proteína. A combinação dessas duas substâncias consegue localizar a sequência de DNA que se quer modificar dentro do núcleo da célula e a modifica.



[日本語要約](#)

Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype

[Hao Yin](#), [Wen Xue](#), [Sidi Chen](#), [Roman L Bogorad](#), [Eric Benedetti](#), [Markus Grompe](#), [Victor Koteliansky](#), [Phillip A Sharp](#), [Tyler Jacks](#) & [Daniel G Anderson](#)

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding author](#)

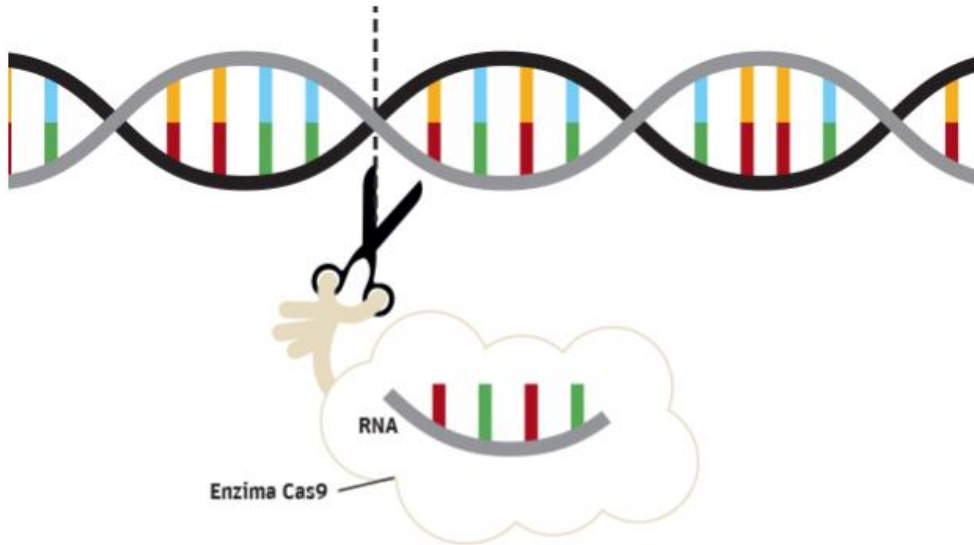


O MUNDO DO CRISPR

Nova técnica de edição genética pode mudar completamente desde a área da saúde até produção de combustível

Feito com o **thinglink..**

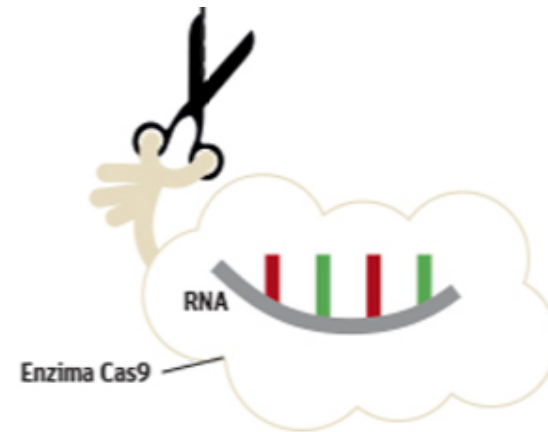
SABER MAIS >



Enzima Cas9

EDIÇÃO GENÔMICA

Conheça a técnica que permite fazer mudanças precisas no DNA



Enzima Cas9

EXEMPLOS

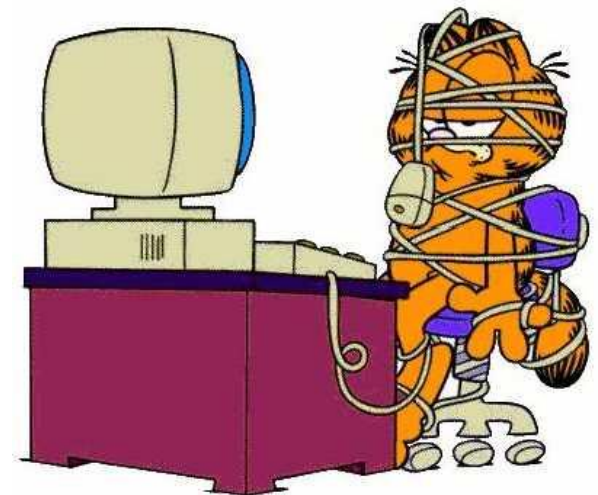
Um dos casos de sucesso já reportados pelos cientistas envolve o reparo de proteínas importantes para a contração do músculo, melhorando a distrofia muscular; em outro caso, alterou-se o DNA de mosquitos, reduzindo a transmissão de malária

VISUALIZANDO O PROCESSO...

https://www.youtube.com/watch?v=UfA_jAKV29g

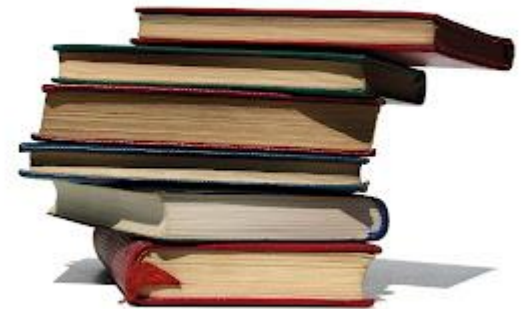
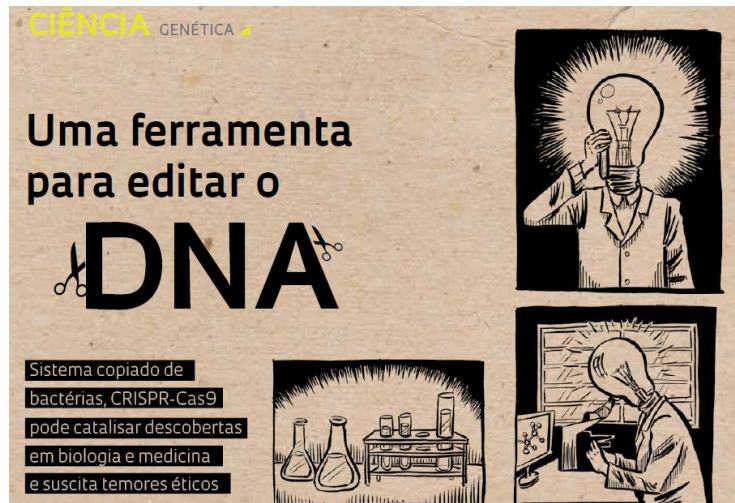
<https://www.youtube.com/watch?v=TnzcwTyr6cE>

<https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>



BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas Ed(s) Borém, A. Fritsche-Neto, R. (2013)
Cap 7 – Plantas Transgênicas, pp. 229-266.



ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceitos referentes a transgênicos
2. Transformação por agrobactéria
3. Transformação por biobalística
4. A importância da cultura de tecido na transformação de plantas
5. Transformação animal
6. Técnica de CRISPR

