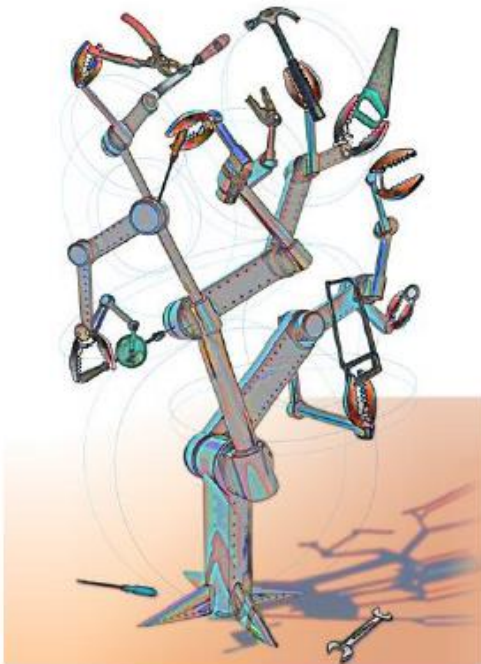


GENÉTICA MOLECULAR APLICADA NO MELHORAMENTO DE MICRORGANISMOS E BIOLOGIA SINTÉTICA

Aula 9

LGN232 – Genética Molecular



Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

MICROORGANISMOS

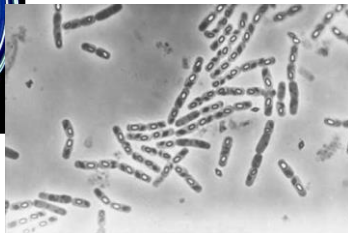
- Quem são?

Eubactérias

Arqueias



Procariotos



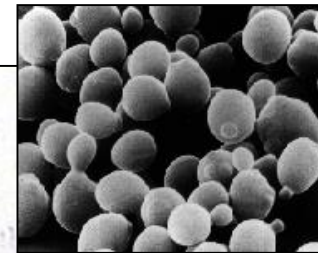
Fungos

Protozoários

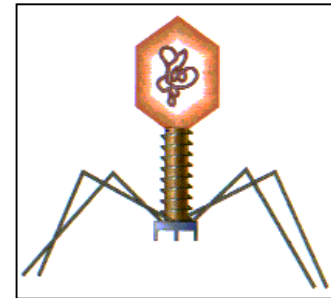
Algas Unicelulares



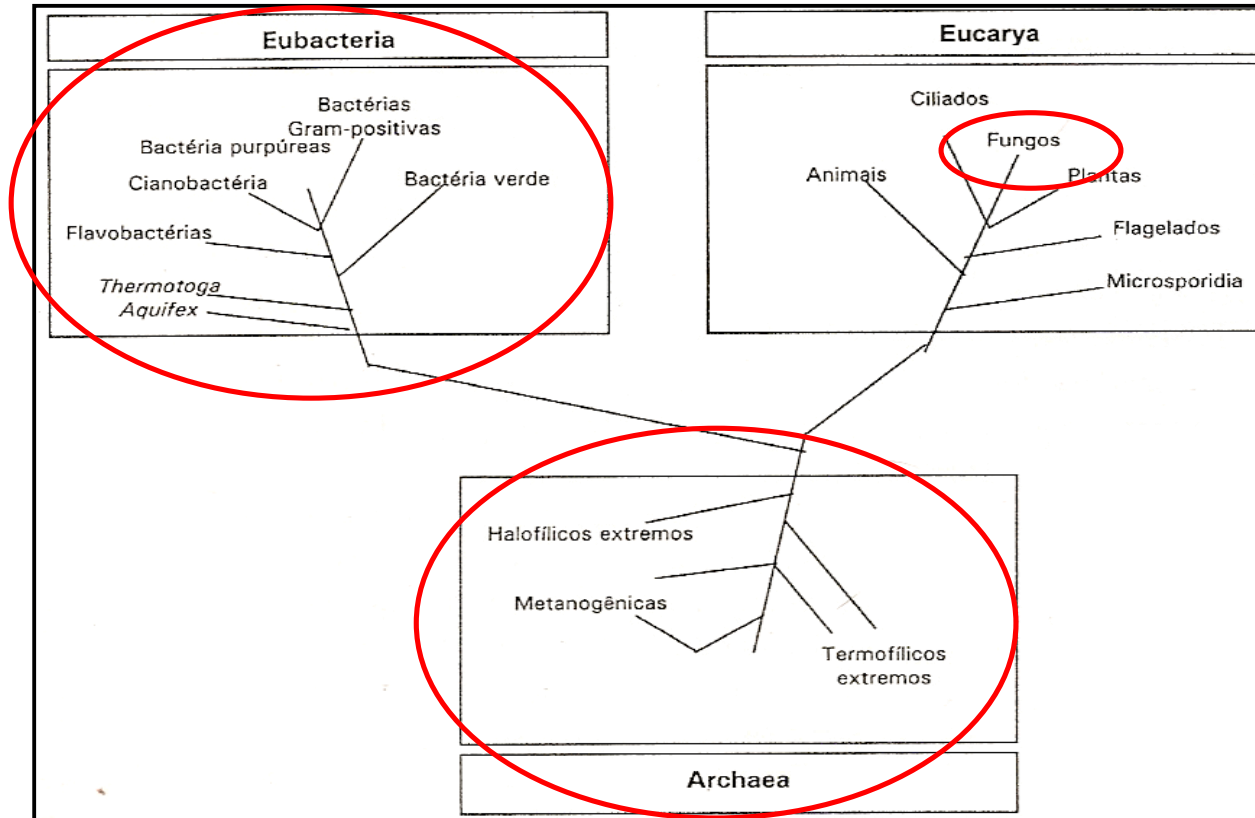
Eucariotos



Vírus



TRÊS DOMÍNIOS



Árvore filogenética derivada das seqüências de base de RNA ribossômico (adaptado de Carl Woese). Fonte: Melo et al., 2002.

DIVERSIDADE MICROBIANA

Espécie	Nº Conhecido	Nº Estimado	NC/NE %
Bactéria	4 700	40 000	11,0
Fungo	69 000	1 500 000	4,6
Alga	40 000	60 000	66,7
Planta	276 750	295 000	90,8
Protozoário	30 800	100 000	30,8

DIVERSIDADE MICROBIANA



DIVERSIDADE MICROBIANA

- Onde eles podem ser encontrados???

em quase
todos os

T elevadas (+110°C)
T muito baixas

**Alta variação na atividade
metabólica**

recifes de corais
lagos tropicais
mares profundos
florestas tropicais



DIVERSIDADE MICROBIANA

Grande diversidade reflete a importância para a biosfera:



- Degradação de materiais orgânicos;
- Degradação de substâncias xenobióticas;
- Participação de ciclos biogeoquímicos;
- Produção de diversos compostos;

**Necessidade de
CONSERVAÇÃO!!!**

ONDE É APLICADO?

Início: fermentação alcoólica - vinho e cerveja.

- antibióticos

Biomassa celular microbiana (SCP)

boi de 450 kg = 0,45 kg proteína.dia⁻¹

450 kg microrganismos = toneladas de proteína.dia⁻¹

- agricultura
- biorremediação

GENÉTICA MOLECULAR E MELHORAMENTO?

Um processo de interesse aplicado, para ser eficiente, deve produzir o máximo no mínimo período de tempo e no menor espaço.

M
E
L
H
O
R
A
R

Economia no processo;
Produtividade;
Eficiência na utilização de um substrato;
etc.

Linhagens mais apropriadas para
uso industrial e agrícola

MELHORAMENTO GENÉTICO

Processo de melhoramento depende:

- Tipo de microrganismo: bactéria x fungo
- Tipo de produto final: metabólitos primários
metabólitos secundário
organismo como um todo

ENTENDER A GENÉTICA MOLECULAR QUE REGE O PROCESSO!
DESENVOLVIMENTO DE MICROROGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS!

VANTAGENS DOS MICROORGANISMOS

Melhoramento de Microrganismos

Vs.

Melhoramento de Plantas

Complexidade

Superespecialização

Sazonalidade

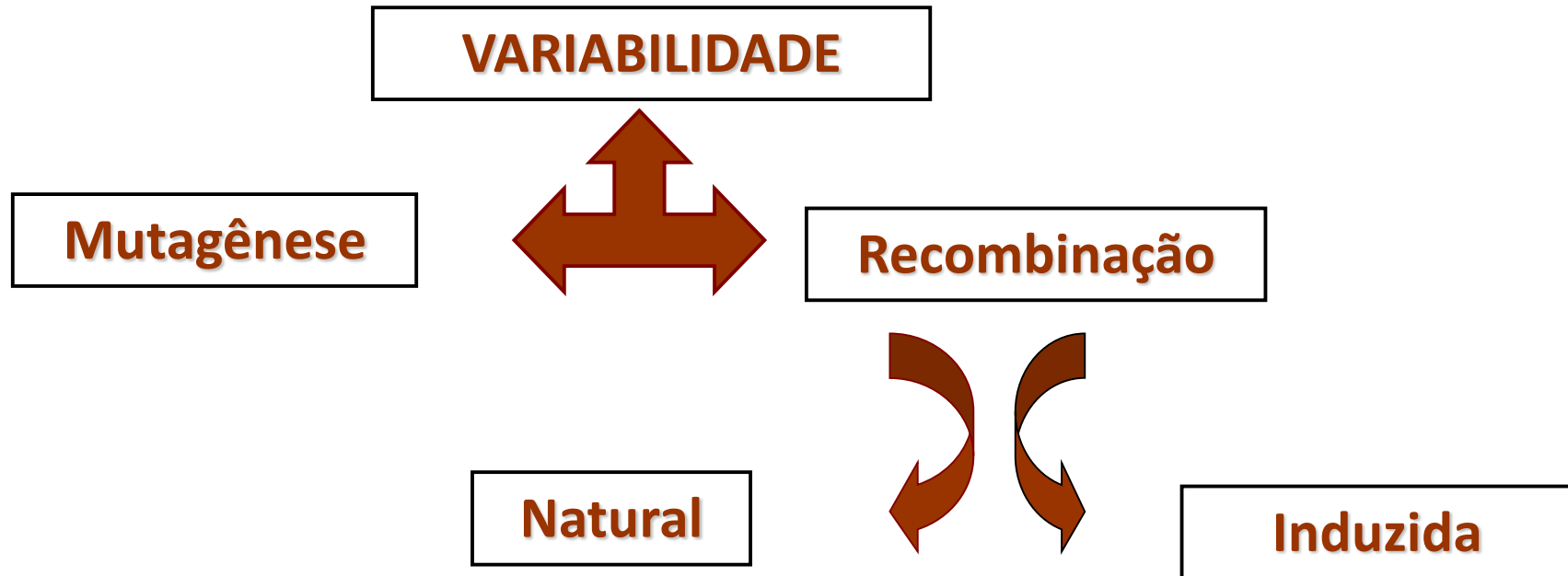
E o controle ambiental ?

MELHORAMENTO GENÉTICO

- **Melhoramento envolve três processos básicos:**
 - **Geração de variantes (variabilidade);**
 - **Seleção daqueles com propriedades desejadas;**
 - **Reunião, num único indivíduo, das melhores características desejadas (permuta e trocas genéticas).**

Técnicas Clássicas x Técnicas Modernas (TDR)

PRINCÍPIO DO MELHORAMENTO



- Ciclo sexual e parassexual
- Transdução
- Conjugação
- Transformação

- Fusão de Protoplasto
- Transformação
- Transfecção

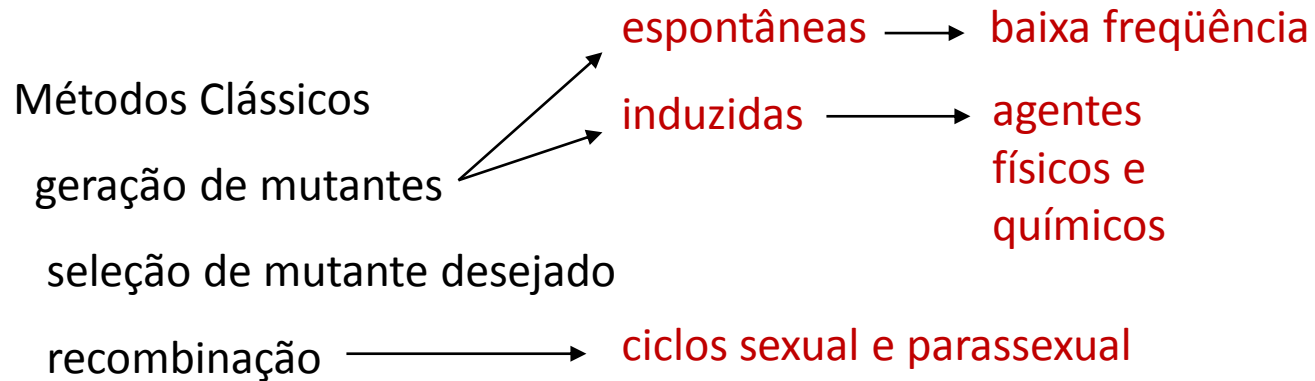
MÉTODOS DE MELHORAMENTO - BACTÉRIAS



Métodos Moleculares:

- TDR ligação dos fragmentos de DNA
- transformação da bactéria hospedeira
- obtenção de colônias em meio seletivo

MÉTODOS DE MELHORAMENTO - FUNGOS



Métodos Moleculares:

fusão de protoplastos

transformação

TDR

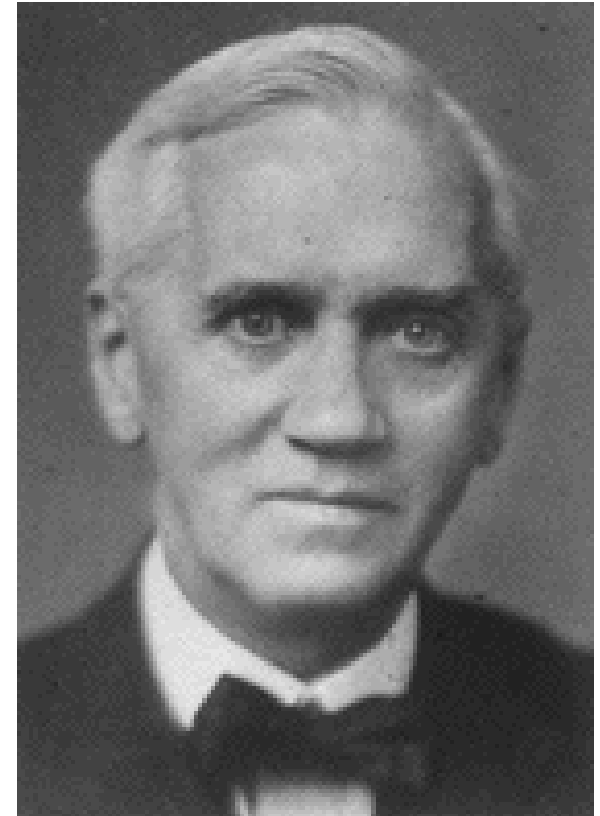
APLICAÇÕES



Penicillium chrysogenum

Produto: penicilina

“Contaminante inibia o crescimento de *Staphylococcus* mesmo diluído 800 vezes.”



Sir Alexander Fleming

☪ 1881 📅 1955

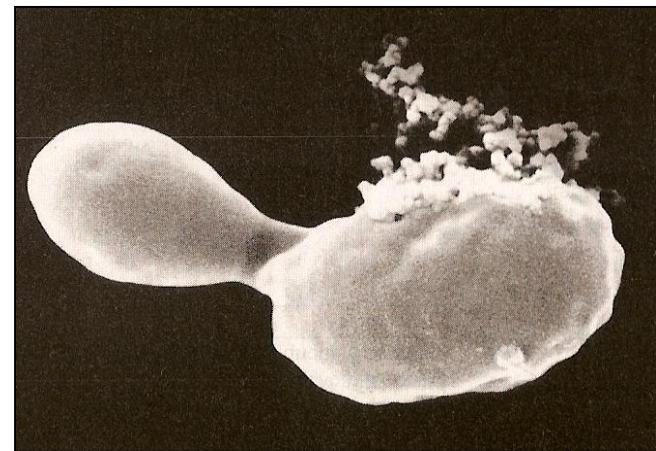
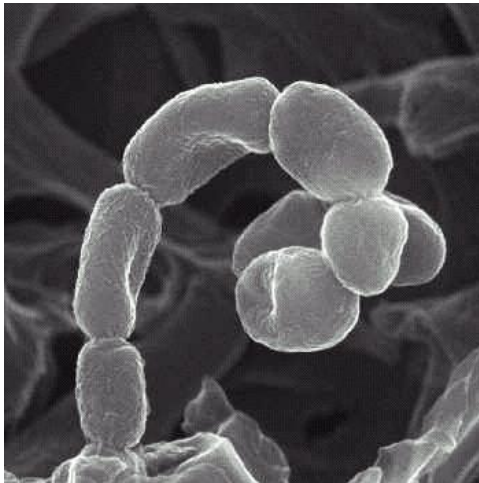
Nobel Medicina 1945

Linhagem Fleming ambiente / seleção natural	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linhagem NRRL-1951 mutantes espontâneos	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linhagem NRRL- 1951.325 raio-X	150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linhagem X-1612 ultra-violeta	300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linhagem Wis Q-176 ultra-violeta nitrogênio mostarda mutantes espontâneos	550 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linhagem Wis51-20	
Linhagem E-1 nitrogênio mostarda mutantes espontâneos ultra-violeta	
Linhagem E-15-1	7 000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ ↓ ↓ ↓	
Várias Linhagens Industriais	50 000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

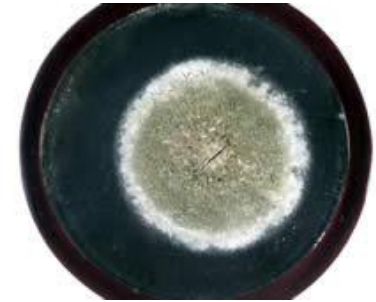
Metabólitos secundários de diversas bactérias e fungos.

- Melhoramento visando aumento de produtividade e diminuição de custos de produção.
- Mutagênese e ferramentas moleculares.



***Streptomyces* spp. productores de antibióticos**

<i>Produtor</i>	<i>Antibiótico</i>
<i>S. alboniger</i>	Puromicina
<i>S. ambofaciens</i>	Espiramicina
<i>S. aureofaciens</i>	Tetraciclina
<i>S. avermitilis</i>	Avermictina
<i>S. azureus</i>	Tiostrepton
<i>S. clavuligerus</i>	Cefamicina C
<i>S. coelicolor</i>	Actinorodina
<i>S. fradiae</i>	Tilosina
<i>S. galileus</i>	Aclacinomicina A
<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomicina
<i>S. griseus</i>	Estreptomicina
<i>S. hygroscopicus</i>	Bialafos
<i>S. peuceticus</i>	Daunorubicina
<i>S. rimosus</i>	Oxitetraciclina
<i>S. thernotolerans</i>	Carbomicina
<i>S. venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>S. violaceoruber</i>	Granacitina
<i>S. viridochromogenes</i>	Bialafos



Saccharomyces cerevisiae

Produto: vinho

Local: Caxias do Sul RS (~1985).



- *Saccharomyces cerevisiae* linhagem “Montrachet” - alta produção
- *Schyzosaccharomyces pombe* linhagem “Benda” - decompõe ác. L-málico
- opção: fermentação escalada
- melhoramento: obtenção de recombinantes por fusão de protoplastos e retrocruzamentos de recombinantes com *Saccharomyces cerevisiae*.

NOTA: primeira patente norte-americana de um produto biotecnológico brasileiro e uma das primeiras patentes mundiais no campo da enologia.

PRODUÇÃO DE ETANOL

- Fatores de síntese

S. cerevisiae - produção compostos heterólogos

Vacina hepatite B

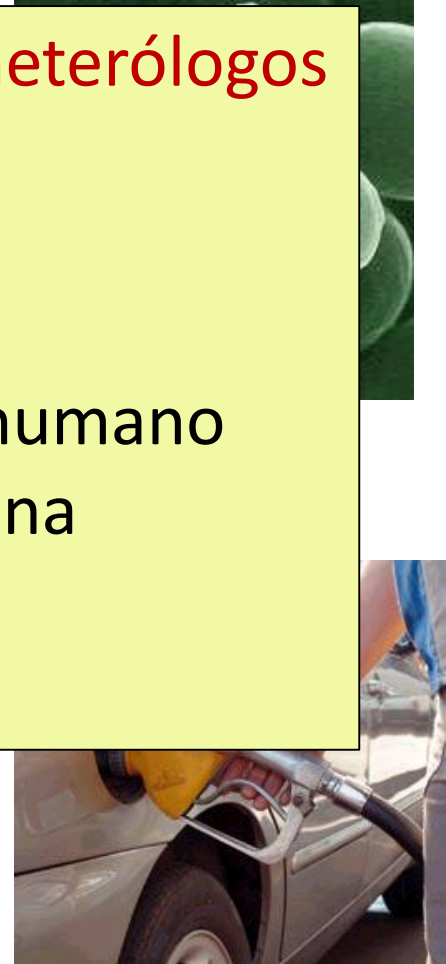
Interferon humano

Fator de crescimento epidermal humano

Inibidor de trombina - hirudina

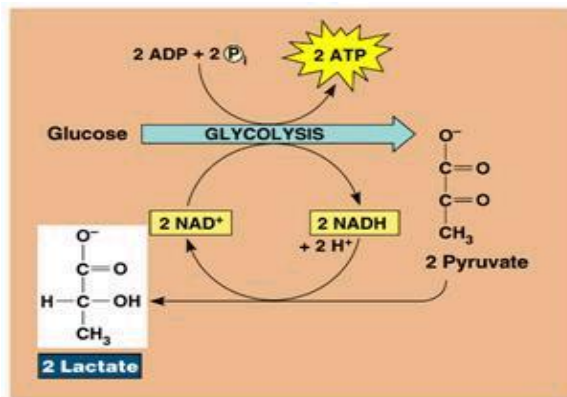
Hormônio da paratireóide

Técnicas de engenharia genética para introdução de novos genes em *S. cerevisiae* - uso de novos substratos.



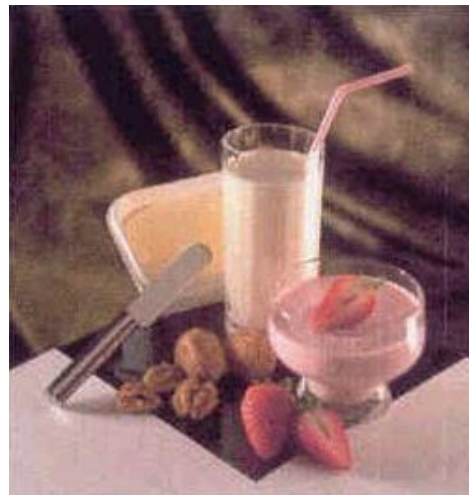
PRODUÇÃO DE LATICÍNEOS E COMPOSTOS AROMÁTICOS

- *Lactococcus, Streptococcus, Atopodium, Lactobacillus* e *Carnobacterium*
- Modificação genética para aumento da expressão de genes desejáveis



(b) Lactic acid fermentation

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



PRODUÇÃO ÁCIDO CÍTRICO

- Indústria de alimentos e bebidas
- Indústria farmacêutica e cosméticos

Irradiação com raios gama e tratamento com mutagênicos



Aspergillus niger

CONTROLE BIOLÓGICO

Fungos entomopatogênico:
Beauveria
Metharizium...



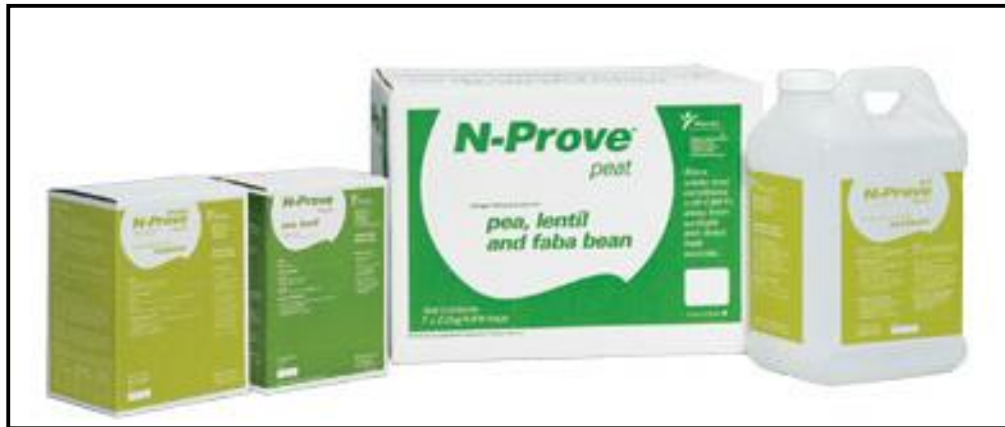
Bacillus thuringiensis

PRODUTOS COMERCIAIS



BIOFERTILIZANTES

- Melhoramento: clonagem de genes *nif* / *fix* e *nod* / *nol*.



Rhizobium sp.

MICROORGANISMOS TRANSGÊNICOS

Clonagem do gene quitinase em *Azospirillum*, fixador de nitrogênio.

Transfer of a plant chitinase gene into a nitrogen-fixing *Azospirillum* and study of its expression¹

Jayaraman Jayaraj, Subbaratnam Muthukrishnan, and George H. Liang

Can. J. Microbiol. 50: 509–513 (2004)

METAGENÔMICA

Obtenção do gene catabolizador de naftaleno, utilizado na biorremediação.

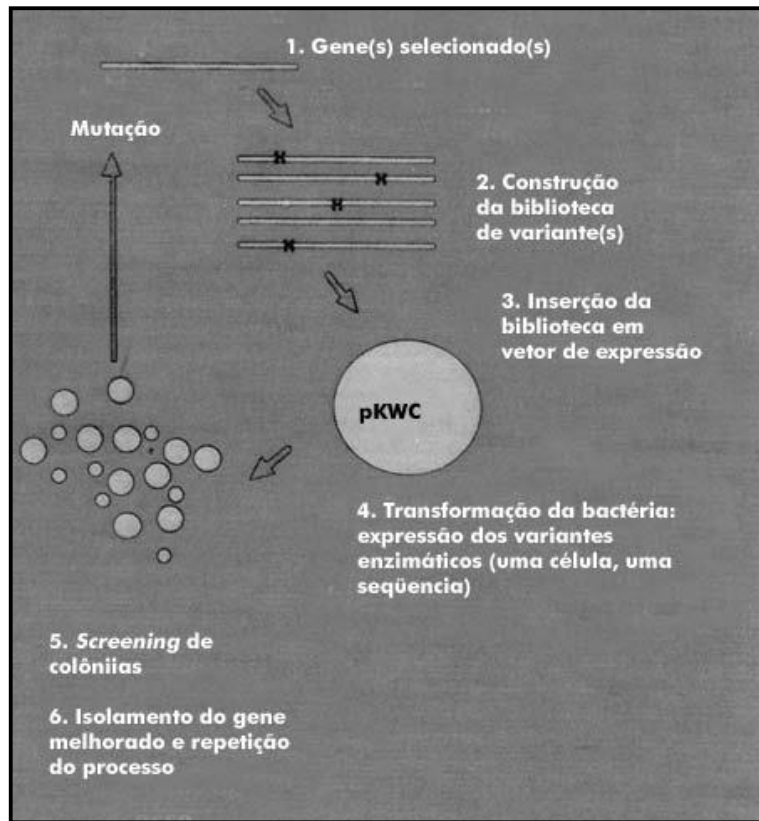
Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-006-0671-4

ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches

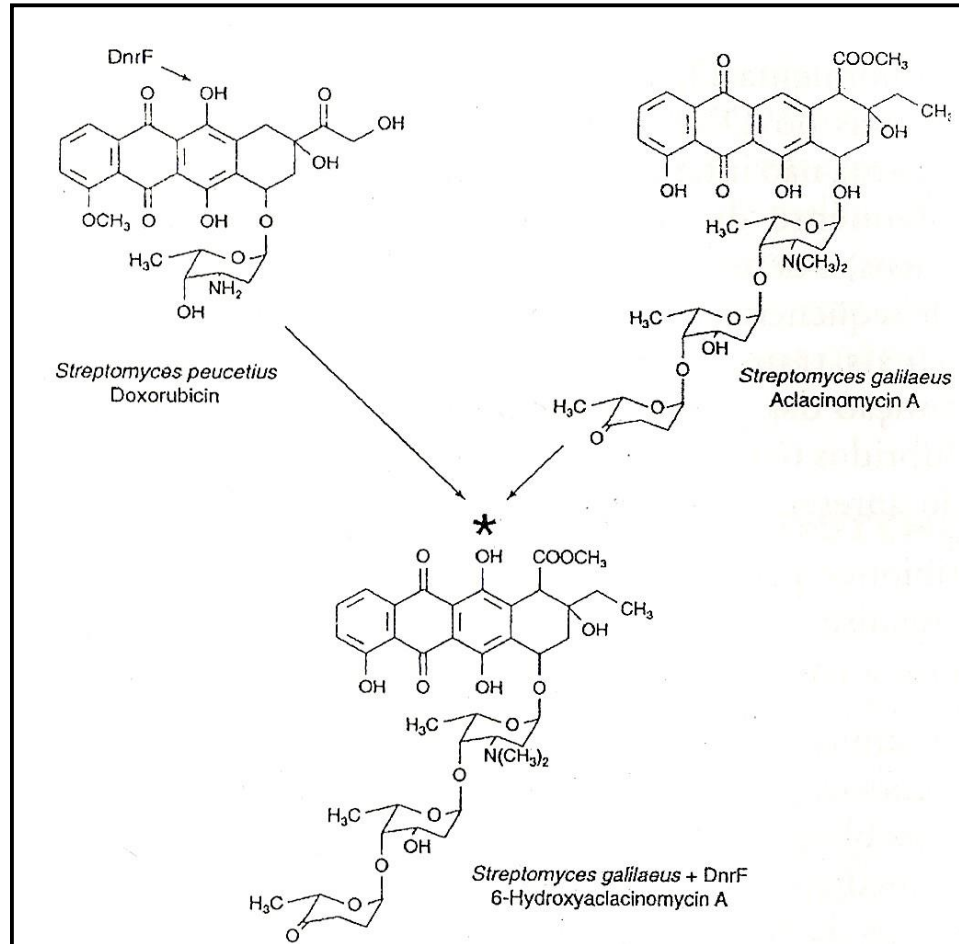
Akira Ono • Ryo Miyazaki • Masahiro Sota •
Yoshiyuki Ohtsubo • Yuji Nagata • Masataka Tsuda

EVOLUÇÃO DIRIGIDA



Criação artificial de variabilidade genética por meio de várias técnicas moleculares.

PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS HÍBRIDOS



PERSPECTIVAS



SUPER MICRORGANISMO



 [comments on this story](#)

Published online 27 January 2010 | *Nature* **463**, 409 (2010) | doi:10.1038/463409a

News

Stories by subject

- [Business](#)
- [Earth and Environment](#)
- [Policy](#)
- [Technology](#)

Stories by keywords

- [Energy](#)
- [Biofuels](#)
- [Biotechnology](#)

Altered microbe makes biofuel

Bacterium could work directly on grass or crop waste.

[Jeff Tollefson](#)

In a bid to overcome the drawbacks of existing biofuels, researchers have engineered a bacterium that can convert a form of raw plant biomass directly into clean, road-ready



BIOLOGIA SINTÉTICA

A biologia sintética pode ser entendida como a criação de organismos feitos sob medida, sejam eles geneticamente modificados ou construídos a partir do zero. Ela surgiu a partir das técnicas de transgenia, que permitem alterar um organismo inserindo ou removendo pedaços de DNA de seu genoma.

Área que combina biologia, química e engenharia para projetar e construir novas funções e sistemas vivos, ou para redesenhar os sistemas vivos existentes com o propósito de torná-los mais úteis (The Royal Society, 2008).

OBJETIVOS

1. Aprender sobre a vida através de sua construção;
2. Fazer com que a engenharia genética, seja padronizada nas suas criações e recombinação para produzir novos e mais sofisticados sistemas;
3. Expandir os limites de seres vivos e máquinas até que ambos se unam, para produção de organismos realmente programáveis.

CONSTRUINDO NOVAS ROTAS ...

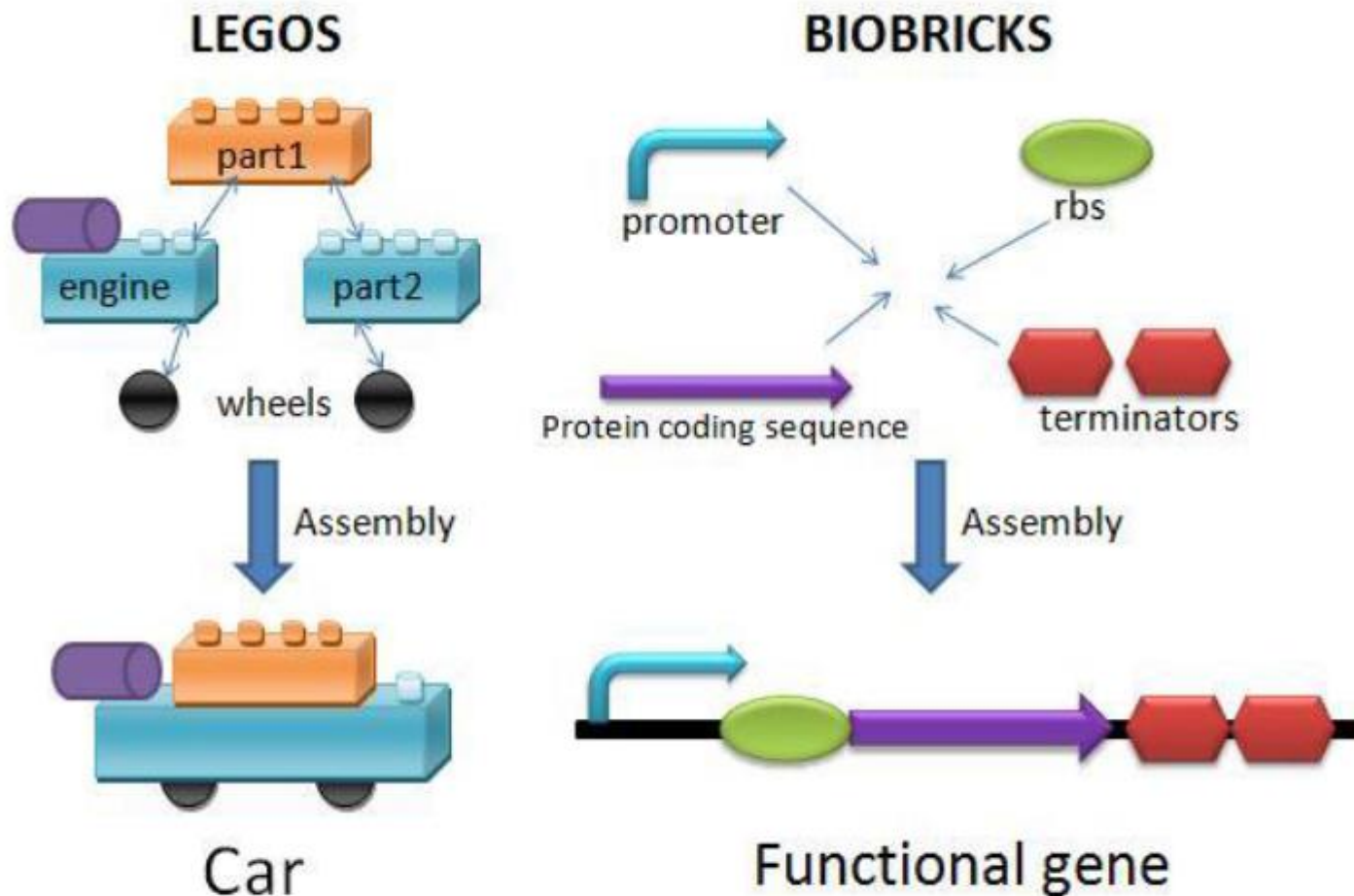


Figure1: Comparison between the concept of Legos and Biobricks

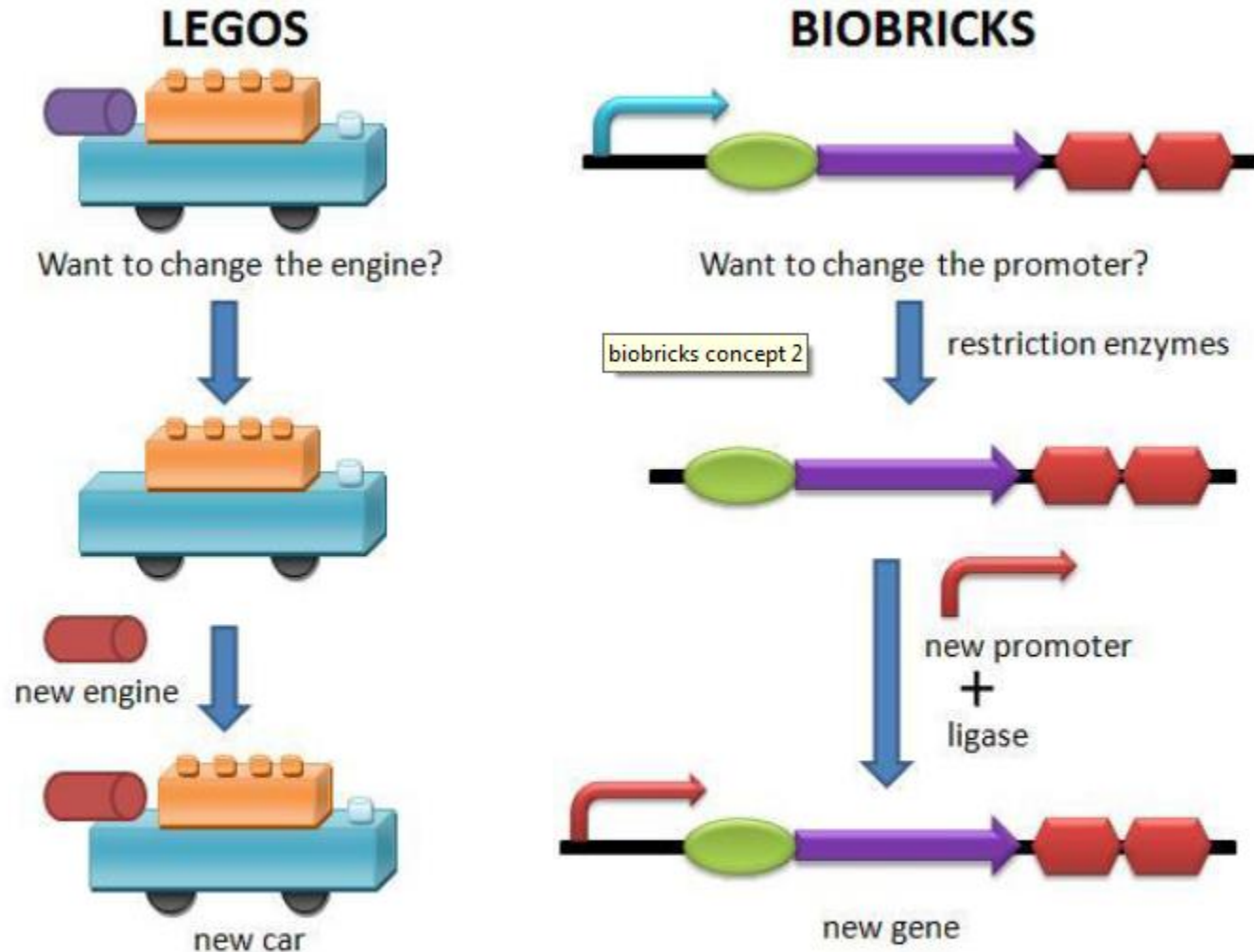
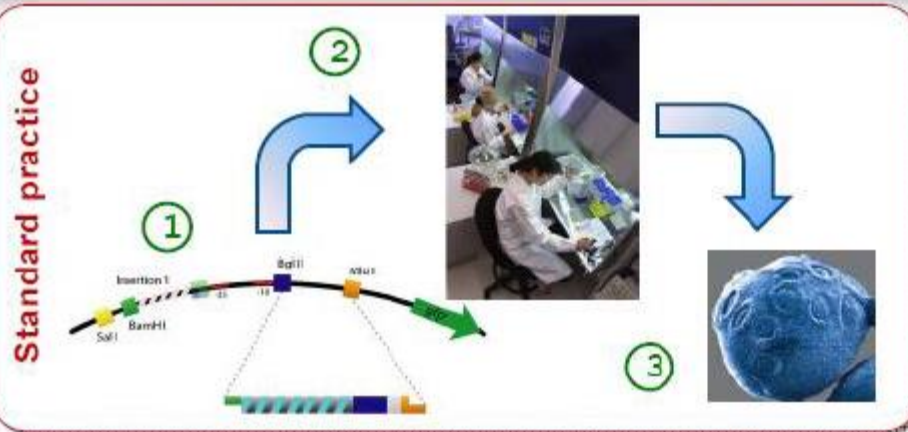


Figure2: The concept of interchangeable parts in biobricks

PLATAFORMA INOVADORA

Standardization & Automation of Strain Engineering Rapid, reliable microbial engineering



Traditional construction

- ① Labor intensive planning
- ② Hand crafted construction
- ③ Relatively slow, expensive, error-prone
- ④ 4 week cycle, 40 strains per cycle with 4 FTEs



Automated construction

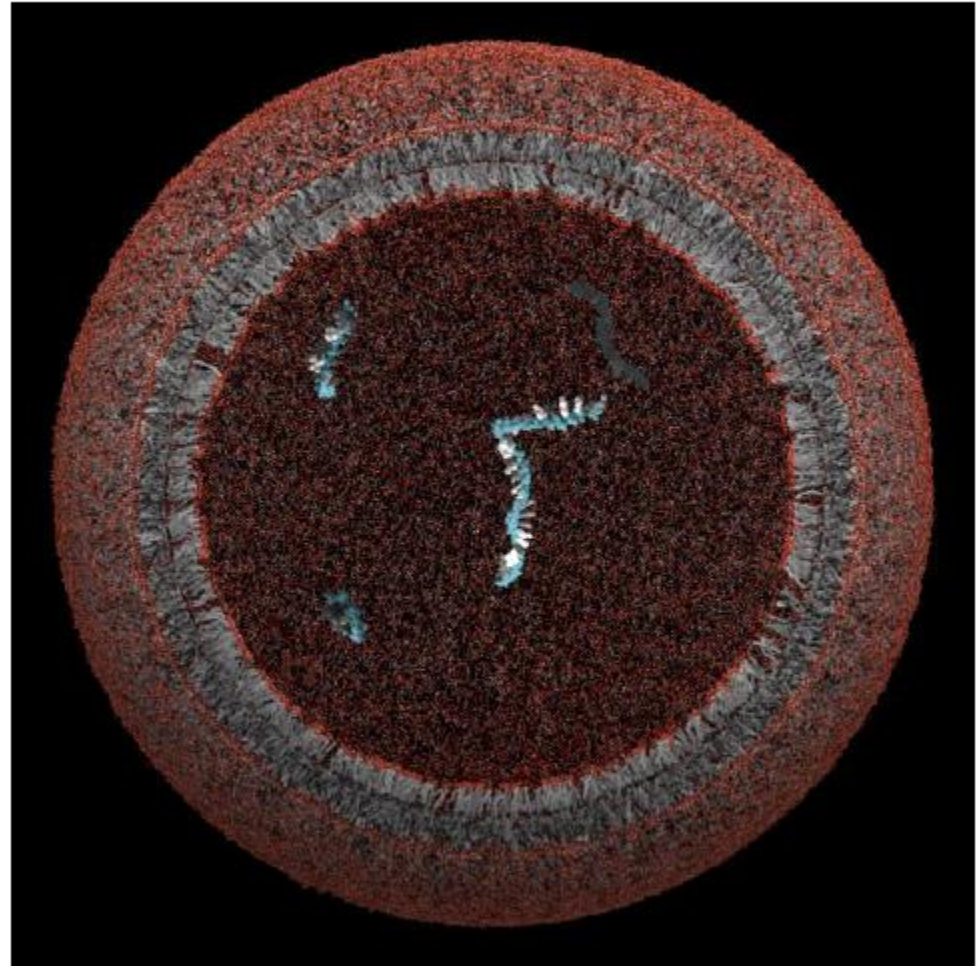
- ① Computer assisted design
- ② Robotics platform for unit operations
- ③ Fast, inexpensive, reliable
- ④ 6 week cycle, 5000 strains per cycle with 4 FTEs

BIOLOGIA SINTÉTICA NO MUNDO



PROTOCÉLULAS

Apesar de estar formada por dois componentes (RNA replicase e uma membrana de ácidos graxos), uma protocélula seria capaz de crescer, de se duplicar e de evoluir.



GENOMA MÍNIMO

- *Mycoplasma genitalium* (580.070 pb) – 477 genes:
 - ~120 genes não são necessários para o crescimento em lab
 - ~350 genes são necessários para o crescimento em lab

***M. genitalium* JCVI-1.0**

TIME Thursday, Jan. 24, 2008
Scientist Creates Life — Almost
By Alice Park

Complete chemical synthesis,
assembly, and cloning of a
Mycoplasma genitalium
genome.
Gibson *et al.* Science 319(5867):
1215-1220. 2008

<http://www.sciencemag.org/content/319/5/867/1215.abstract>

PRIMEIRO ORGANISMO SINTÉTICO



Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson *et al.*

Science **329**, 52 (2010);

DOI: 10.1126/science.1190719

RESEARCH ARTICLE

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,¹ Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}

Custo = 20 milhões de dólares
Next big Future - <http://nextbigfuture.com/>

COMO ACONTECEU?

Anunciada a criação da primeira linhagem de células viáveis de um ser vivo controlada por um genoma totalmente sintetizado em laboratório

Pesquisadores transformaram uma vida em outra, no caso uma bactéria *Mycoplasma capricolum* em outra, a *Mycoplasma mycoides*

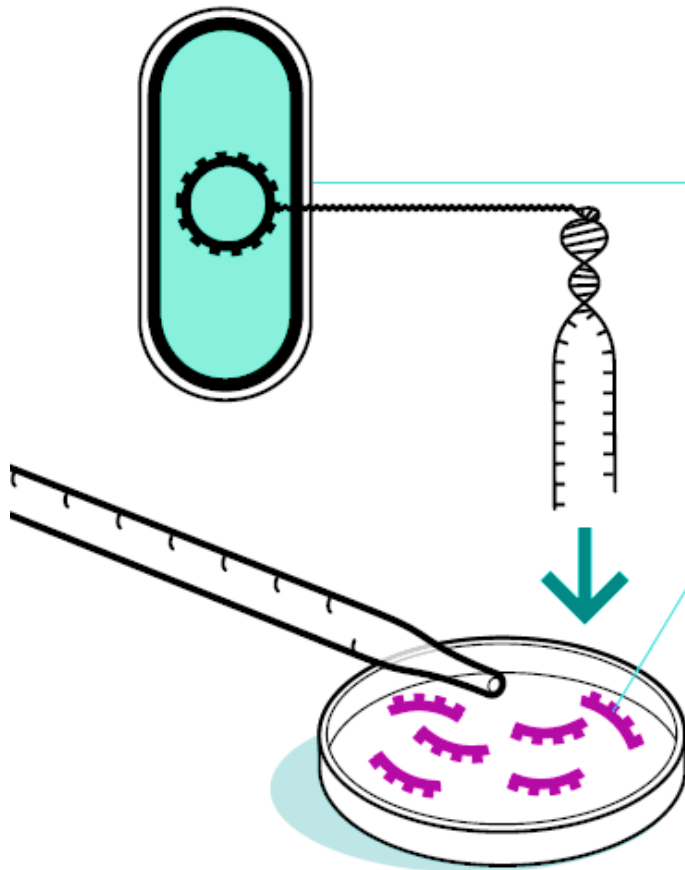
Grupo de Venter transferiu o genoma de uma bactéria em outra que assumiu o comportamento da primeira

Dois dias após o transplante, as células deixaram de conter o DNA original da *M. capricolum* (seja porque ele foi destruído ou diluído no processo de replicação) e apresentavam um único tipo de material genético, o cromossomo sintético da *M. mycoides*

Em toda essa operação, apenas 14 genes sem muita importância da *M. mycoides* se perderam ou foram anulados

O transplante de DNA passo a passo

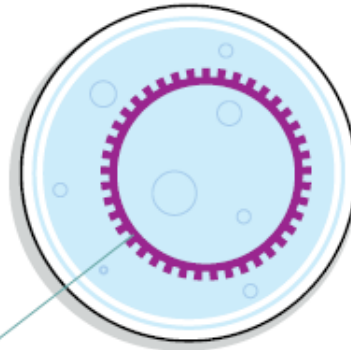
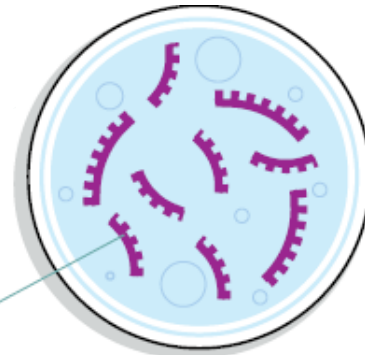
Como os cientistas fizeram a célula de uma bactéria ser controlada pelo genoma sintético de outra



- 1** Os pesquisadores do JCVI sequenciaram o genoma da bactéria *Mycoplasma mycoides*, um único cromossomo com cerca de 1,1 milhão de pares de bases, e armazenaram os dados num computador.
- 2** Em seguida, pediram a um laboratório que todo o DNA do organismo fosse sintetizado em 1.078 fragmentos de acordo com especificações bastante precisas. Denominado tecnicamente *cassette*, cada fragmento tinha 1.080 pares de bases e mais uma determinada sequência de 80 pares de bases em cada extremidade, útil para a remontagem de todo o genoma.

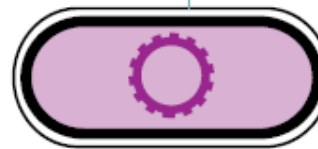
3

Quebrado em pedaços, o genoma sintético foi inserido na *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro da levedura, os fragmentos de DNA foram unidos progressivamente na ordem correta com o auxílio do sistema genético do fungo. Primeiro, os cientistas juntaram todos os cassettes em trechos de DNA com 10 mil pares de bases. Depois, cada trecho foi ligado até originar 11 segmentos com 100 mil pares de bases. Por fim, os segmentos foram unidos e o cromossomo, remontado na célula de levedura.



4

O cromossomo foi então retirado da levedura e transplantado para células de uma bactéria semelhante, a *Mycoplasma capricolum*. As células receptoras aceitaram o DNA implantado, passaram a produzir as proteínas da *M. mycoides* e a se replicar normalmente. Nasceu o primeiro organismo regido por um genoma sintético, a bactéria *M. mycoides* JCVI-syn1.0.



ORGANISMOS SINTÉTICOS..COMO FAZER..

Vida em 7 etapas

Entenda como a equipe do americano Craig Venter criou uma célula com DNA sintético

1. Não comece do zero

Ninguém sabe redigir um genoma inteiro a partir do zero. Por isso, os cientistas partiram de uma bactéria que já existe na natureza: a *M. mycoides*. Ela foi escolhida porque tem um genoma considerado pequeno, com "apenas" 1 milhão de letras (o genoma humano é 3 200 vezes maior).

2. Leia o DNA original

Os cientistas escaneiam o DNA dessa bactéria. Para fazer isso, aplicam enzimas que quebram o DNA em pequenos pedaços - que então são submetidos a um campo magnético, lidos com raio X e digitalizados. É a mesma técnica que Craig Venter usou para decifrar o genoma humano.

3. Altere no computador

Com a sequência genética digitalizada, os cientistas podem editá-la no computador - como se fosse um arquivo de Word. Eles rescreveram trechos do DNA, incluindo 4 mil novas letras genéticas - que incluem informações como o nome da empresa de Venter e trechos de livros.

4. Transforme em molécula

Hora de transformar o código digital em genoma. Para isso, os cientistas manipulam as 4 substâncias químicas que compõem o DNA na natureza - adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Cada uma delas corresponde a uma letra do genoma artificial - que é montado em blocos de 1 000 letras.

5. Insira num fungo

Os blocos são injetados em fungos, que começaram a juntá-los em pedaços maiores. Os fungos fazem essas emendas aleatoriamente, sem critério. Por isso, os cientistas precisam tentar o procedimento muitas vezes - até que, por pura tentativa e erro, os fungos remontem os pedaços de DNA na ordem correta.

6. Repita o processo

Conforme os fungos vão acertando a montagem do DNA, o genoma vai ficando maior. Primeiro, eles juntaram blocos de 1 000 letras genéticas em grupos de 10 mil. Depois, 100 mil. Por fim, 1 milhão de letras - elas formam um cromossomo sintético que contém o DNA criado pelos cientistas no computador.

7. Implante numa célula

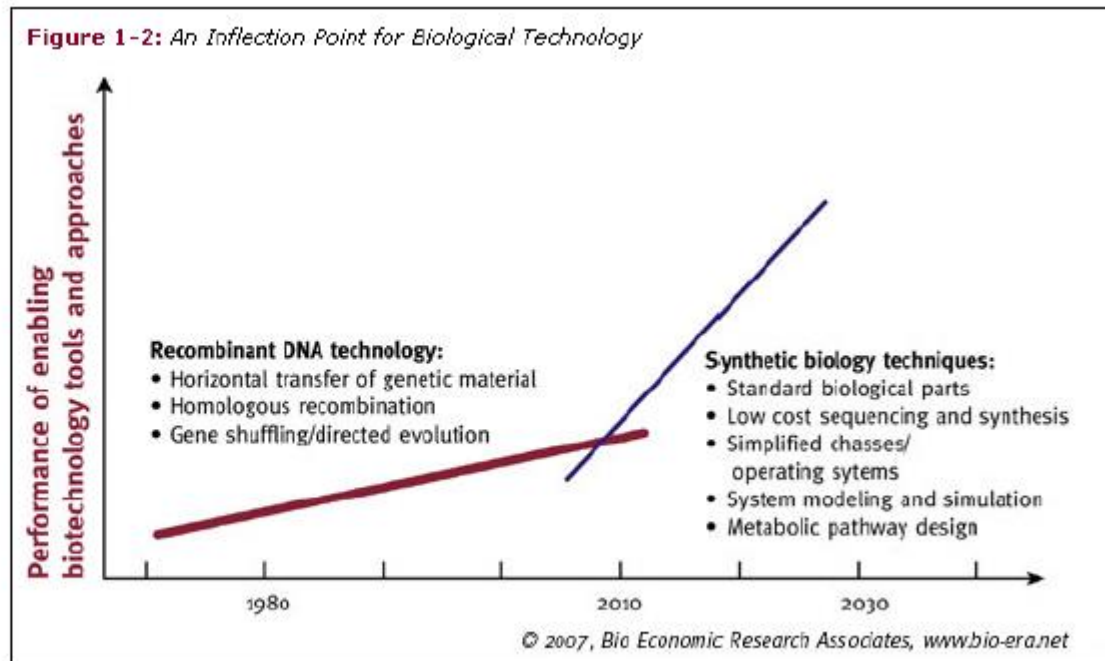
O cromossomo é injetado num ser vivo - no caso, uma bactéria chamada *M. capricolum*. Sob o controle do genoma artificial, essa bactéria se transforma numa nova espécie, cujas características são definidas pelo DNA artificial. Está criada uma forma de vida sintética.



Mãos a obra

BIOLOGIA SINTÉTICA, UMA ENGENHARIA EXTREMA?

“In our view, synthetic biology is an extension of the continuum of genetic science that has been used safely for more than 40 years by the biotechnology industry in development of commercial products.”
(Erickson, Singh and Winters, 2011)



Riscos de BS e GM análogos?

MAS PARA QUE TUDO ISSO?

Produção de combustíveis

Os organismos sintéticos poderiam ser manipulados para produzir hidrogênio - um combustível altamente eficiente, e cuja queima não polui o ambiente. Na natureza, já existem genes capazes de fazer isso: estão presentes em determinadas bactérias marinhas, que são capazes de "comer" metano e excretar hidrogênio como resultado.

Cura de doenças

A ideia é conceber bactérias que ajudem a combater certos tipos de doenças, como câncer e infecções resistentes a antibióticos. Bastaria criar um microorganismo programado para se alimentar de determinada proteína (que só exista nas células que você deseja destruir, como as cancerosas) e injetá-lo no organismo.

Combate ao aquecimento global

O processo de fotossíntese é a transformação de água, CO₂ e luz em oxigênio e açúcar. Com a engenharia genética, talvez seja possível criar micróbios que façam a fotossíntese com mais eficiência do que as plantas - e removam mais CO₂ da atmosfera, reduzindo o efeito estufa e freando o aquecimento global.

Fim do lixo

Os lixões e os oceanos do mundo estão cheios de plástico - que levará centenas de milhares de anos para se degradar e desaparecer. Mas na natureza já existe uma bactéria, a Flavobacterium, capaz de comer um plástico: náilon. A biologia sintética poderia aperfeiçoar essa capacidade, criando um micro-organismo que pudesse digerir todos os tipos de plástico.

HÁ RISCOS?



Acidente biológico

Se as bactérias comedoras de CO₂ escapassem do controle, por exemplo, e consumissem todo esse gás da atmosfera terrestre, a temperatura no planeta cairia para -18 C. Os cientistas dizem que os organismos artificiais serão propositalmente frágeis, incapazes de sobreviver fora de determinadas condições. Mas sempre existe a possibilidade de que eles sofram mutações - e se transformem em pragas incontroláveis.

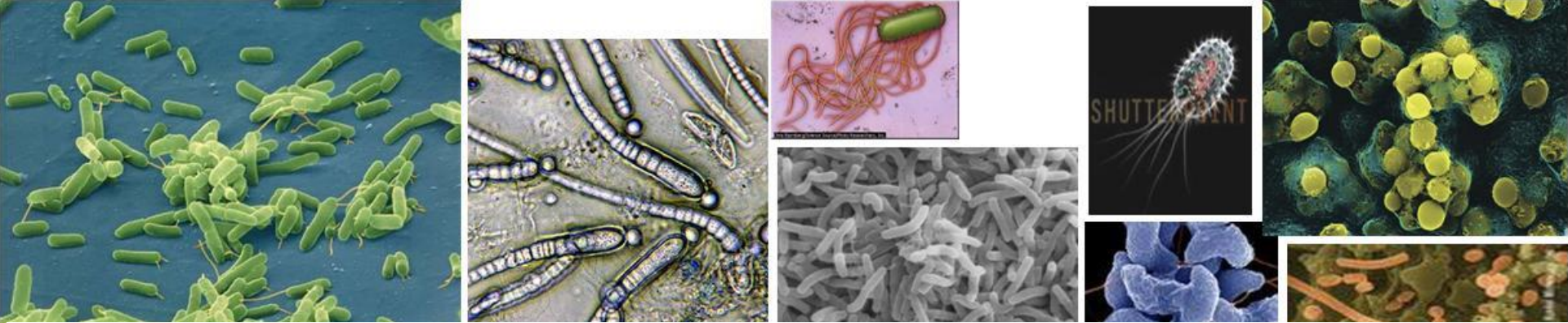
Guerra e terrorismo

Lembra dos ataques terroristas com a bactéria antraz, que assustaram os EUA em 2001? Com a biologia sintética, será possível aumentar a potência de armas como essa (desenvolvendo um antraz mais facilmente transmissível, por exemplo). Ou então criar vírus artificiais altamente letais e resistentes, contra os quais não exista nenhum tipo de tratamento conhecido.

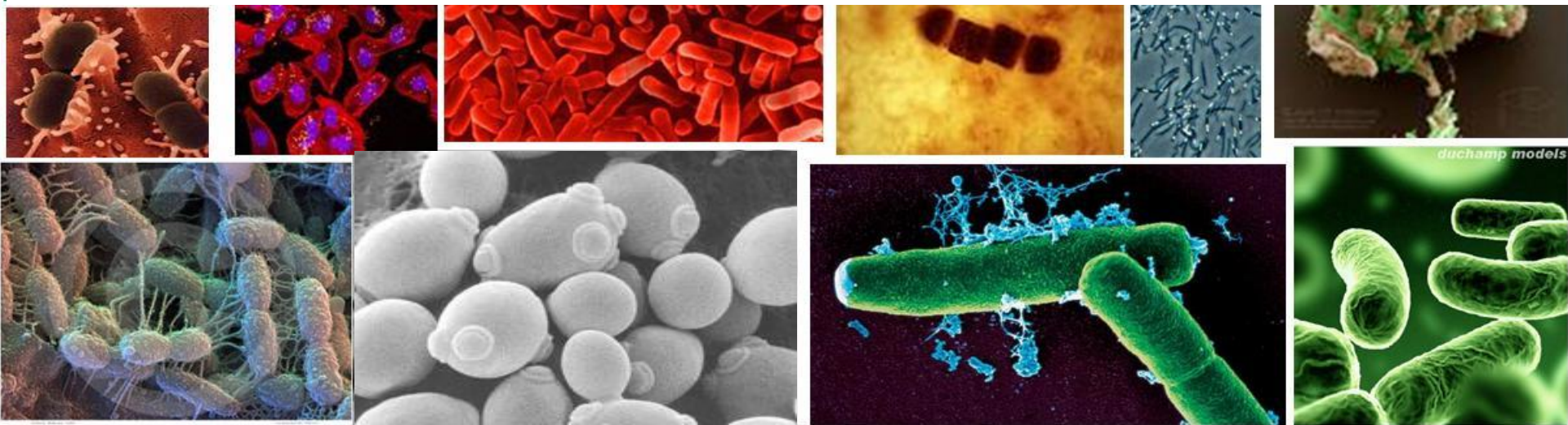
THE REGULATION OF SYNTHETIC BIOLOGY
A GUIDE TO UNITED STATES AND EUROPEAN UNION REGULATIONS, RULES AND GUIDELINES
SynBERC and iGEM Version 9.1 January 10, 2012

**Shlomiya Bar-Yam, Jennifer Byers-Corbin, Rocco Casagrande, Florentine Eichler, Allen Lin, Martin Oesterreicher,
Pernilla Regardh, R. Donald Turlington, and Kenneth A. Oye¹**

INTRODUCTION	01
UNITED STATES FEDERAL REGULATIONS.....	02
NIH Guidelines	02
EPA Regulations	05
USDA APHIS Regulations	07
FDA Regulations	09
Commerce Department Regulations	09
Select Agent Rules	11
HHS Synthesis Screening Guidance for Providers of Synthetic Double Stranded DNA	12
EUROPEAN UNION DIRECTIVES AND REGULATIONS.....	14
Directive 90/219/EEC on Contained Use of GMMs	14
Directive 2001/18/EC on Deliberate Release into the Environment of GMMs	17
Regulation 1829/2003 on Genetically Modified Food and Feed	17
Regulation 1830/2003 Concerning Traceability and Labeling of GMOs	19
Regulation 428/2009 on Export Controls of Dual-Use Goods	20
European Agreement Concerning International Carriage of Dangerous Goods by Road	22
EU Legal Framework Concerning the Prevention of Bio-Terrorist Acts	22
Directive 2004/35/EC on Environmental Liability	23
INTERNATIONAL TREATIES AND AGREEMENTS.....	25
Convention on Biological Diversity	25
Cartagena Protocol and Nagoya-Kuala Lumpur Supplementary Protocol on Liability	25
UN Bioweapons Convention	26
The Australia Group Guidelines	26
CONCLUSIONS -- CURRENT COVERAGE AND FUTURE PROSPECTS.....	28



O segredo da vida...



SITES INTERESSANTES E VÍDEOS...

THE SYNTHETIC BIOLOGY PROJECT (<http://www.synbioproject.org/about/>)

SYNBIOSAFE (<http://www.synbiosafe.eu/>)

JCVI (<http://www.jcvi.org/cms/research/groups/synthetic-biology-bioenergy/>)

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

<https://www.youtube.com/watch?v=-gnTr7itDHc>

https://www.youtube.com/watch?v=1YIME6_VsXk



BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO – MICRORGANISMOS, MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C (ED.), EMBRAPA.

GENÉTICA DE MICRORGANISMOS. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO (AUTOR). EDITORA UFG.

EL-HANI, C.N.; RIOS, V.P. Vida sintética: uma nova revolução. **ComCiência**, n.102, 2008

GERD, H.G. et al. Preparing synthetic biology for the world. **Frontiers in Microbiology**, v.4, artigo 5, 2013.

GIBSON, D.G. et al. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. **Science** 329, v. 52, 2010.

PIVETTA, M. A síntese da criação. **Pesquisa FAPESP** ,172, junho de 2010.