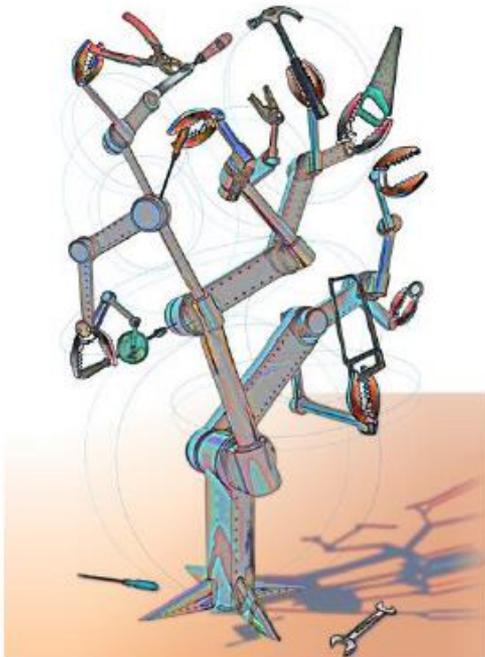


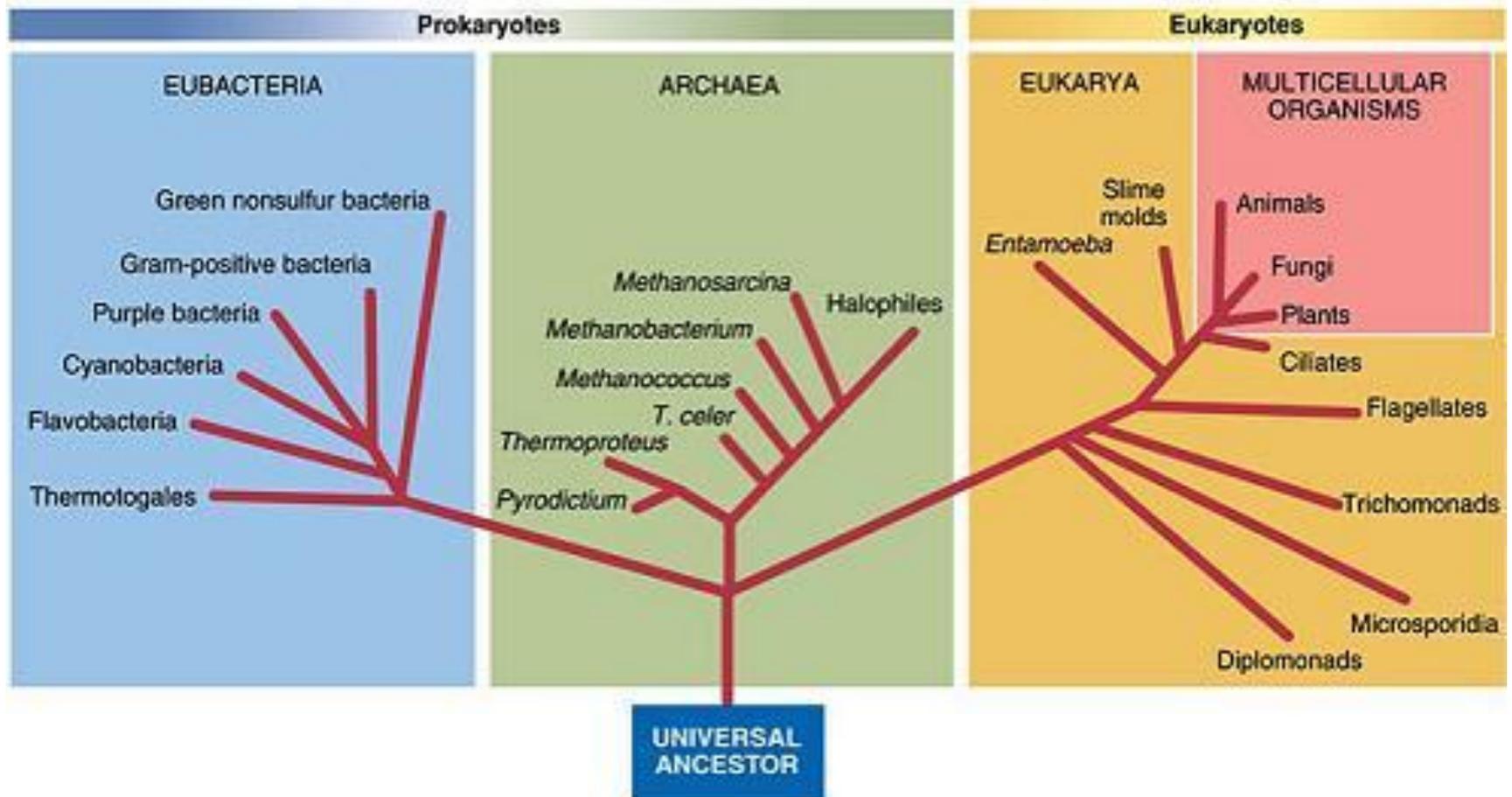
# GENÉTICA MOLECULAR APLICADA NO MELHORAMENTO DE MICRORGANISMOS E BIOLOGIA SINTÉTICA

## Aula 9

LGN232 – Genética Molecular



# DOMÍNIOS DA VIDA



# Sequenciamento do gene ribossomal e filogenia

*Escolhendo o cronômetro correto:*

- Genes que codificam para RNAs ribossomais são excelentes para análise de relações evolutivas
- Todos os organismos possuem estes genes – distribuição universal
- Funcionalmente homóloga em cada organismo
- Regiões conservadas e variantes – permitem alinhamento
- São antigos e transferidos verticalmente

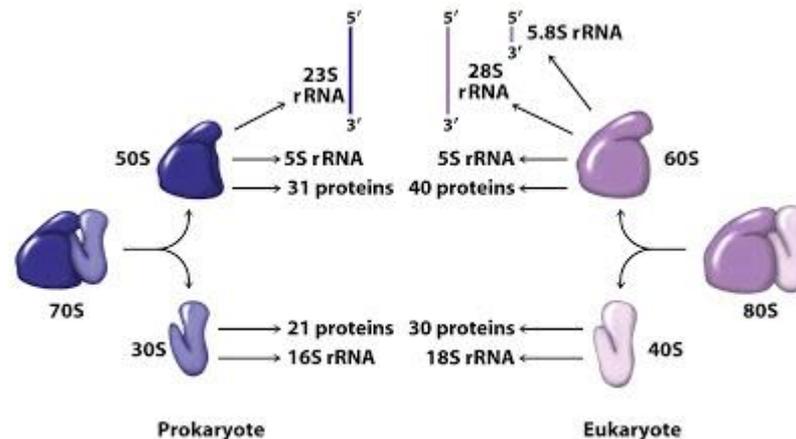
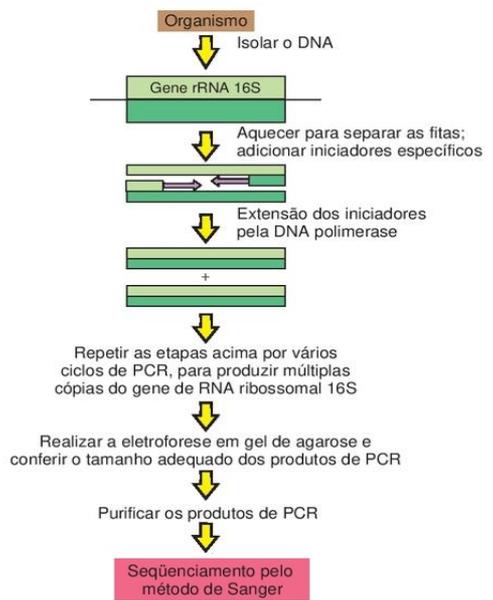


Figure 22-12 Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# Análise da sequência

## Sequenciamento rDNA (16S ou 18S)



```

1          TTAATGCGTTAGCTACAGCACTAA--GAGGG-CGGAG-ACCCC-TAACACTTAGCACTCAT
2  GCGGAGTGC ..... G .....
3  ..... G .....
4  GCTTAaTGCg ..... TGC ..... G .....
5  GCG .....
6  GCGGaGTCC ..... A . T ..... AA . G ..... G . G . TC .....
7  ..... G .....
8  ..... G ..... G .....
9  ..... G ..... G ..... C .....
10 ..... G ..... G .....
11 ..... G ..... G .....
12 .....
13 ..... G .....

-----10+-----20+-----30+-----40+-----50+-----60+-----70+

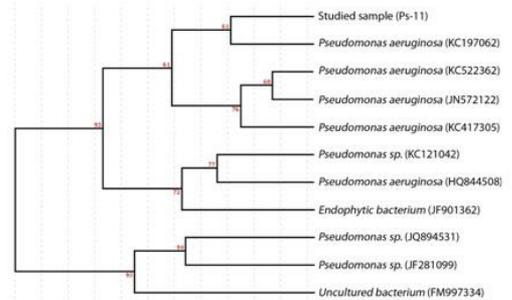
1  CCGTTTACGGGCTGG-AcTACCAGGGGTACTTAATCCT-GTTCGCTCCCAACCGCTTTCGGCTCTCAG
2  ..... G ..... A .....
3  ..... A .....
4  ..... A .....
5  ..... A .....
6  ..... GAC ..... T .....
7  ..... A ..... A .....
8  ..... A .....
9  ..... A .....
10 .....
11 ..... G .....
12 .....
13 .....

-----80+-----90+-----100+-----110+-----120+-----130+-----140+

1  CCGTCAGGTTACAG-AcCAGAG-AGTGGCCTTCGCGCACT-GGTGTTCCTCCACATCTCTAC-GCAATTC
2  ..... G .....
3  ..... A .....
4  .....
5  ..... G ..... A .....
6  TT ..... G . G ..... T .....
7  ..... C .....
8  ..... G ..... A .....
9  ..... G ..... A .....
10 ..... G ..... A .....
11 ..... G ..... A .....
12 .....
13 ..... A . A ..... G .....

-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200+-----210+
    
```

## Identificação do microrganismo por comparação das seqüências depositadas em bancos de dados



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Pseudomonas lini strain DLE411J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	584	584	100%	1e-166	99%	NR_029042.2
<a href="#">Pseudomonas protekii strain AN28/1 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	579	579	100%	3e-165	99%	NR_132724.1
<a href="#">Pseudomonas mandelii strain NBRC 103147 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	579	579	100%	3e-165	99%	NR_114216.1
<a href="#">Pseudomonas arsenicoxydans strain VC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	579	579	100%	3e-165	99%	NR_117022.1
<a href="#">Pseudomonas mandelii strain CIP 105273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	579	579	100%	3e-165	99%	NR_024902.1
<a href="#">Pseudomonas frederiksbergensis strain DSM 13022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	575	575	100%	6e-164	99%	NR_117177.1
<a href="#">Pseudomonas frederiksbergensis strain JAJ28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	575	575	100%	6e-164	99%	NR_028906.1

Figure 1: Phylogenetic relationship between studied sample (Ps-11) and representative species based on partial 16S rDNA sequences constructed using the neighbour-joining method. Studied sample (Ps-11) has been submitted to NCBI-Genbank and the accession number thus obtained is KF44770 (*Pseudomonas aeruginosa* strain SN4).

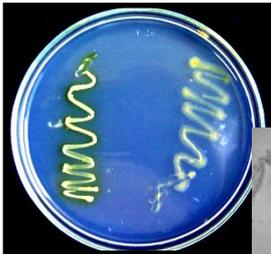
# MICROORGANISMOS

Eubactérias

Arqueias



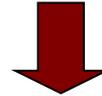
Procariotos



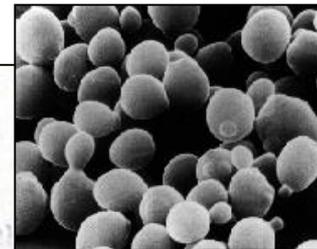
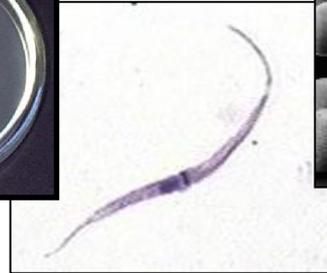
Fungos

Protozoários

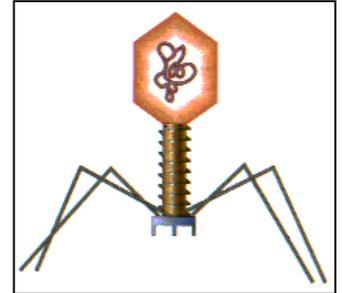
Algas Unicelulares



Eucariotos



Vírus



# DIVERSIDADE MICROBIANA



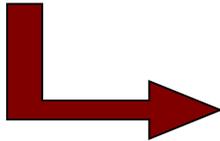
# DIVERSIDADE BACTERIANA

- Onde eles podem ser encontrados???

em quase  
todos os  
habitats da  
Terra



T elevadas (+110°C)  
T muito baixas  
ambientes hipersalinos  
ambientes ácidos



florestas úmidas  
recifes de corais  
lagos tropicais  
mares profundos  
florestas tropicais

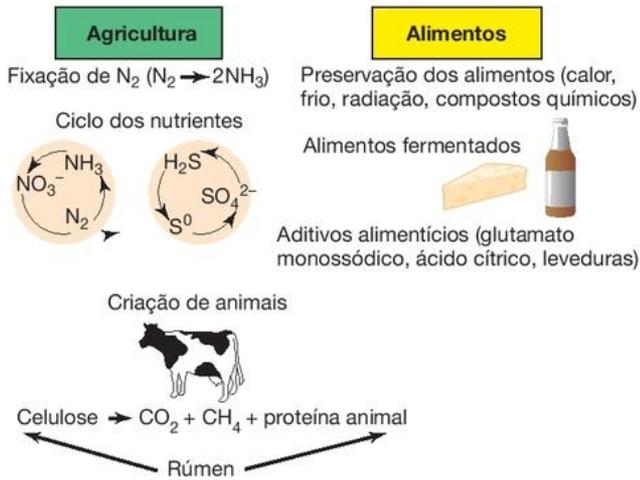
Alta variação na  
atividade metabólica



# DIVERSIDADE MICROBIANA

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

# Impacto dos microrganismos na atividade humana



## Doenças

Identificação de novas doenças

Tratamento, cura e prevenção

## Energia/Meio Ambiente

Biocombustíveis ( $CH_4$ )

Fermentação (Milho  $\rightarrow$  Etanol)

Biorremediação (óleo derramado  $\xrightarrow{O_2}$   $CO_2$ )  
(poluentes orgânicos  $\rightarrow$   $CO_2$ )

Mineração microbiana ( $CuS \rightarrow Cu^{2+} \rightarrow Cu^0$ )

## Biotecnologia

Organismos geneticamente modificados

Síntese de produtos farmacêuticos (insulina e outras proteínas humanas)

Terapia gênica para certas doenças

(Indivíduo doente  $\rightarrow$  correção da lesão genética)

*Início: fermentação alcoólica - vinho e cerveja.*

- Antibióticos
- Etanol
- Ácidos
- Vitaminas
- Antibióticos
- Vacinas
- enzimas
- biomassa celular microbiana (SPC "single cell protein")
- aminoácidos
- biorremediação

**Necessidade de CONSERVAÇÃO!!!**

## **Características dos microrganismos de interesse biotecnológico**

- **Apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;**
- **Permitir o acúmulo do produto no meio;**
- **Não produzir substâncias incompatíveis com o produto;**
- **Apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;**
- **Não ser patogênico;**
- **Não exigir condições de processo muito complexas;**
- **Não exigir meios de cultura dispendiosos;**
- **Permitir a rápida liberação para o meio.**

# VANTAGENS DOS MICROORGANISMOS

Melhoramento de Microrganismos

*Vs.*

Melhoramento de Plantas

- menor complexidade
- Superespecialização
  - Sazonalidade
- controle ambiental

# **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!**

# MELHORAMENTO GENÉTICO

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

**Técnicas Clássicas x Técnicas Modernas**

# Bases do melhoramento genético de microrganismos

Mutagênese  
randômica e seleção

Técnicas  
moleculares

Manipulação de  
genes estruturais

Manipular o metabolismo  
primário para aumentar a  
concentração de  
precursores/cofatores

Manipulação  
de genes  
reguladores

introdução de  
cópias adicionais do  
cluster de genes

introdução de cópias  
adicionais de genes  
biossintéticos

substituição de  
promotores

deletar fluxo  
intermediário

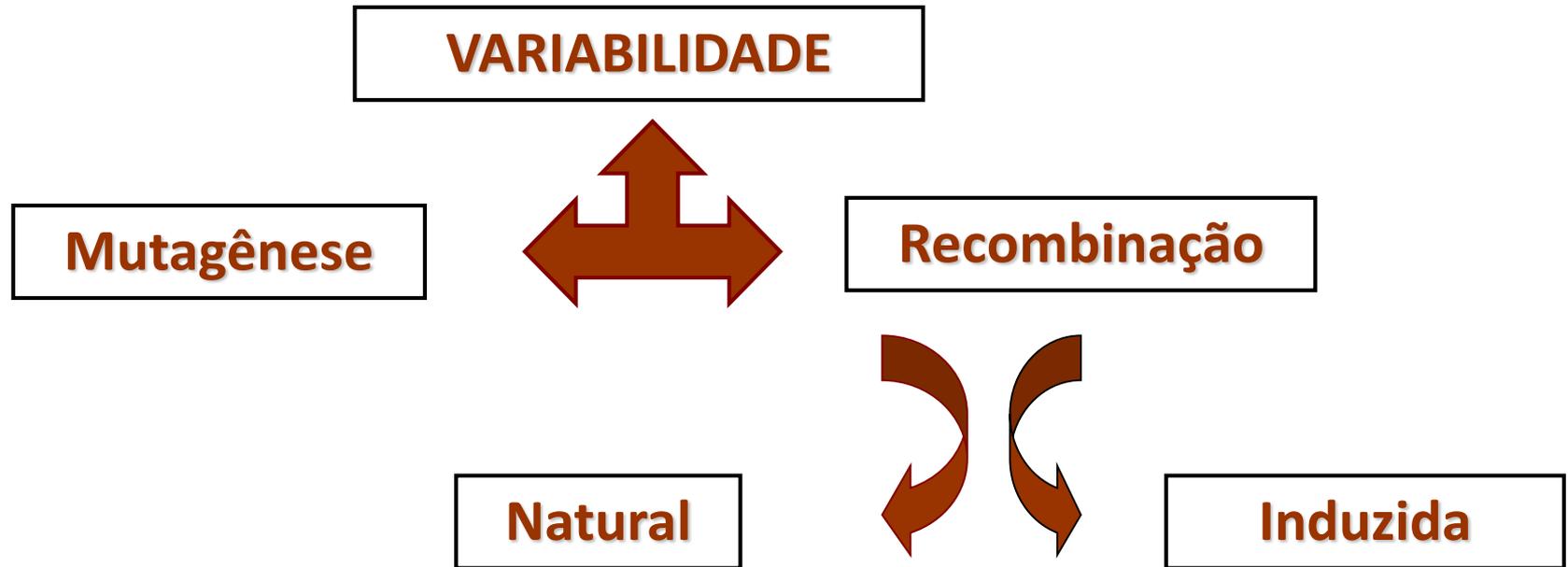
introduzir genes de  
resistência adicionais

aumentar a velocidade  
de transporte

Introduzir genes  
reguladores  
adicionais

Deletar  
precursores

# PRINCÍPIO DO MELHORAMENTO



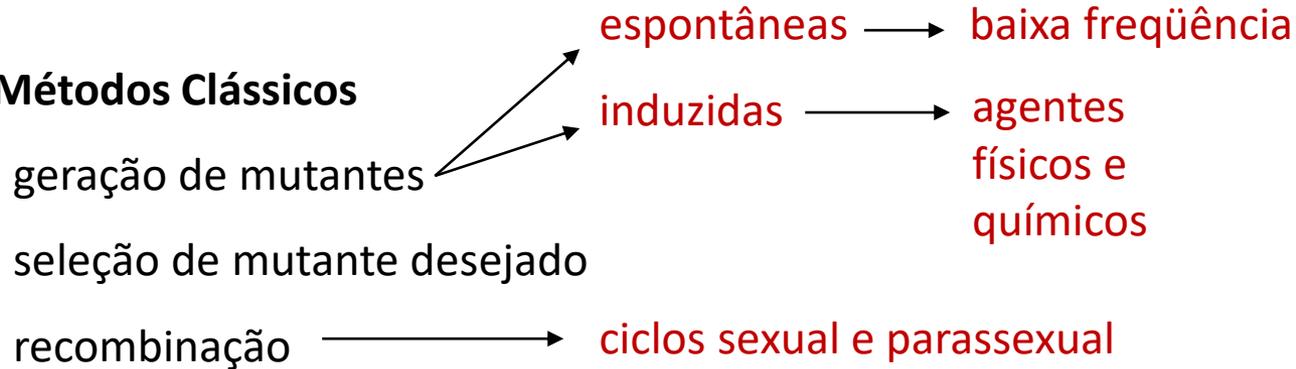
- Ciclo sexual e parassexual
- Transdução
- Conjugação
- Transformação

- Fusão de Protoplasto
- Transformação
- Transfecção

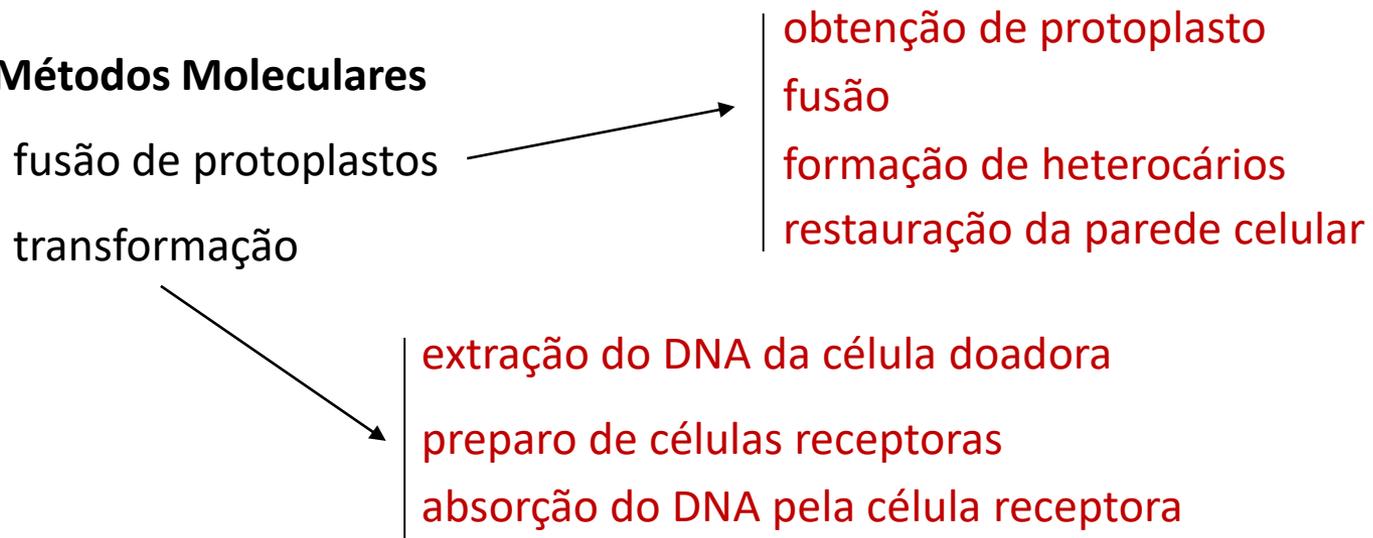


# MÉTODOS DE MELHORAMENTO - FUNGOS

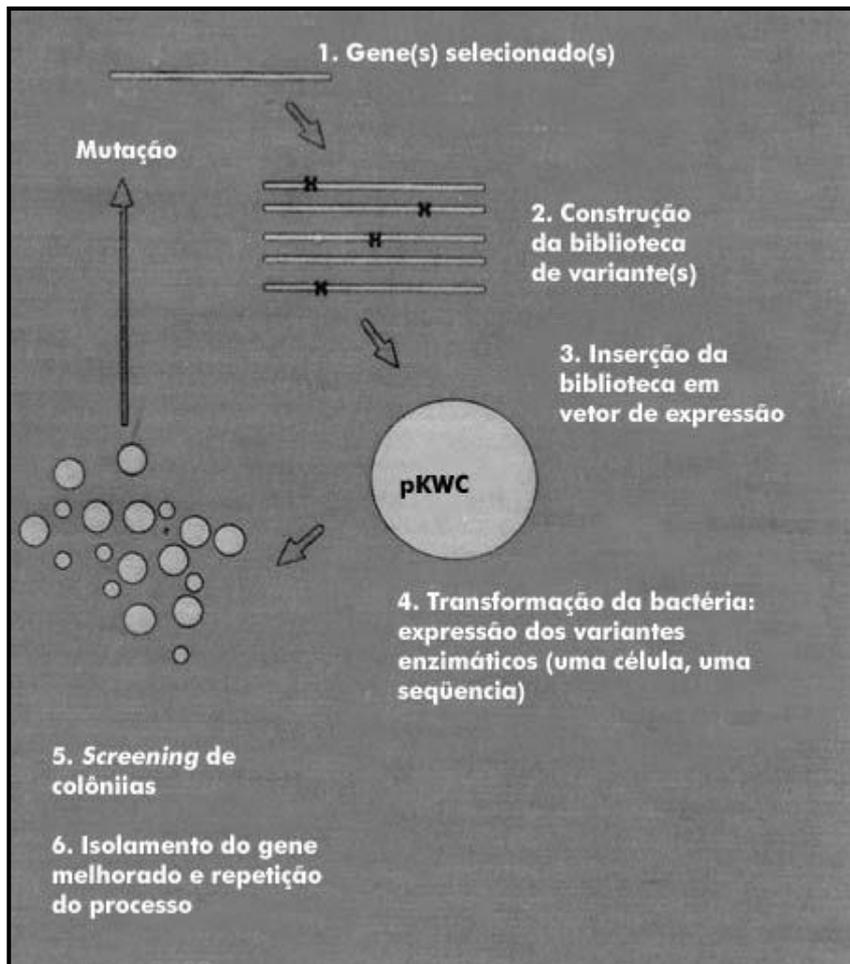
## Métodos Clássicos



## Métodos Moleculares



# EVOLUÇÃO DIRIGIDA



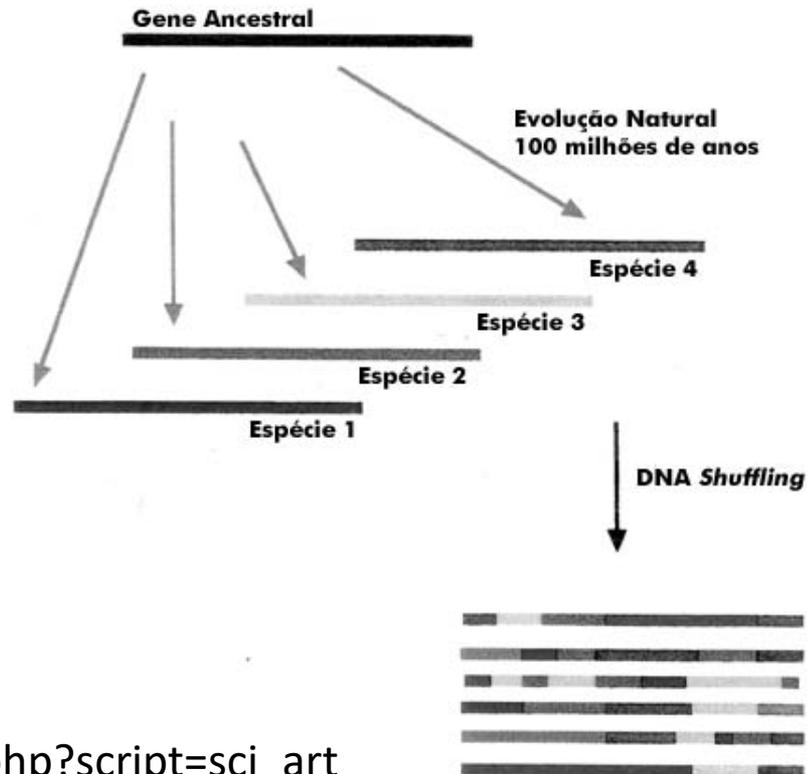
**Criação artificial de variabilidade genética por meio de várias técnicas moleculares.**

## **Técnica da evolução dirigida ou evolução *Uma cron*.**

A partir de gene selecionado (1), são obtidas mutações por reação de PCR em presença de manganês para indução de erros (2). Essas sequências de DNA alterado são introduzidas em vetores (3), veículos que levam os genes para células receptoras (4) por um processo de transformação no qual eles se expressam e os melhores são selecionados (5). O processo pode ser repetido várias vezes (6), até que se obtenha o melhoramento desejado.

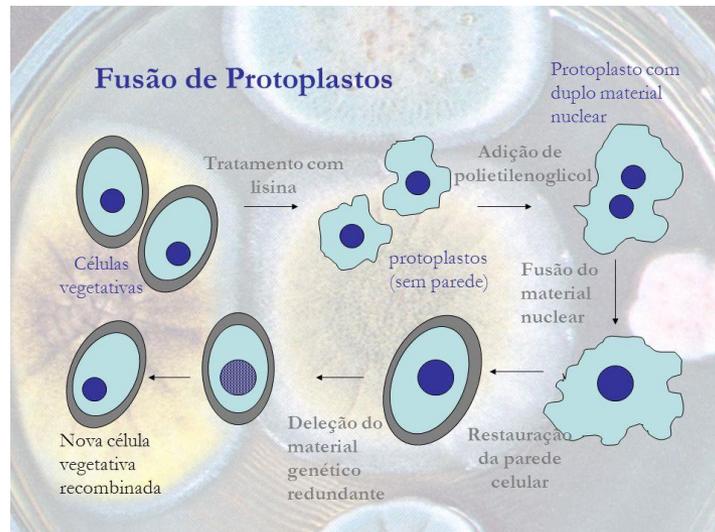
# DNA shuffling

Figura 3 - Recombinação artificial em genes selecionados pela evolução natural. A partir de um gene ancestral, em cem milhões de anos foram selecionados naturalmente genes distintos de uma mesma proteína homóloga, em quatro diferentes espécies. Elas não se cruzam na natureza, mas no laboratório, pela técnica do "embaralhamento do DNA" (*DNA shuffling*), produzem-se proteínas que são misturas daquelas que existem nas quatro espécies.



# FUSÃO DE PROTOPLASTOS

- Dificuldade de cruzamentos intergenéricos ou interespecíficos
- Incompatibilidade que ocorre entre duas linhagens impedindo a anastomose das hifas
- **Protoplastos: células desprovidas da parede celular.** Possibilidade de fundir células antes incompatíveis.
- A ausência de parede é útil para transformação genética e hibridação somática
- Pode-se utilizar: micélios de fungos filamentosos, leveduras, conídios



## ***Saccharomyces cerevisiae***

Produto: vinho

Local: Caxias do Sul RS (~1985).



- *Saccharomyces cerevisiae* linhagem “Montrachet” - alta produção
- *Schyzosaccharomyces pombe* linhagem “Benda” - decompõe ác. L-málico
- 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.*

# METODOLOGIAS DE TRANSFORMAÇÃO

## Metodologia de PEG/CaCl<sub>2</sub>

Protoplastos tratados com PEG se tornam momentaneamente permeáveis, permitindo a entrada de DNA próximo.

## Eletroporação

Pulsos elétricos são utilizados para aumentar a permeabilidade celular e entrada de DNA.

## Biobalística (bombardeamento)

DNA é adsorvido à microprojéteis de tungstênio ou ouro, os quais são acelerados e introduzidos na células alvo.

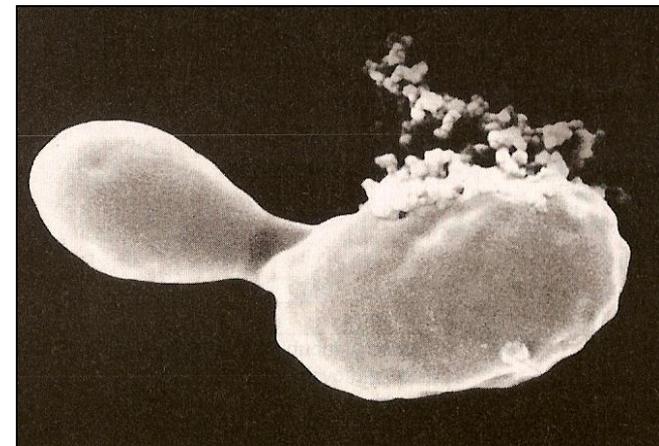
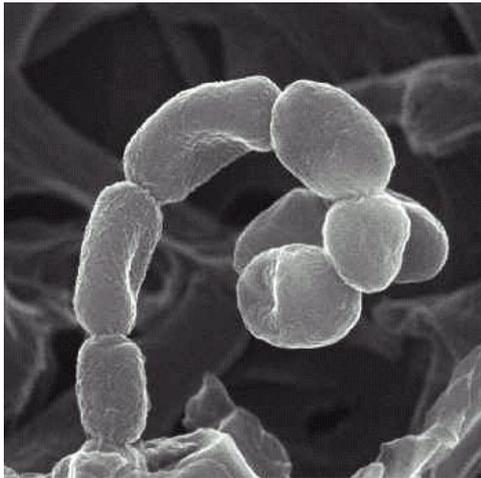
## *Agrobacterium tumefaciens*

A bactéria introduz o DNA de interesse na célula alvo.

# 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.

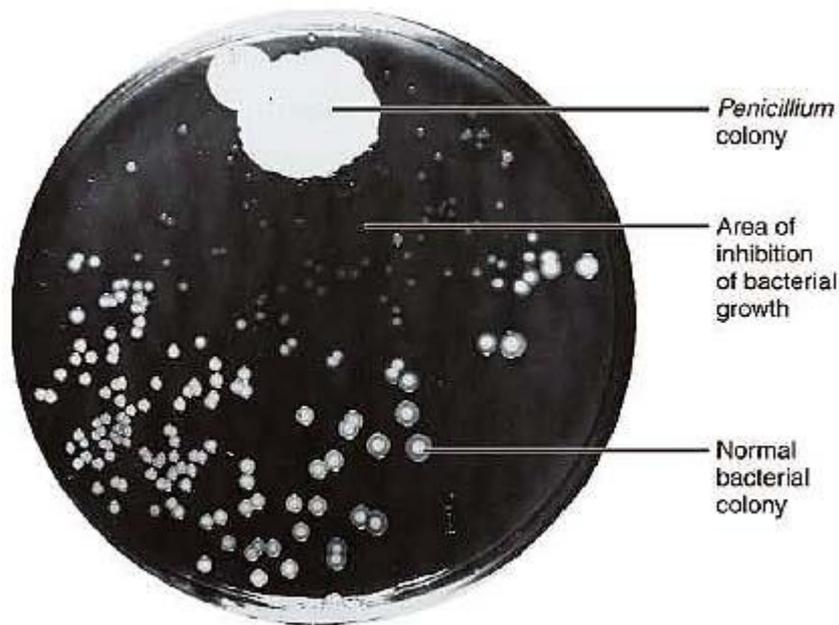


## **Penicilina: o exemplo mais conhecido de seleção de cepas**

### ***Penicillium chrysogenum***

Produto: penicilina, ativa contra bactérias gram-positivas

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



***Sir Alexander Fleming***

□ 1881   □ 1955

**Nobel Medicina 1945**

## *Aplicações do melhoramento de microrganismos*

Linhagem Fleming	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ ambiente / seleção natural	
Linhagem NRRL-1951	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ mutantes espontâneos	
Linhagem NRRL- 1951.325	150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ raio-X	
Linhagem X-1612	300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ ultra-violeta	
Linhagem Wis Q-176	550 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
↓ ultra-violeta	
↓ nitrogênio mostarda	
↓ mutantes espontâneos	
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 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

# Aplicações do melhoramento de microrganismos

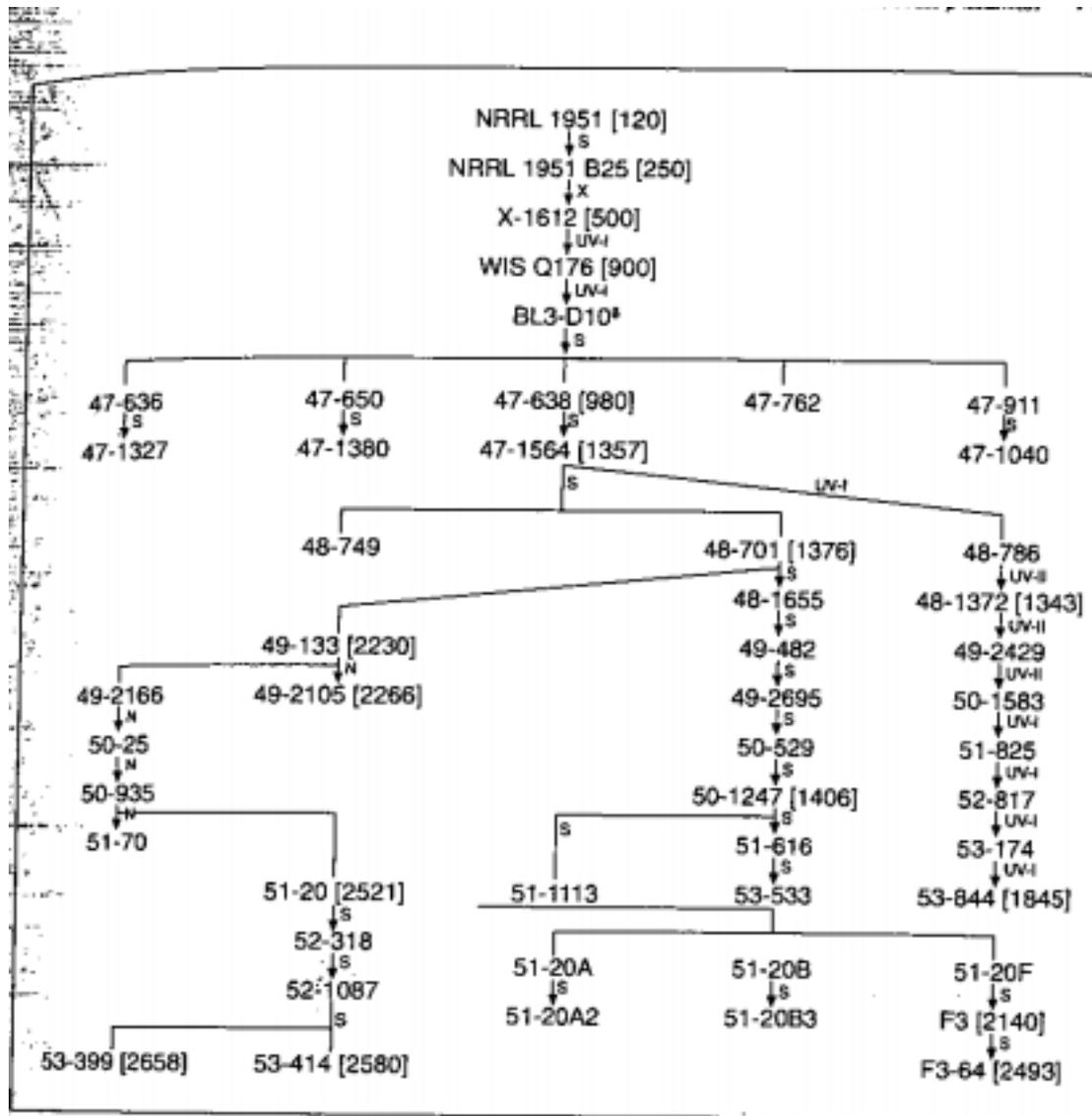


Figura 5.4 — Genealogia da cepa Wisconsin de *Penicillium chrysogenum*. S: etapas de seleção; X: tratamento com raios X; UV-I: radiação ultravioleta à 275 nm, UV-II: radiação ultravioleta a 253 nm; N: tratamento com gás mostarda nitrogenada. Colchetes indicam o rendimento obtido em Unidades Internacionais (UI) por ml.

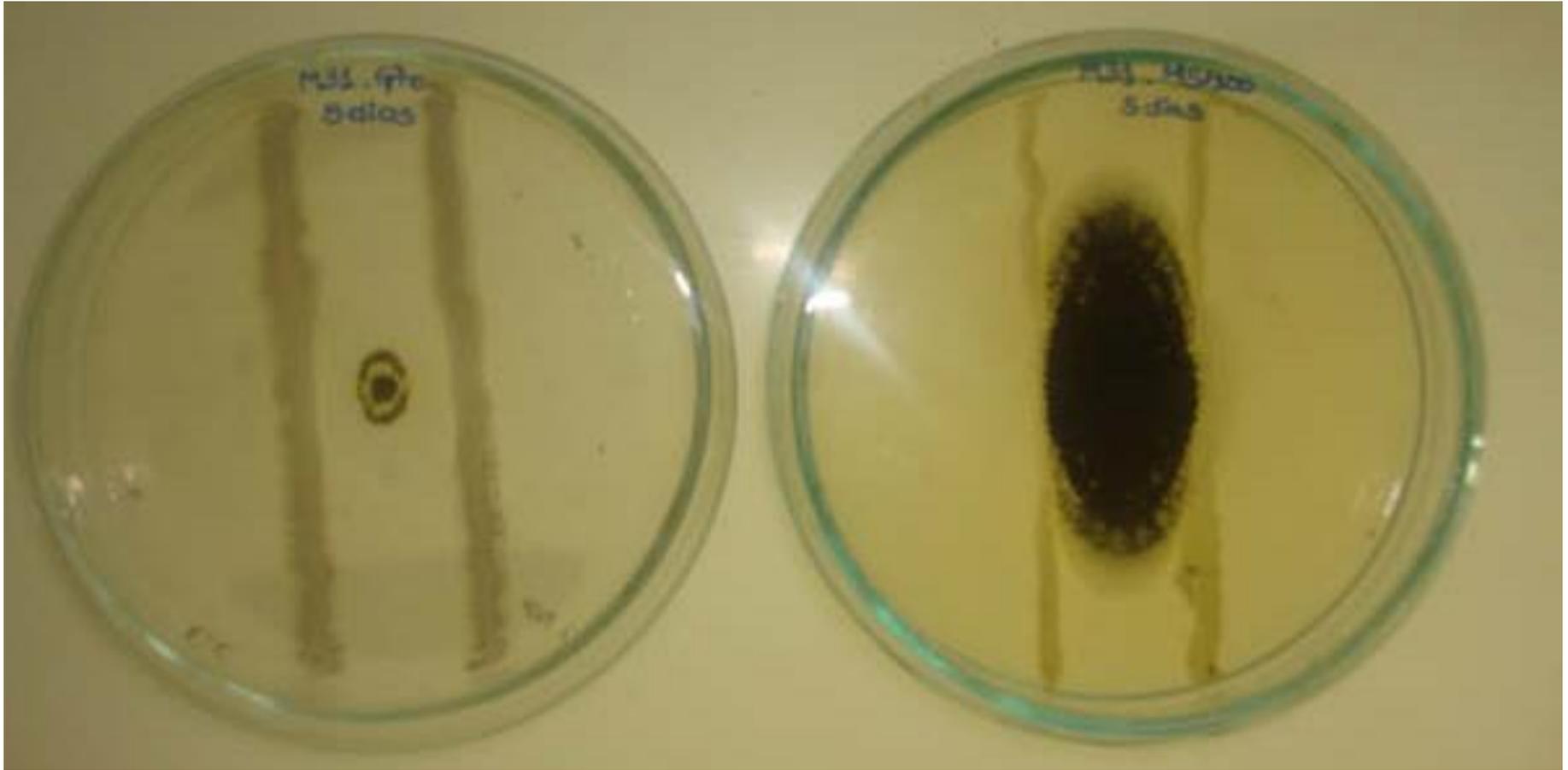
## ***Streptomyces* spp.: principais produtores de antibióticos**

<b><i>Produtor</i></b>	<b><i>Antibiótico</i></b>
<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



*Aplicações do melhoramento de microrganismos*

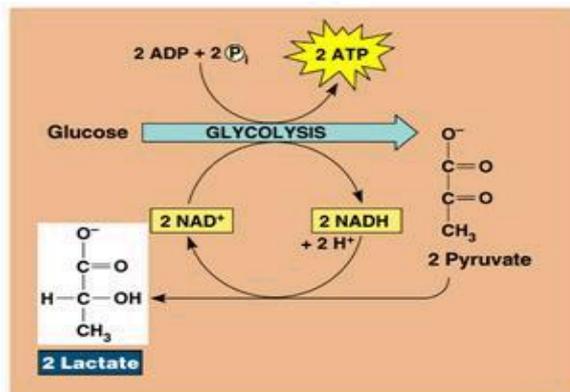
***Screening de novos produtos com ação antibiótica  
para controle biológico de patógenos***



# PRODUÇÃO DE LATICÍNEOS E COMPOSTOS AROMÁTICOS

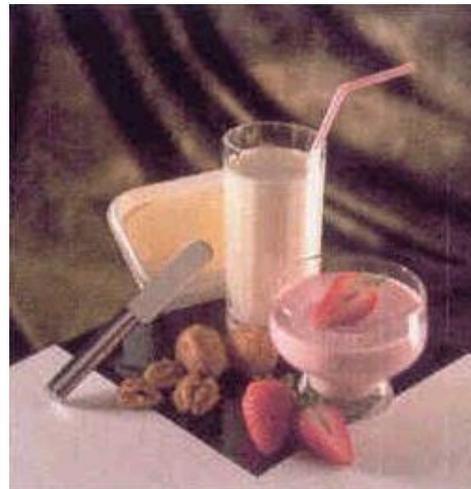
*Lactococcus, Streptococcus, Atopodium, Lactobacilus e Carnobacterium*

- Enzimas que dão sabor e aroma a queijos



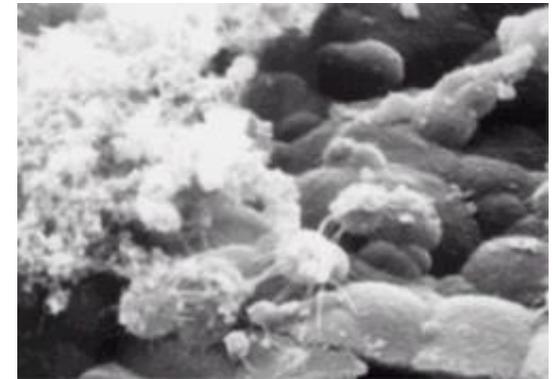
(b) Lactic acid fermentation

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



# PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Engenharia metabólica para aumento nos níveis de produção

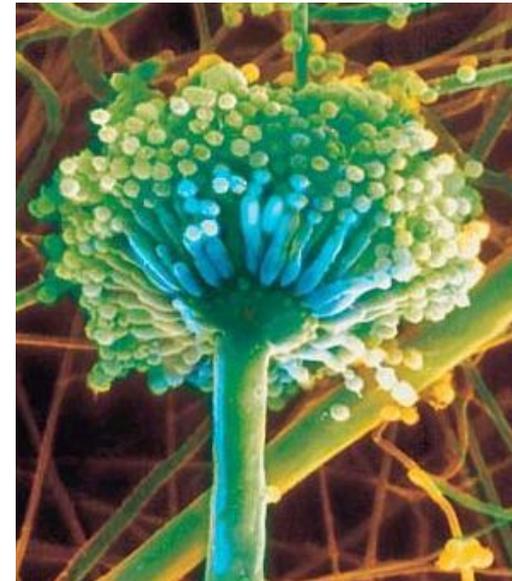


*Xanthomonas campestris*

# 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 entomopatogênicos:

*Beauveria*

*Metharizium...*

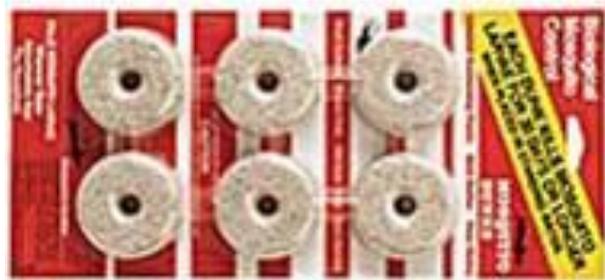
*Aplicações do melhoramento*

- Aumento de virulência;
- Maior produção de enzimas e toxinas
- Especificidade
- Resistência a inibidores como a luz solar, fungicidas e altas temperaturas



*Bacillus thuringiensis*

# PRODUTOS COMERCIAIS



# BIOFERTILIZANTES

*Alternativas para melhoramento:*

- Estirpes com alta frequência de nodulação e fixação
- Adaptação a diferentes tipos de solos e culturas
- Transferência de genes *nif* / *fix* e *nod* / *nol*.

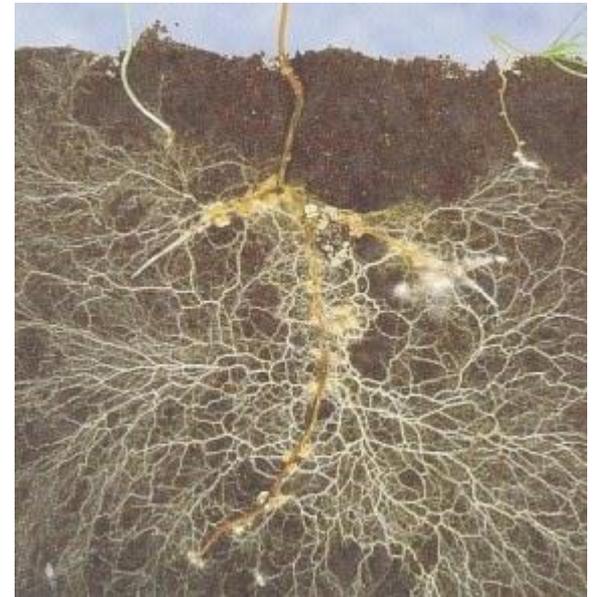


***Rhizobium sp.***

# BIOFERTILIZANTES

*Alternativas para melhoramento:*

- Produção de inóculo puro;
- Capacidade de crescer em meios artificiais;
- Resistência a condições adversas



***Micorrizas***

# 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 expression<sup>1</sup>**

Jayaraman Jayaraj, Subbaratnam Muthukrishnan, and George H. Liang

Can. J. Microbiol. 50: 509–513 (2004)

*S. cerevisiae* - produção compostos heterólogos

Vacina hepatite B

Interferon humano

Fator de crescimento epidermal humano

Inibidor de trombina - hirudina

Hormônio da paratireóide

# Aplicações do melhoramento de microrganismos

Dupont

Processo de produção de 1,3 propanodiol (usado na produção de polímeros), utilizando *Escherichia coli* recombinante:



## Harvest

Renewably sourced feedstocks are harvested, dried and then wet-milled to create a range of carbohydrate rich feedstocks such as glucose.



## Fermentation

Glucose is converted into 1,3 propanediol using a patented microorganism under exact temperatures and conditions.

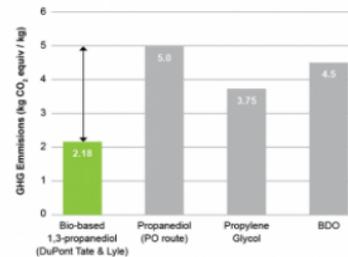


## Refining

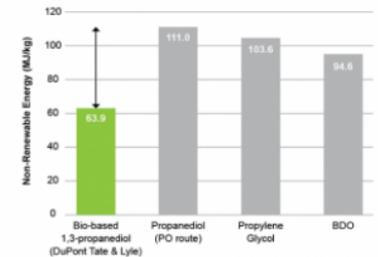
The 1,3 propanediol is refined to a final purity of 99.7% by deactivating and removing the microorganism, water, and other byproducts.

## The greener alternative

From "cradle-to-gate" (extraction and production prior to delivery to customers), bio-based 1,3-propanediol produces 56% less greenhouse gas emissions and consumes 42% less nonrenewable energy than petroleum-based 1,3-propanediol. Compared with propylene glycol (PG), bio-based 1,3-propanediol produces 42% less greenhouse gas emissions and uses 38% less nonrenewable energy from cradle to gate. Compared with butanediol (BDO), bio-based 1,3-propanediol produces 52% less greenhouse gas emissions and uses 32% less nonrenewable energy from cradle-to-gate.



Greenhouse Gas Emissions  
56% less than Propanediol  
42% less than Propylene Glycol  
52% less than BDO



Non-Renewable Energy Use  
42% less than Propanediol  
38% less than Propylene Glycol  
32% less than BDO

## *Aplicações do melhoramento de microrganismos*

### **DSM**

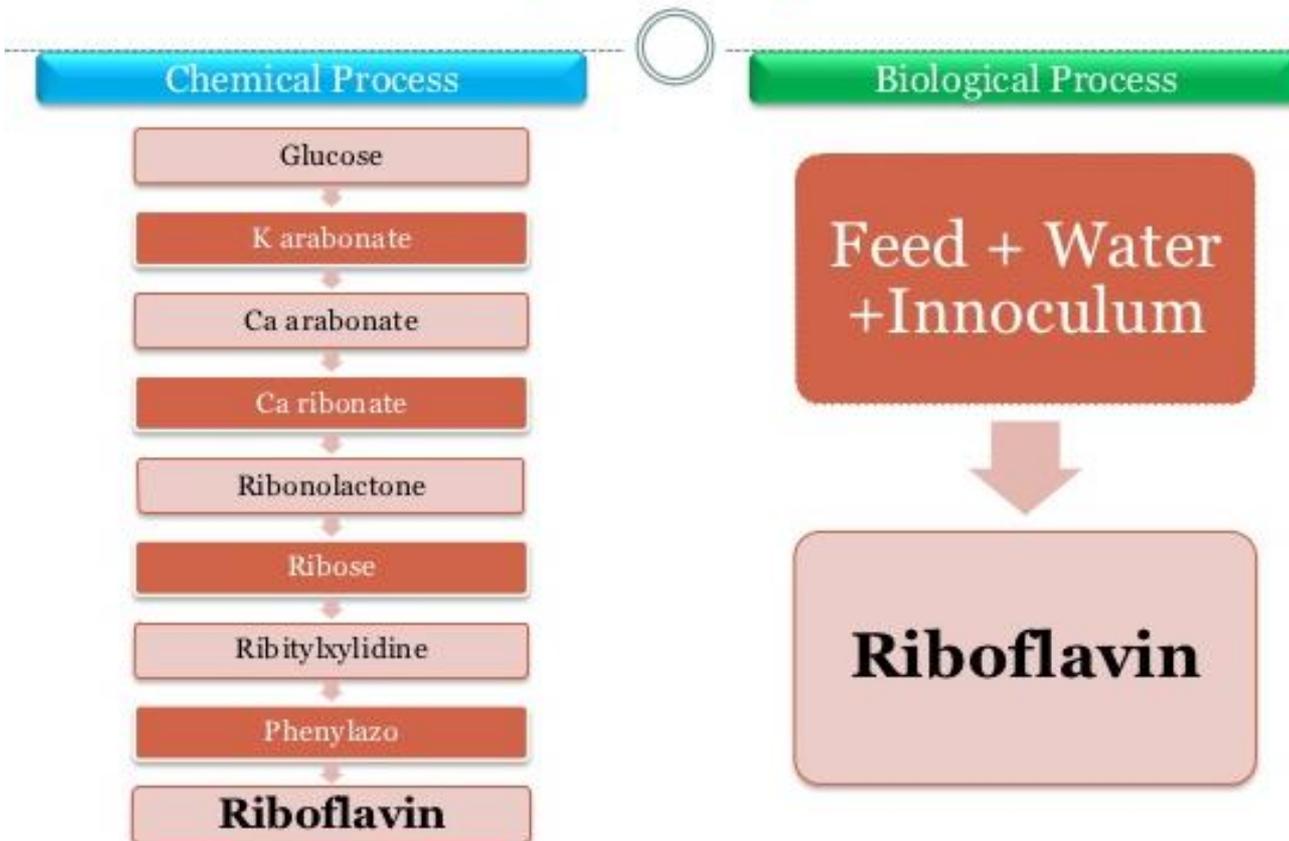
**desenvolveu uma rota biotecnológica completa para produção do antibiótico cefalexina, em substituição a conversão química da penicilina**

The development of the biocatalytic process included the following elements: screening existing enzymes; strain selection; strain improvement; optimisation of the fermentation process; choice of form of the enzyme for application (*e.g.* free cells or immobilised, aqueous or solvent); choice of bioreactor type (*e.g.* batch *vs.* continuous, fluidised, membranes, etc.); optimisation of downstream processing and product isolation.

**BASF**

**desenvolveu uma rota biotecnológica completa para produção de riboflavina (vitamina B2), em substituição a síntese química**

## Chemical v/s Biological Process



# Amyris

desenvolveu um processo baseado em leveduras para produção de farneseno, o qual pode ser convertido em farnesano (combustível) e em esqualeno (usado em cosméticos).



[Molecule](#) [Applications](#) [Our Process](#) [Specifications](#) [Purchase](#)

## Our Process

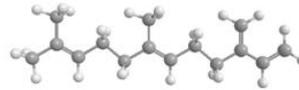


Amyris's *trans*- $\beta$ -Farnesene is produced through fermentation of sugars by yeast. Target genes are selected to change the yeast's metabolism,

converting the yeast from an ethanol-producing organism into a hydro-carbon producing organism.

Amyris's platform enables the production of selected molecules at high purity levels. It also provides three distinct advantages over the existing sources: first, it efficiently produces compounds that can't be made by chemical synthesis;

second, it replaces compounds typically derived from plant sources that can't be extracted reliably; and third, it replaces compounds made from petrochemicals, with renewable compounds.



This technology platform is revolutionary in allowing commercially viable levels of production of the *trans*- $\beta$ -Farnesene molecule.



[Molecule](#) [Applications](#) [Our Process](#) [Specifications](#) [Purchase](#)

Other applications include:

- Performance materials
- Adhesives
- Fragrances
- Surfactants
- Stabilizers
- Oligomers and polymers
- Resins
- Foams, coatings and sealants
- Emulsifiers
- Vitamin precursors
- Crop protection



# 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

# METAGENÔMICA

---

**Comunicado** 02  
**Técnico**

ISSN 2177-4447  
Brasília, DF  
Novembro, 2009

**Construção de uma  
Biblioteca Metagenômica de  
Expressão da Microbiota de  
Rúmen de Caprinos**

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA  
E PROSPECÇÃO DE GENES PARA A SÍNTESE DE  
POLIHIDROXALCANOATOS**

Construção de biblioteca metagenômica para prospecção de genes envolvidos na biossíntese de antibióticos

---

**PROSPECÇÃO DE GENES DE CELULASE  
PRESENTES EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA**

# SUPER MICROORGANISMO



[comments on this story](#)

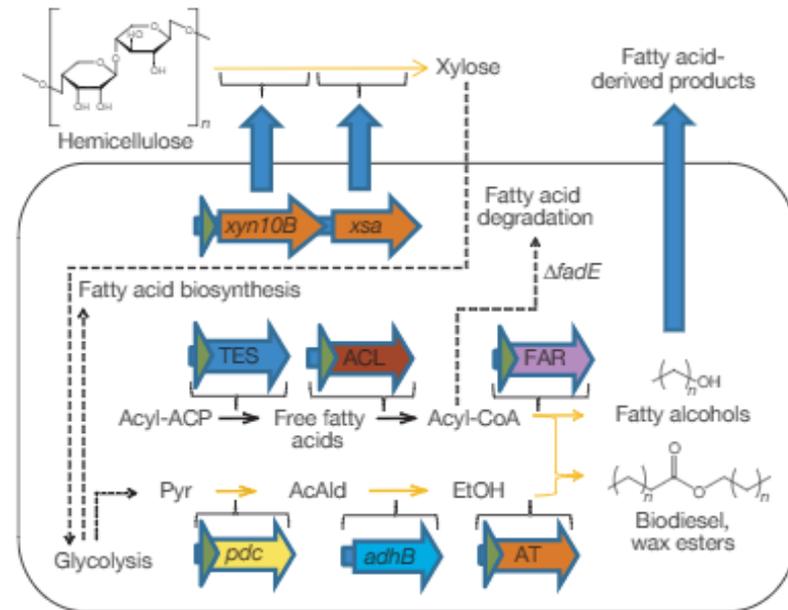
Published online 27 January 2010 | *Nature* **463**, 409 (2010) | doi:10.1038/463409a

News

Stories by subject

## Altered microbe makes biofuel

Here we demonstrate the engineering of *Escherichia coli* to produce structurally tailored fatty esters (**biodiesel**), fatty alcohols, and waxes **directly from simple sugars**. Furthermore, we show engineering of the biodiesel-producing cells to express hemicellulases, a step towards producing these compounds directly from hemicellulose, a major component of plant-derived biomass.



**Figure 1 | Engineered pathways for production of fatty acid-derived molecules from hemicelluloses or glucose and depiction of the synthetic operons used in this study. Flux through the *E. coli* fatty acid pathway (black**

# 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.

# BIOLOGIA SINTÉTICA

- 1989 – Steven A. Benner criou DNA com duas “letras” genéticas artificiais, originando diversas variedades de DNA.

## **Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet**

JOSEPH A. PICCIRILLI, STEVEN A. BENNER, TILMAN KRAUCH, SIMON E. MORONEY & STEVEN A. BENNER

Laboratory for Organic Chemistry, ETH Zurich, CH-8092 Switzerland.

A new Watson-Crick base pair, with a hydrogen bonding pattern different from that in the A·T and G·C base pairs, is incorporated into duplex DNA and RNA by DNA and RNA polymerases and expands the genetic alphabet from 4 to 5 letters. This expansion could lead to RNAs with greater diversity in functional groups and greater catalytic potential.

- 2003 – Peter G. Schultz desenvolveu células (DNA normal) capazes de gerar aa. não naturais e reuni-los para formar novas proteínas.

## **An archaeobacteria-derived glutamyl-tRNA synthetase and tRNA pair for unnatural amino acid mutagenesis of proteins in *Escherichia coli***

[Stephen W. Santoro](#), [J. Christopher Anderson](#), [Vishva Lakshman](#), and [Peter G. Schultz](#)\*

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

---

# 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

“Our interest in synthesis of large DNA molecules and chromosomes grew out of our efforts over the past 15 years to build a minimal cell that contains only essential genes. This work was inaugurated in 1995 when we sequenced the genome of *Mycoplasma genitalium*, a bacterium with the smallest complement of genes of any known organism capable of independent growth in the laboratory”

<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

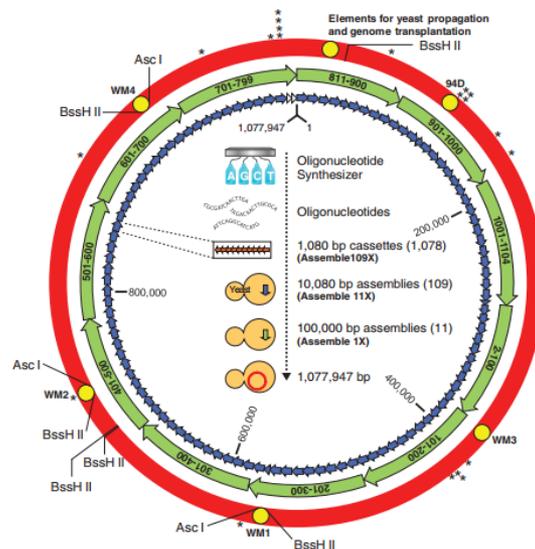
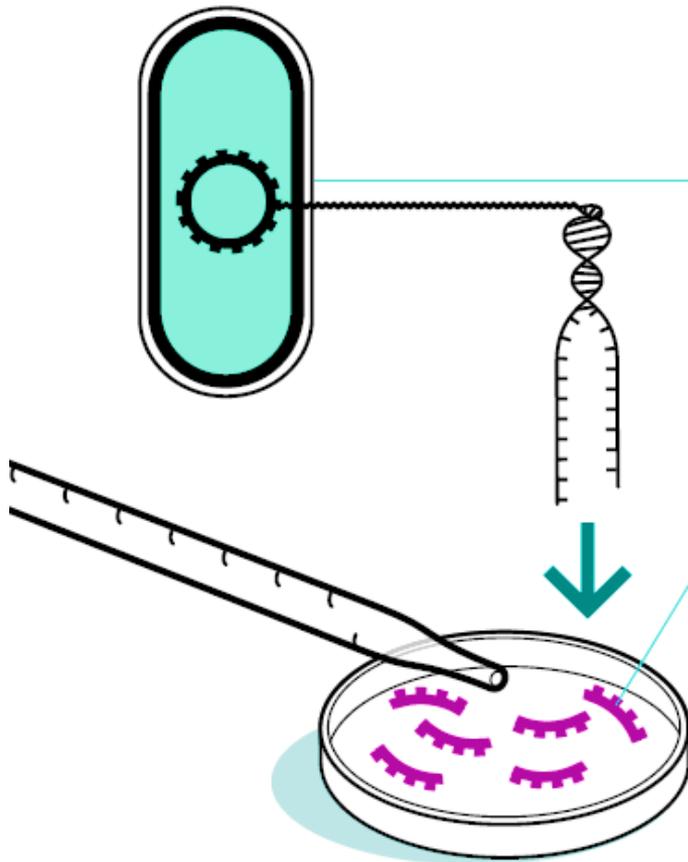


Fig. 1. The assembly of a synthetic *M. mycoides* genome in yeast. A synthetic *M. mycoides* genome was assembled from 1078 overlapping DNA cassettes in three steps. In the first step, 1080-bp cassettes (orange arrows), produced from overlapping synthetic oligonucleotides, were recombined in sets of 10 to produce 109–10-kb assemblies (blue arrows). These were then recombined in sets of

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

# O transplante de DNA passo a passo

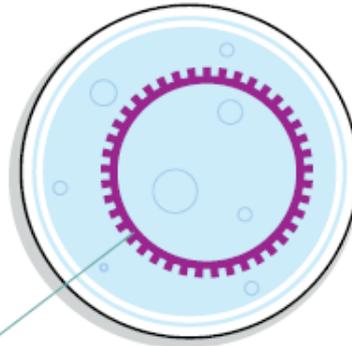
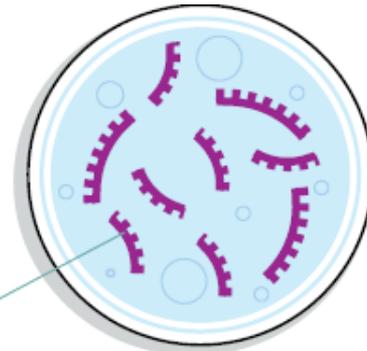
Como os cientistas fizeram a célula de uma bactéria ser controlada pelo genoma sintético de outra



- 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.

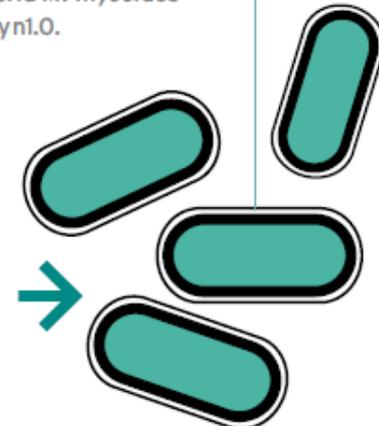
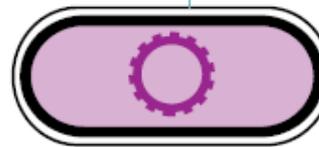
3

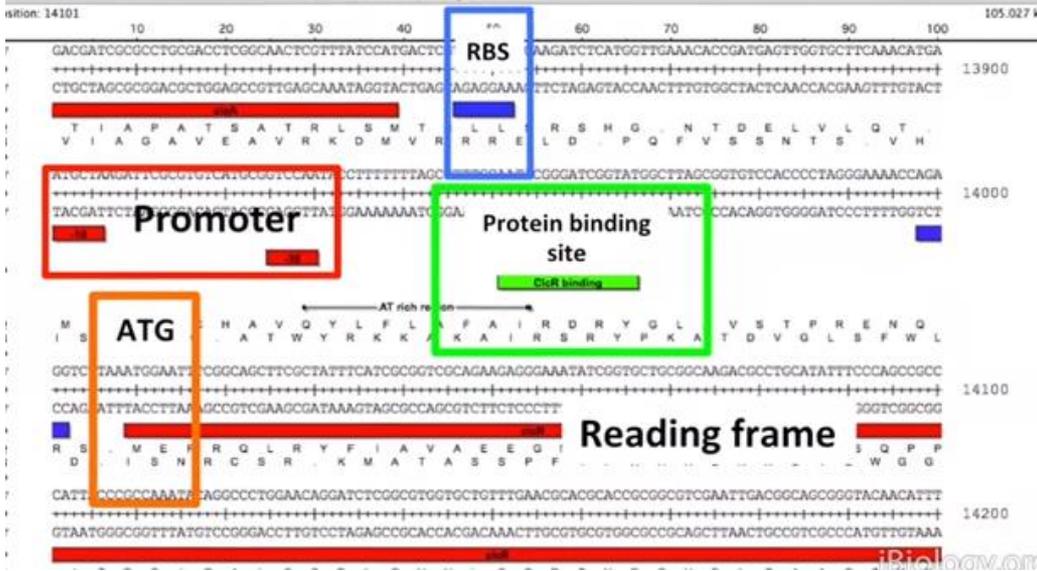
Quebrado em pedaços, o genoma sintético foi inserido na *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro da levedura, os fragmentos de DNA foram unidos progressivamente na ordem correta com o auxílio do sistema genético do fungo. Primeiro, os cientistas juntaram todos os cassettes em trechos de DNA com 10 mil pares 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.



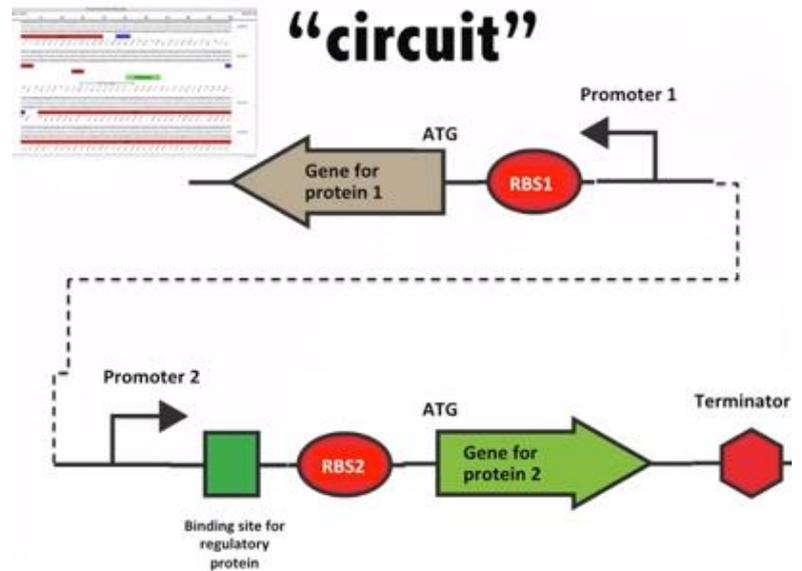
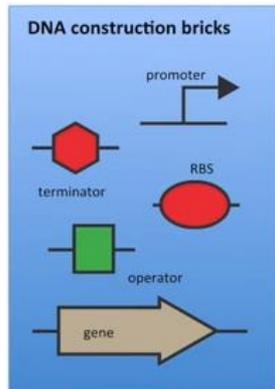
4

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.





# From DNA sequence to "circuit"



# CONSTRUINDO NOVAS ROTAS ...

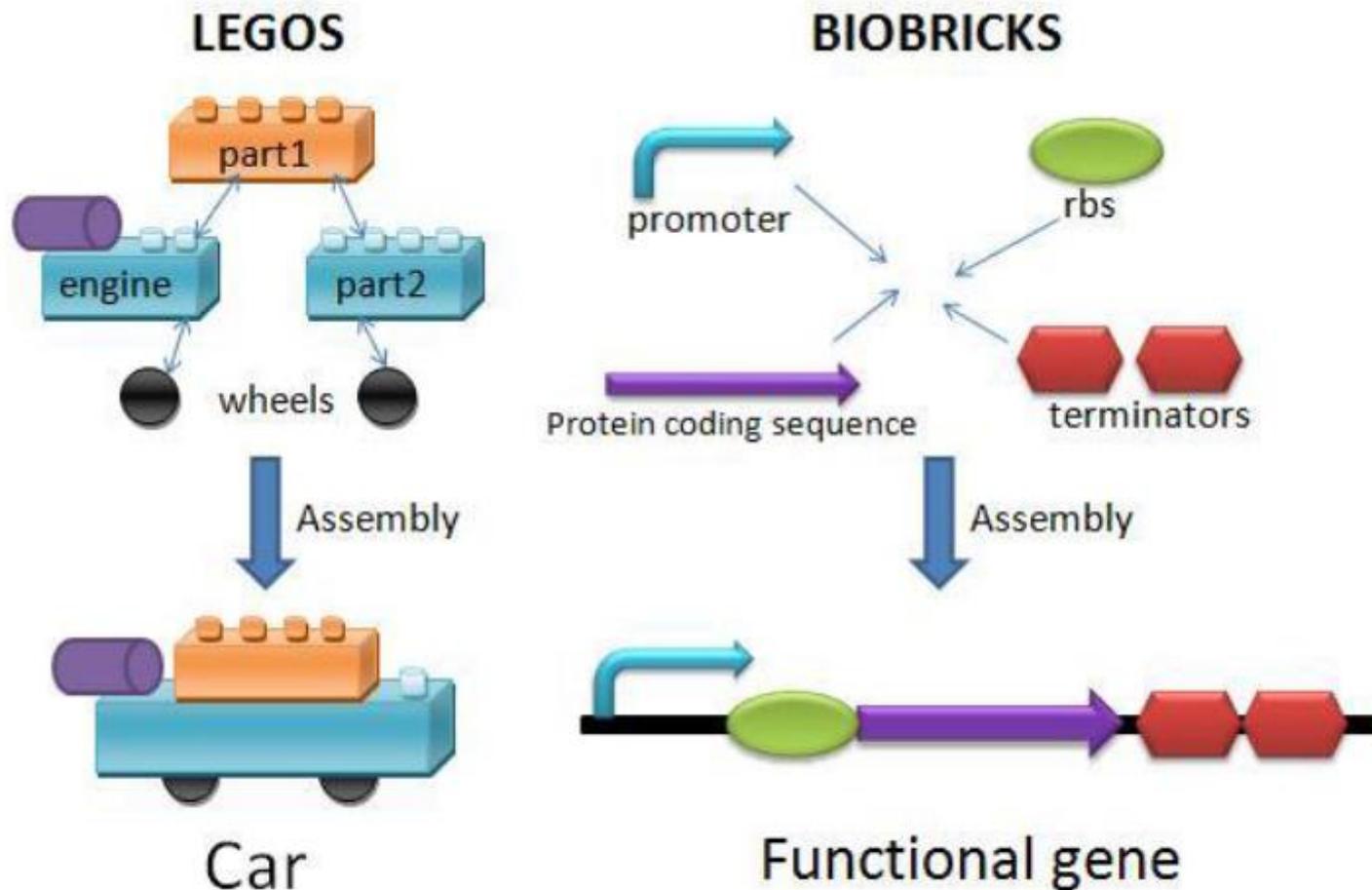


Figure1: Comparison between the concept of Legos and Biobricks

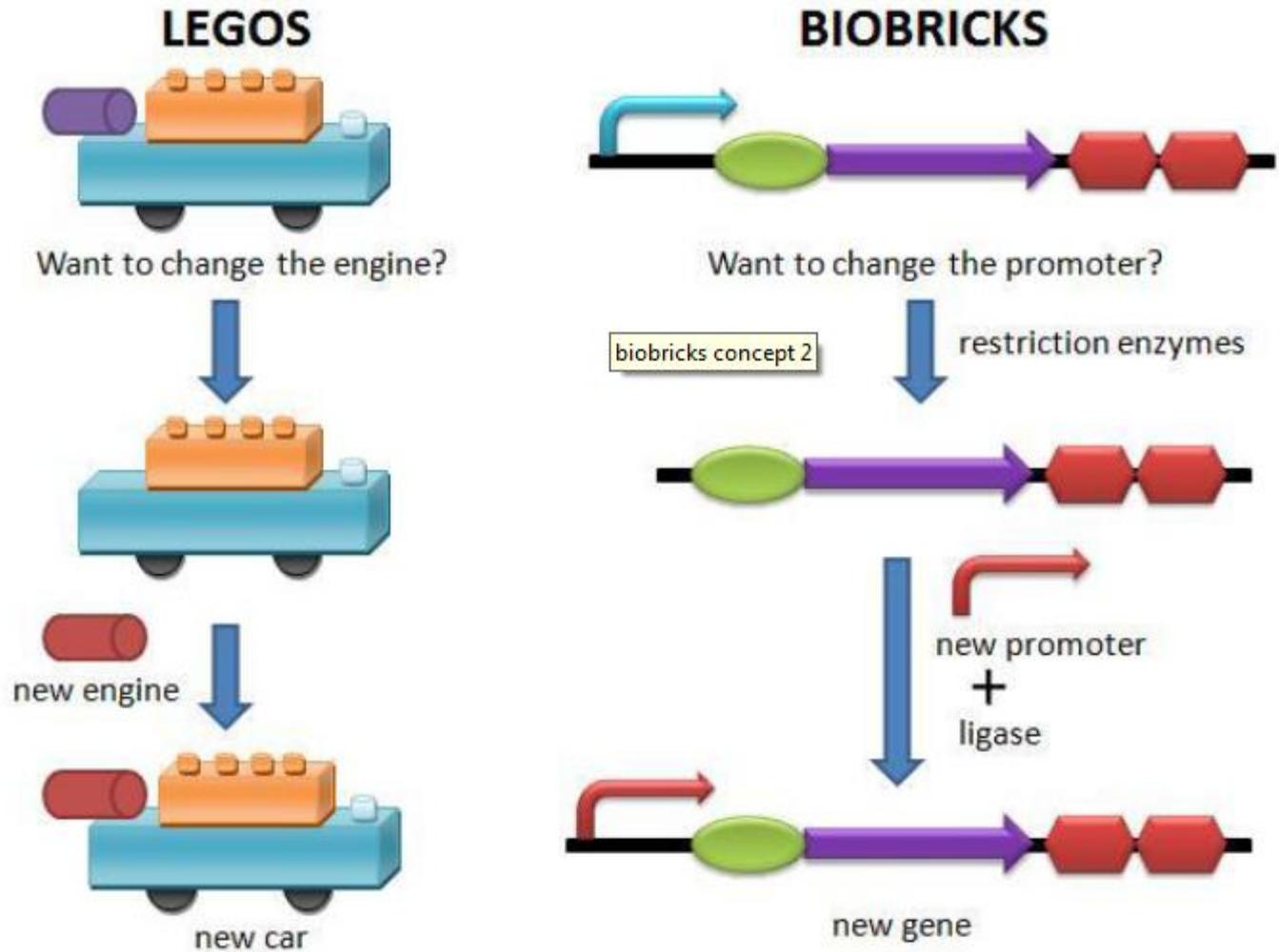


Figure2: The concept of interchangeable parts in biobricks



# Synthetic Biology

based on standard parts

---

## About

The International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation is an independent, non-profit organization dedicated to education and competition, the advancement of synthetic biology, and the development of an open community and collaboration.

iGEM runs three main programs: the **iGEM Competition** - an international team competition made up of predominantly undergraduate students interested in the field of synthetic biology; the **Labs Program** - a program for academic labs to use the same resources as the competition teams; and the **Registry of Standard Biological Parts** - a growing collection of genetic parts use for building biological devices and systems.

[http://parts.igem.org/Help:Synthetic\\_Biology](http://parts.igem.org/Help:Synthetic_Biology)

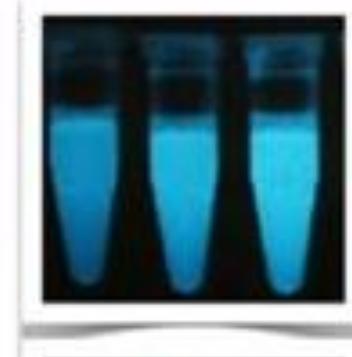
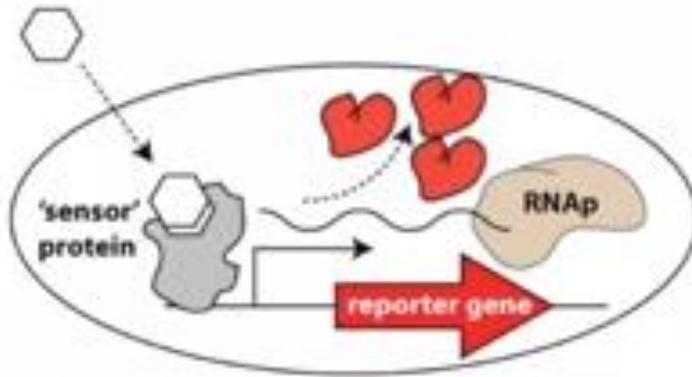
<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog>

<http://parts.igem.org/Help:Promoters/Construction>

[http://parts.igem.org/Add\\_a\\_Part\\_to\\_the\\_Registry](http://parts.igem.org/Add_a_Part_to_the_Registry)

[https://openwetware.org/wiki/Knight:Annealing\\_and\\_primer\\_extension\\_with\\_Taq\\_polymerase](https://openwetware.org/wiki/Knight:Annealing_and_primer_extension_with_Taq_polymerase)

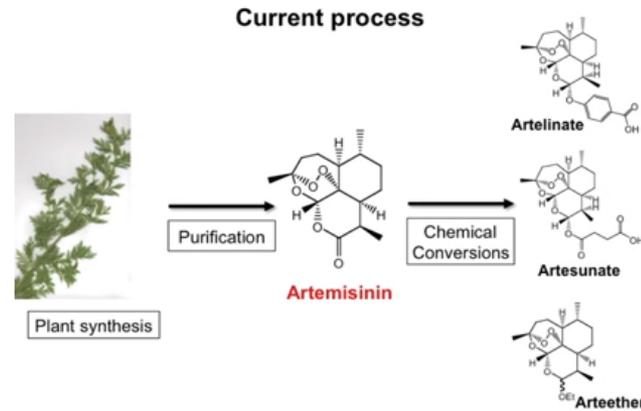
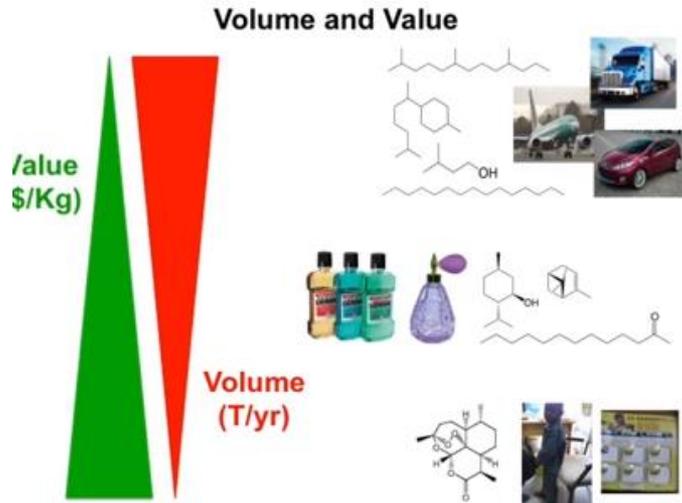
# Biologia sintética para produção de biossensores



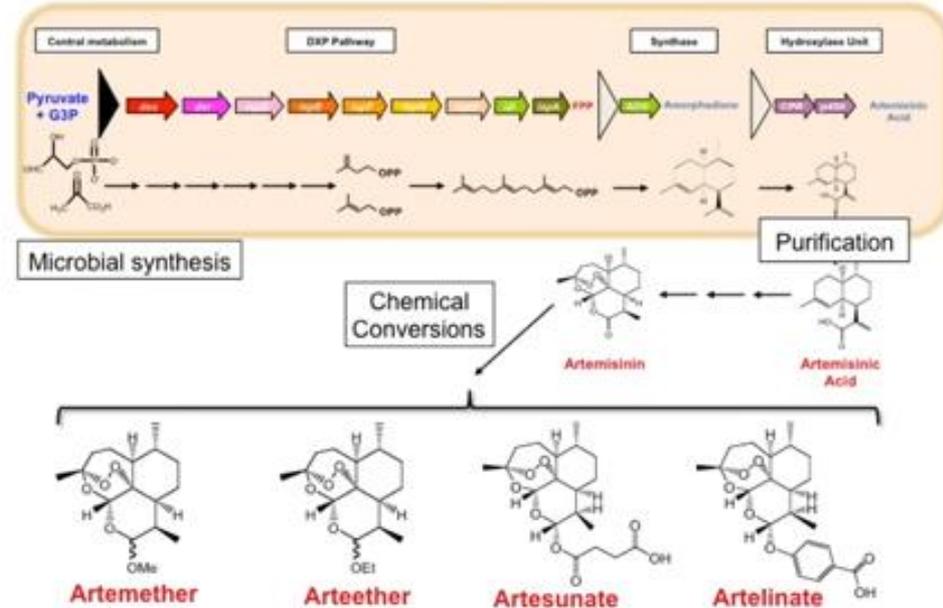
2. Bioluminescence



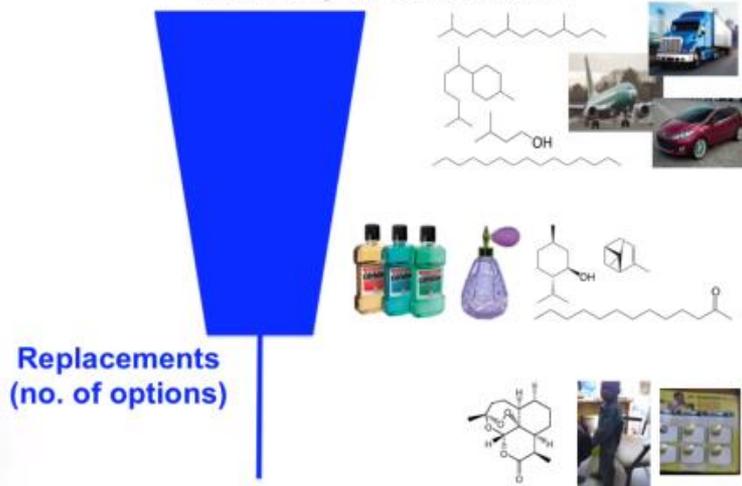
# Biologia sintética para produção de medicamentos



## A semi-synthetic route for artemisinin



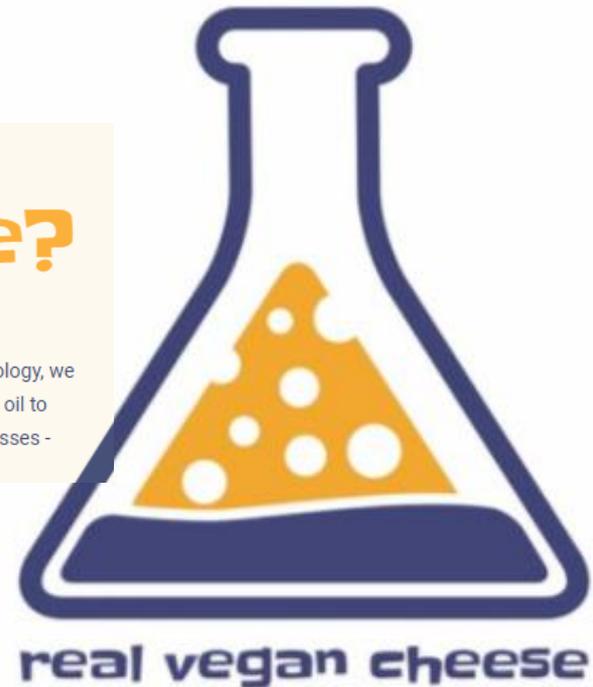
## Flexibility for substitution



# Biologia sintética para produção de alimentos

## What's vegan cheese?

Real Vegan Cheese is not a cheese substitute! It all starts with regular old baker's yeast. Through synthetic biology, we engineer our yeast to become milk-protein factories. Our milk proteins are then combined with water and vegan oil to make Vegan Milk which is ultimately converted into Real Vegan Cheese through standard cheese-making processes - just like cheese made from cow or goat milk!



Search Animal Genome for Milk Protein DNA



Synthesize Yeast DNA Based on Those Sequences



Put DNA into Yeast



Collect Milk Proteins from Yeast



Make Vegan Milk



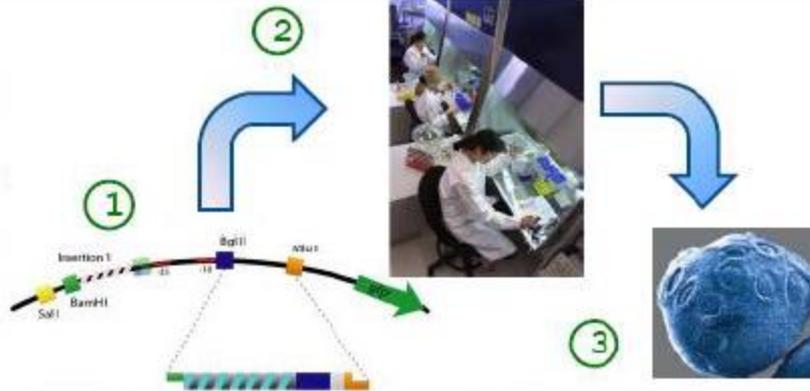
Make Real Vegan Cheese

# PLATAFORMA INOVADORA

## Standardization & Automation of Strain Engineering Rapid, reliable microbial engineering



Standard practice



### 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 Strain construction



### 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







# 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, CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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. Oye<sup>1</sup>**

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

# 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](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.

# Atividade – Quiz

- Pesquisar sobre produtos biotecnológicos que utilizam as técnicas de biologia sintética:
  - Qual o produto?
  - Aplicações/Importância/Inovação
  - Principais genes/métodos
- Max. 1 pag, entrega na próxima aula