

Universidade de São Paulo (USP)
Escola de Engenharia de Lorena (EEL)
Engenharia Bioquímica



Aula 08

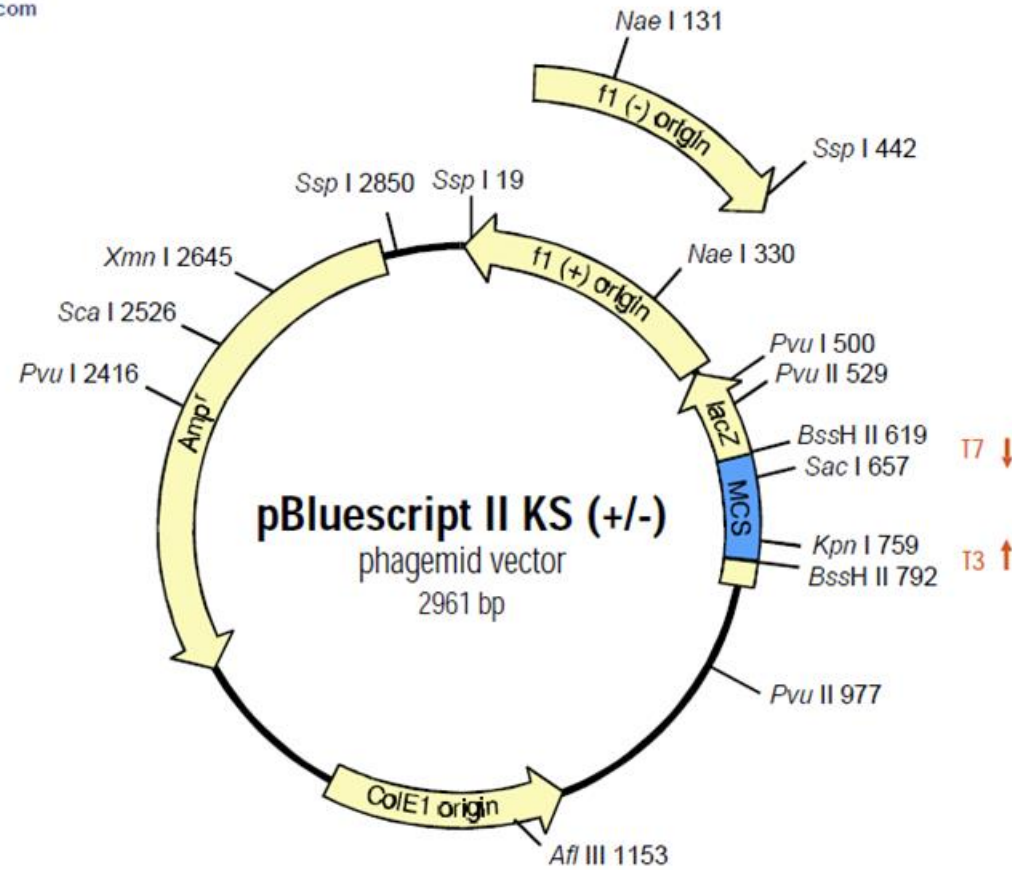
Vetores para transformação em plantas

Elisson Romanel

- 1. Características dos vetores e seu desenvolvimento**
- 2. Elementos fundamentais dos vetores**
- 3. Genômica Funcional**
- 4. Consequencias da transformação genética**

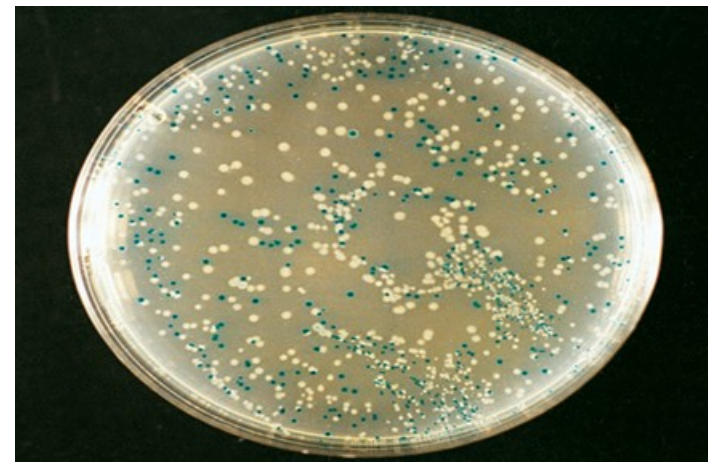
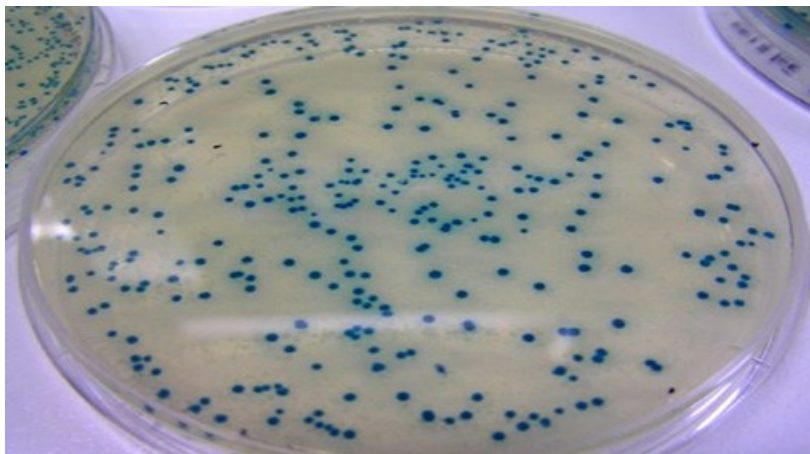
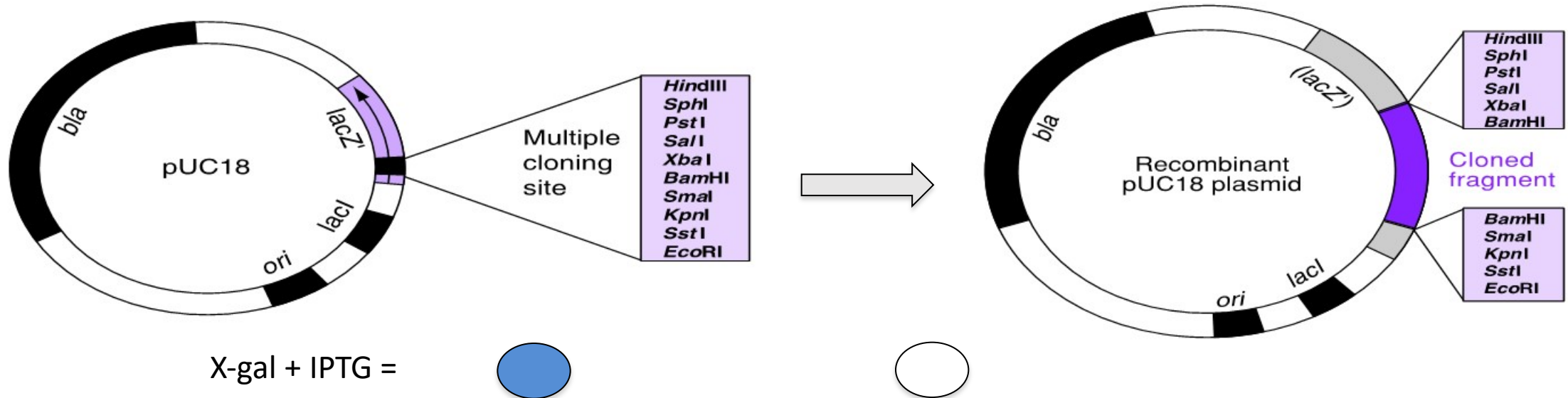
Características desejáveis para um Vetor

La Jolla, CA 92037
stratagene.com



Características desejáveis para um Vetor

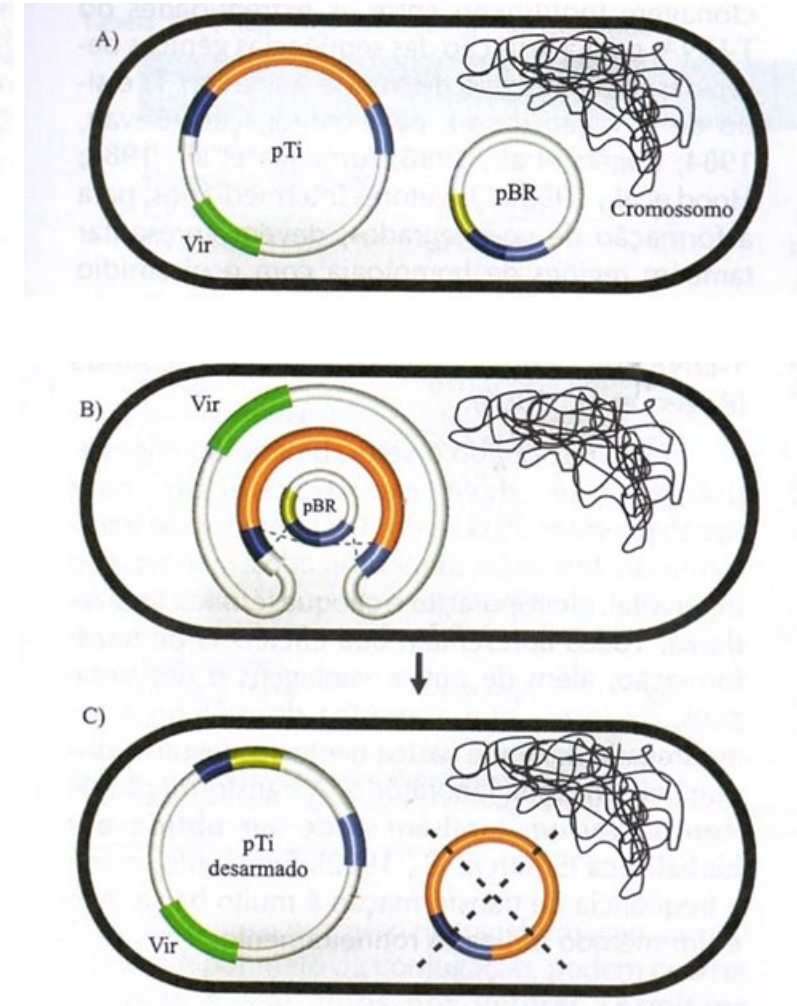
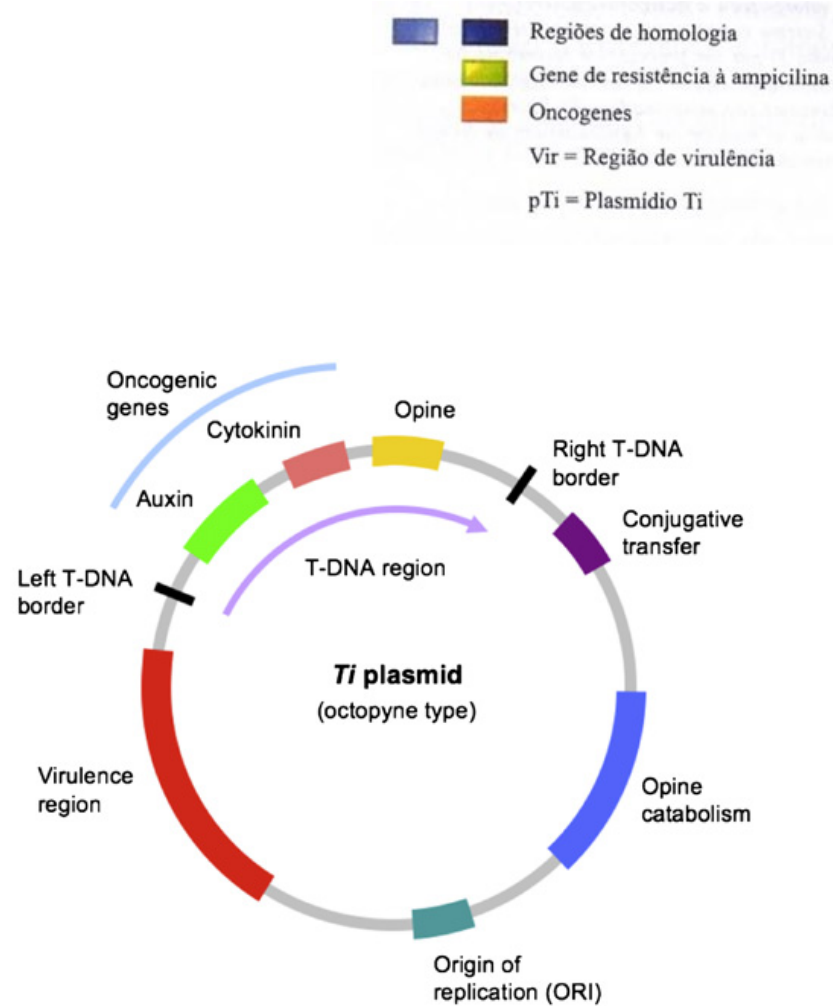
Lembrança do Curso de Biologia Molecular



Desenvolvimento de vetores para planta

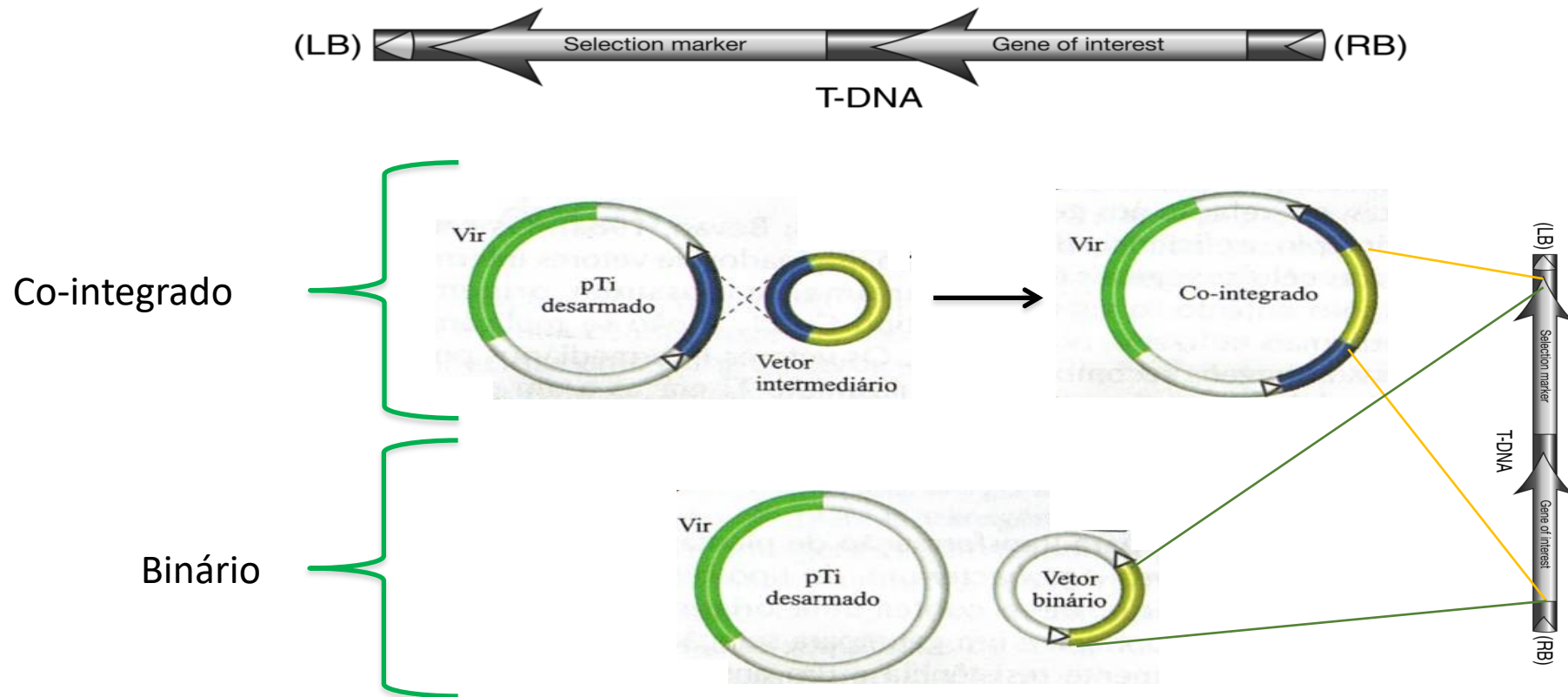


- Sequencia das bordas do T-DNA
- Remoção dos oncogenes
- Genes *VIR* funcionam em *trans*

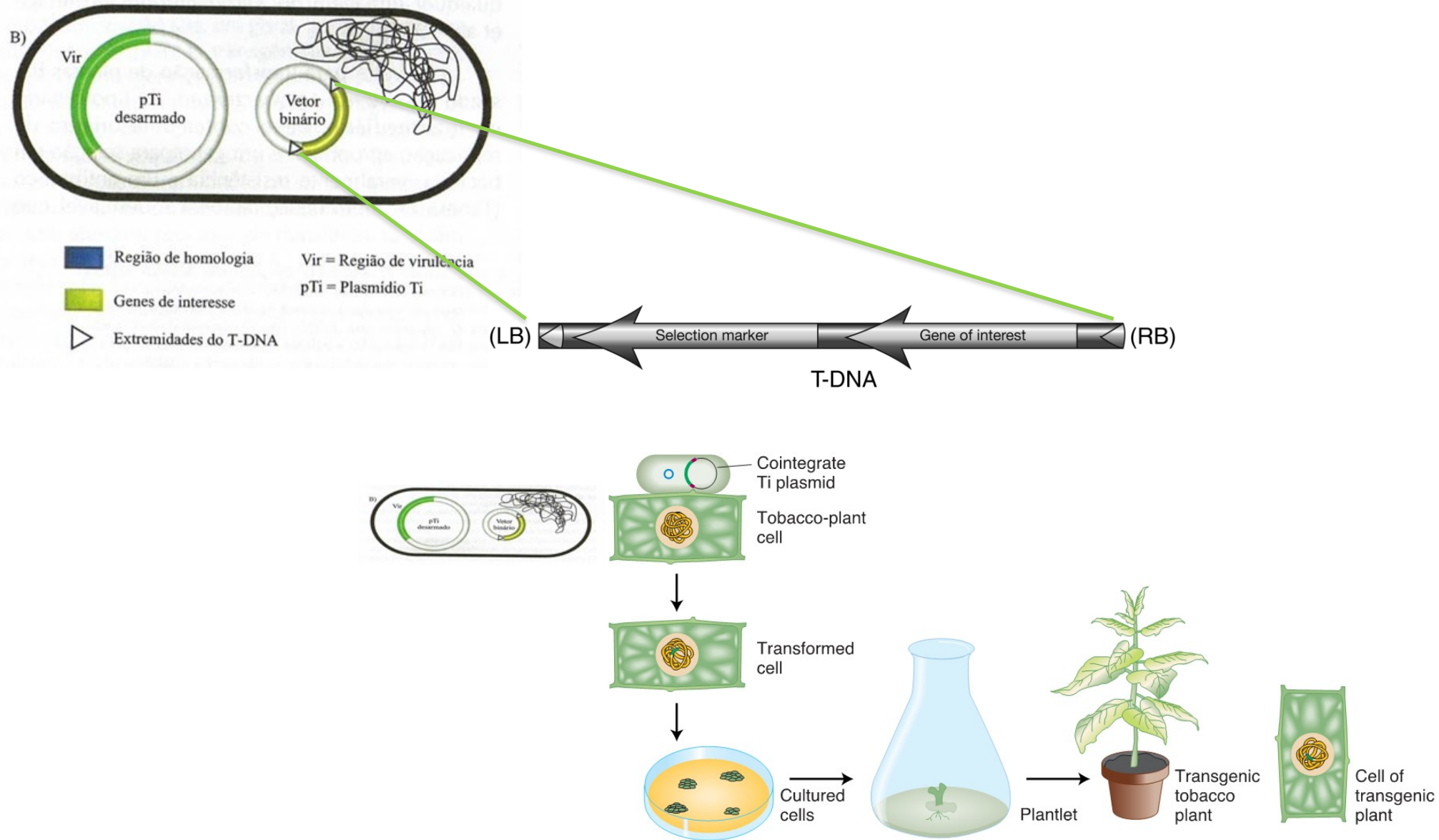


Vetores de clonagem em plantas

Preparando o vetor...



Transformação Genética de Plantas



Aplicação Biotecnológica do T-DNA

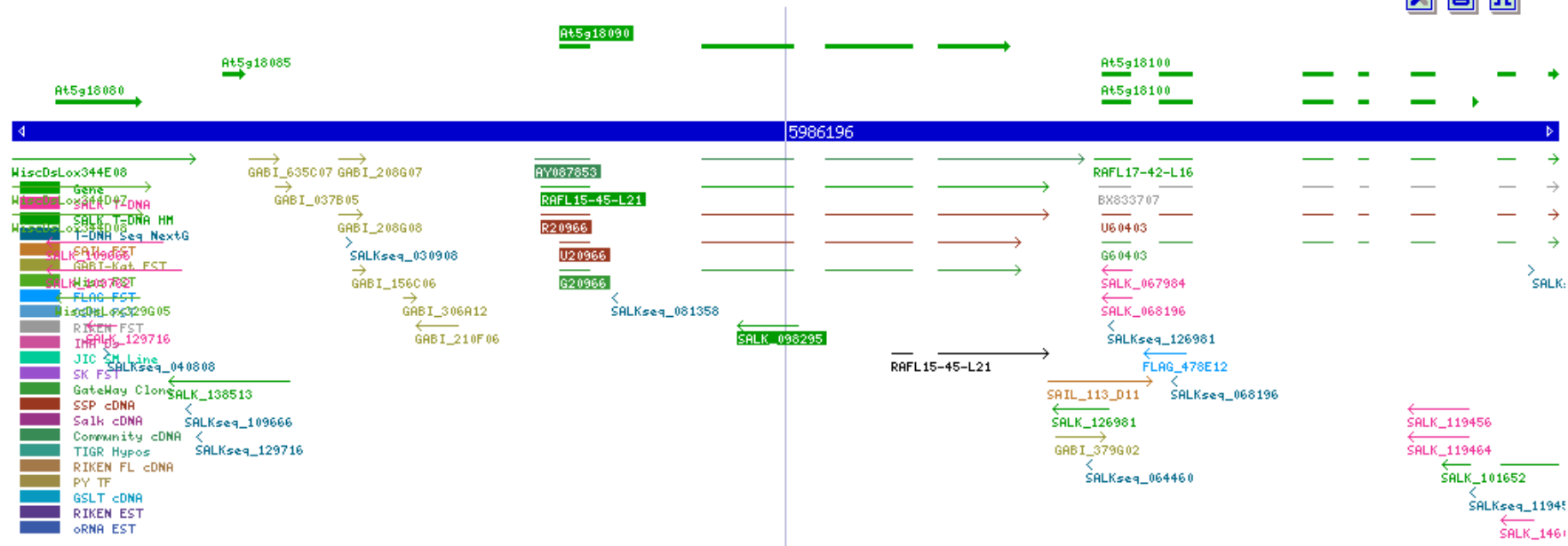


T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool (Aug. 21, 2015)

Arabidopsis thaliana [Araport 11]
chr5 5983696 - 5988696

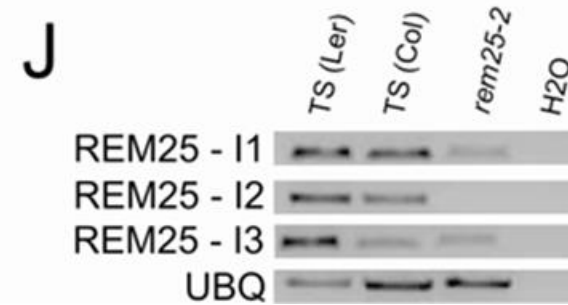
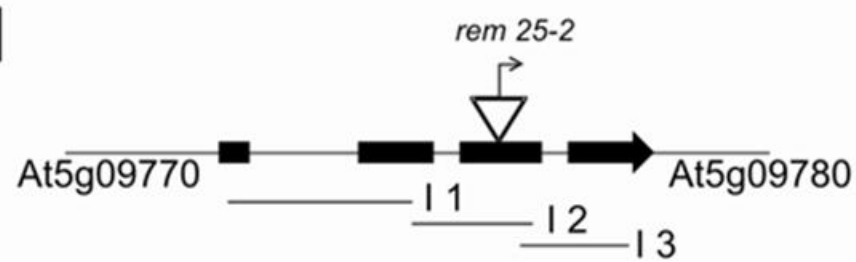
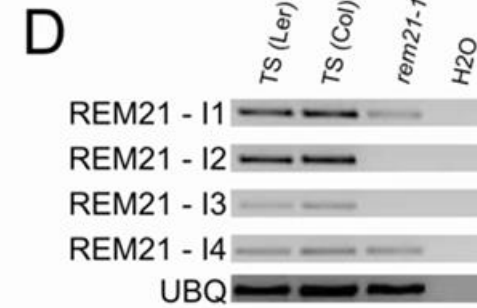
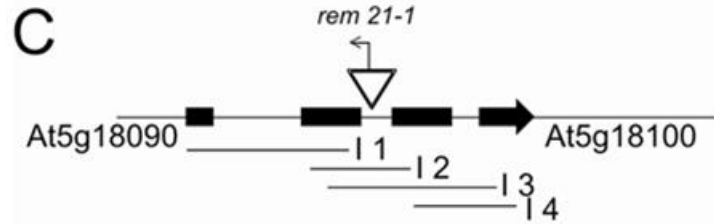
Powered by *gebd* 4.18.3

out ◀◀◀◀◀◀ ◻ ▶▶ **in**

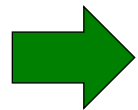
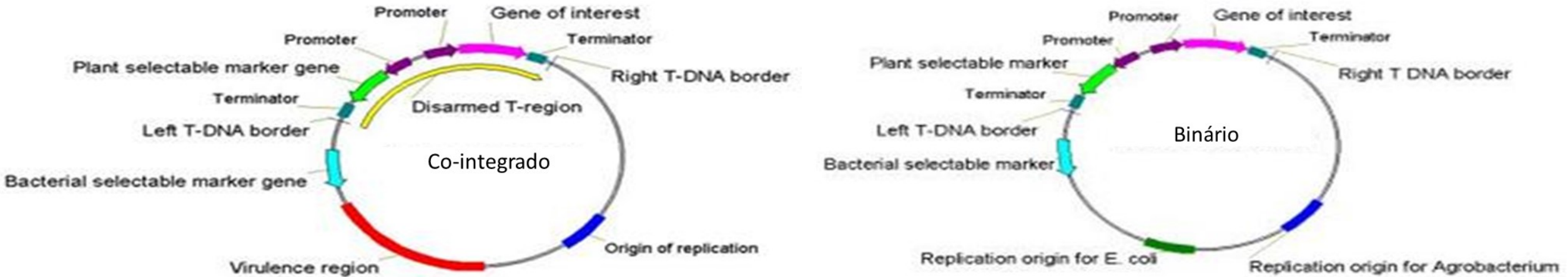


<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Aplicação Biotecnológica do T-DNA



Desenvolvimento de vetores para planta



- Origem de replicação em Agrobacteria

- Marcador de seleção para planta

- Bordas precisam ser incorporadas em vetores desejáveis



- Genes requerem ajustes

Promotor (força, especificidade e tipo de regulação)

Terminador

Desenvolvimento de vetores para planta

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

| | Codon | Amino acid ² | % ³ | Ratio ⁴ | Codon | Amino acid | % | Ratio | Codon | Amino acid | % | Ratio | Codon | Amino acid | % | Ratio | |
|----------|----------|-------------------------|----------------|--------------------|----------|------------|-----|-------|----------|------------|------|-------|----------|------------|-----|-------|----------|
| U | UUU | Phe (F) | 1.9 | 0.51 | UCU | Ser (S) | 1.1 | 0.19 | UAU | Tyr (Y) | 1.6 | 0.53 | UGU | Cys (C) | 0.4 | 0.43 | U |
| | UUC | Phe (F) | 1.8 | 0.49 | UCC | Ser (S) | 1.0 | 0.17 | UAC | Tyr (Y) | 1.4 | 0.47 | UGC | Cys (C) | 0.6 | 0.57 | |
| | UUA | Leu (L) | 1.0 | 0.11 | UCA | Ser (S) | 0.7 | 0.12 | UAA | STOP | 0.2 | 0.62 | UGA | STOP | 0.1 | 0.30 | |
| | UUG | Leu (L) | 1.1 | 0.11 | UCG | Ser (S) | 0.8 | 0.13 | UAG | STOP | 0.03 | 0.09 | UGG | Trp (W) | 1.4 | 1.00 | |
| C | CUU | Leu (L) | 1.0 | 0.10 | CCU | Pro (P) | 0.7 | 0.16 | CAU | His (H) | 1.2 | 0.52 | CGU | Arg (R) | 2.4 | 0.42 | U |
| | CUC | Leu (L) | 0.9 | 0.10 | CCC | Pro (P) | 0.4 | 0.10 | CAC | His (H) | 1.1 | 0.48 | CGC | Arg (R) | 2.2 | 0.37 | |
| | CUA | Leu (L) | 0.3 | 0.03 | CCA | Pro (P) | 0.8 | 0.20 | CAA | Gln (Q) | 1.3 | 0.31 | CGA | Arg (R) | 0.3 | 0.05 | |
| | CUG | Leu (L) | 5.2 | 0.55 | CCG | Pro (P) | 2.4 | 0.55 | CAG | Gln (Q) | 2.9 | 0.69 | CGG | Arg (R) | 0.5 | 0.08 | |
| A | AUU | Ile (I) | 2.7 | 0.47 | ACU | Thr (T) | 1.2 | 0.21 | AAU | Asn (N) | 1.6 | 0.39 | AGU | Ser (S) | 0.7 | 0.13 | U |
| | AUC | Ile (I) | 2.7 | 0.46 | ACC | Thr (T) | 2.4 | 0.43 | AAC | Asn (N) | 2.6 | 0.61 | AGC | Ser (S) | 1.5 | 0.27 | |
| | AUA | Ile (I) | 0.4 | 0.07 | ACA | Thr (T) | 0.1 | 0.30 | AAA | Lys (K) | 3.8 | 0.76 | AGA | Arg (R) | 0.2 | 0.04 | |
| | AUG | Met (M) | 2.6 | 1.00 | ACG | Thr (T) | 1.3 | 0.23 | AAG | Lys (K) | 1.2 | 0.24 | AGG | Arg (R) | 0.2 | 0.03 | |
| G | GUU | Val (V) | 2.0 | 0.29 | GCU | Ala (A) | 1.8 | 0.19 | GAU | Asp (D) | 3.3 | 0.59 | GGU | Gly (G) | 2.8 | 0.38 | U |
| | GUC | Val (V) | 1.4 | 0.20 | GCC | Ala (A) | 2.3 | 0.25 | GAC | Asp (D) | 2.3 | 0.41 | GGC | Gly (G) | 3.0 | 0.40 | |
| | GUA | Val (V) | 1.2 | 0.17 | GCA | Ala (A) | 2.1 | 0.22 | GAA | Glu (E) | 4.4 | 0.70 | GGA | Gly (G) | 0.7 | 0.09 | |
| | GUG | Val (V) | 2.4 | 0.34 | GCG | Ala (A) | 3.2 | 0.34 | GAG | Glu (E) | 1.9 | 0.30 | GGG | Gly (G) | 0.9 | 0.13 | |
| | U | | | | C | | | | A | | | | G | | | | |



Humanos

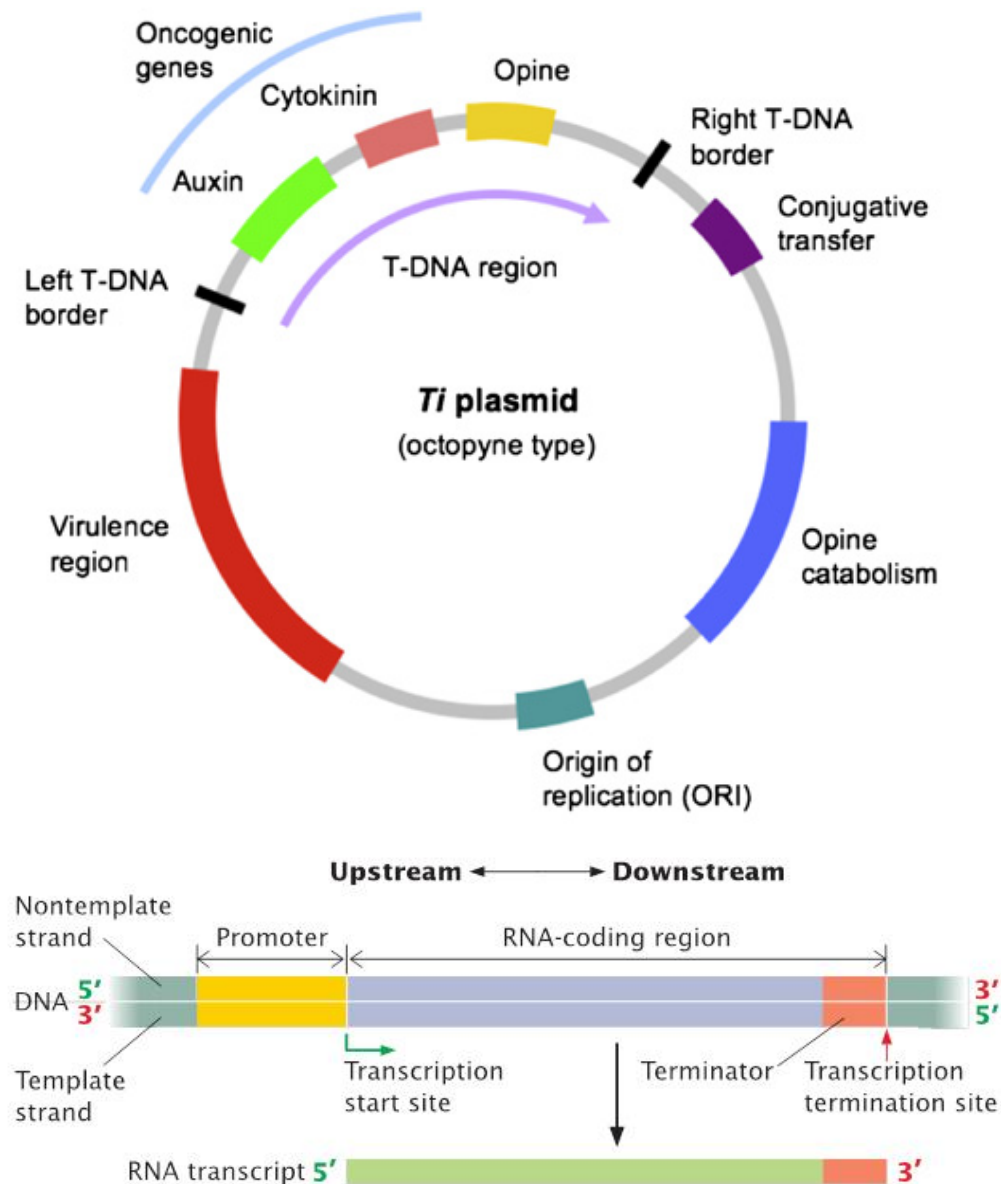


Levedura



Bactéria

Sequencias derivadas da *Agrobacterium*



- Promotor

- Constitutivo:

- Nopalina sintase (NOS)

- 35S RNA vírus do mosaico da couveflor



- Tecidos x células

- Eudicot x monocot (ZmUBI1, OsACT/intron)

- Tecido-específico:

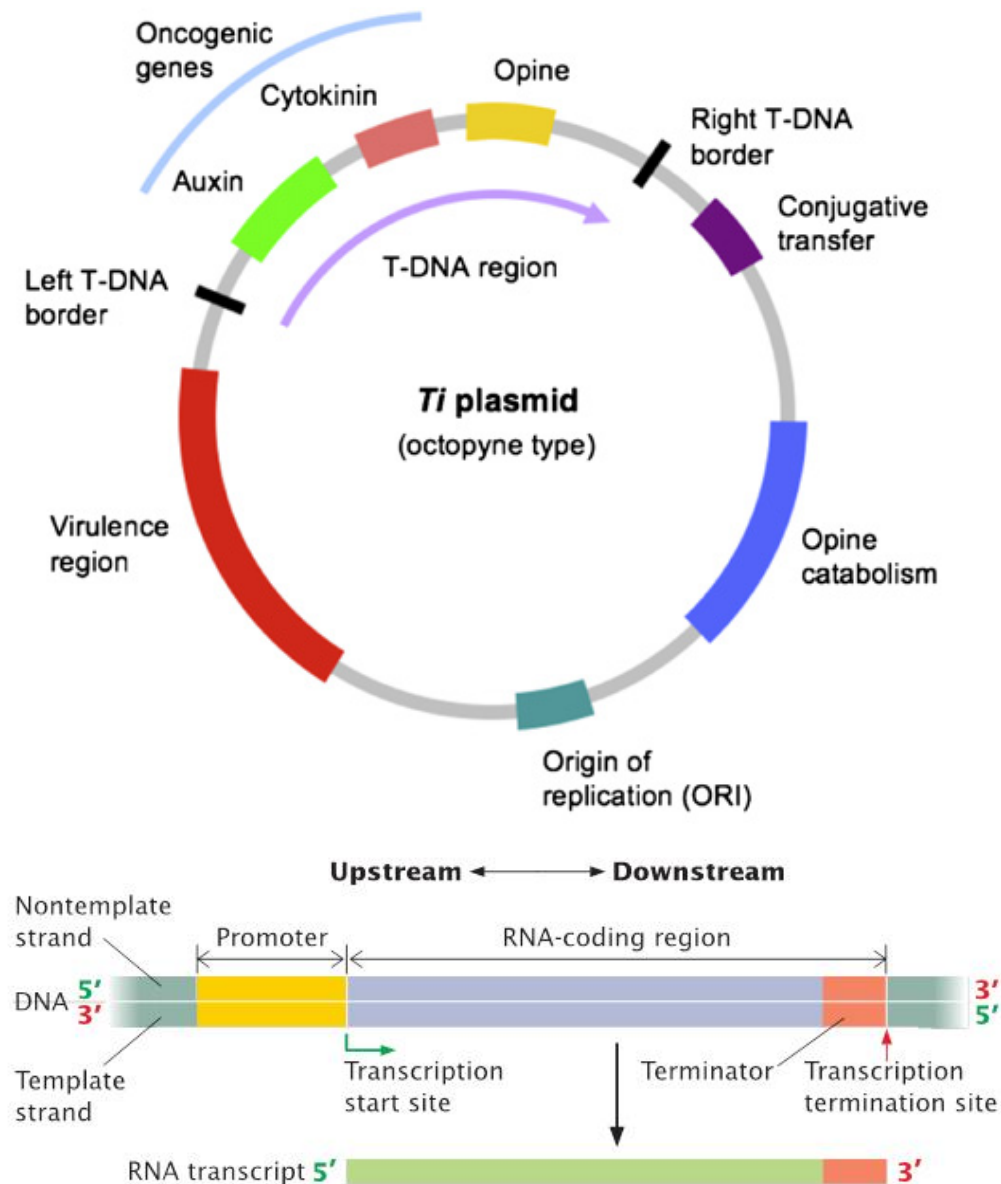
- Subst. tóxicas

- Sistemas heterólogos

- Caracterização funcional

- Elementos cis

Sequencias derivadas da *Agrobacterium*



- Promotor

- Induzível:

- Não derivado de planta

- Requer substância para ativação
- Viabilidade experimental x agrícola

- Derivado de planta e responde ao ambiente

- Derivado de planta e responde ao desenvolvimento

- Não requer substância; viabilidade agrícola

- Dificuldade na execução e possibilidade de vazamento de expressão

Genes marcador de seleção

- Uso de Antibióticos

- Inibe a síntese de proteína (Cloroplasto)

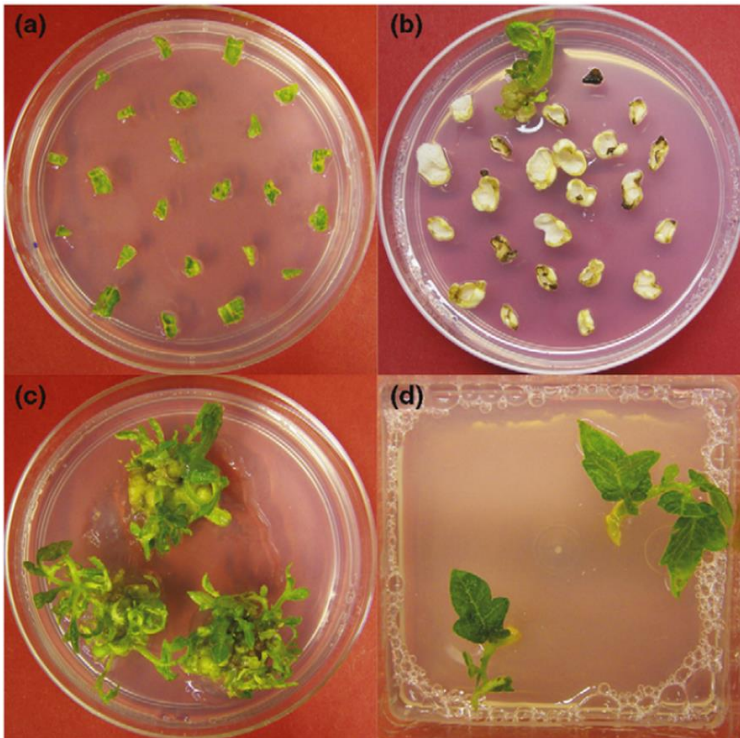
- *nptII* (neomicina fosfotransferase II) (1983) - canamicina



Streptomyces kanamyceticus

- *hpt* (higromicina fosfotransferase) (1985) - higromicina

Streptomyces hygroscopicus



TRENDS in Biotechnology

Antibiótico na seleção dos transformantes

Genes marcador de seleção

- Uso de Herbicidas

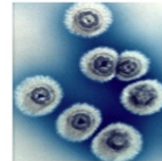
- Acúmulo de amônia em plantas

Inibidor da glutamina sintetase (GS)

Herbicida PPT (fosfinotricina ou amônia glufosinato)

- *pat* (fosfinotricina acetiltransferase) (1989)

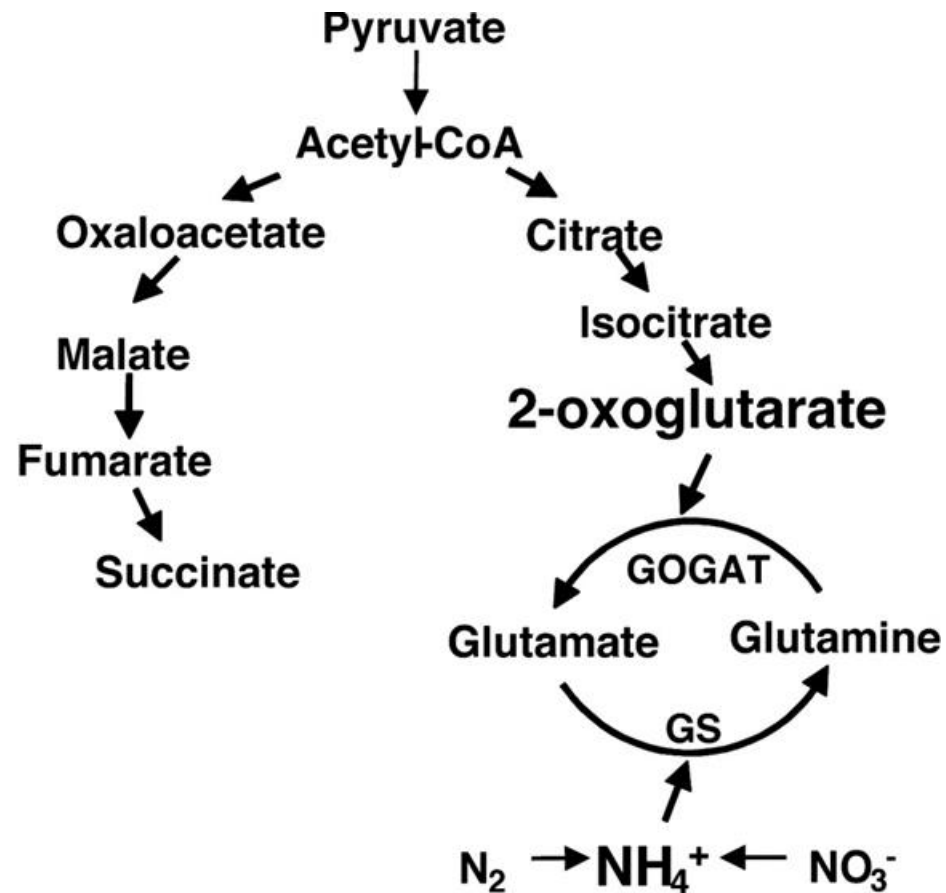
Detoxifica PPT



Streptomyces viridochromogenes

- *bar* (fosfinotricina acetiltransferase) (1989)

Streptomyces hygroscopicus



Genes repórteres



- Presente nos vetores de transformação
- Indicador de transformação
- Análise funcional de promotor
- Sistemas não destrutivos x ausência de atividade endógena

β -glucuronidase (uidA/GUS)

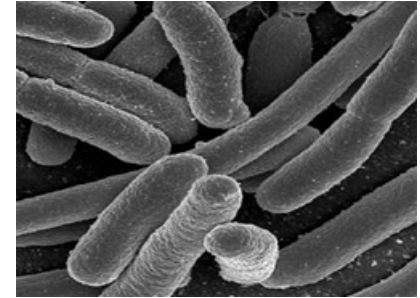
Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein)

Genes repórteres



β -glucuronidase (uidA/GUS) - 1987

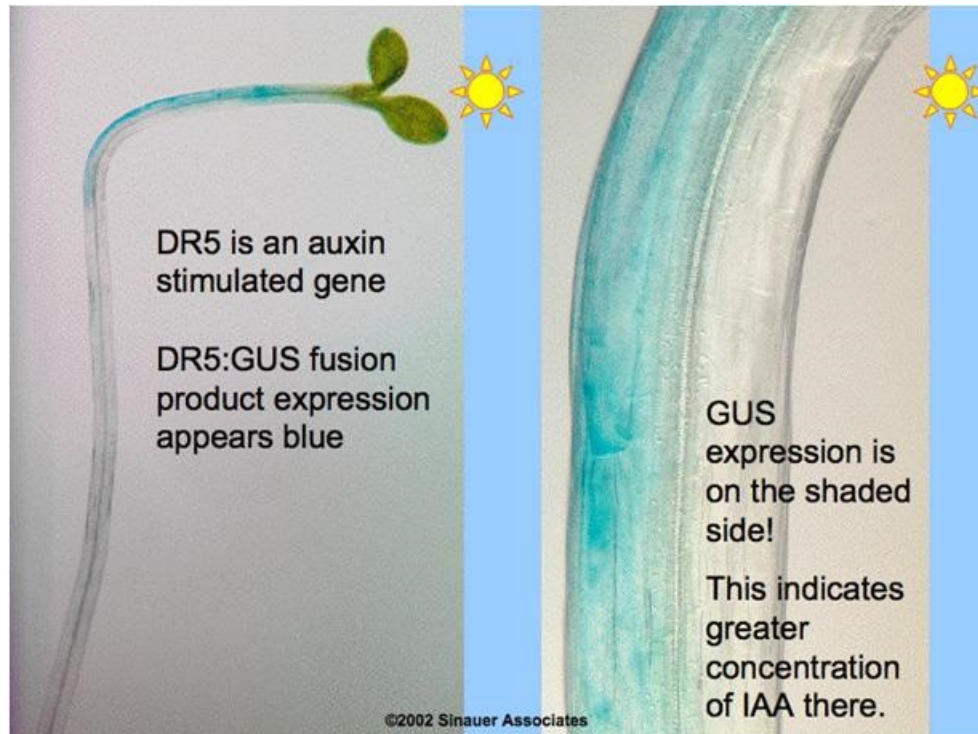
- Acúmulo sem prejuízo vegetal
- Ensaio histoquímico: fácil, rápido e não-radiotivo
- X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo)
- Quantitativo e qualitativo
- Uso de intron/procariotos
- Ensaio destrutivo e substrato é caro



Escherichia coli

Genes repórteres

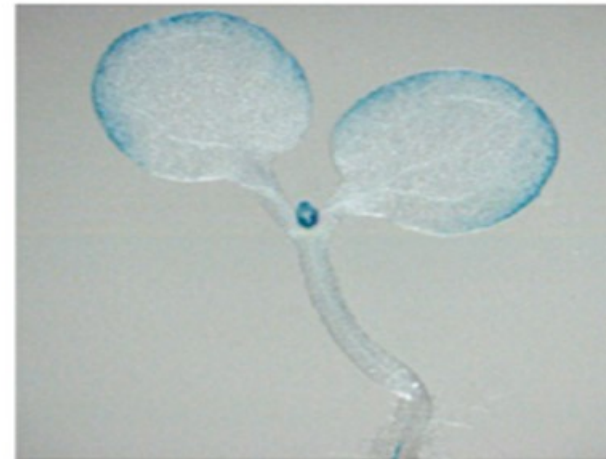
Aula 02 – Célula vegetal, órgãos, tecidos e hormônios vegetais



A

Ptaa1::TAA1-GUS

Wc



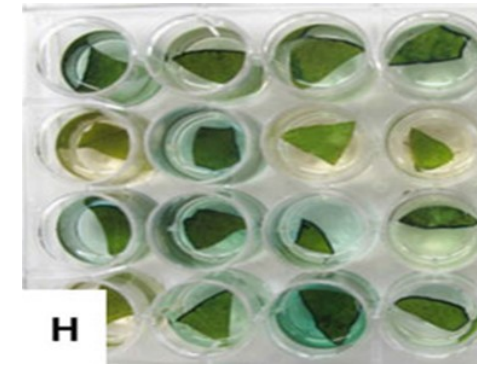
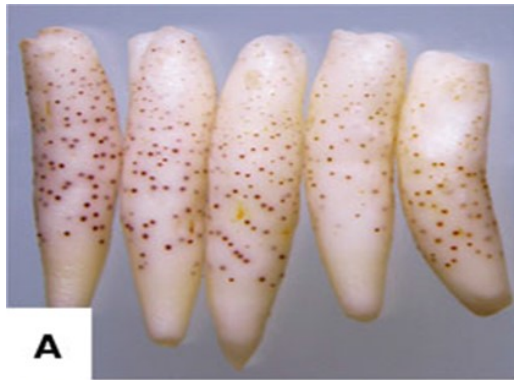
E

DR5::GUS



Genes repórteres

High throughput *Agrobacterium tumefaciens*-mediated germline transformation of mechanically isolated meristem explants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)



Genes repórteres

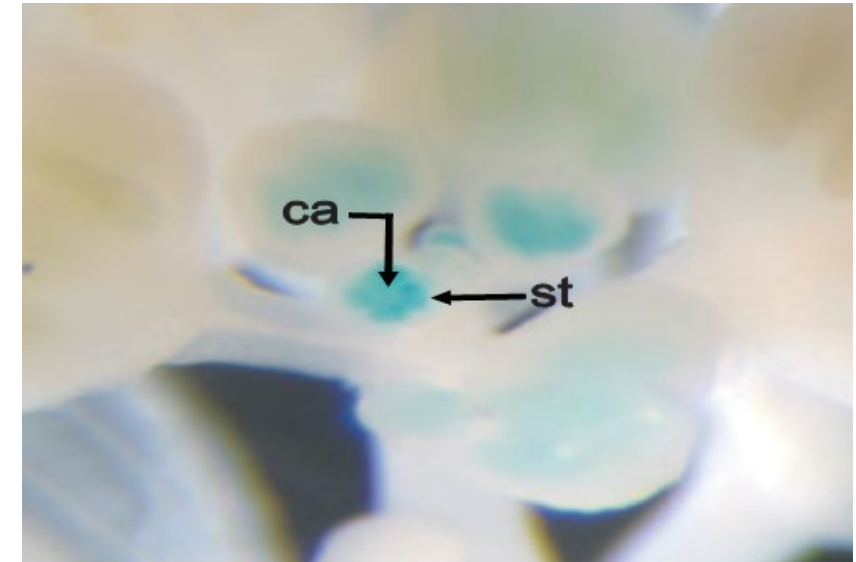
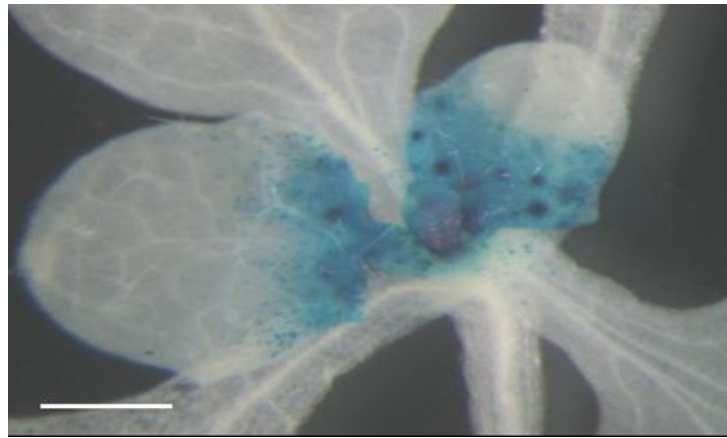
***Reproductive Meristem22* is a unique marker for the early stages of stamen development**

ELISSON ROMANEL¹, PRADEEP DAS², RICHARD M. AMASINO³, JAN TRAAS²,
ELLIOT MEYEROWITZ⁴ and MARCIO ALVES-FERREIRA^{*,1}

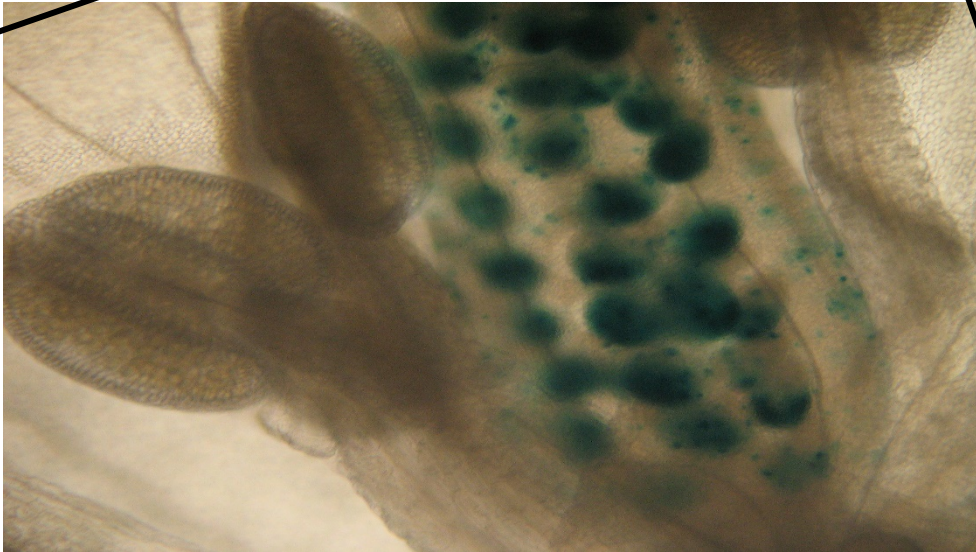
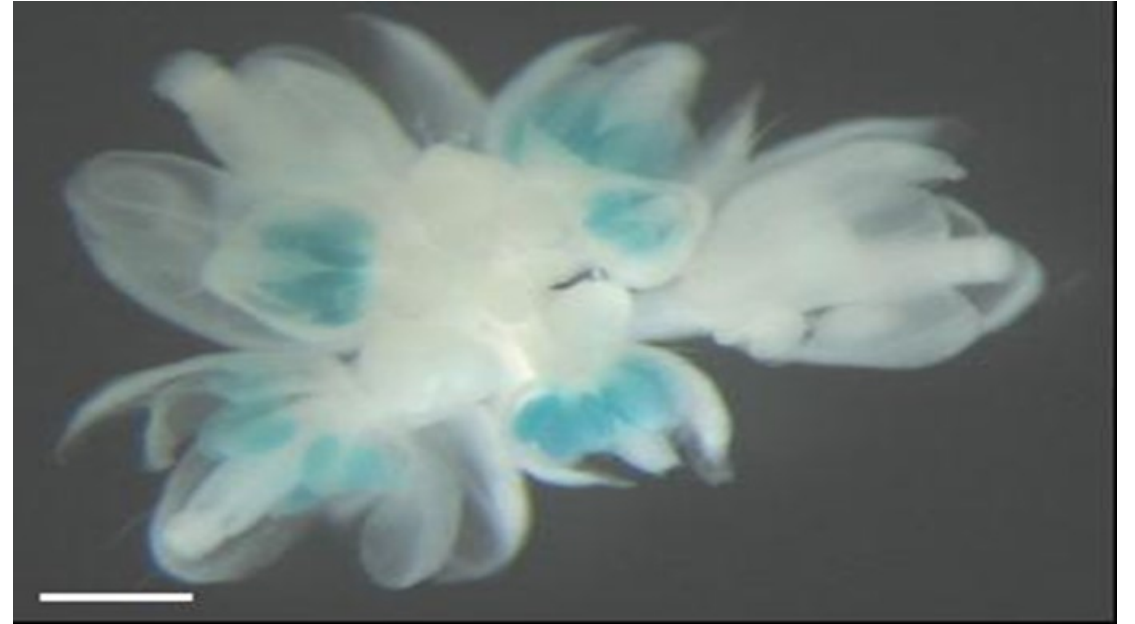
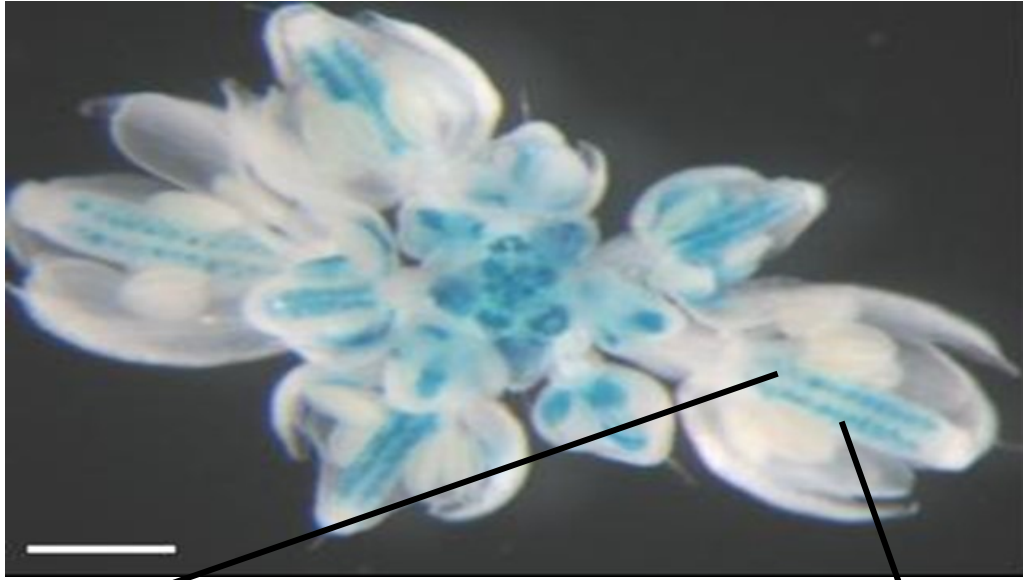
Método de transformação: Infiltração da Inflorescência

Promoter789pb

GUS



Genes repórteres



Genes repórteres



Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001

- Acúmulo sem prejudicar vegetal
- Não requer substrato (requer equipamento adequado)



Aequorea victoria



Genes repórteres



Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001

- Acúmulo sem prejudicar vegetal
- Não requer substrato (requer equipamento adequado)
- Quantitativo e qualitativo (maior sensibilidade)



Aequorea victoria

Genes repórteres

***Reproductive Meristem22* is a unique marker for the early stages of stamen development**

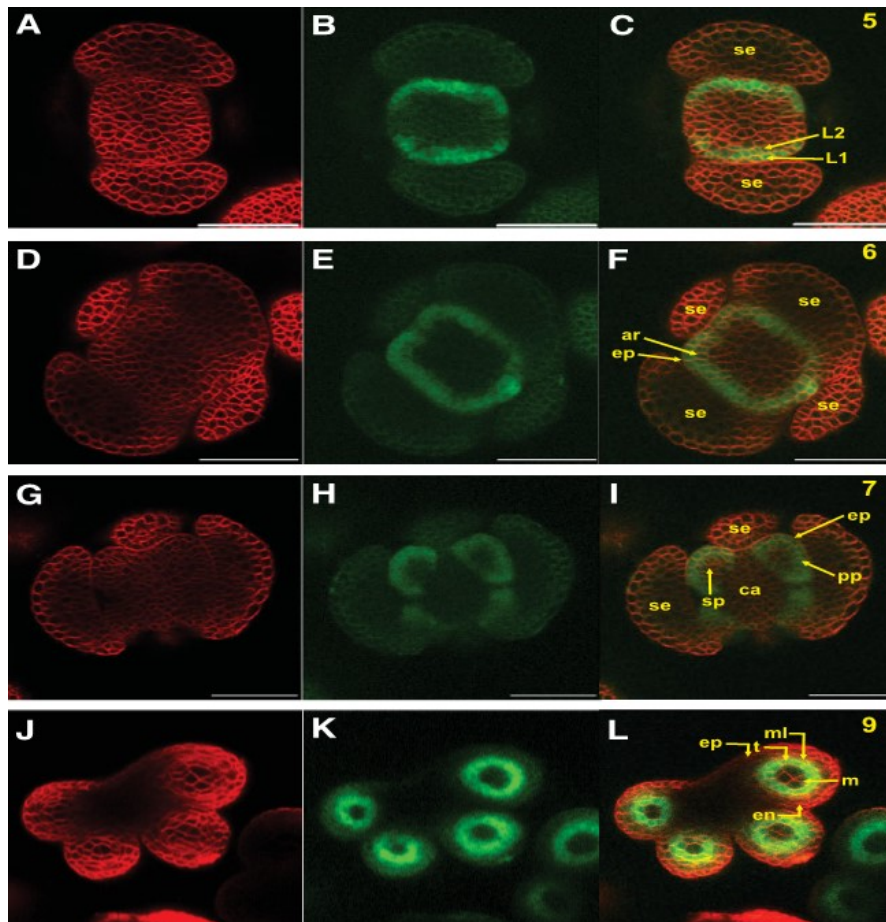
ELISSON ROMANEL¹, PRADEEP DAS², RICHARD M. AMASINO³, JAN TRAAS²,
ELLIOT MEYEROWITZ⁴ and MARCIO ALVES-FERREIRA^{*,1}

pREM22

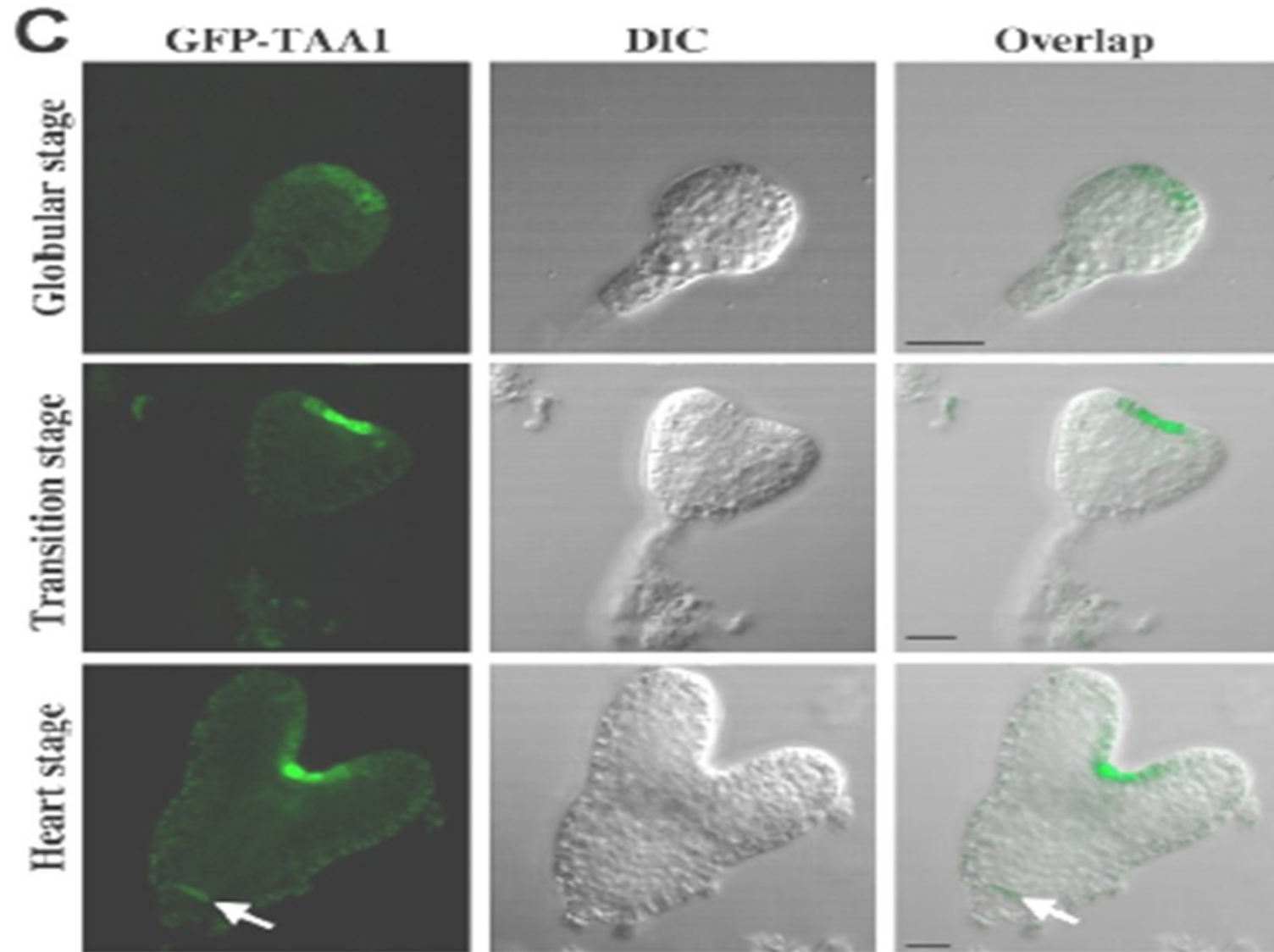
GUS

GFP

Ter



Genes repórteres



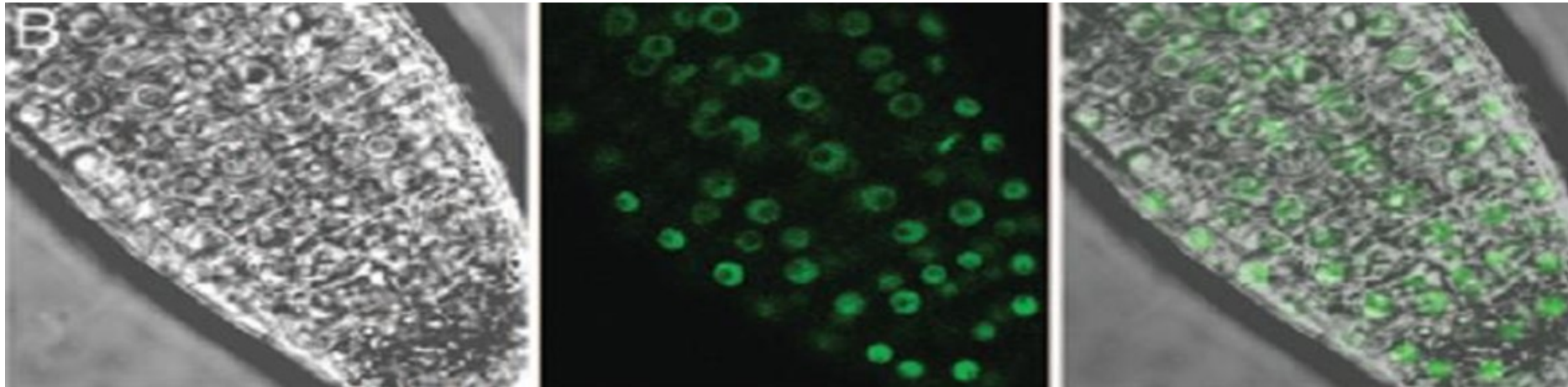
Genes repórteres

Método de transformação: Infiltração da Inflorescência



LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of *FLC*

Joshua S. Mylne^{**†}, Lynne Barrett^{**‡}, Federico Tessadori[§], Stéphane Mesnage^{*¶}, Lianna Johnson[‡], Yana V. Bernatavichute[‡], Steven E. Jacobsen[‡], Paul Fransz[§], and Caroline Dean^{*,**}



Genes repórteres



Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001

- Acúmulo sem prejudicar vegetal
- Não requer substrato (requer equipamento adequado)
- Quantitativo e qualitativo (maior sensibilidade)
- Ensaio não destrutivo
- Análise em tempo real
- Sensibilidade ao nível subcelular



Aequorea victoria

Genes repórteres

Método de transformação: Agroinfiltração

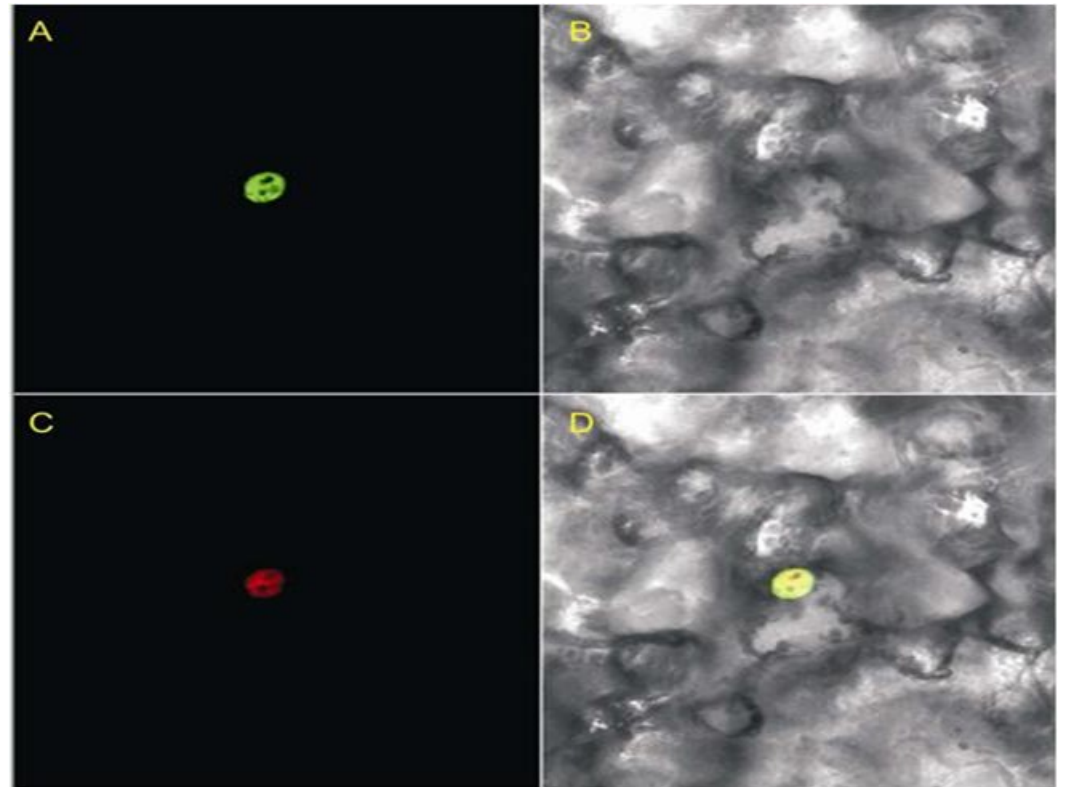


35S

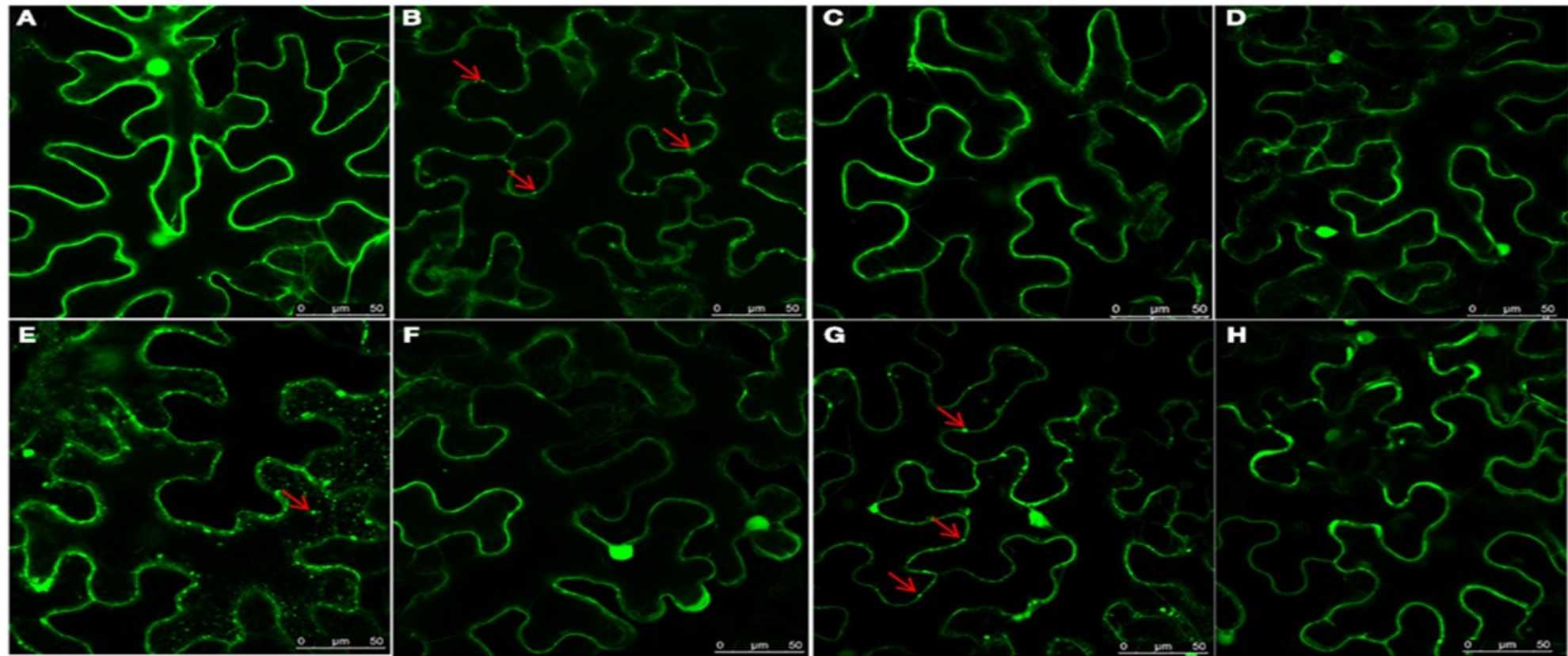
REM22

GFP

Ter



Genes repórteres



Genes repórteres



Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001

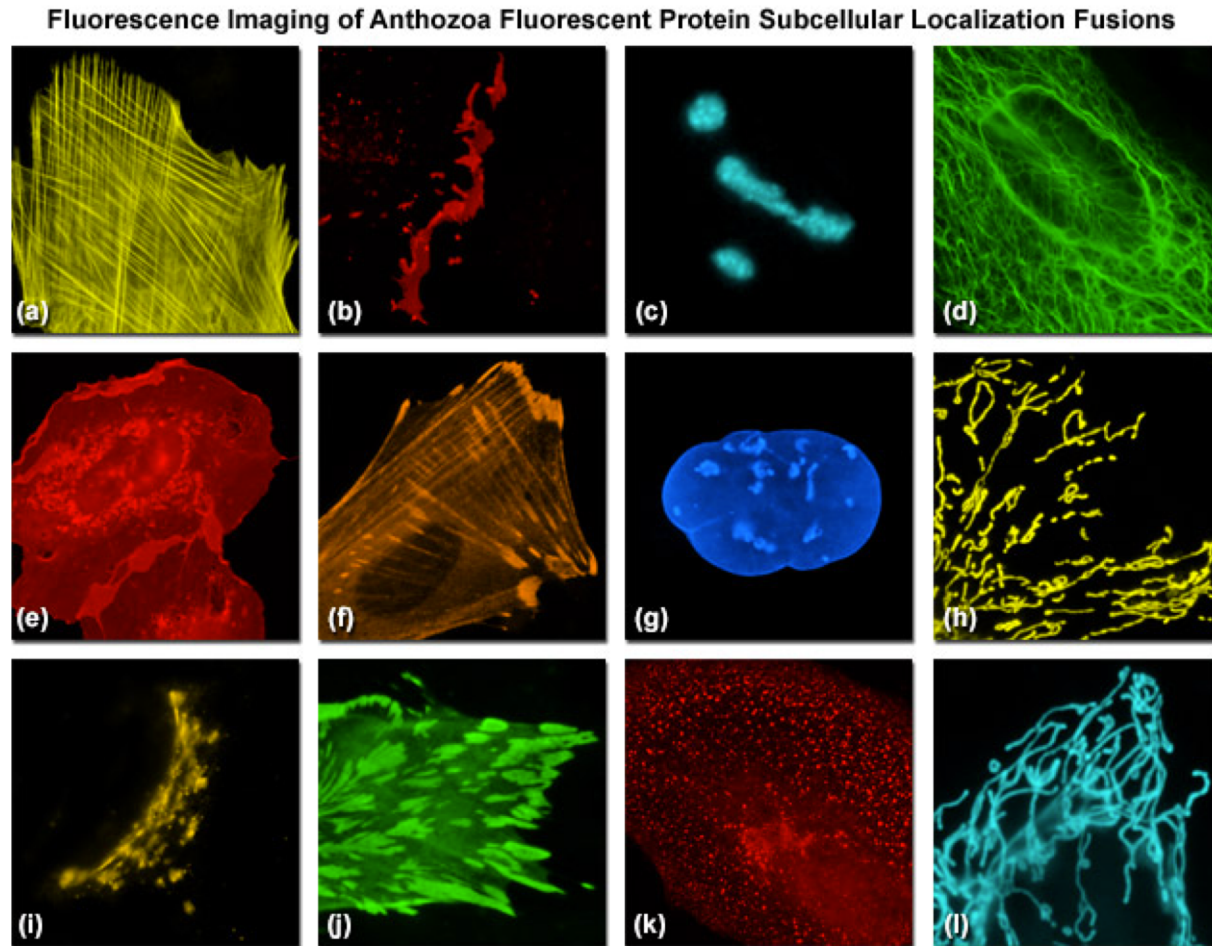
- Acúmulo sem prejudicar vegetal
- Não requer substrato (requer equipamento adequado)
- Quantitativo e qualitativo (maior sensibilidade)
- Ensaio não destrutivo
- Análise em tempo real
- Sensibilidade ao nível subcelular
- Triagem de transformantes iniciais, cultura de tecidos e pólen em campo
- Ampla variedade de proteína fluorescente



Aequorea victoria

Genes repórteres

Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001



Genes repórteres

Proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) - 2001

The Nobel Prize in Chemistry 2008



Photo: U. Montan

Osamu Shimomura

Prize share: 1/3



Photo: U. Montan

Martin Chalfie

Prize share: 1/3



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien

Prize share: 1/3



Aequorea victoria

The Nobel Prize in Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien *"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"*.

Consequências da transformação



Consequencias da transformação

Ainda é uma arte imprecisa...

- **Arranjo dos genes no vetor**

 - > 1 gene – evitar o uso do mesmo promotor e terminador (regiões repetitivas)

 - Múltiplos genes – devem estar na mesma orientação (regiões repetitivas)

- **Número de cópias do transgene**

- **Posição do transgene**

- **Características do transgene**

 - Diferenças no conteúdo G+C

 - Arquitetura dos códons e região promotora

Preocupação Pública

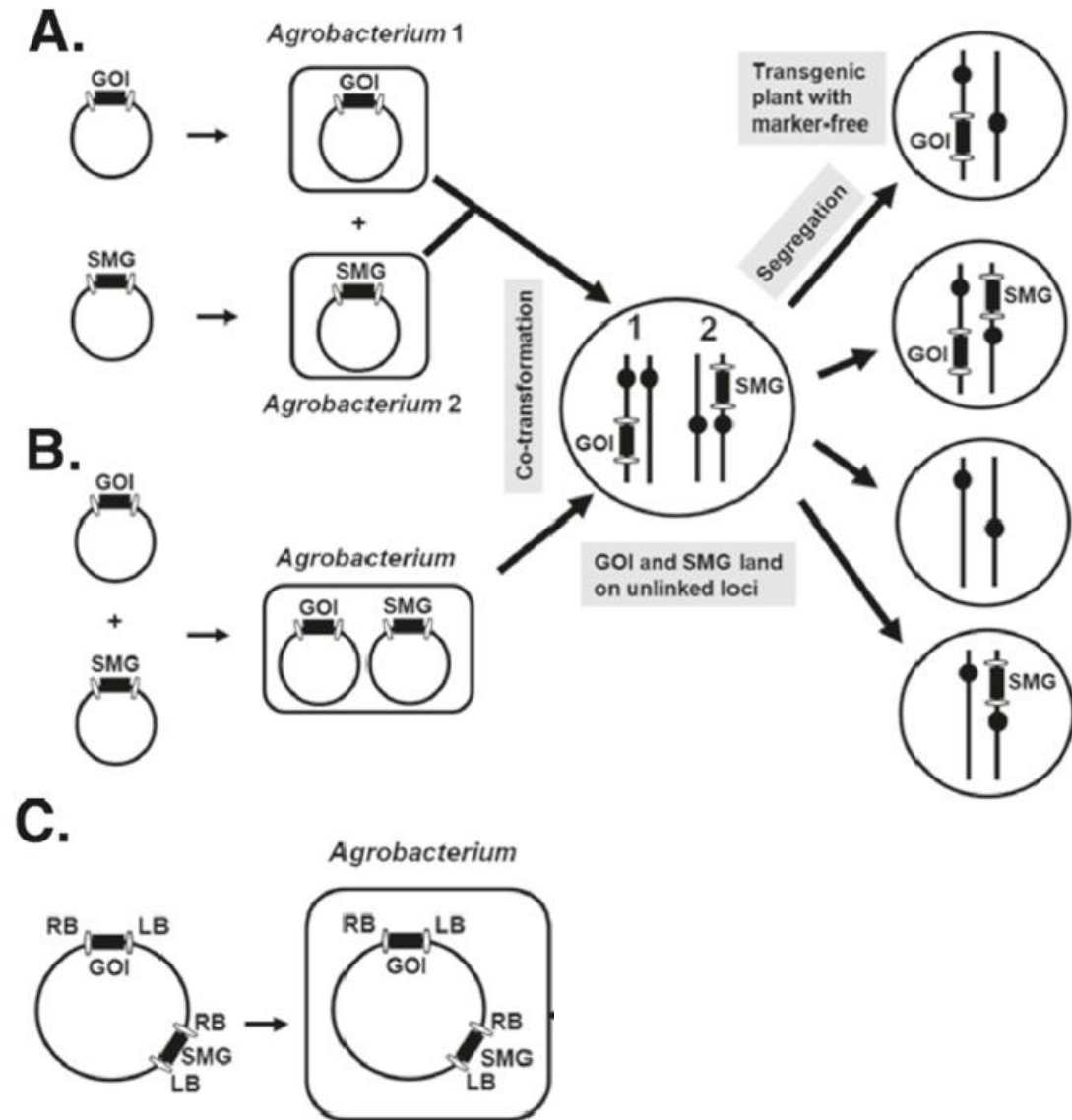
- Tecnologia de Limpeza gênica
- Marcadores: antibióticos/herbicidas



Preocupação Pública

Tecnologia de Limpeza gênica

- Marcadores: antibióticos/herbicidas
- Uso de PCR para identificação
- GOI e SMG não ligados



Preocupação Pública

Tecnologia de Limpeza gênica

- Marcadores: antibióticos/herbicidas
- Uso de PCR para identificação
- GOI e SMG não ligados
- Sistema recombinase sítio-específico

