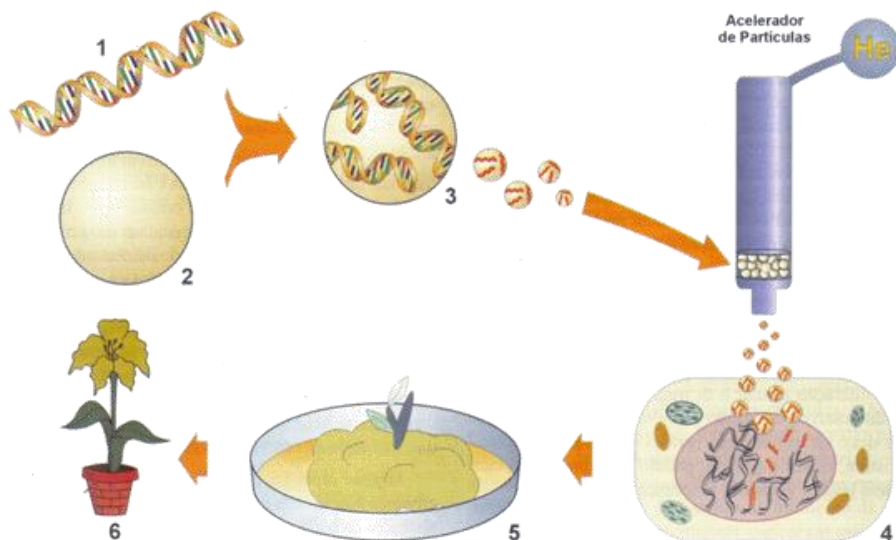


MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Aula 8

LGN0232 – Genética molecular



Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

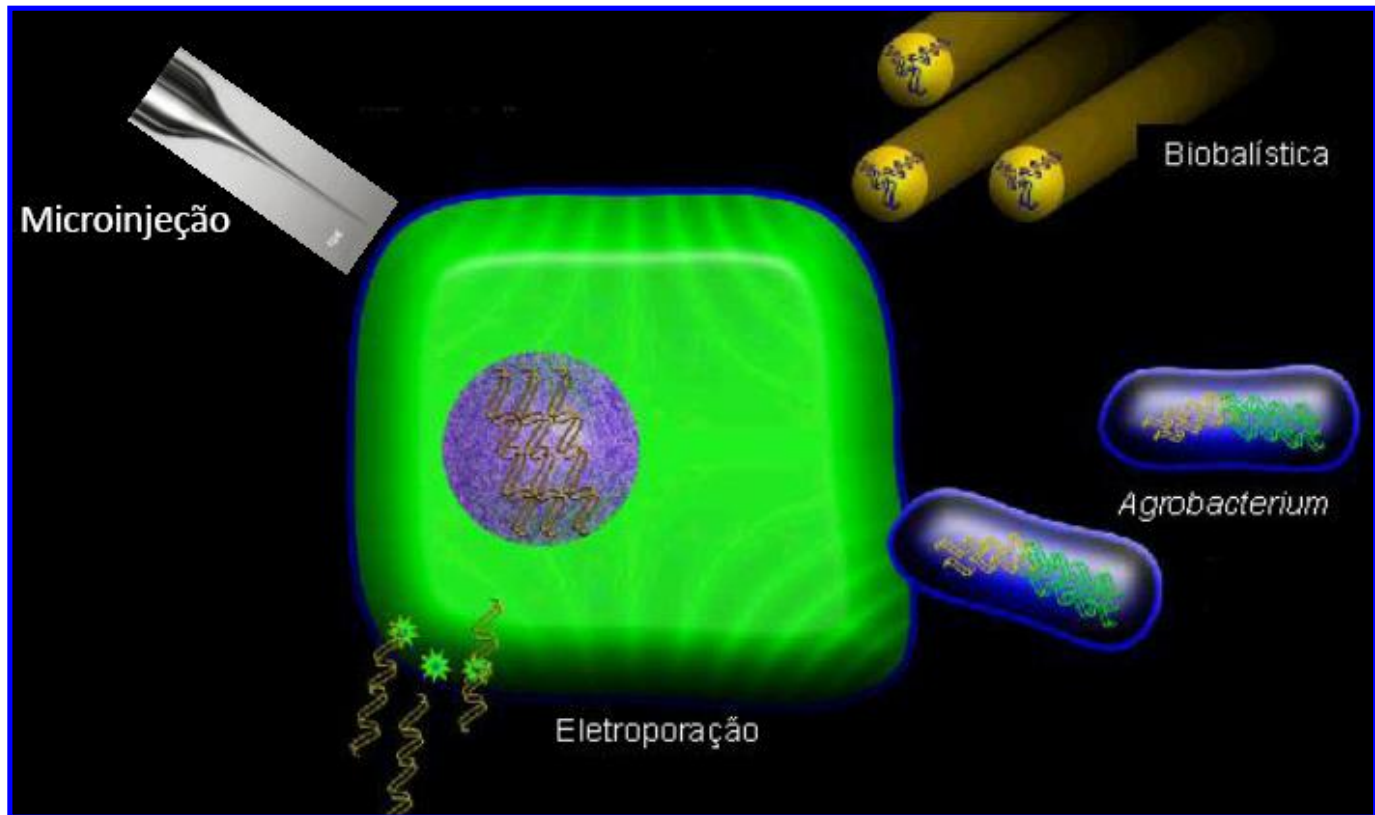


CONCEITOS IMPORTANTES

- 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



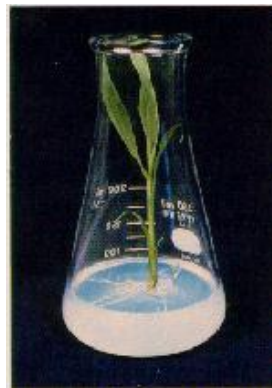
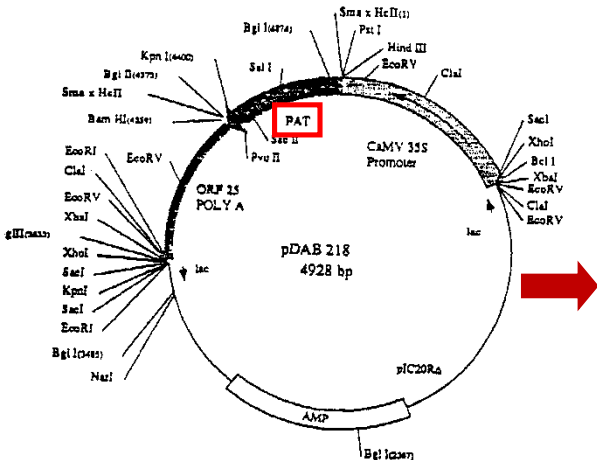
Altamente dependente do organismo!

Como eu faço a transformação de plantas?



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



Confirmação



Melhoramento



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



CONSTRUÇÃO SINTÉTICA DO TRANSGENE

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



Precisa conter no mínimo:

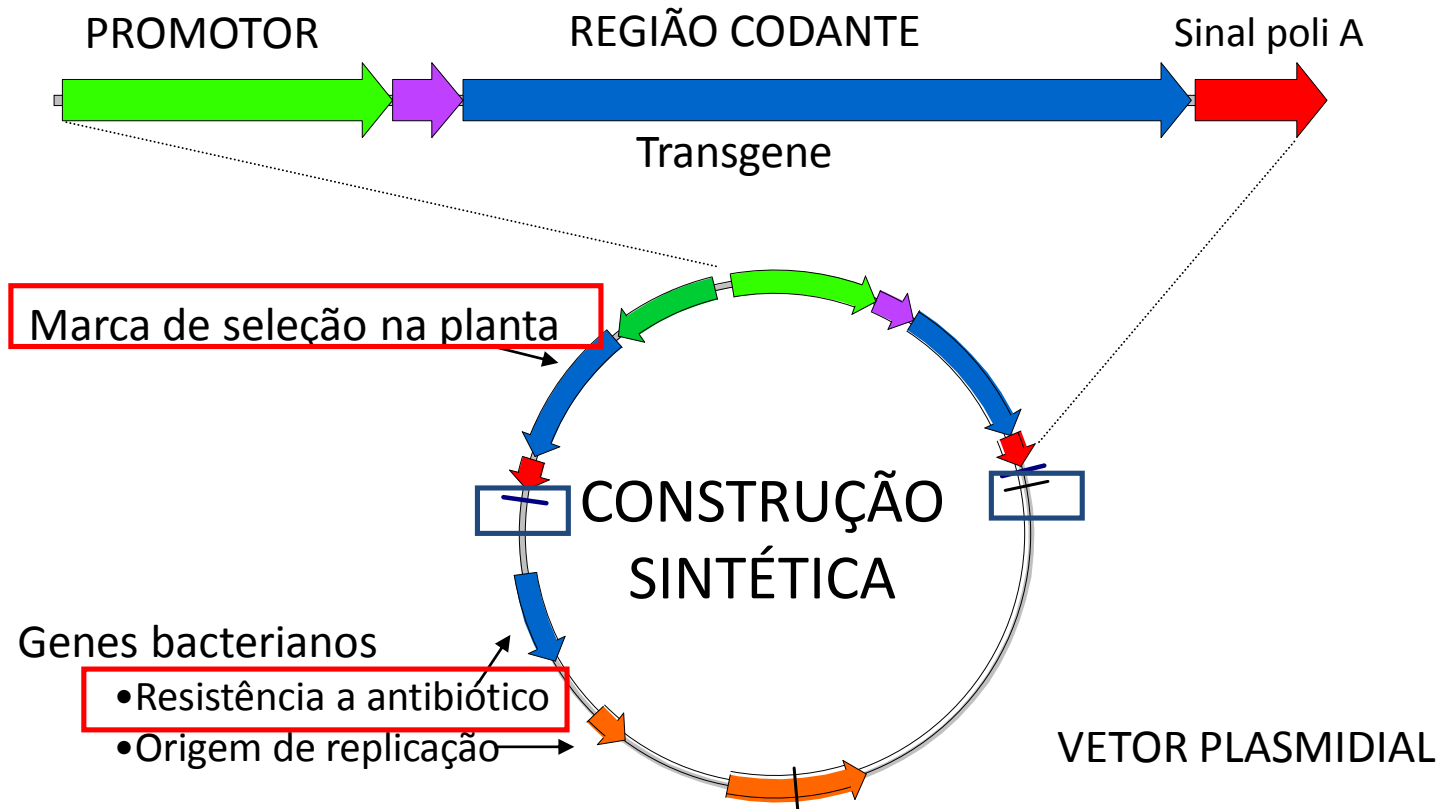
1. Gene de interesse

- A região de interesse e seus elementos controladores

2. Marca de seleção

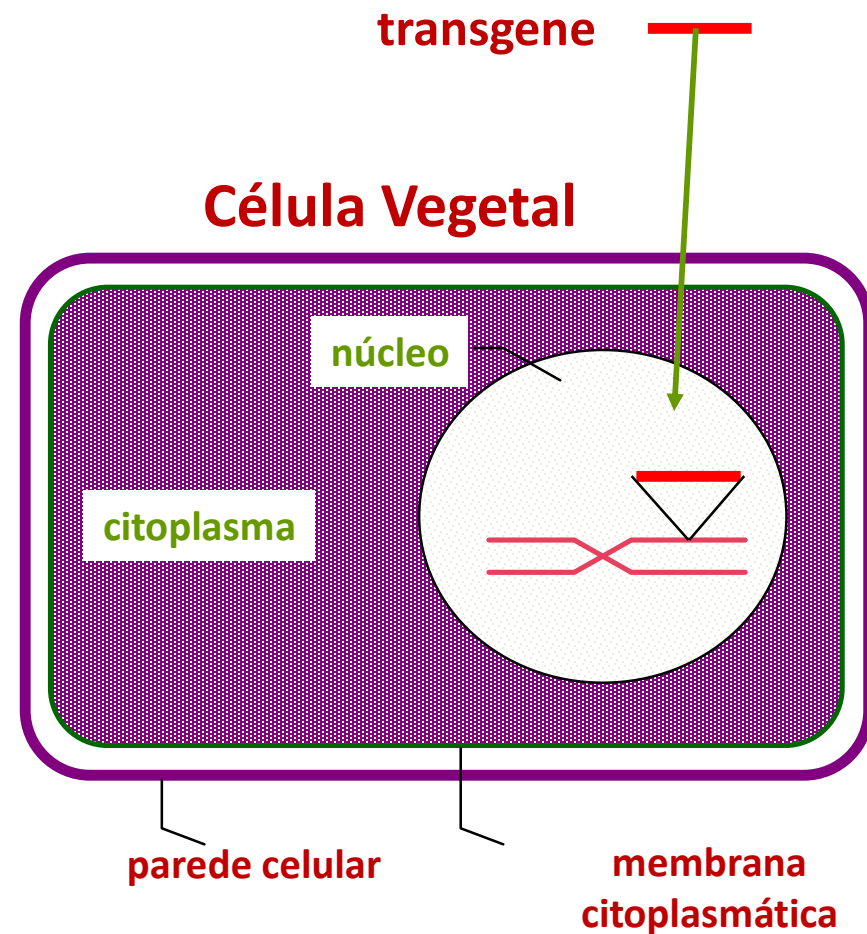
- Diferencia plantas transformadas e não transformadas

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

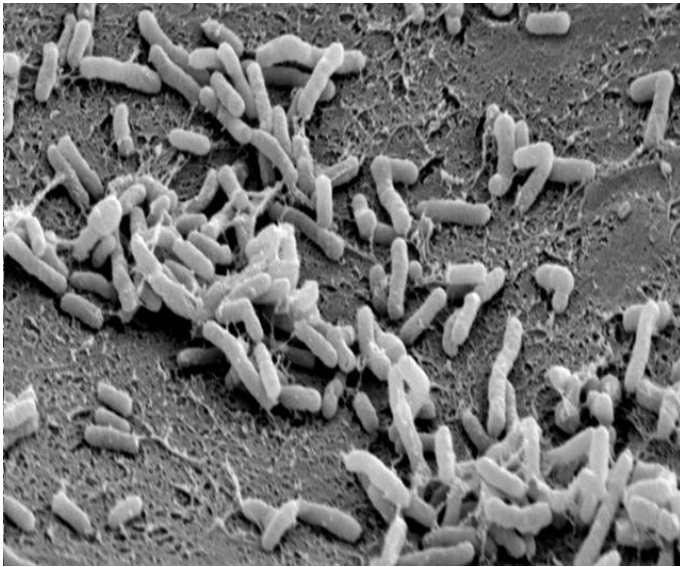
- Bactéria do solo que tem a capacidade de transferir parte do seu DNA para dentro da célula da planta;
- No laboratório, a bactéria é colocada em cultura junto com as células de plantas, ou inoculada no tecido da planta, transferindo parte do seu DNA para as células da planta;

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.

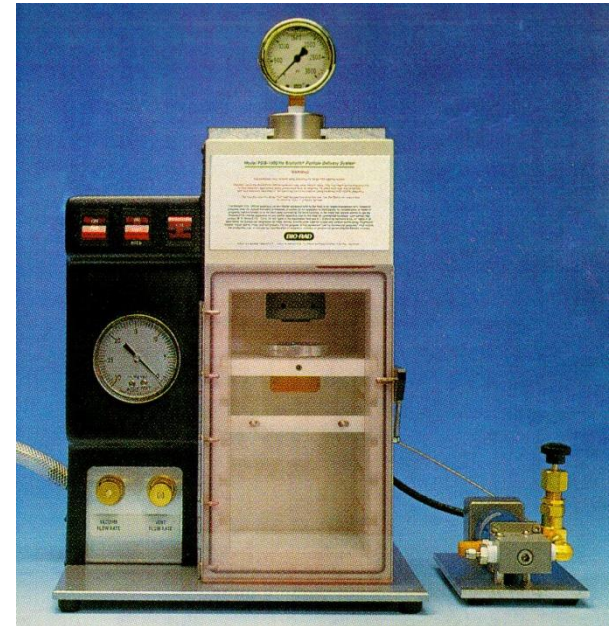
MÉTODO BIOLÓGICO X FÍSICO

Agrobacterium tumefaciens



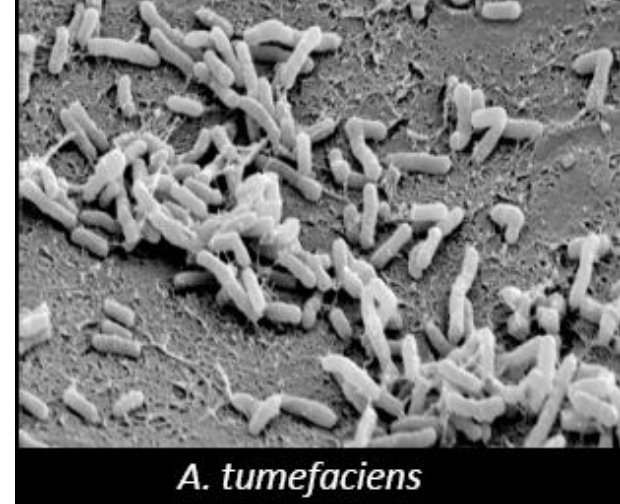
Propriedade natural da bactéria
Agrobacterium de transferir DNA para
dentro da célula da planta.

Bombardeamento de microprojéteis
“Biolística” ou “gene gun”

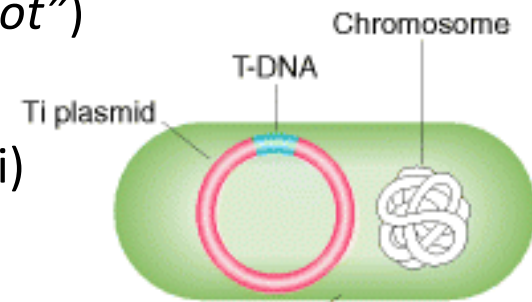


Partículas são cobertas de DNA e atiradas
para dentro da célula da planta.

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;

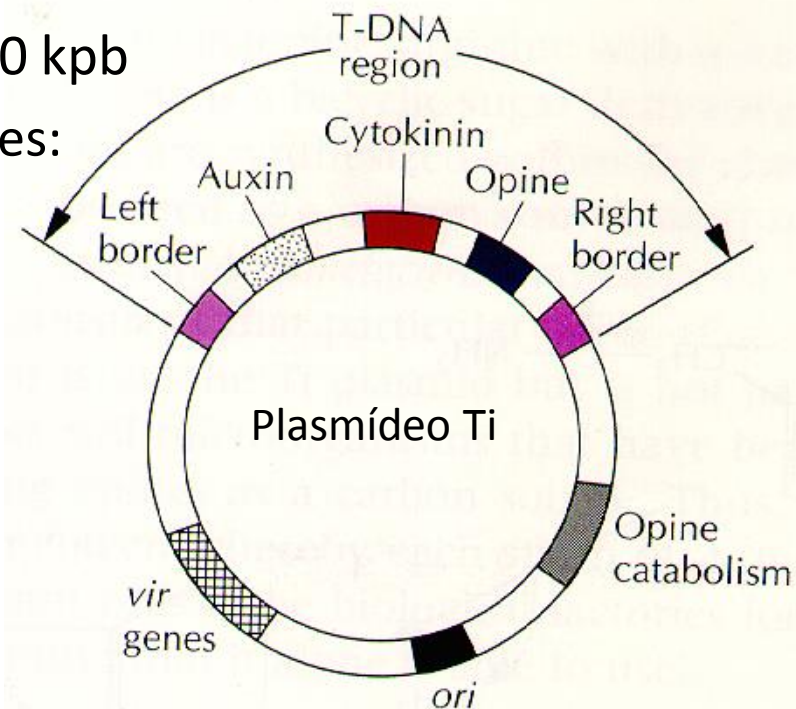
Síntese de Opina

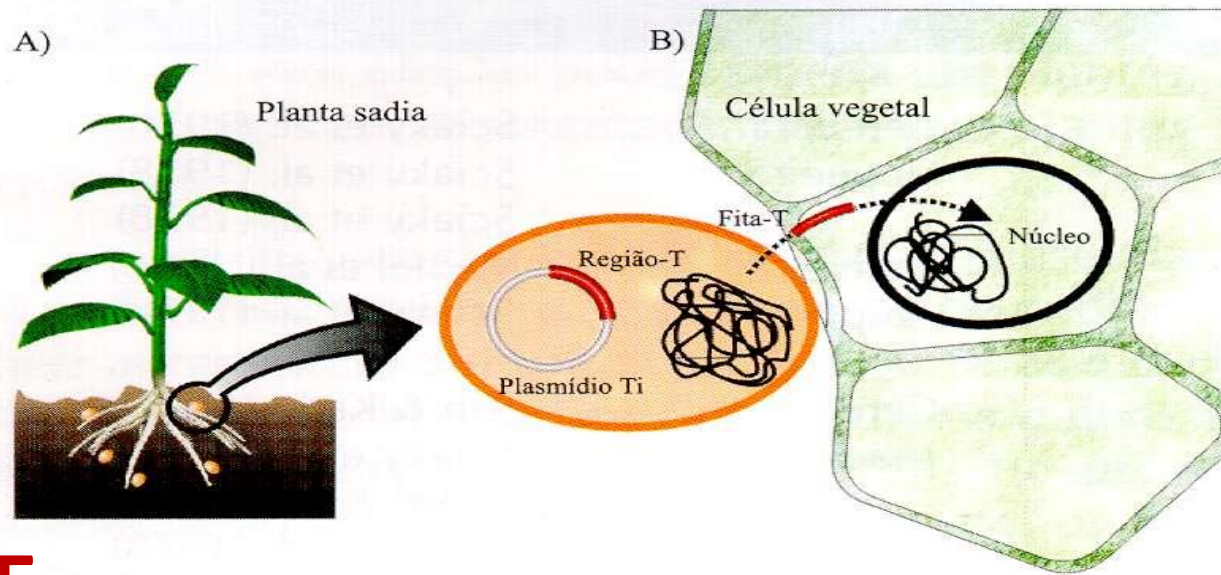
- Quanto mais a célula da planta se divide maior é a produção de opina e o nicho da agrobactéria se torna extremamente favorável;
- Somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar a opina produzida como fonte de energia, carbono e nitrogênio;

**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!!**

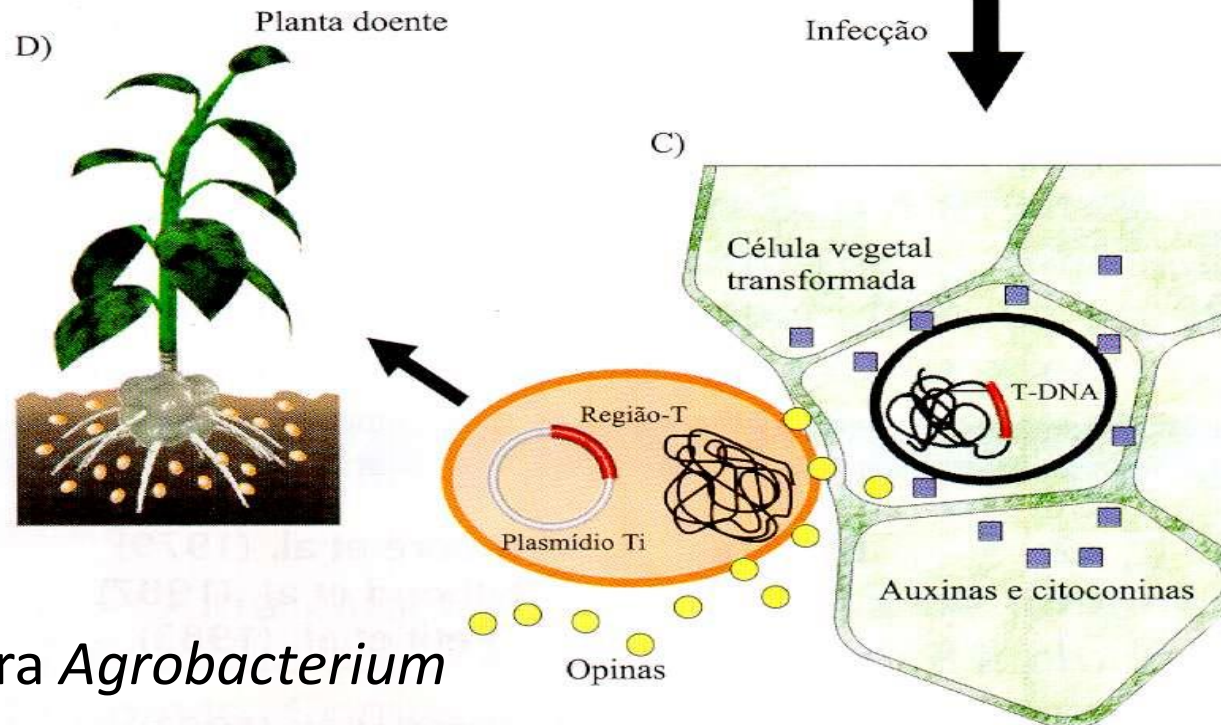
Agrobacterium

- 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**





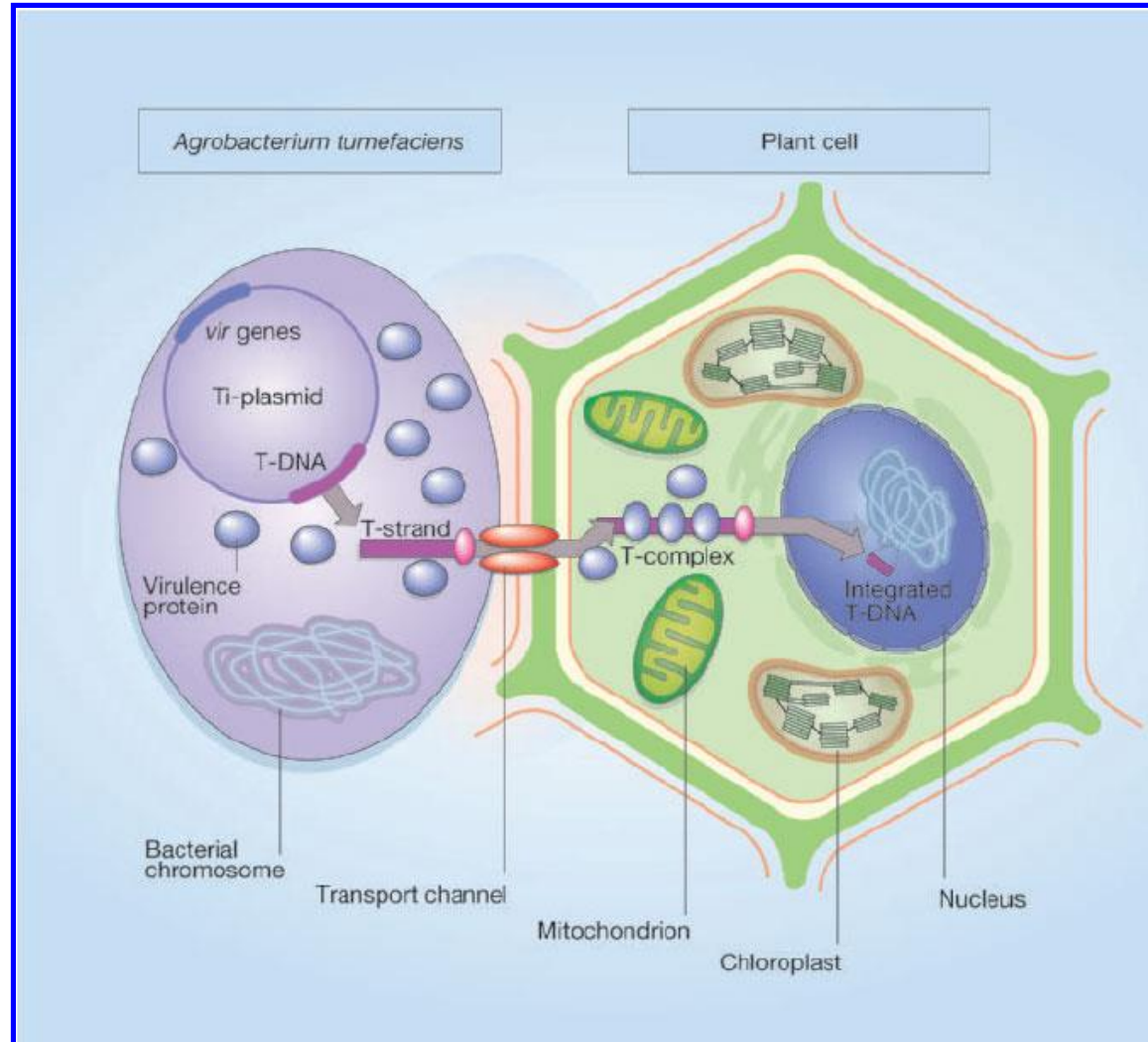
Infecção



PATOGENICIDADE NATURAL DE *A. tumefaciens*

Opinas: fonte de C e N para *Agrobacterium*

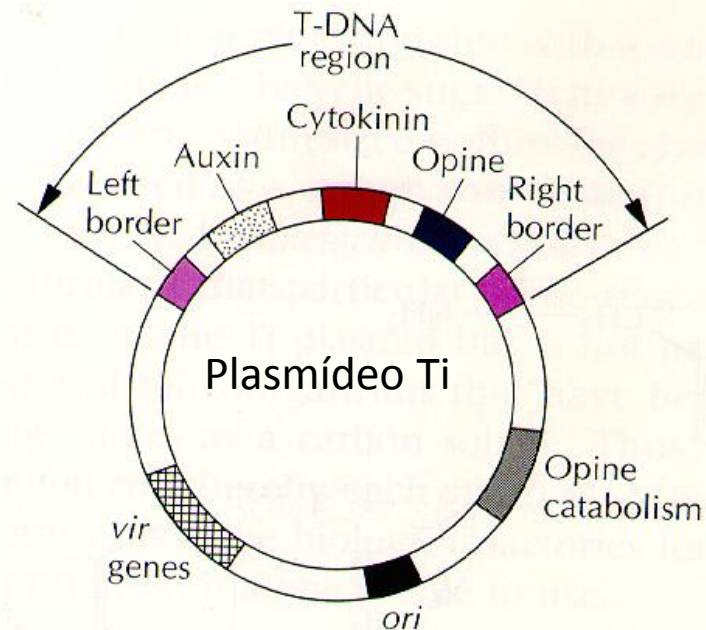
PATOGENICIDADE NATURAL DE *A.* *tumefaciens*



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*



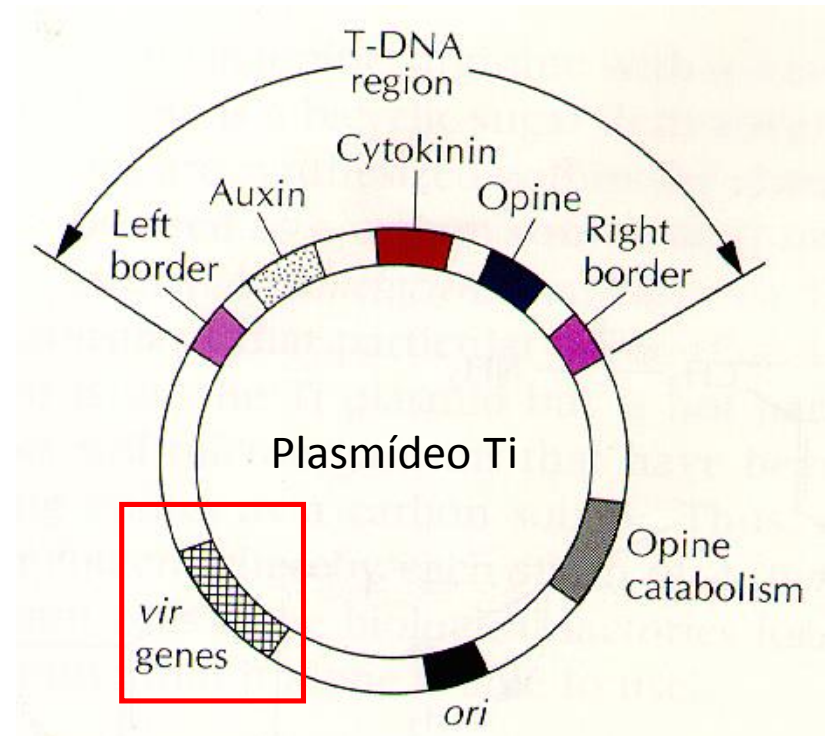
Agrobacterium

Região *vir*

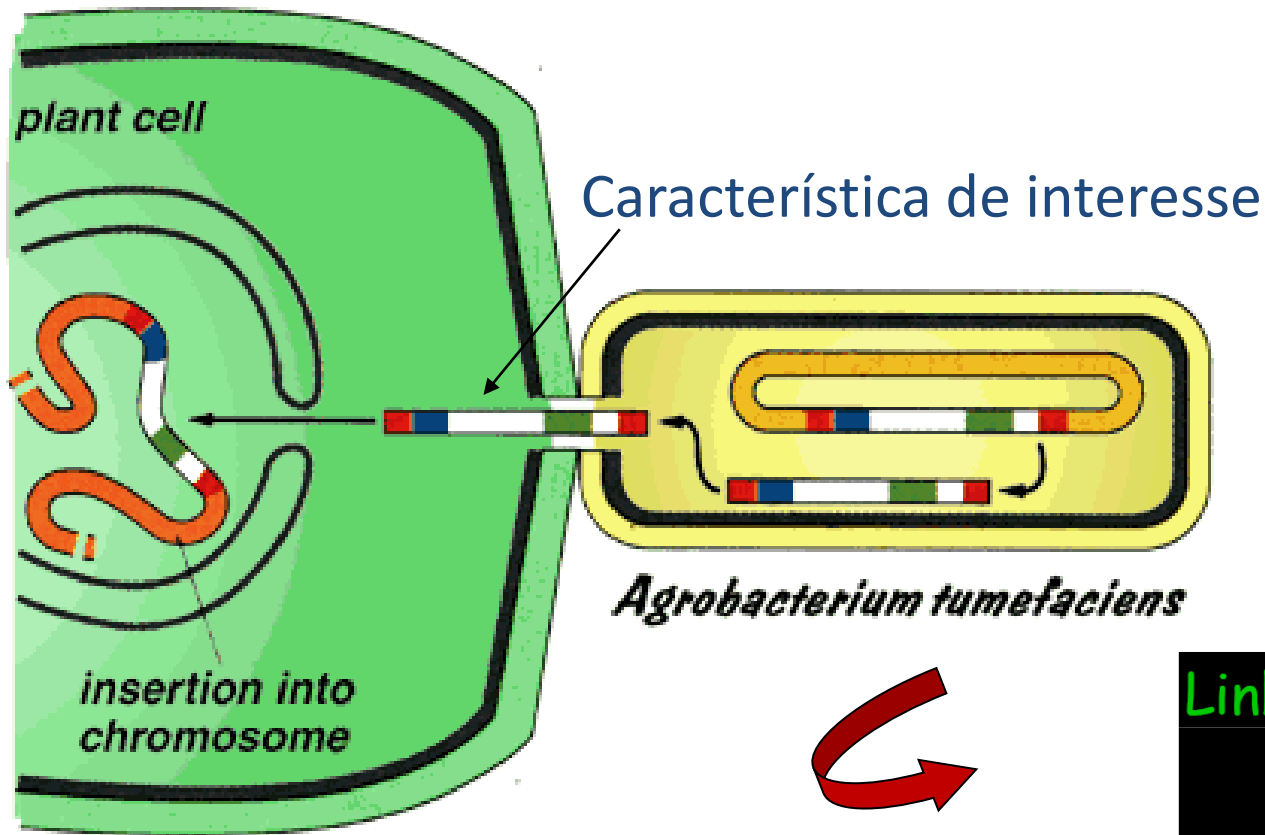
- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA

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

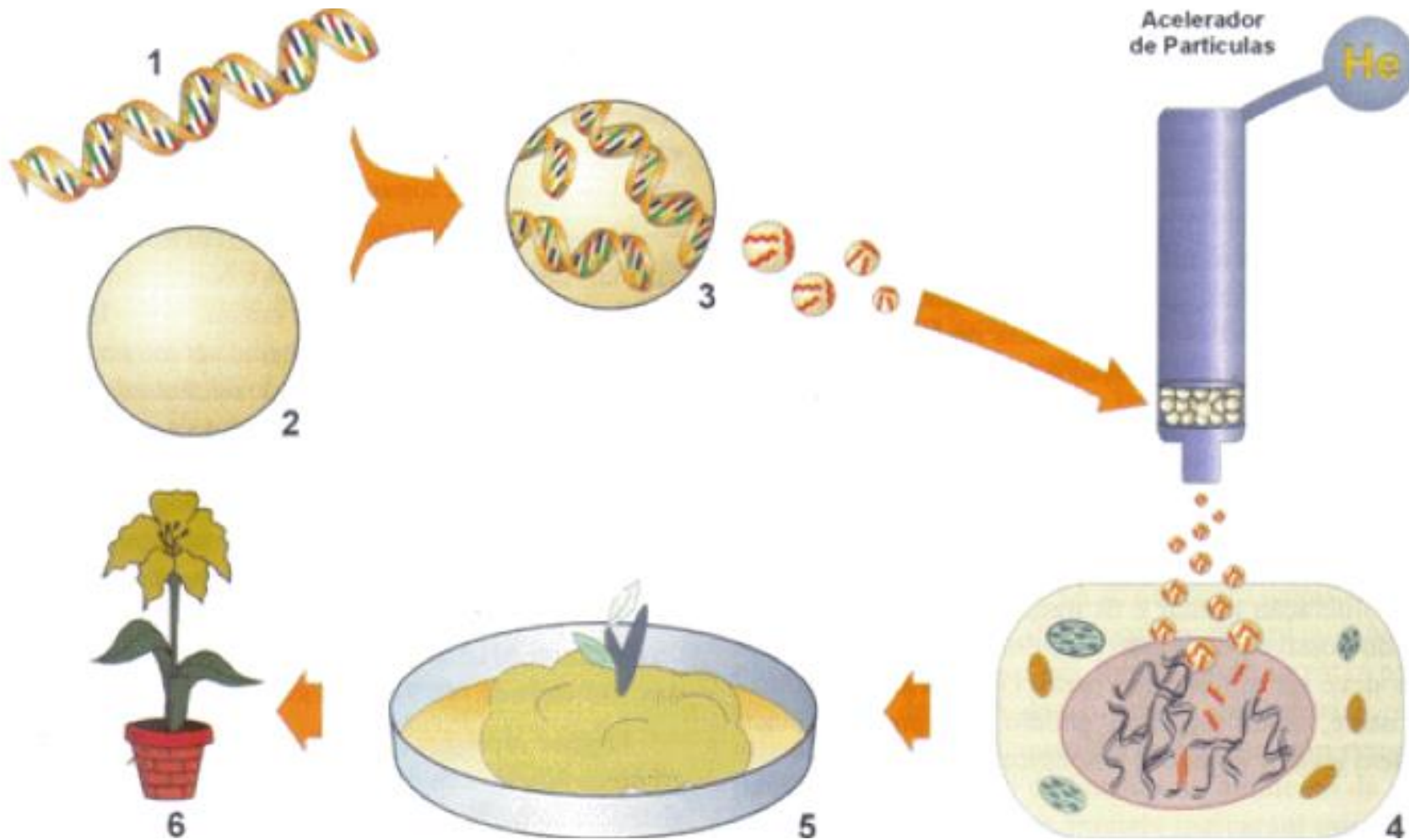


Transgene de interesse

Bordas 25pb T-DNA

Região vir funcional

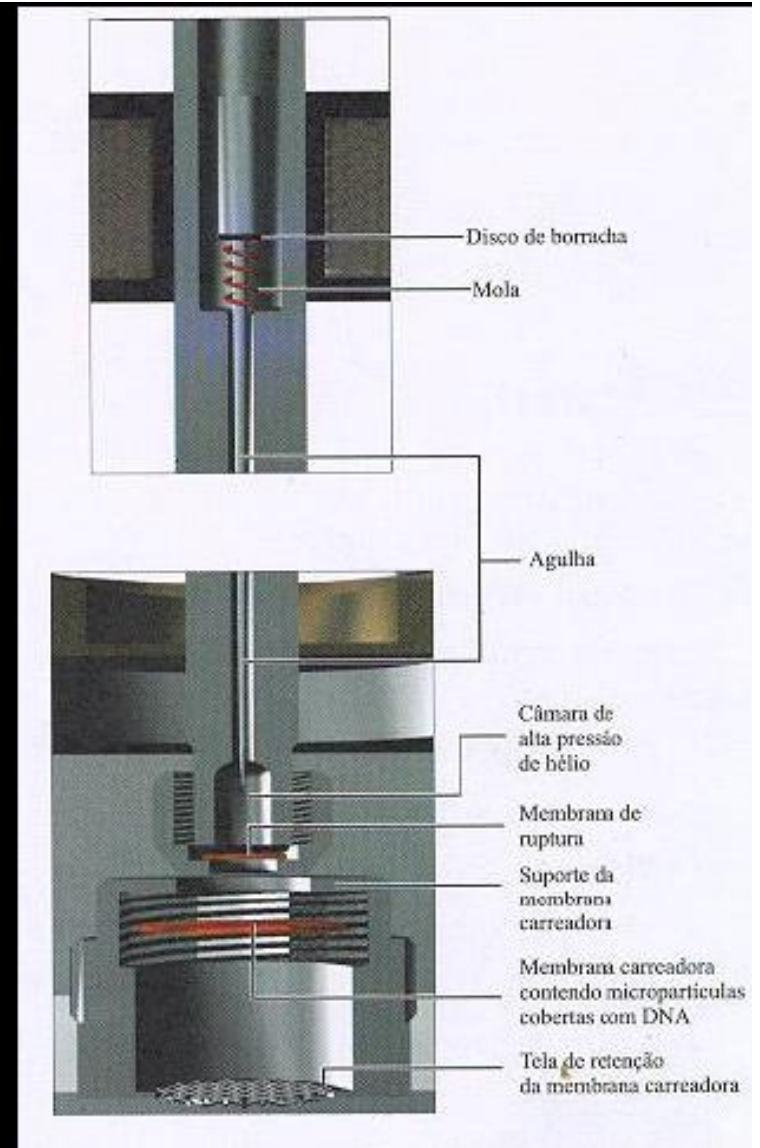
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



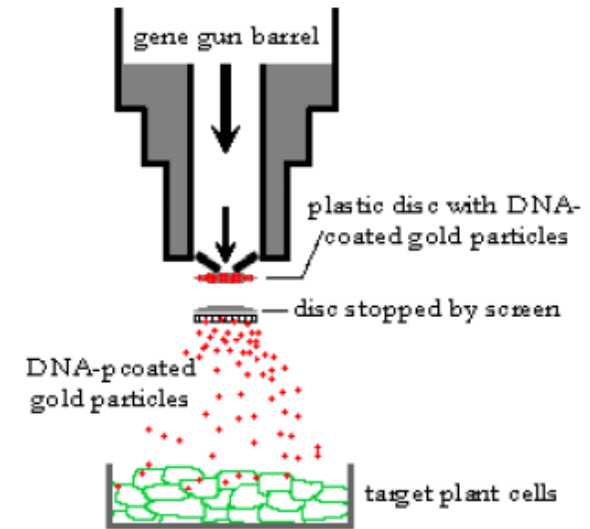
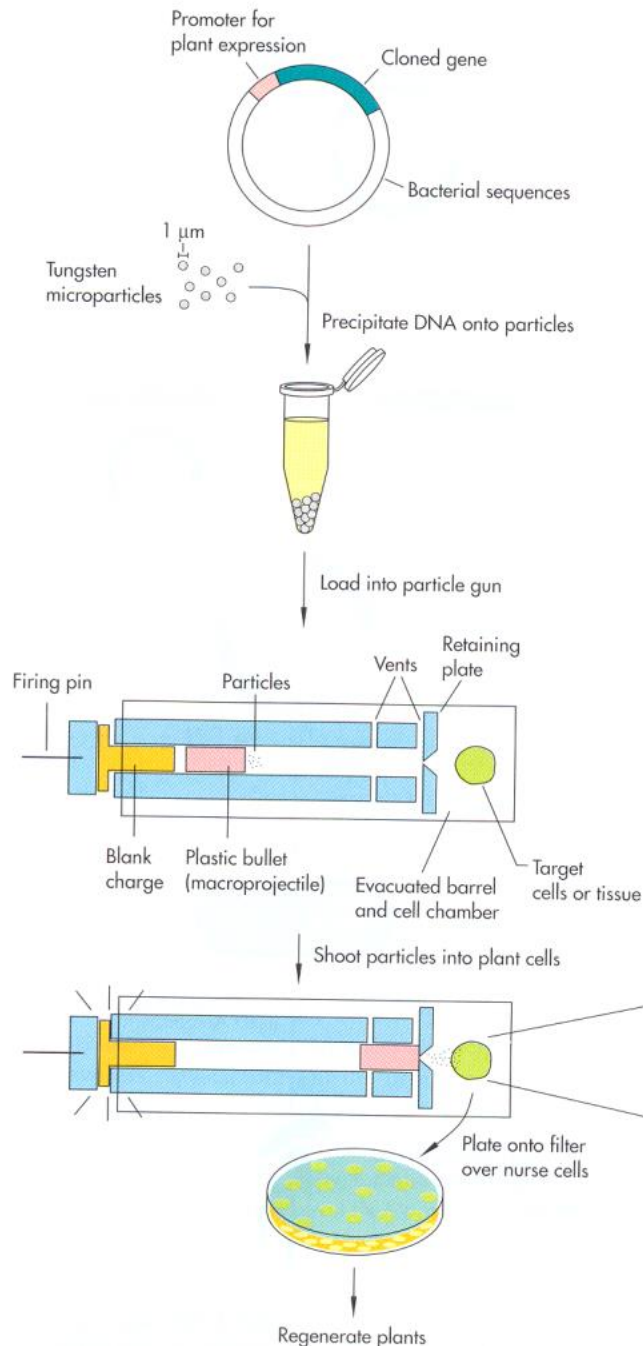
TRANSFORMAÇÃO VIA BIOBALÍSTICA



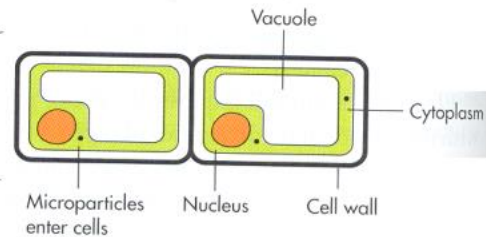
Bombardeador



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

Agrobacterium tumefaciens

Ti plasmid carrying desired genes



Cocultivation of *Agrobacterium* with plant pieces



DNA transferred to plant cells

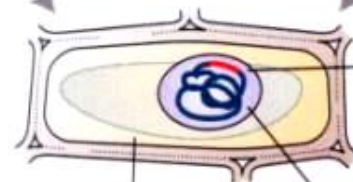
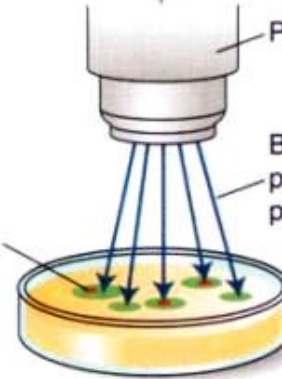
Particle gun method

Particles coated with DNA encoding desired genes



Particle gun

Bombardment of plant pieces with particles



Chromosomes with integrated DNA encoding desired genes

Plant cell

Nucleus



Cell multiplication (callus)



Shoot regeneration followed by root regeneration

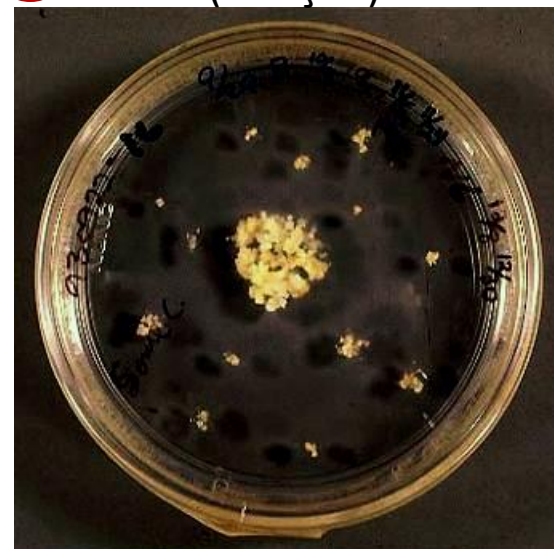


Plant with new trait

TRANSFORMAÇÃO – SELEÇÃO

Células em cultura
(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.



Ensaio resistência à herbicida
transgênico não-transgênico
Resistente Susceptível



TRANSFORMAÇÃO – SELEÇÃO E CONFIRMAÇÃO

Gene de seleção

Antibiótico:

Canamicina

Higromicina

Herbicida:

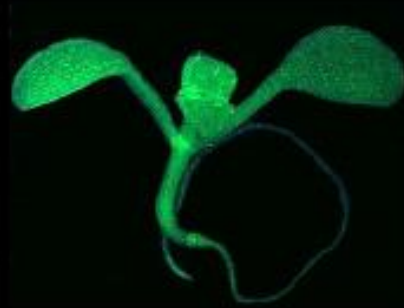
Glifosato

Genes repórteres:

GFP, mRFP, CFP, YFP, mCherry etc

GUS

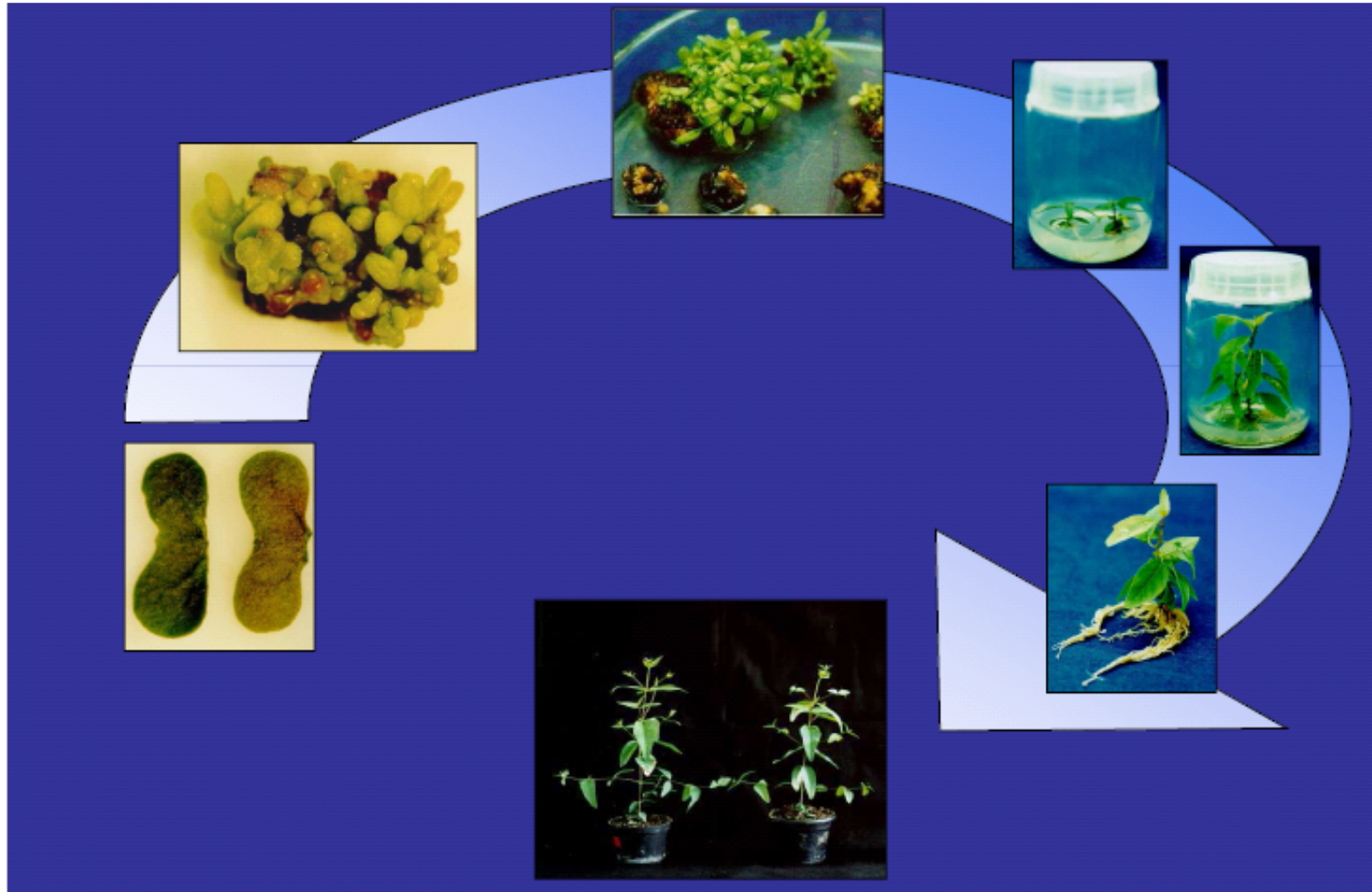
Luciferase



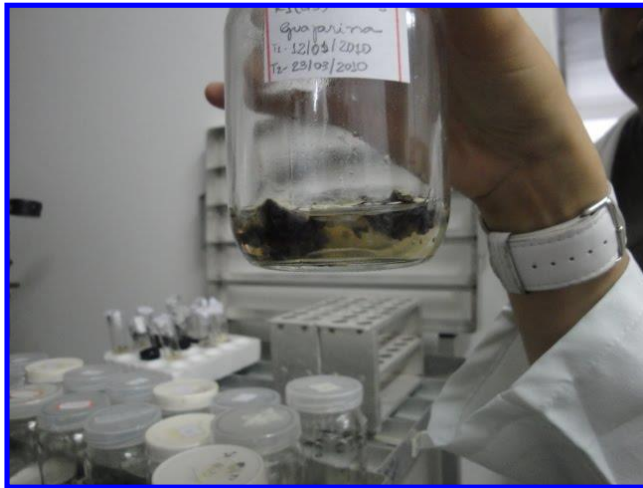
PRINCÍPIOS DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS



REGENERAÇÃO DEPENDE DO EXPLANTE...



ETAPAS NO LABORATÓRIO



Planta regenerada

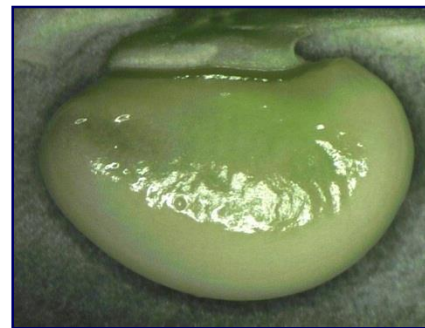


Germinação



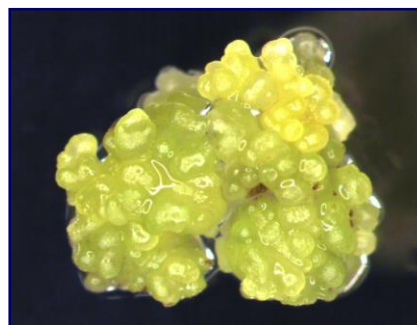
Cultura de tecidos de soja

Desenvolvimento

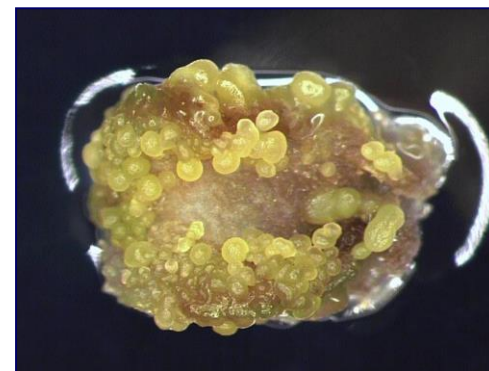


Sementes imaturas

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

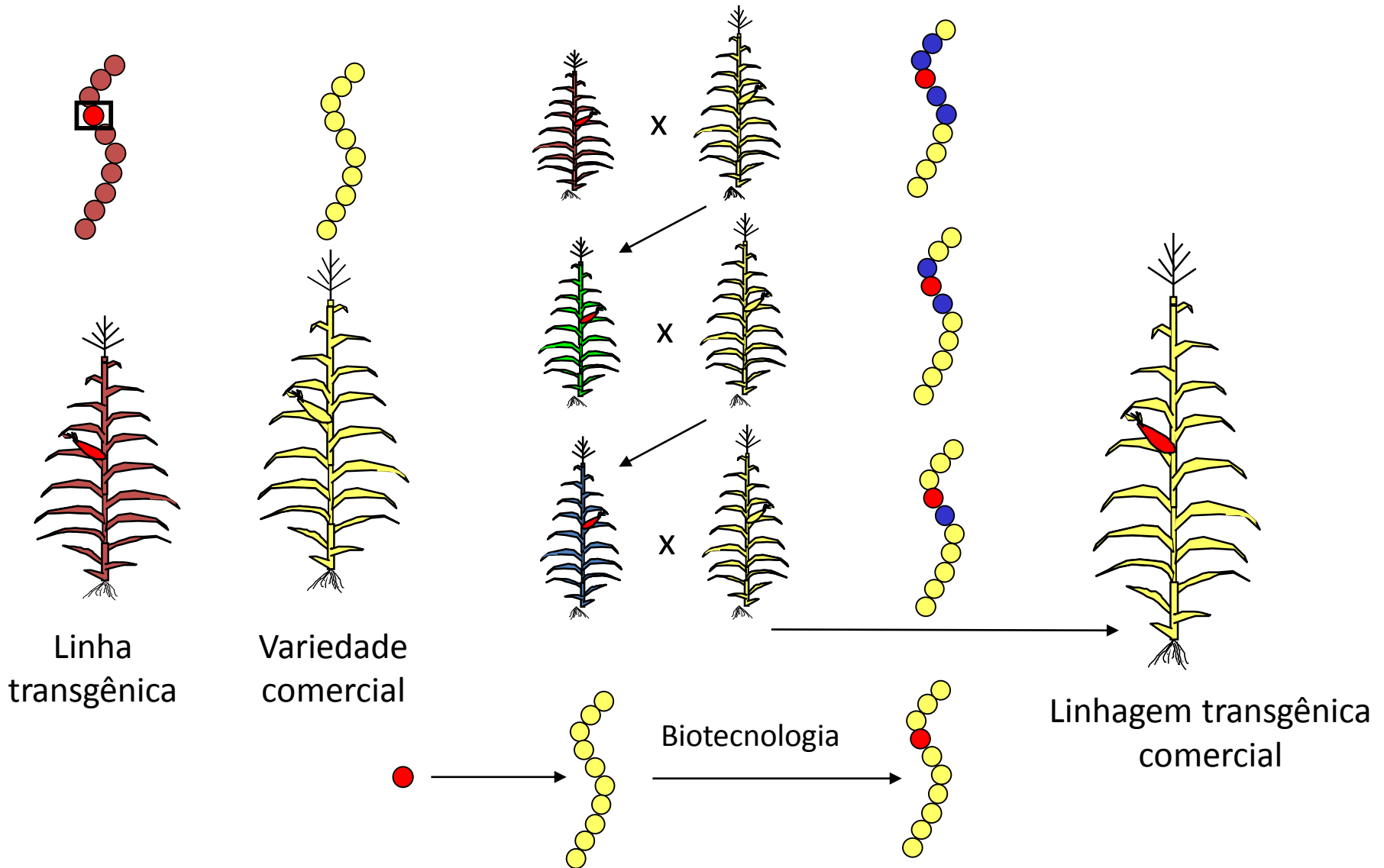
▽
Avaliação Final

▽
Variedade Comercial

S
E
L
E
Ç
Ã
O

CONSTRUÇÃO DA VARIEDADE TRANSGÊNICA

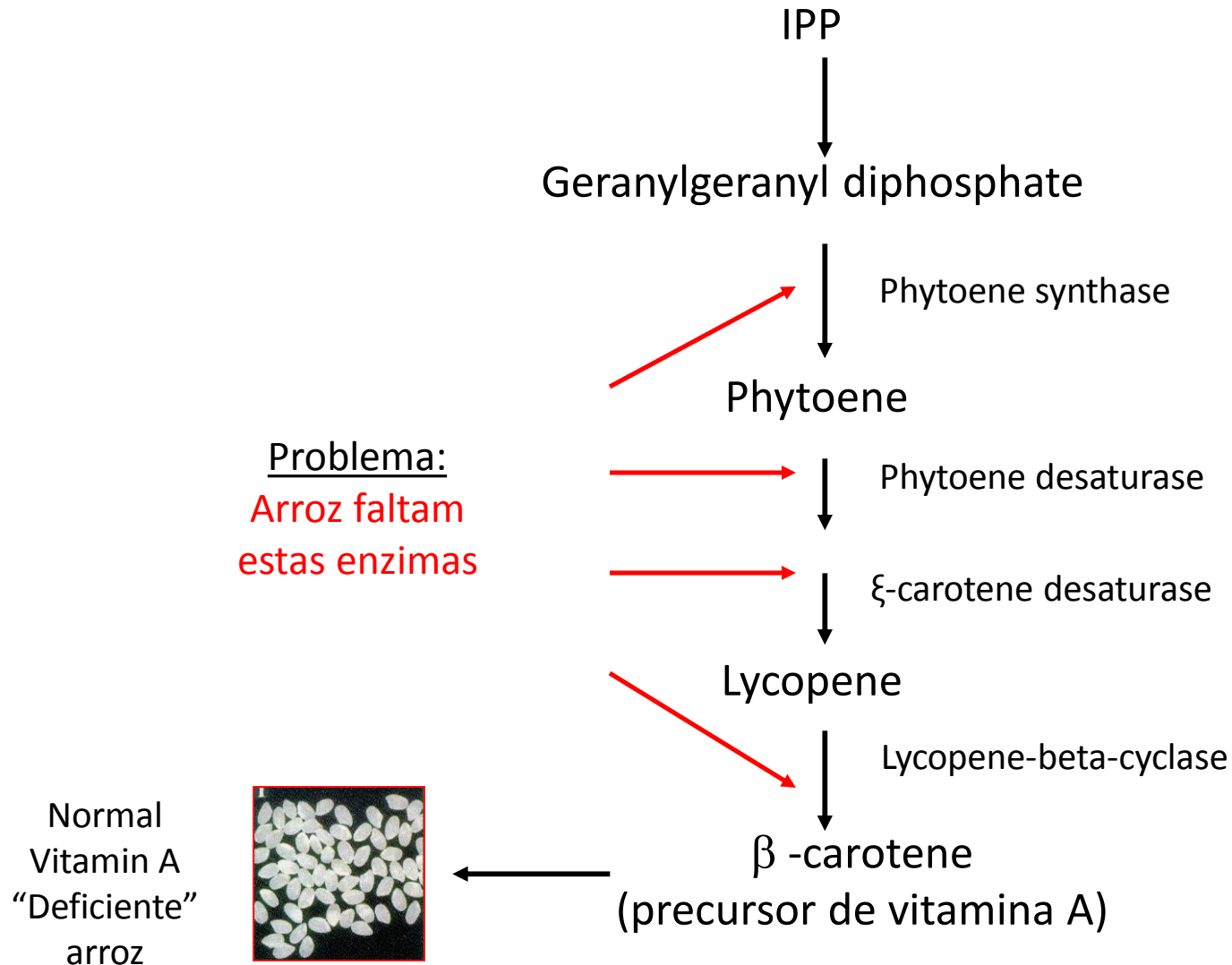
Retrocruzamento e seleção (6 - 8 gerações)



The Golden Rice Story

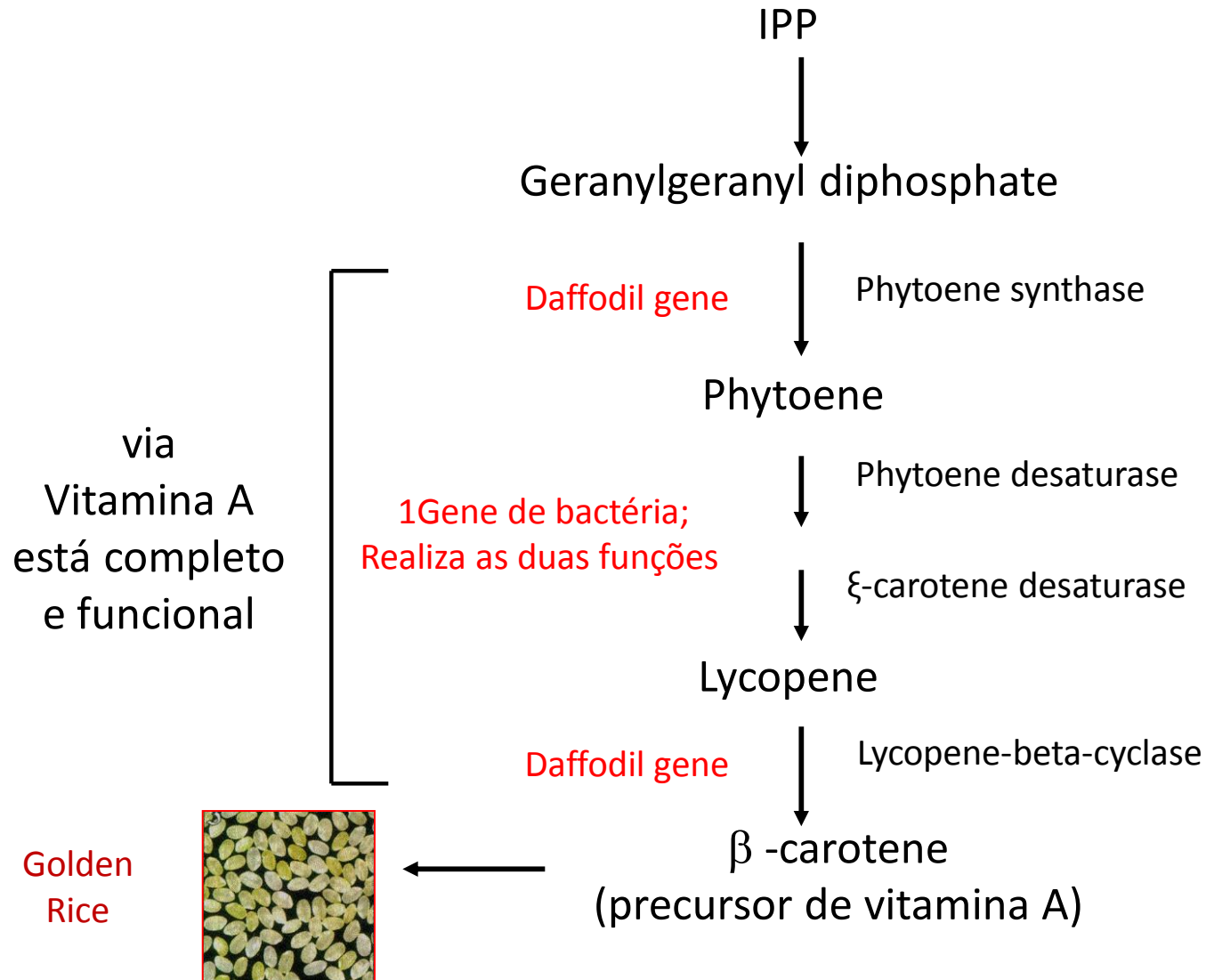
- Deficiência em vitamina A é um problema importante de saúde pública
 - Causa cegueira
 - Influencia na severidade de diarreias e sarampo
- >100 milhões de crianças tem este problema
- Para muitos países a infra-estrutura não existe para entregar pílulas de vitaminas
- Melhorar o conteúdo de vitamina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

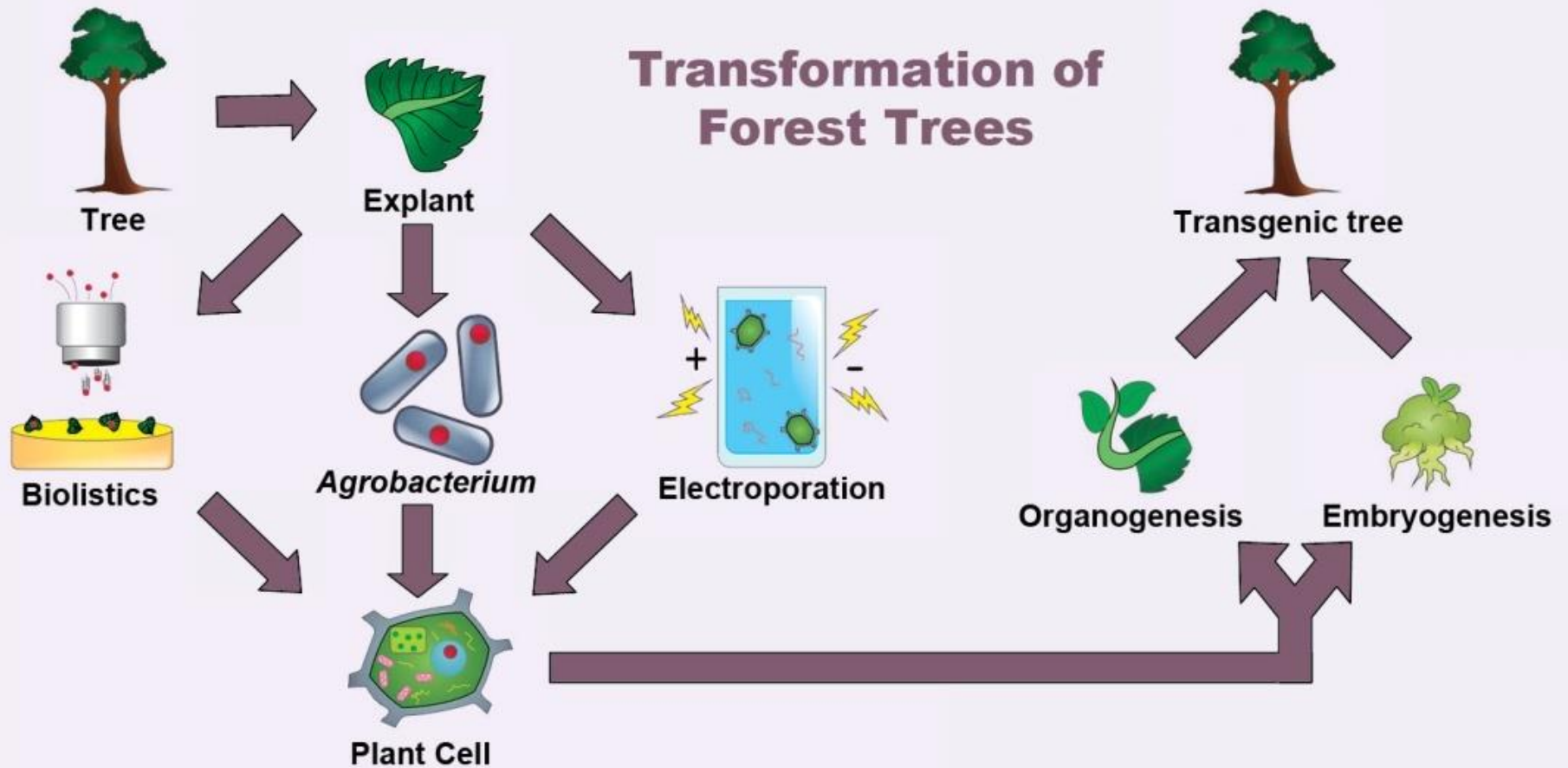
Aceitação do consumidor!!!

Milho RoundUp Ready



Antes

Depois



TRANSFORMAÇÃO DE ANIMAIS

Microinjeção

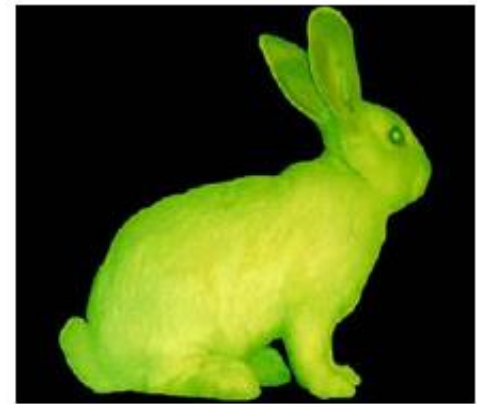
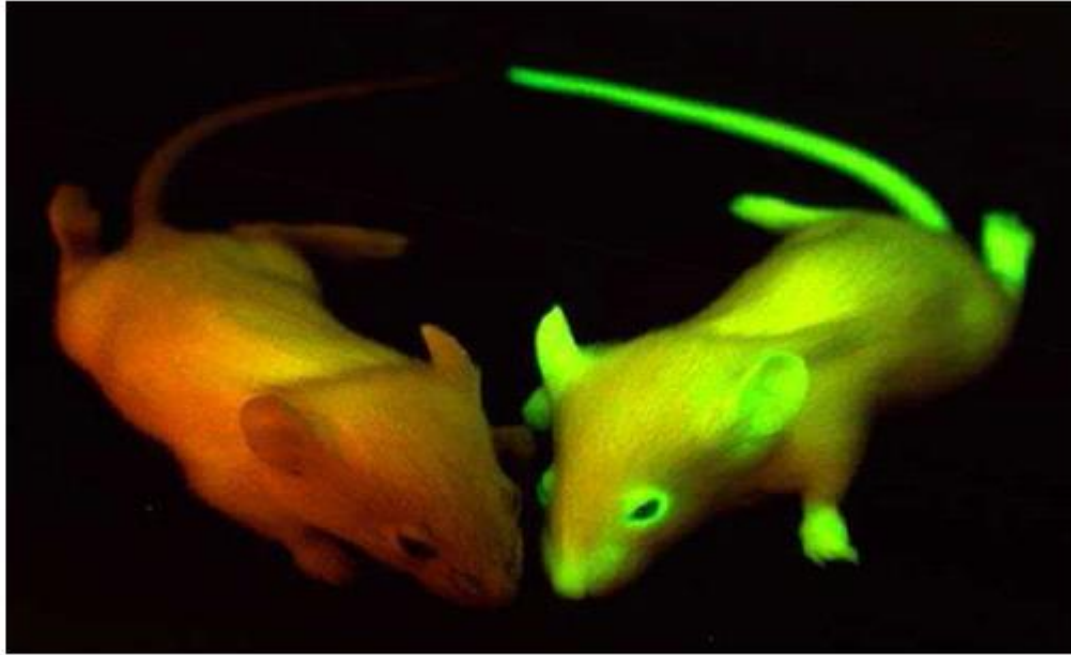
Por meio de agulhas microscópicas é injetado DNA no núcleo da célula alvo

- 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

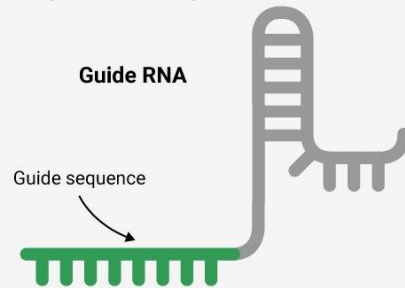


Carne “light”- ômega 3

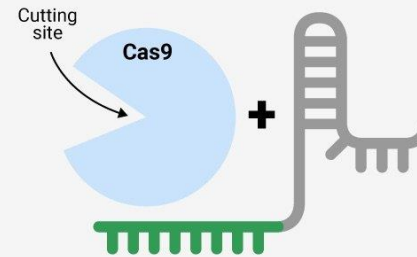
NOVAS TÉCNICAS VÊM SURGINDO!

EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

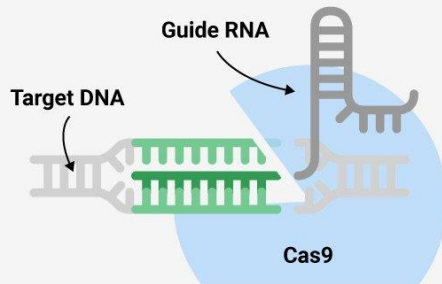
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA they want to modify.



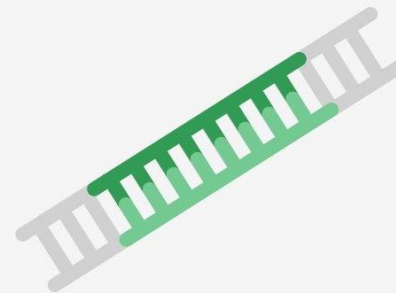
- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 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



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 >

UM DOS PRIMEIROS TRABALHOS...

A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2,†}
Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6‡} Emmanuelle Charpentier^{4‡}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems provide bacteria and archaea with adaptive immunity against viruses and plasmids by using CRISPR RNAs (crRNAs) to guide the silencing of invading nucleic acids. We show here that in a subset of these systems, the mature crRNA that is base-paired to trans-activating crRNA (tracrRNA) forms a two-RNA structure that directs the CRISPR-associated protein Cas9 to introduce double-stranded (ds) breaks in target DNA. At sites complementary to the crRNA-guide sequence, the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. The dual-tracrRNA:crRNA, when engineered as a single RNA chimera, also directs sequence-specific Cas9 dsDNA cleavage. Our study reveals a family of endonucleases that use dual-RNAs for site-specific DNA cleavage and highlights the potential to exploit the system for RNA-programmable genome editing.



NIH Public Access

Author Manuscript

Science. Author manuscript; available in PMC 2013 August 15.

Published in final edited form as:

Science. 2013 February 15; 339(6121): 823–826. doi:10.1126/science.1232033.

RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9

Prashant Mali^{1,5}, Luhan Yang^{1,3,5}, Kevin M. Esvelt², John Aach¹, Marc Guell¹, James E. DiCarlo⁴, Julie E. Norville¹, and George M. Church^{1,2,*}

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

³Biological and Biomedical Sciences Program, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁴Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, MA 02215, USA



HHS Public Access

Author manuscript

Science. Author manuscript; available in PMC 2013 October 11.

Published in final edited form as:

Science. 2013 February 15; 339(6121): 819–823. doi:10.1126/science.1231143.

Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems

Le Cong^{1,2,*}, F. Ann Ran^{1,4,*}, David Cox^{1,3}, Shuailiang Lin^{1,5}, Robert Barretto⁶, Naomi Habib¹, Patrick D. Hsu^{1,4}, Xuebing Wu⁷, Wenyan Jiang⁸, Luciano A. Marraffini⁸, and Feng Zhang^{1,†}

BIOTECHNOLOGY

Bitter fight over CRISPR patent heats up

Unusual battle among academic institutions holds key to gene-editing tool's future use.

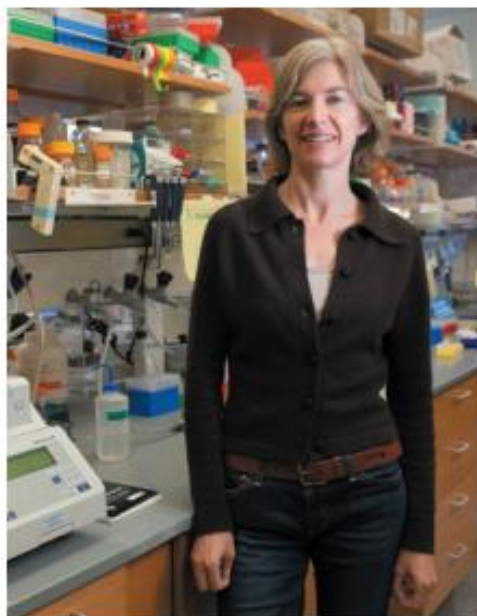
BY HEIDI LEDFORD

A versatile technique for editing genomes has been called the biggest biotechnology advance since the polymerase chain reaction (PCR), and the US Patent and Trademark Office (USPTO) is set to determine who will reap the rewards.

On 11 January, the USPTO granted a request to review a key patent awarded for the technique, known as CRISPR-Cas9. The outcome of the ensuing proceedings, called a patent interference, could be worth millions to the research institutions that are at war over the relevant patents. It might also influence who is allowed to use the technology — and under what terms.

"This is an absolutely humungous biotech patent dispute," says legal scholar Jacob Sherkow of New York Law School. "We're all waiting with bated breath."

CRISPR-Cas9 is a bacterial defence system that uses the enzyme Cas9 to snip DNA at



Jennifer Doudna of the University of California, Berkeley, helped to develop the CRISPR system.

institutions usually come to an agreement to share rights to the invention. "This seems more bitter than disputes I've heard of in the past," she adds.

The two patents in question make broad claims to 'foundational' intellectual property thought to be necessary for most lucrative CRISPR-Cas9 applications. But many patents have been filed on CRISPR-Cas9 technologies, and there is still the chance that the winner of the interference will face additional challenges in court. Zhang's group has also reported another enzyme, called Cpf1, that functions much like Cas9. Researchers expect other alternatives to emerge with time.

LICENSING LOOMS

For now, it is unclear how the dispute will affect researchers who use CRISPR-Cas9, if it does so at all. "Patent holders might send out a few cease-and-desist letters, but they probably won't sue academic researchers," says Rodney Sparks, a biotechnology-patent



FEB 21, 2017 @ 05:00 AM

15,210



EDITOR'S PICK

2 Free Issues of Forbes

How Much Is a CRISPR Patent License Worth?



Jacob S. Sherkow, CONTRIBUTOR

[FULL BIO](#) ▾

Opinions expressed by Forbes Contributors are their own.

Last Wednesday, the Patent Trial and Appeal Board (PTAB) ruled in favor of the Broad Institute in the most monumental biotech patent dispute in decades: a patent "interference" trial over foundational patents covering CRISPR-Cas9, a revolutionary gene-editing technology. A day later—in some truly fortuitous timing—Jorge Contreras of the University of Utah and I published an article in *Science* examining some of the licensing complexities surrounding research institutions' surrogate companies: for-profit biotech companies with exclusive



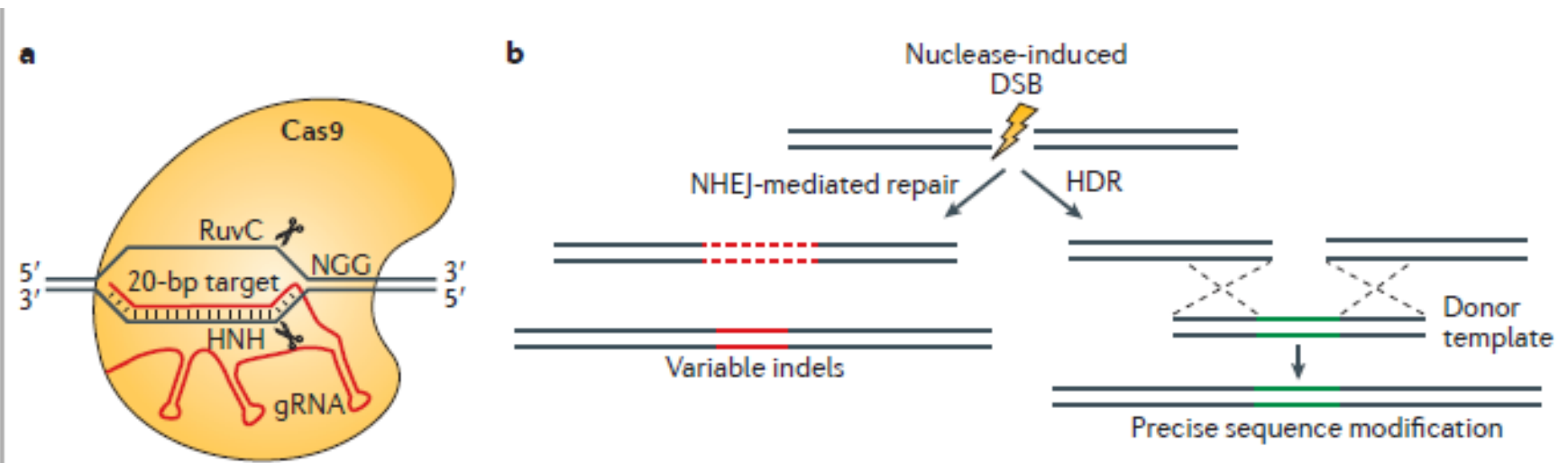
CRISPR patent agreement seeks to expand use in crops

By SHARON BEGLEY @sxbegle / OCTOBER 18, 2017



<https://www.statnews.com/2017/10/18/crispr-patent-expand-crops/>

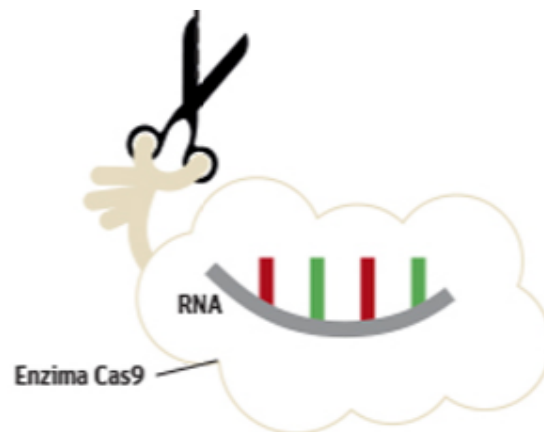
O PRINCIPIO POR TRÁS DA TÉCNICA...





EDIÇÃO GENÔMICA

Conheça a técnica que permite fazer mudanças precisas no DNA



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

Decisão da CTNBio sobre organismo produzido por Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão é um marco para a biotecnologia industrial brasileira



<http://www.abbi.org.br/pt/noticia/decisao-da-ctnbio-sobre-tecnicas-inovadoras-de-melhoramento-de-precisao-e-um-marco-para-biotecnologia-industrial-brasileira/>

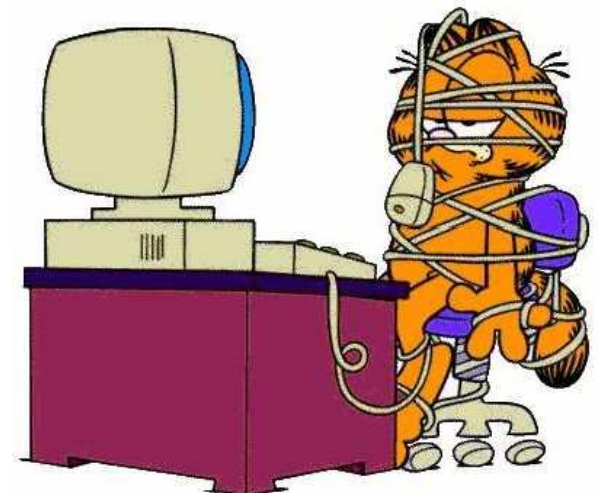
VISUALIZANDO O PROCESSO...

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

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

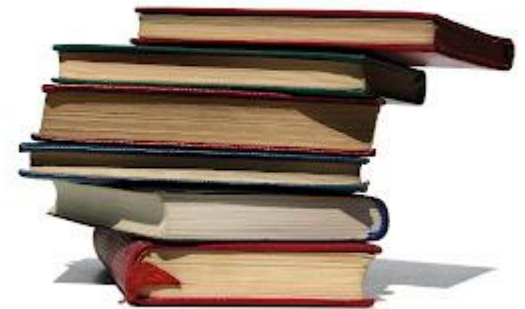
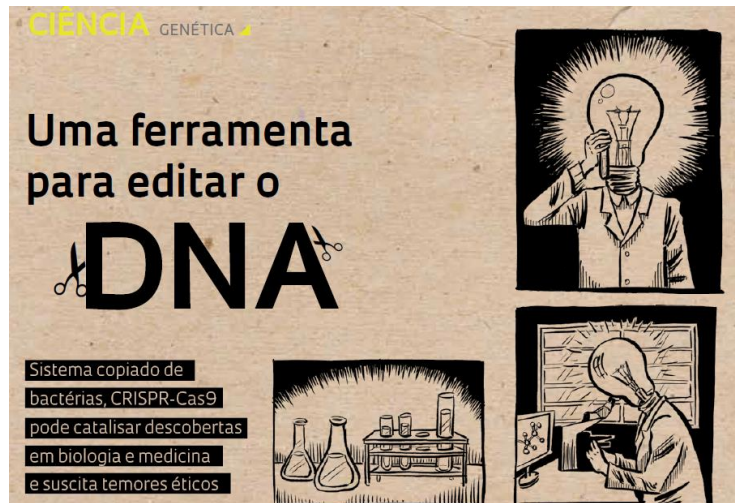
<https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>

https://www.ted.com/talks/jennifer_doudna_we_can_now_edit_our_dna_but_let_s_do_it_wisely



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

