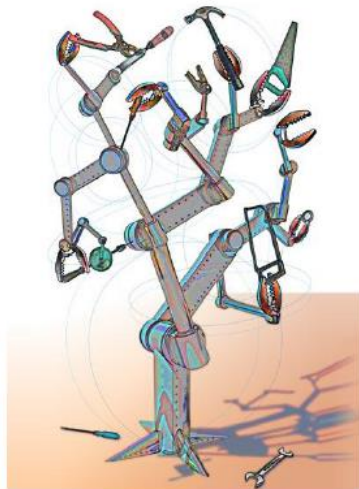


LGN0232 - Genética Molecular

# Genética Molecular Aplicada no Melhoramento de Microrganismos e Biologia Sintética



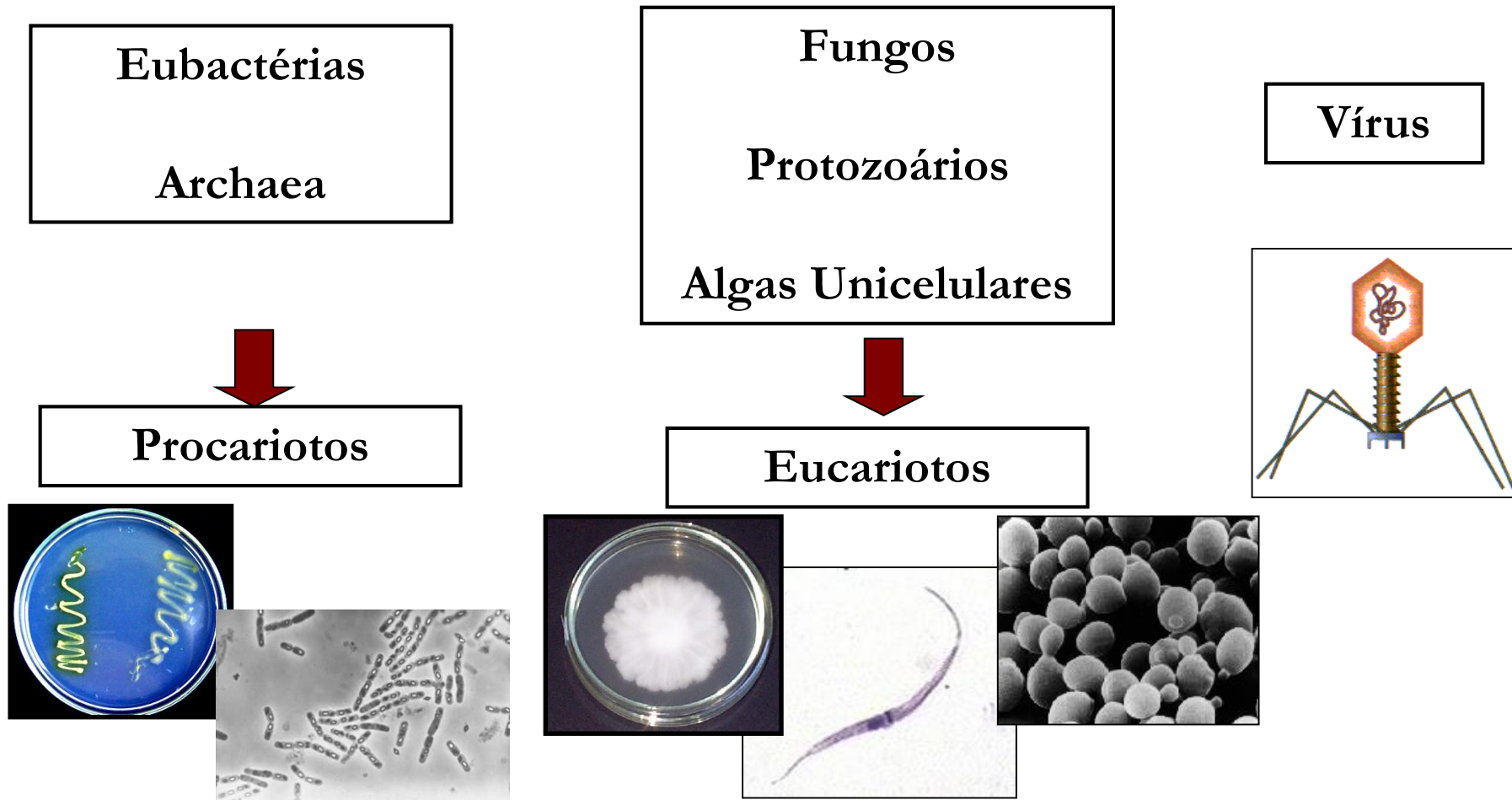
Antonio Figueira

CENA

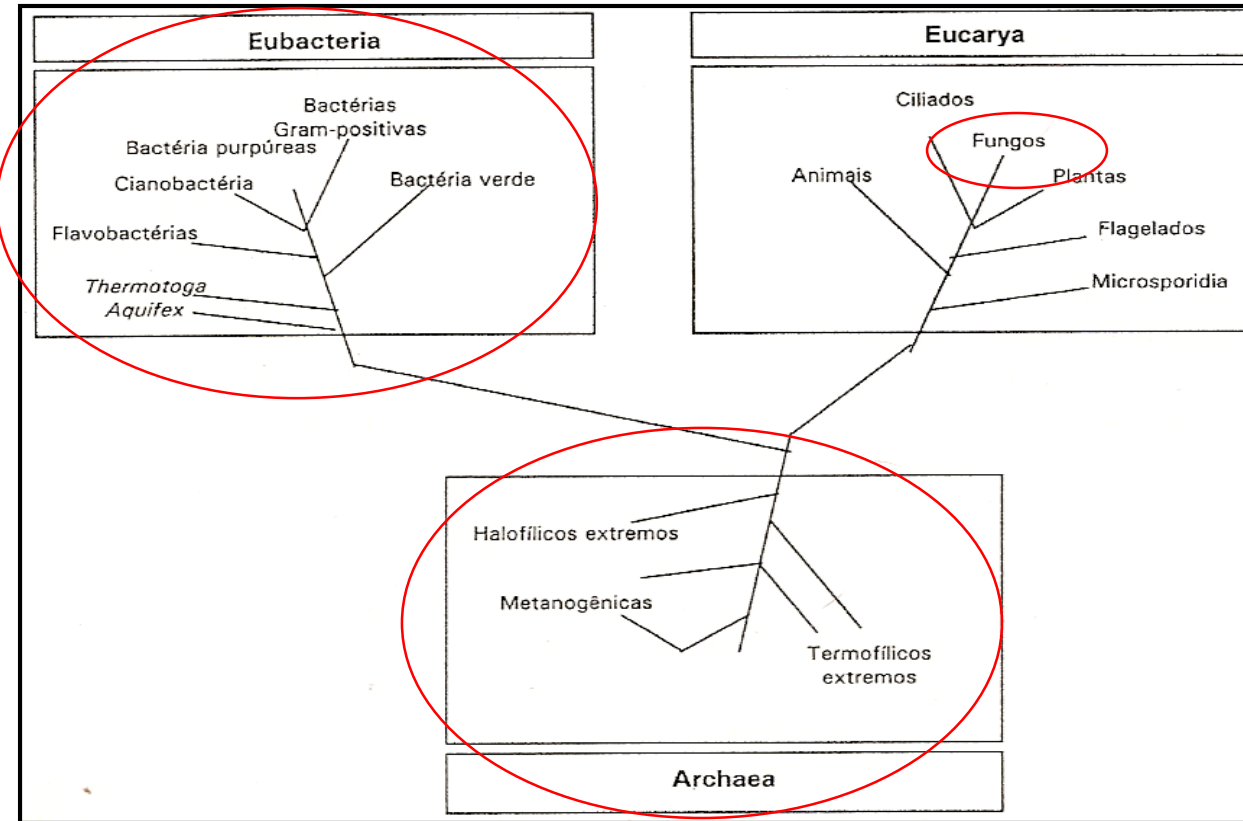
[figueira@cena.usp.br](mailto:figueira@cena.usp.br)

# Microorganismos

- Quem são?



# Três Domínios da Vida



Árvore filogenética derivada das sequências do RNA ribossômico (adaptado de Carl Woese). Fonte: Melo et al. (2002)

# Diversidade Microbiana

- Onde eles podem ser encontrados???

em quase  
todos os  
habitats da  
Terra



T<sup>o</sup> elevadas (+110°C)  
T<sup>o</sup> muito baixas  
ambientes hipersalinos  
ambientes ácidos

Alta variação na atividade  
metabólica

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
- aminoácidos
- etanol
- ácido cítrico
- 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 Microrganismos Geneticamente modificados!



# Vantagens dos Microrganismos

Melhoramento de Microrganismos

*Vs.*

Melhoramento de Plantas

**Complexidade**

**Superespecialização**

**Sazonalidade**

**E o controle ambiental ?**

# Melhoramento Genético

- Melhoramento envolve três processos básicos:

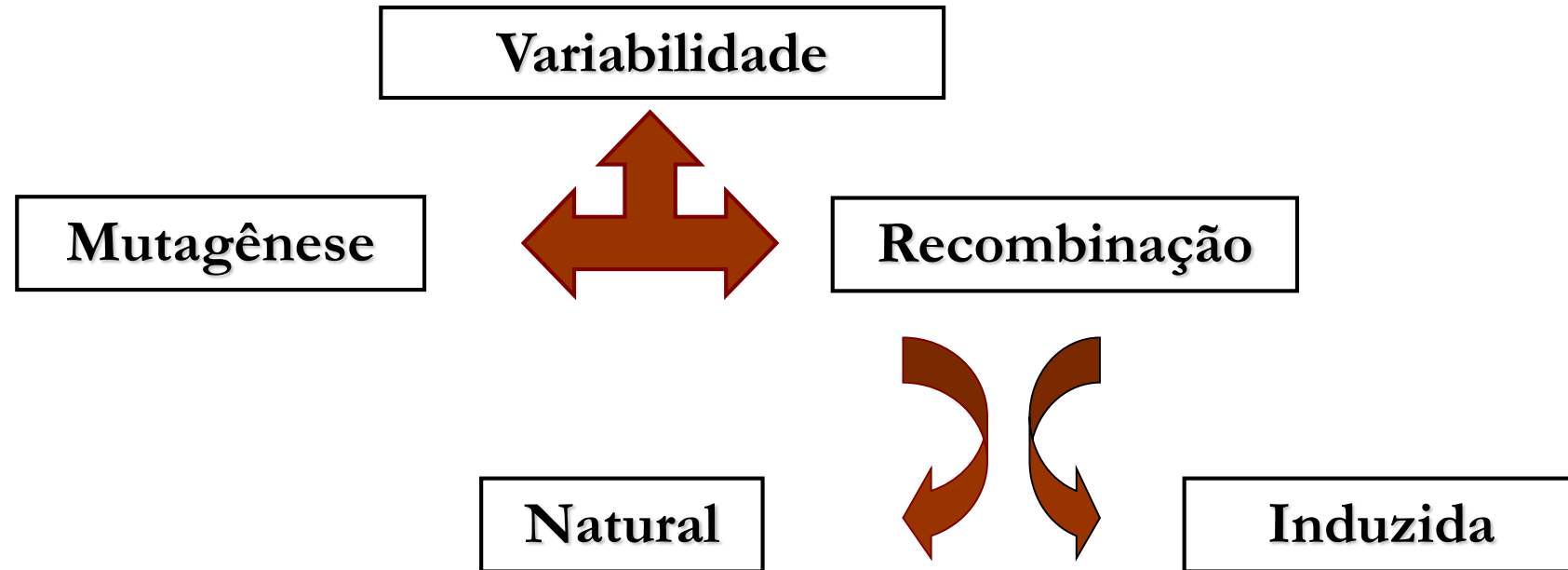
Geração de variantes (variabilidade)

Seleção daqueles com propriedades desejadas

Reunião, num único indivíduo, das melhores características desejadas (permuta e trocas genéticas)

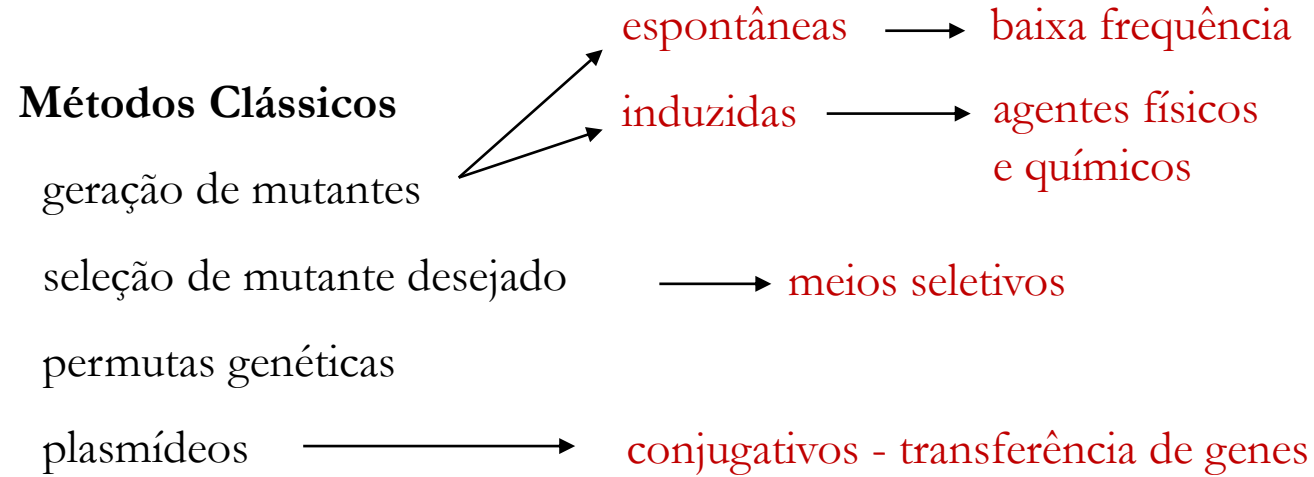
Técnicas Clássicas x Técnicas Modernas (TDR)

# 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



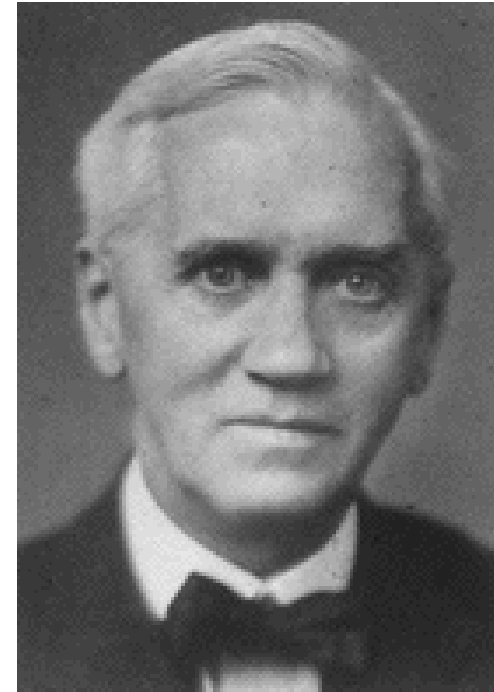
# Aplicações



## *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

550  $\mu\text{g mL}^{-1}$

↓ 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

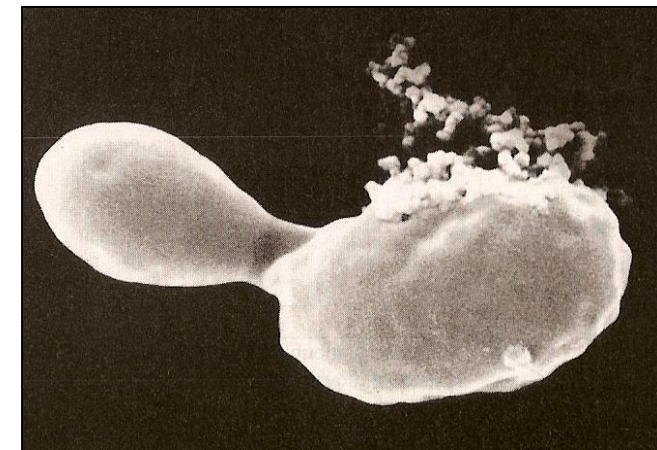
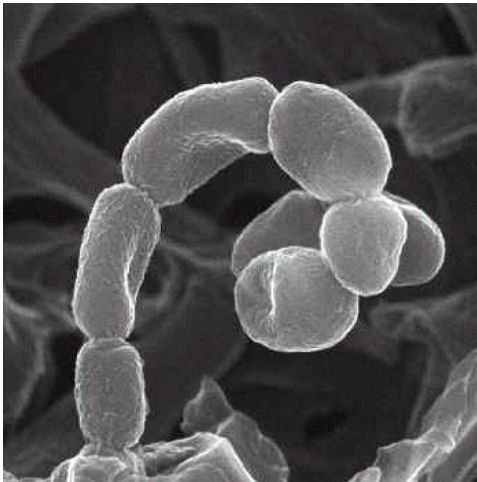
50 000  $\mu\text{g mL}^{-1}$



# 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. glaucesens</i>	Tetracenomicina
<i>S. griseus</i>	Estreptomina
<i>S. hygrosopicus</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 ácido 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

• Fabricação de plásticos, materiais

*S. cerevisiae* - produção compostos heterólogos

Vacina hepatite B

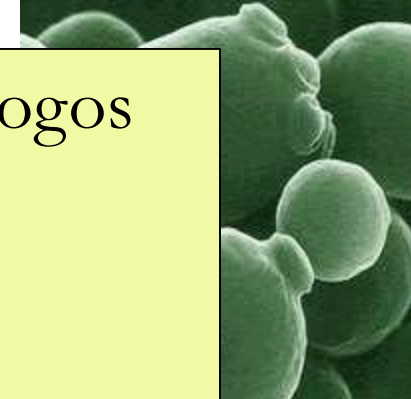
Interferon humano

Fator de crescimento epidermal humano

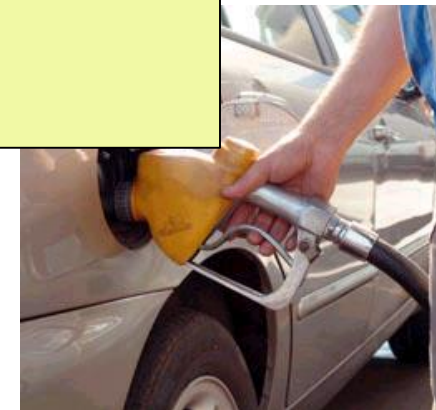
Inibidor de trombina - hirudina

Hormônio da paratireóide

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



*visiae*



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

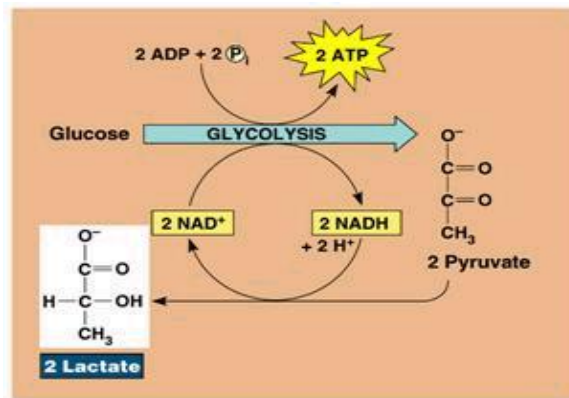


<http://www.abbi.org.br/pt/noticia/decisao-da-ctnbio-sobre-tecnicas-inovadoras-de-melhoramento-de-precisao-e-um-marco-para-biotecnologia-industrial-brasileira/>

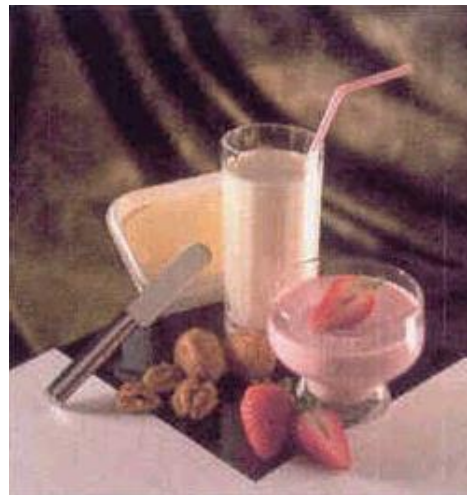
<http://www.globalyeast.com/>

# Produção de Laticínios 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 de 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*



# Biofertilizantes

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



*Rhizobium sp.*

# Metagênômica

Obtenção do gene catabolizador de naftaleno,  
utilizado na biorremediação.

Appl Microbiol Biotechnol

DOI 10.1007/s00253-006-0671-4

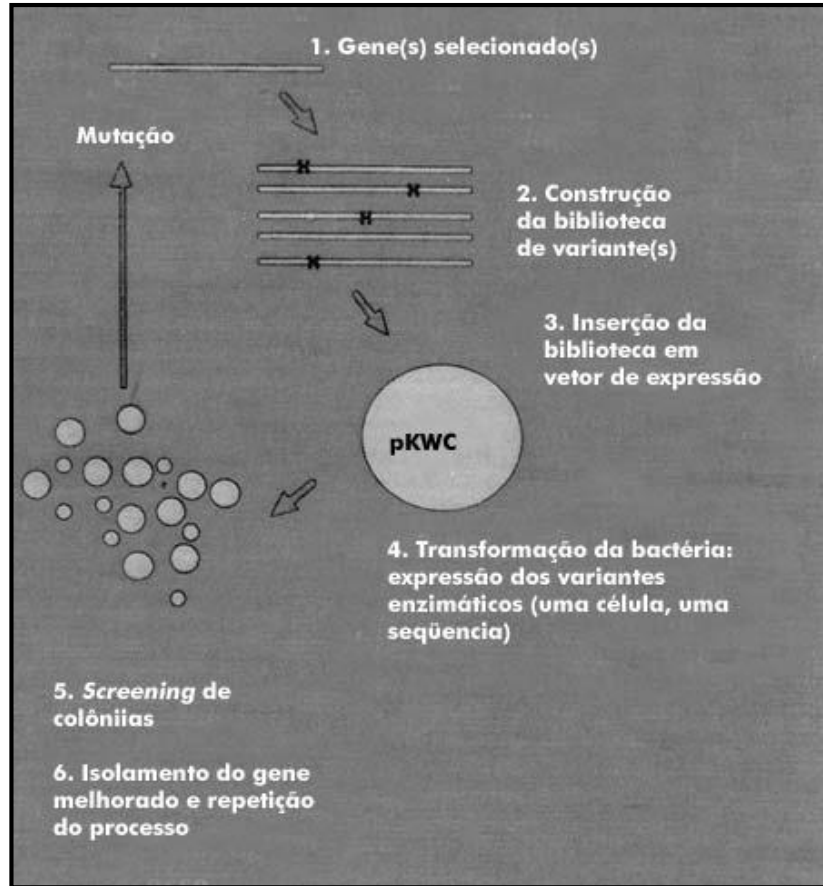
ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

**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 •

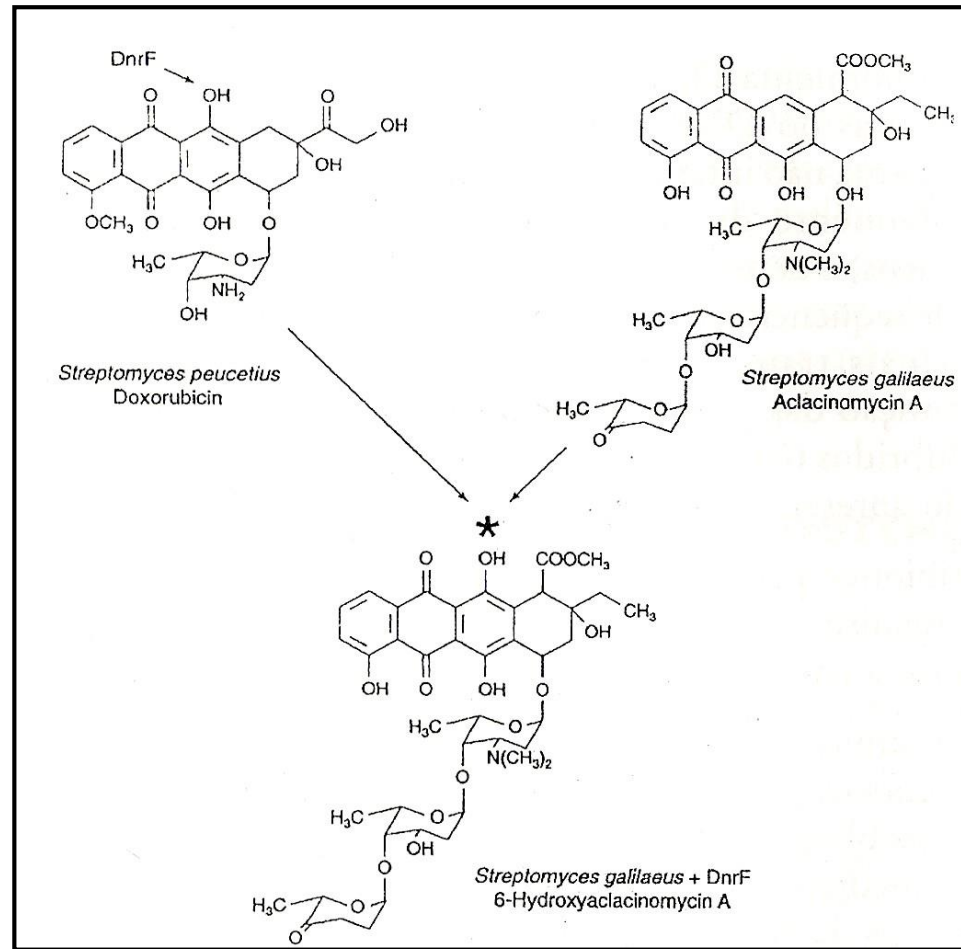
Yoshiyuki Ohtsubo • Yuji Nagata • Masataka Tsuda

# Evolução Dirigida



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

# Produção de Antibióticos Híbridos



# **PERSPECTIVAS**

# Super-microorganism



 [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 da Biologia Sintética

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...

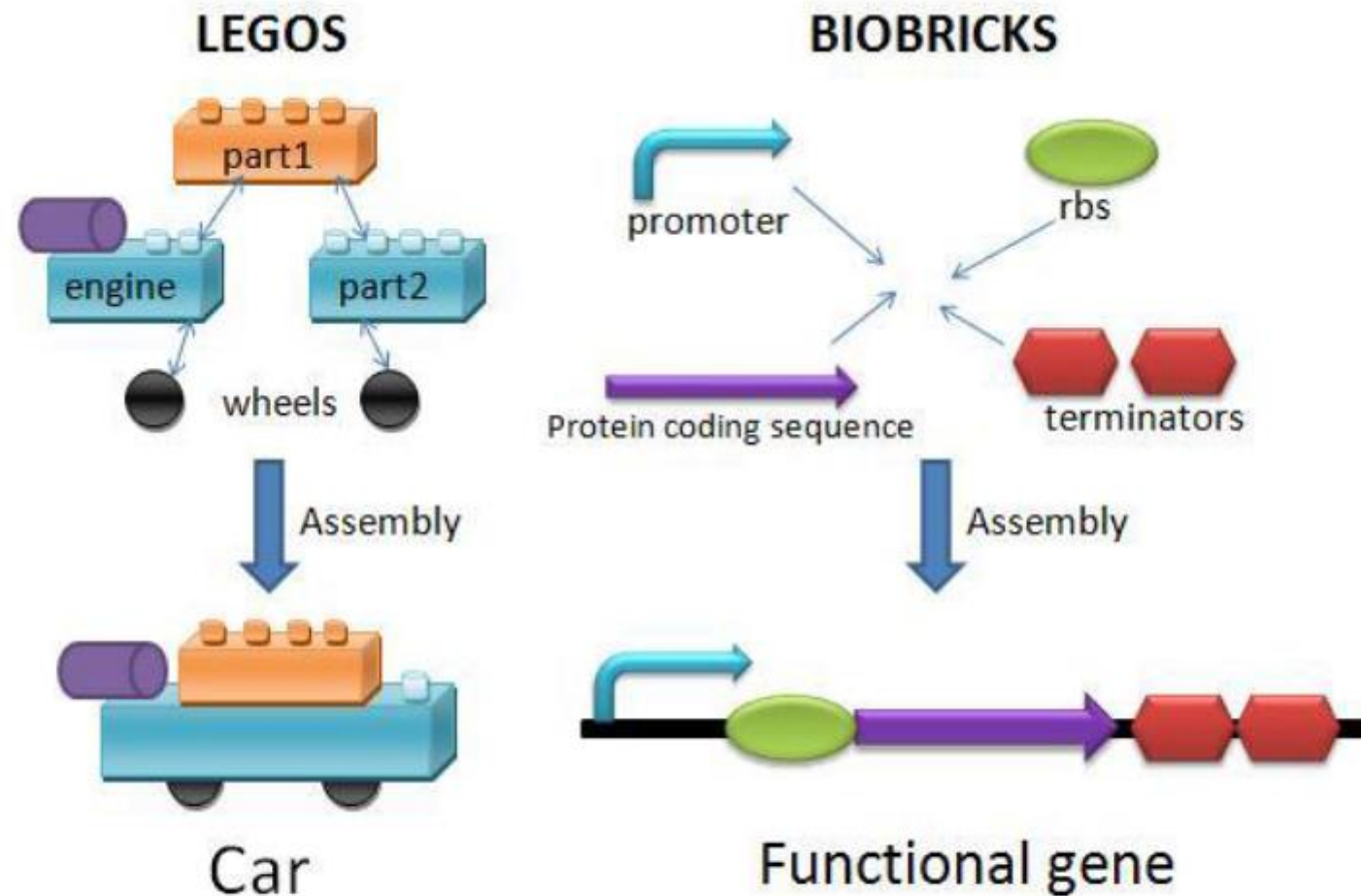


Figure1: Comparison between the concept of Legos and Biobricks

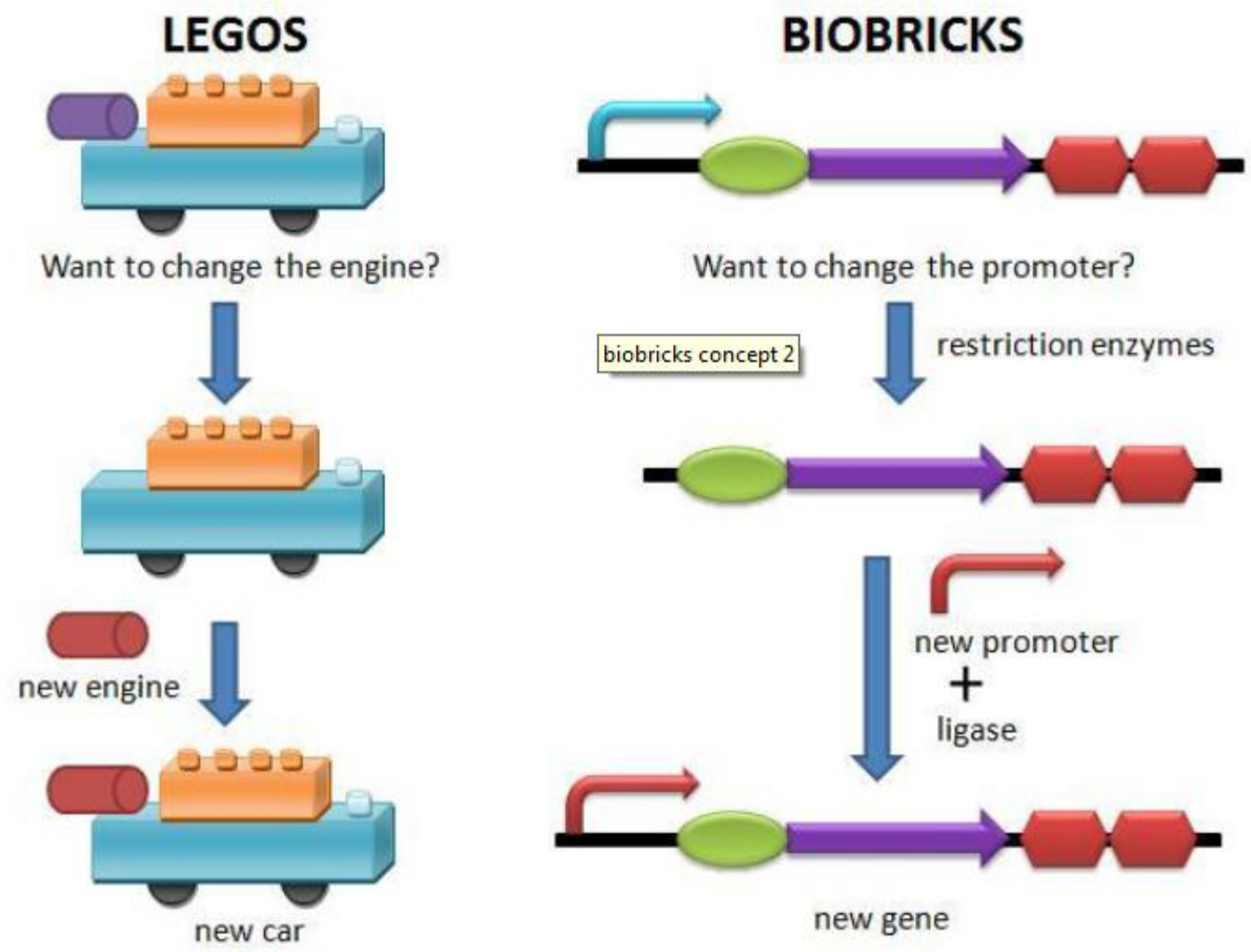



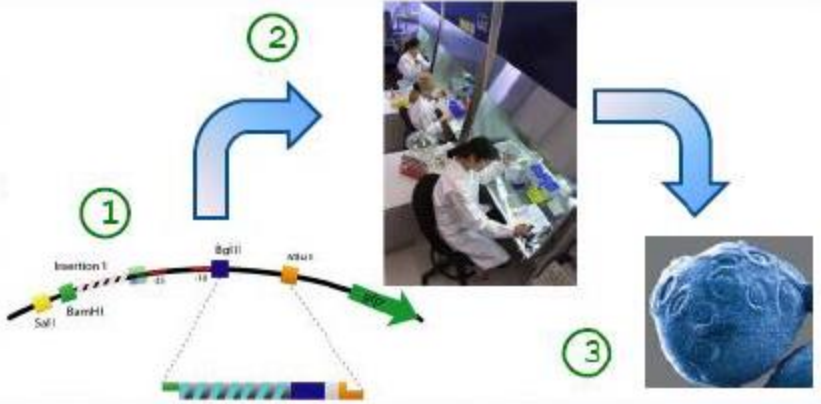
Figure2: The concept of interchangeable parts in biobricks

# Plataforma Inovadora


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



**Standard practice**



**Automated Strain construction**



**Traditional construction**

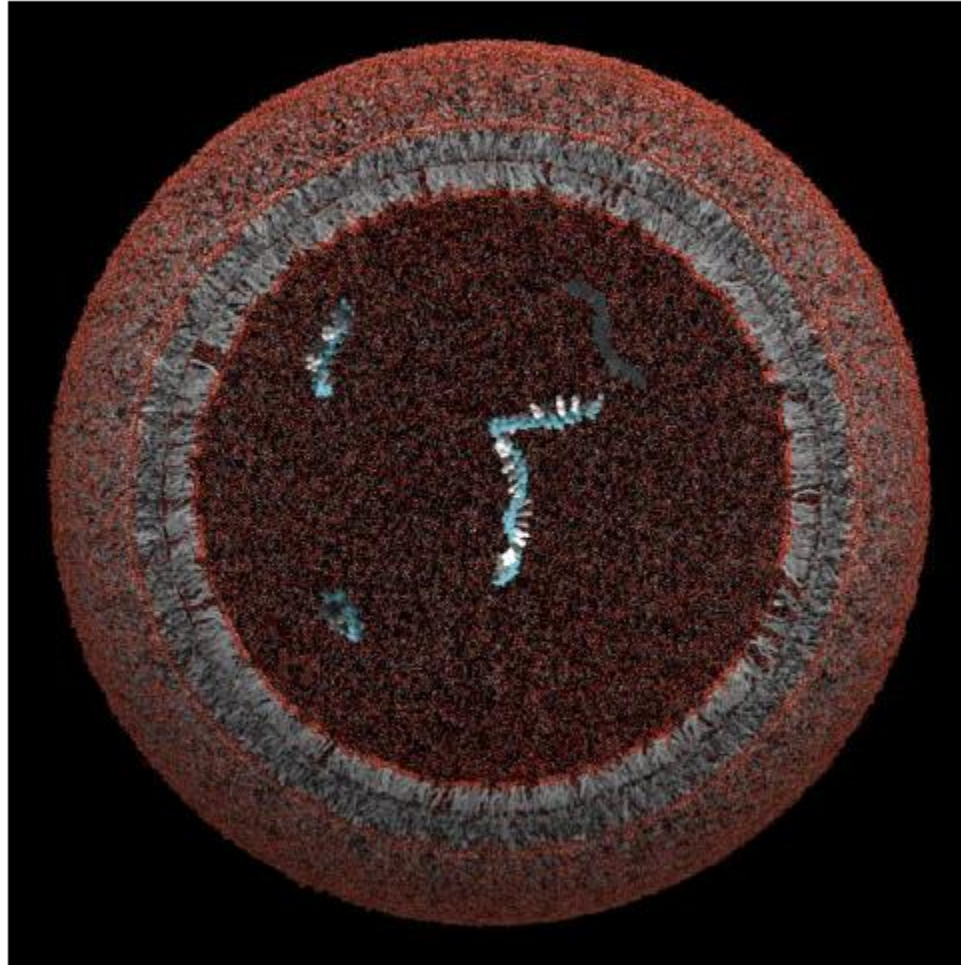
- ① Labor intensive planning
- ② Hand crated construction
- ③ Relatively slow, expensive, error-prone
- ④ 4 week cycle, 40 strains per cycle with 4 FTEs

**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

# Protocélulas

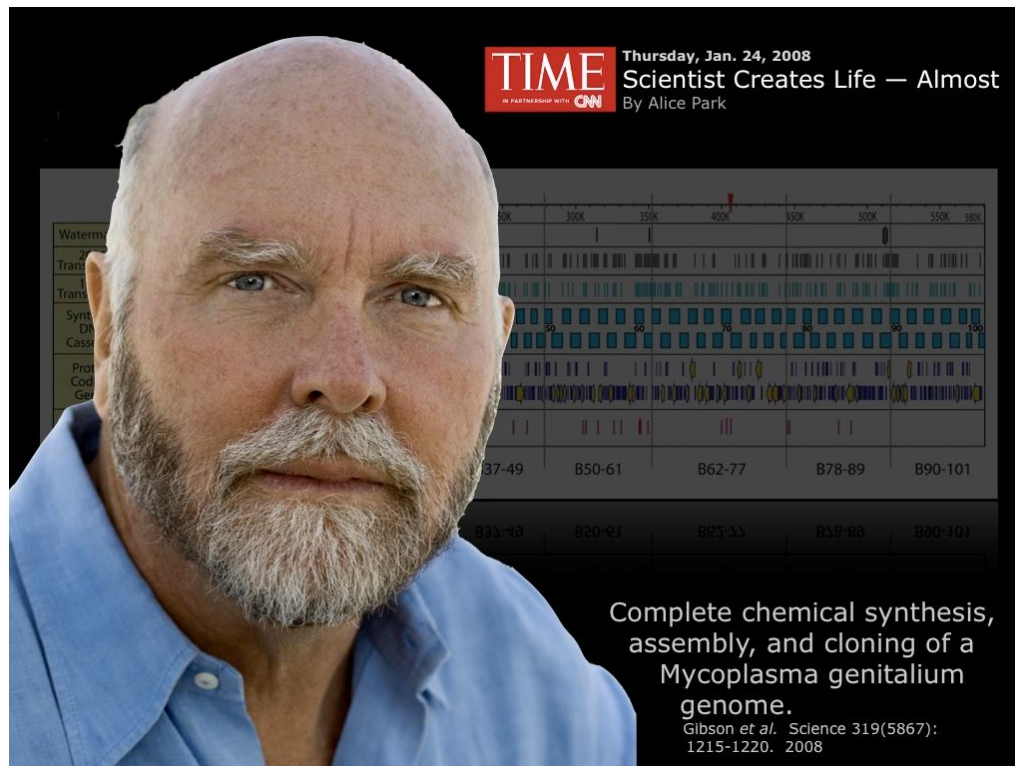
Apesar de estar formada por dois componentes (RNA replicase e uma membrana de ácidos graxos), uma protocélula seria capaz de crescer, de se duplicar e de evoluir.



# 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



<http://www.sciencemag.org/content/319/5867/1215.abstract>

# Primeiro Organismo Sintético



## Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

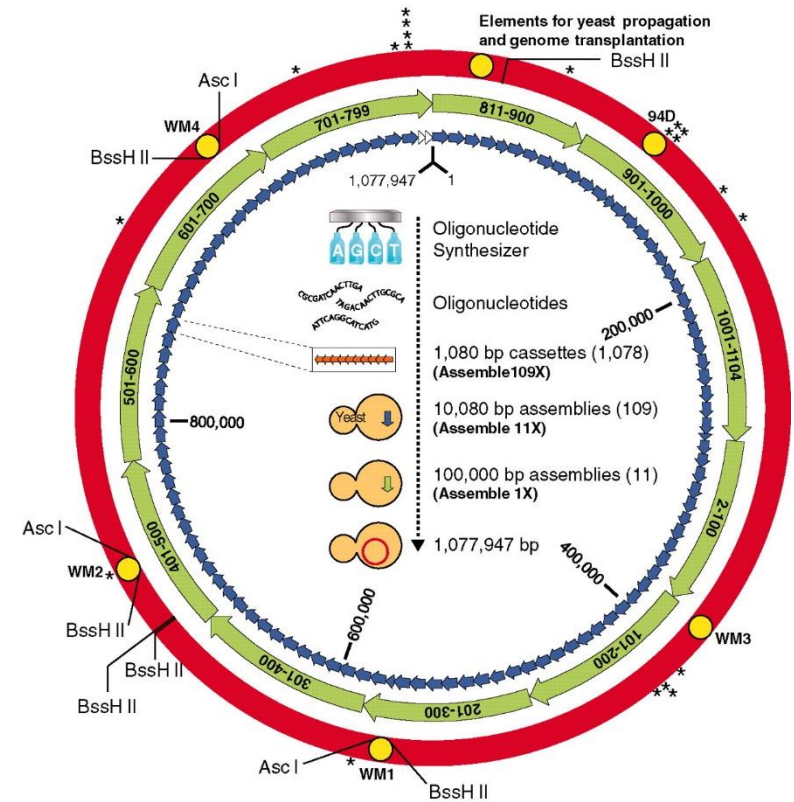
Daniel G. Gibson *et al.*  
*Science* **329**, 52 (2010);  
DOI: 10.1126/science.1190719

### RESEARCH ARTICLE

## Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

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

Custo = 40 milhões de dólares



The assembly of a synthetic *M. mycoides* genome in yeast.

# 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, *Mycoplasma mycoides*

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

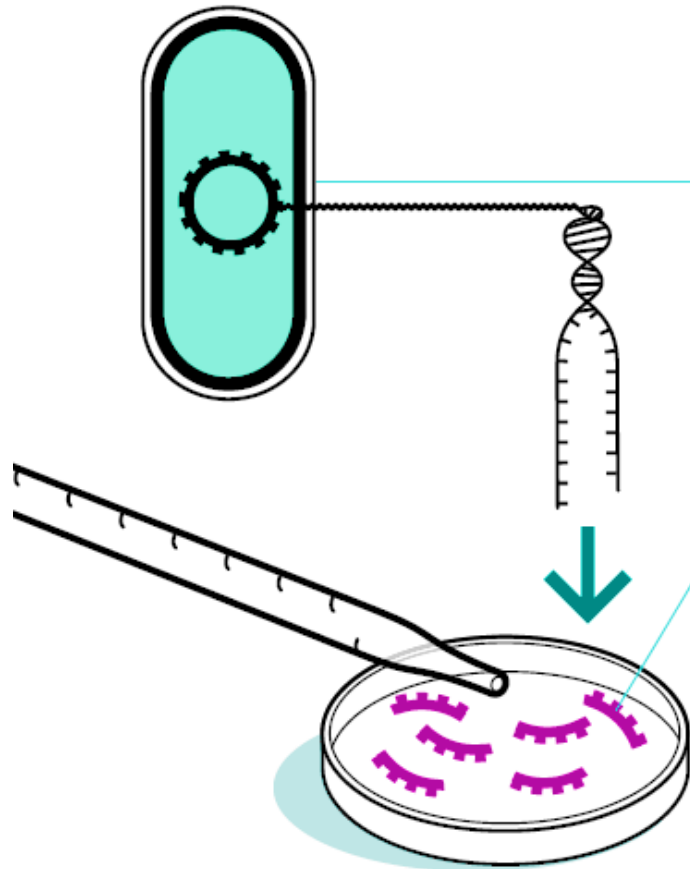
Dois dias após o transplante, as células deixaram de conter o DNA original da *M. capricolum* (seja porque ele foi destruído ou diluído no processo de replicação) e apresentavam um único tipo de material genético, o cromossomo sintético da *M. mycoides*

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



# O transplante de DNA passo a passo

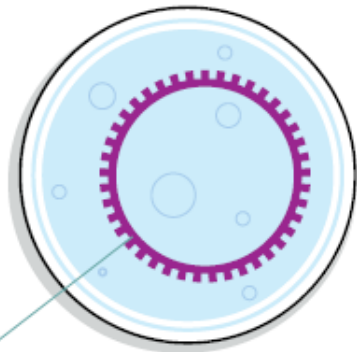
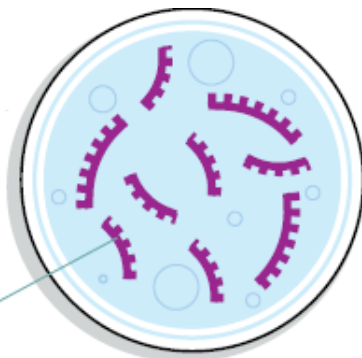
Como os cientistas fizeram a célula de uma bactéria ser controlada pelo genoma sintético de outra



- 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.

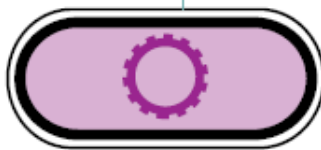
3

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.



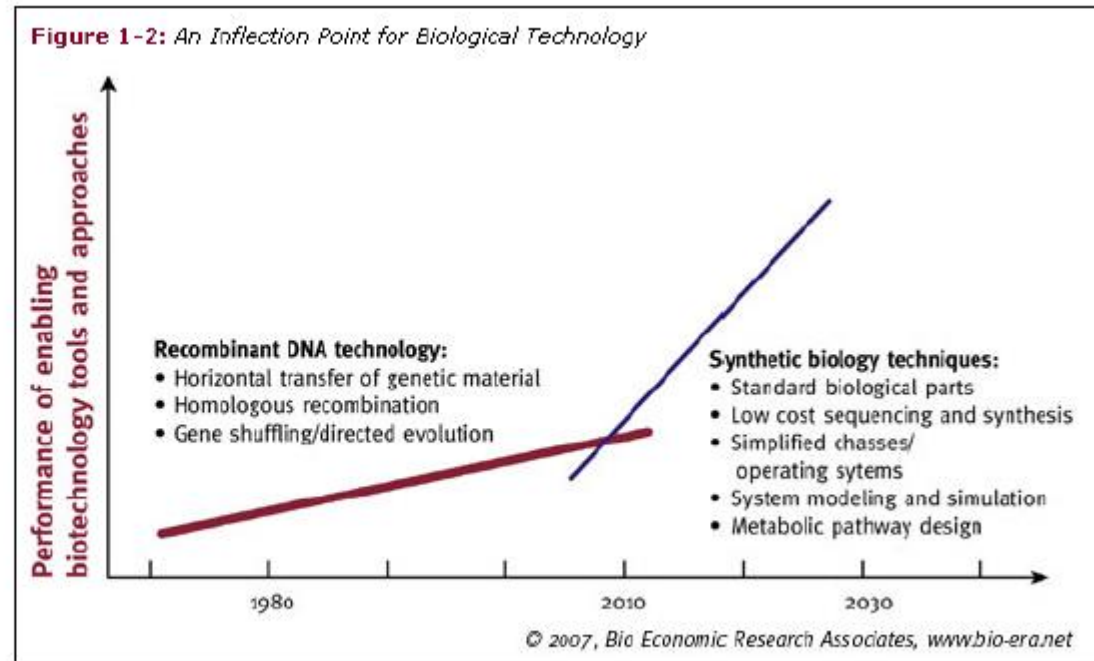
4

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.



# Biologia Sintética

“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, 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)



# ESTUDO DIRIGIDO

1. Diversidade microbiana
2. Métodos de Melhoramento de bactérias x fungos
3. Aplicações de microrganismos melhorados geneticamente
4. Princípios da Biologia Sintética

## Leitura recomendada

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