

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO EM PROCARIOTES E EUKARIOTES

LGN 5809- Genética Molecular

Docente: Profa. Caroline Quencine Verdi

Discentes: Daniele Bononi

Henrique Nery Cipriani

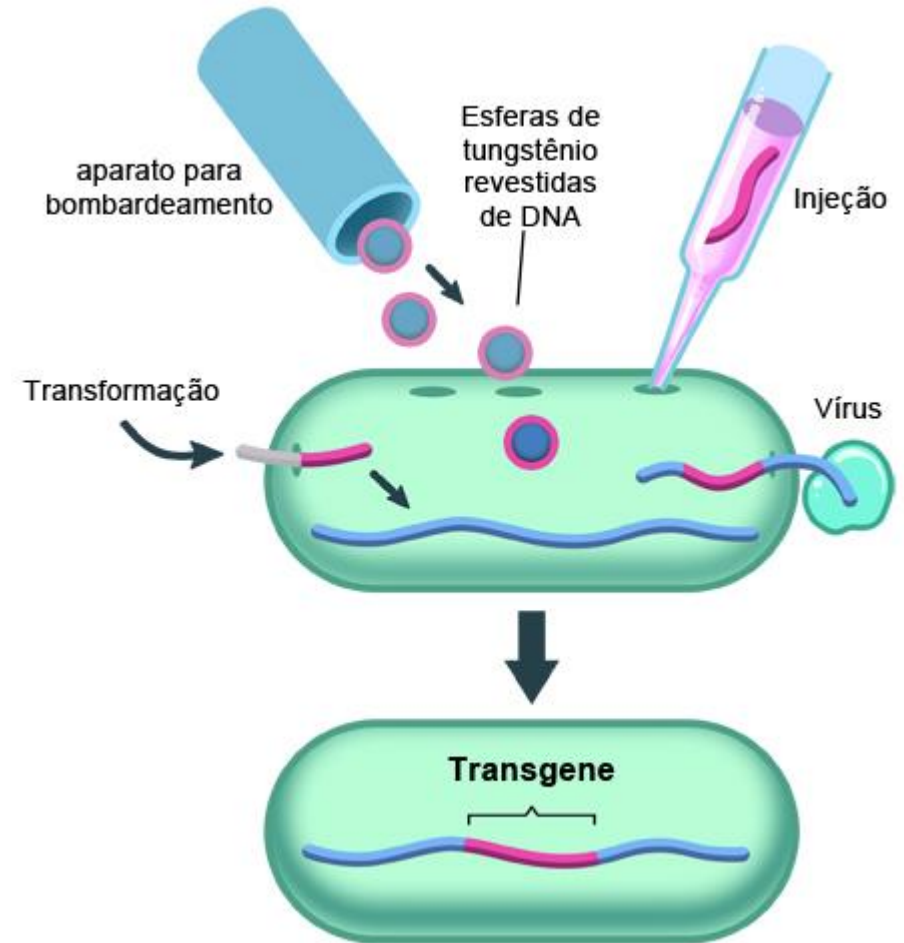
Marina Gouvêa

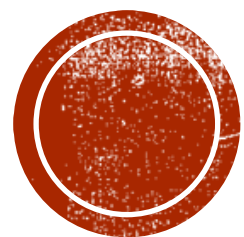
Nicoli Gomes de Moraes



Transformação

Processo de introdução de um gene de interesse no genoma de uma célula receptora e sua posterior expressão



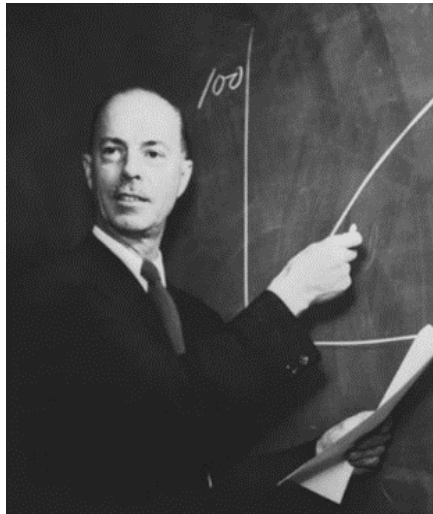


Histórico





- A primeira transformação de bactéria foi demonstrada em **1928** pelo bacteriologista Frederick Griffith → ficou interessado se após injeção de calor em “células” se as mesmas poderiam ser usadas para vacinar camundongos contra pneumonia.
- Com isso descobriu a cepa não virulenta de *Streptococcus pneumoniae*, e hipotetizou que algum princípio transformante tornou a cepa inofensiva.



Oswald Avery

Colin MacLeod

M. McCarty

- **1944** foi identificado esse princípio como sendo genético .
- E chamaram a absorção e incorporação da porção de DNA pela bactéria de “transformação”.
- Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III", *Journal of Experimental Medicine*, 1944





Joshua Lederberg

- **1947-1953** → Conjugação/Transdução
- Aceita teoria da “Transformação”



“Originalmente, pensava-se que a *Escherichia coli* era refratária à transformação.”



Factors Influencing Competence of *Escherichia coli* for Lambda-Phage Deoxyribonucleic Acid Infection

Akiko Higa, Morton Mandel

First published: April 1972 | <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1972.tb00657.x> | Citations: 4



E. coli pode ser induzida a absorver DNA do bacteriófago λ sem o uso do fago auxiliar, após tratamento com solução de CaCl_2



Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA

Stanley N. Cohen, Annie C. Y. Chang, and Leslie Hsu [Authors Info & Affiliations](#)

August 1, 1972 | 69 (8) 2110-2114 | <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>



Demonstraram que o tratamento com CaCl_2 é eficiente para transformação de DNA plasmidial.



Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids

Douglas Hanahan

- O método de transformação de Mandel e Higa foi aprimorado por Douglas Hanahan.
- A descoberta da competência induzida artificialmente em *E. coli* criou um procedimento eficiente para transformar bactérias que permite métodos de clonagem molecular mais simples em biotecnologia e pesquisa.



Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation

[Reinhard Wirth](#), [Anita Friesenegger](#) & [Stefan Fiedler](#)

[Molecular and General Genetics MGG](#) **216**, 175–177 (1989) | [Cite this article](#)

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes

[Richard D. Palmiter](#), [Ralph L. Brinster](#), [Robert E. Hammer](#), [Myrna E. Trumbauer](#), [Michael G. Rosenfeld](#), [Neal C. Birnberg](#) & [Ronald M. Evans](#)

[Nature](#) **300**, 611–615 (1982) | [Cite this article](#)

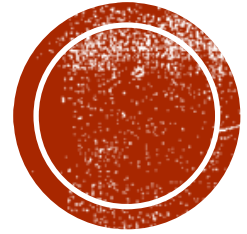
Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity

[P. Zambryski](#), [H. Joos](#), [C. Genetello](#), [J. Leemans](#), [M. Van Montagu](#), [J. Schell](#)

[Author Information](#)

The EMBO Journal (1983) 2: 2143-2150 | <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01715.x>

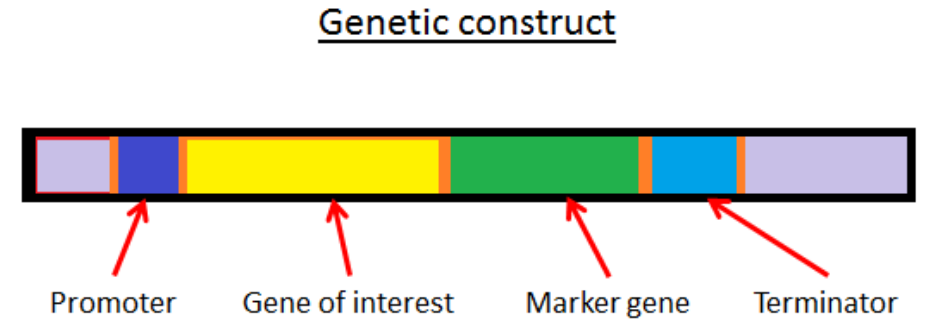




Etapas envolvidas na transformação genética



- 1 - Design do cassete genético
- 2 - Inserção do cassete em um vetor
- 3 - Amplificação do vetor
- 4 - Escolha do método e inserção do DNA dentro da célula
- 5 - Seleção de células (indivíduos) transformados
- 6 - Recuperação/ Regeneração
- 7 - Confirmação



Eficiência pretendida, Quantidade e tamanho de genes, Reprodutibilidade, célula alvo, Características do organismo, Estabilidade, Local para transformação (núcleo, cloroplasto, mitocôndria)

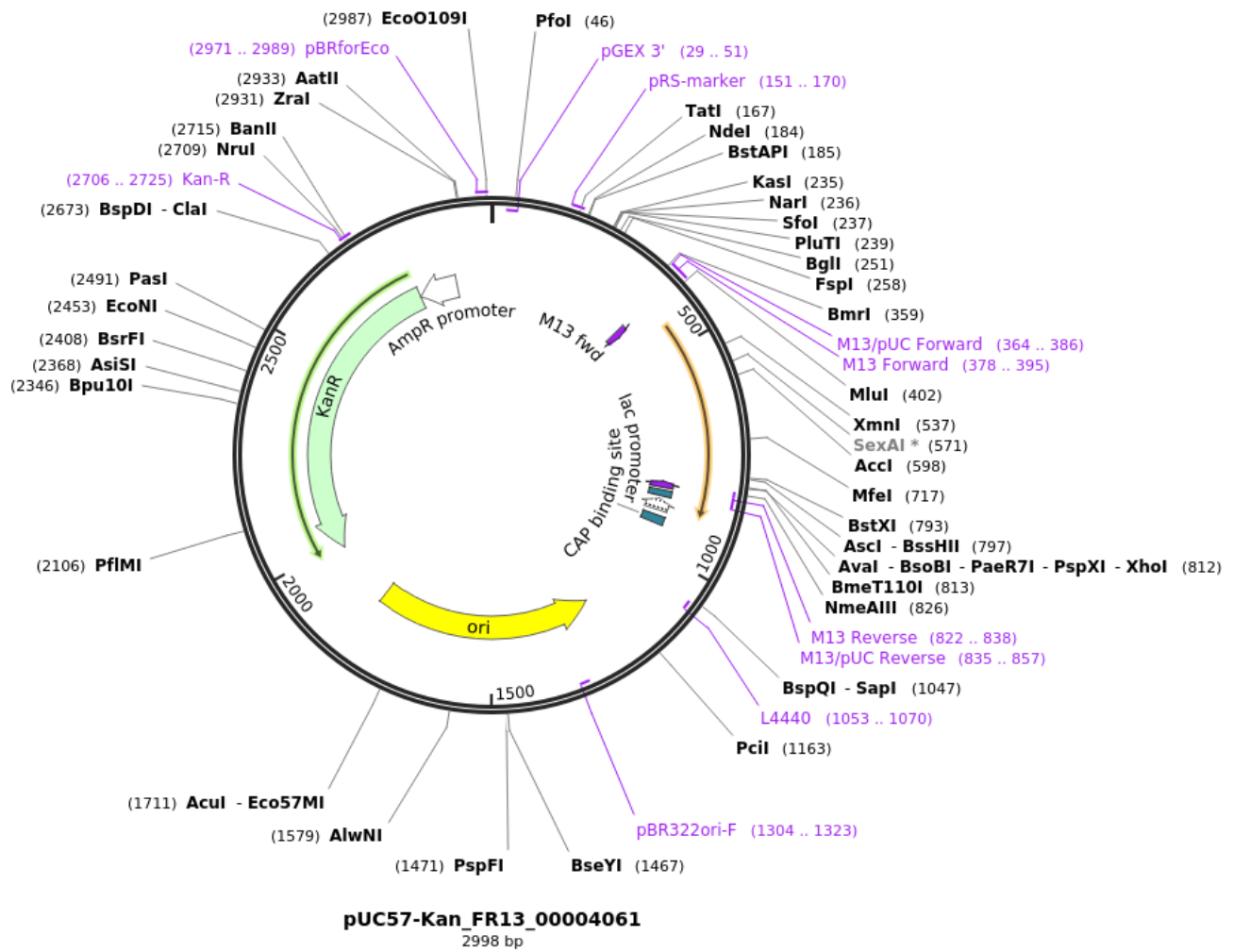


Vetores - Veículos que transportam o gene de interesse dentro de uma célula alvo para replicação e expressão (Plasmídeos. cosmídeos. cromossomos artificiais. vetores virais, etc)

Created with SnapGene®

Elementos de vetor:

- 1 - Origem de replicação
- 2 - Sítio de múltipla clonagem
- 3- Marcador seletivo

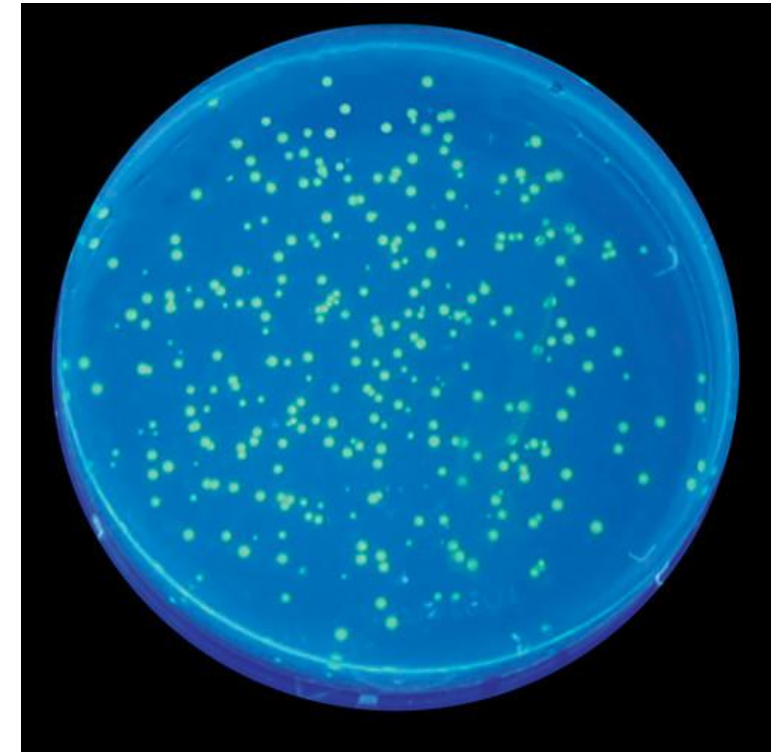
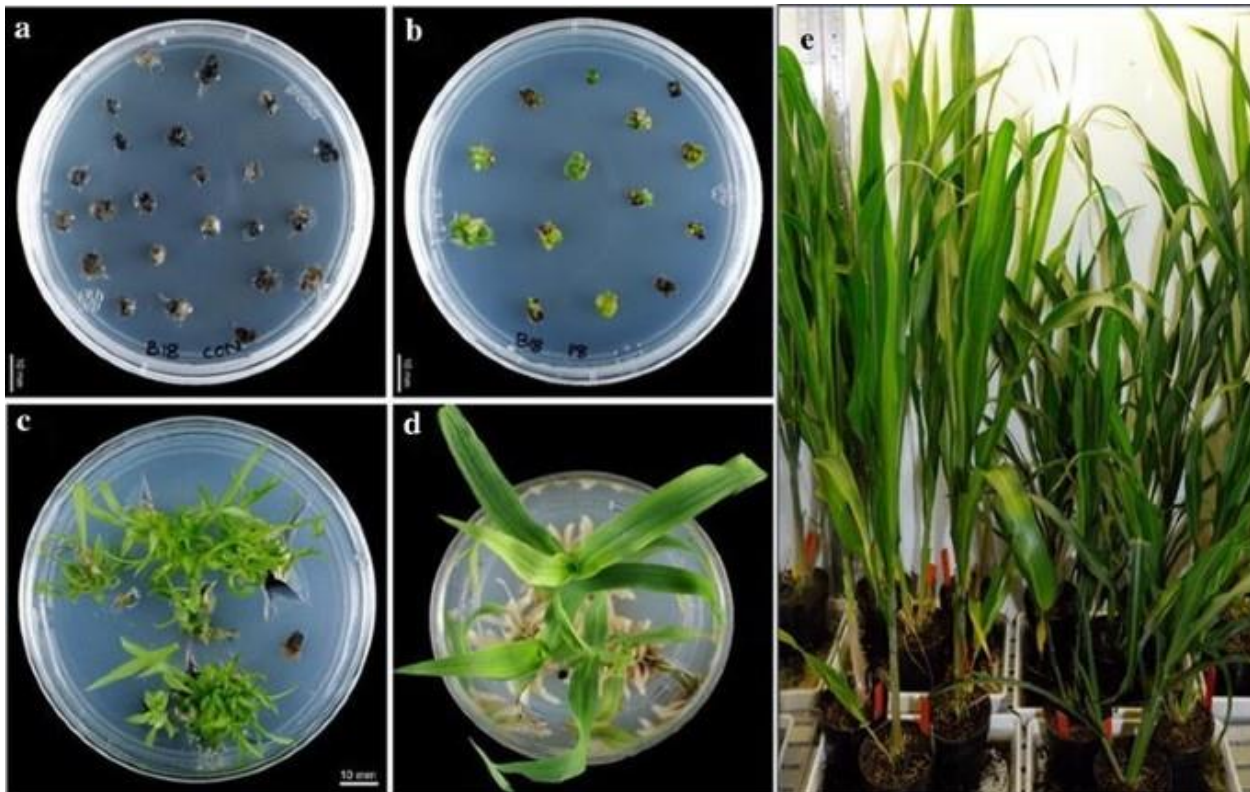


Elementos Cassete:

- 1 - Promotor
- 2 - Região codificadora do gene
- 3- Região terminadora



Seleção de organismos **transformados** através de genes que conferem às células transformadas alguma **característica** para a sua identificação (Marcadores seletivos).
Exemplo: **Genes de resistência** à **antibióticos**, a **herbicidas** (no caso de plantas) e genes de **proteínas fluorescentes**, por exemplo.

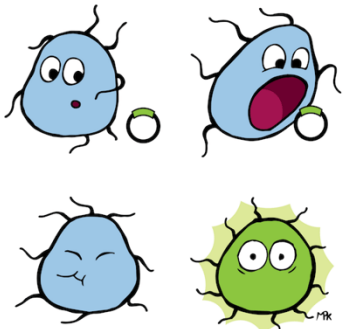


Métodos de transformação genética

Indiretos ou Biológicos (vetores)

Transferência mediada por *Agrobacterium*

Vetores virais
(CaMV - permite inserções de no máx.
0.8 Kb - pouco usado)



Diretos ou Físicos e Químicos

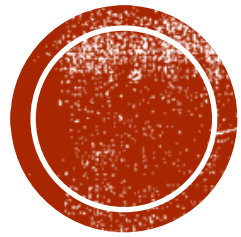
Protoplastos

Biobalística

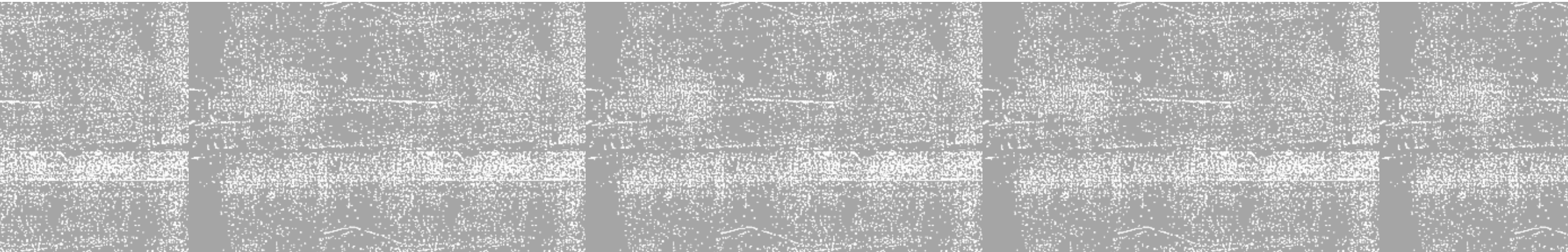
Macro/Micro injeção

Eletroporação/ Eletrofusão

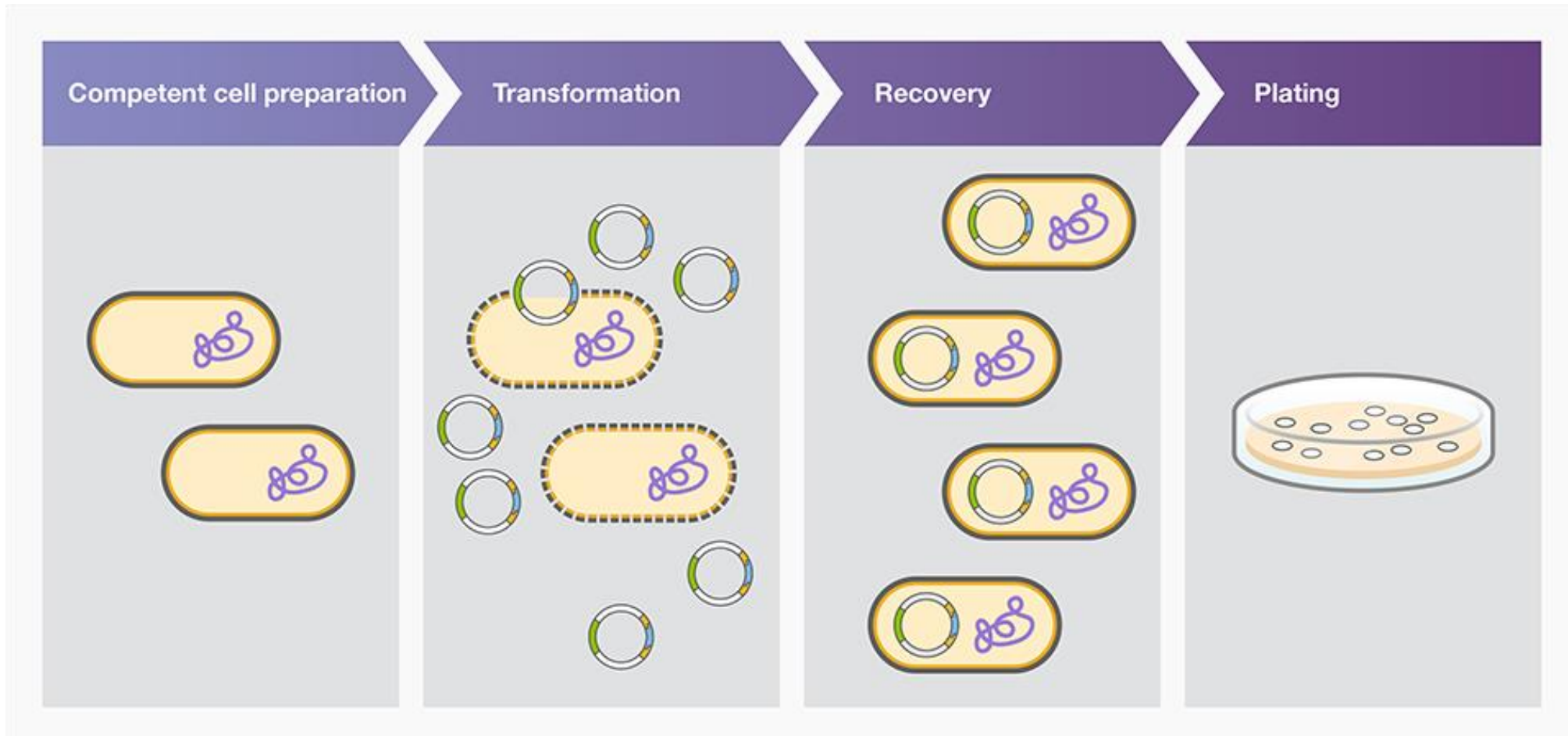




Transformação em procariotos



Etapas

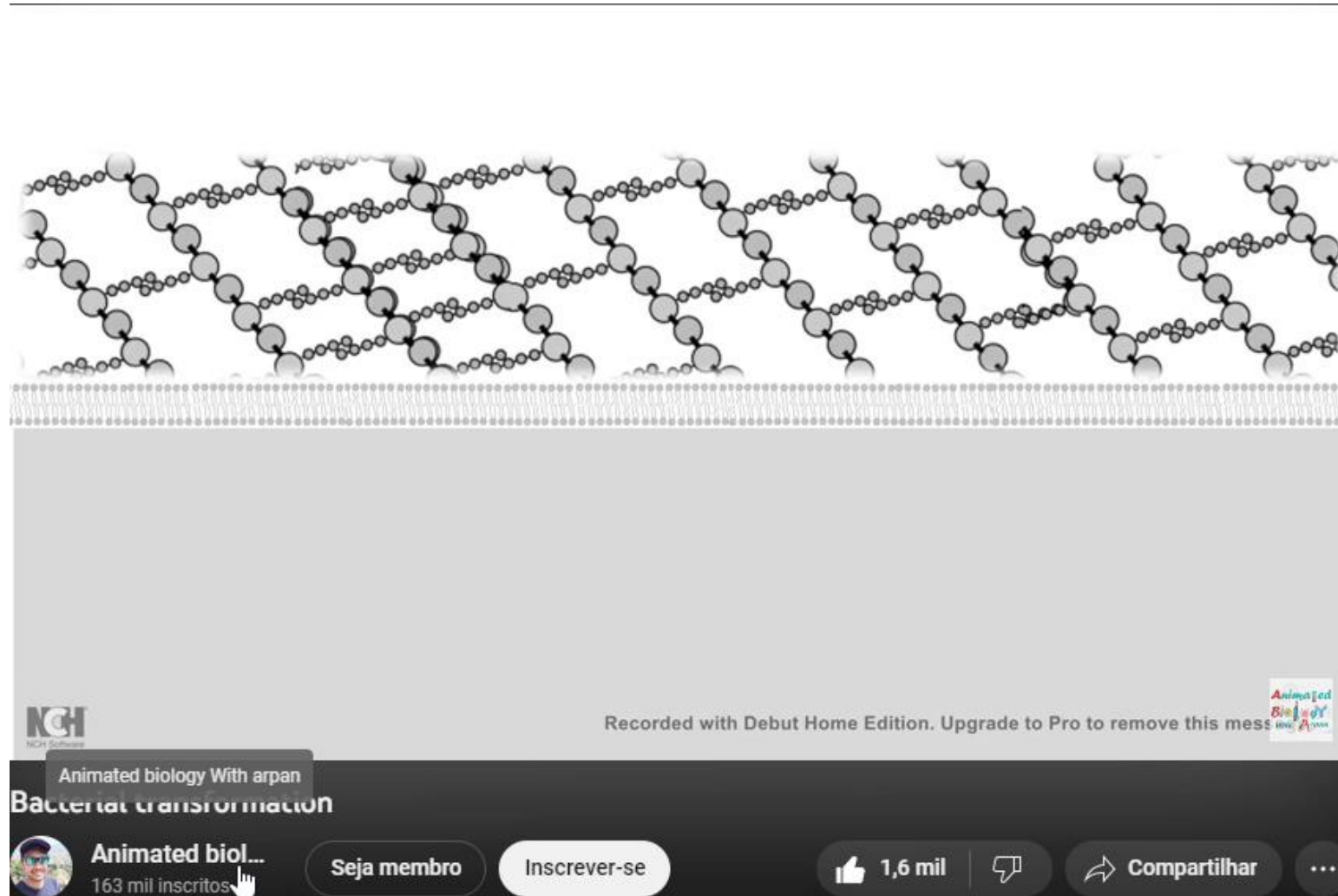


THERMOFISCHER. Bacterial Transformation Workflow—4 Main Steps - BR. Disponível em:

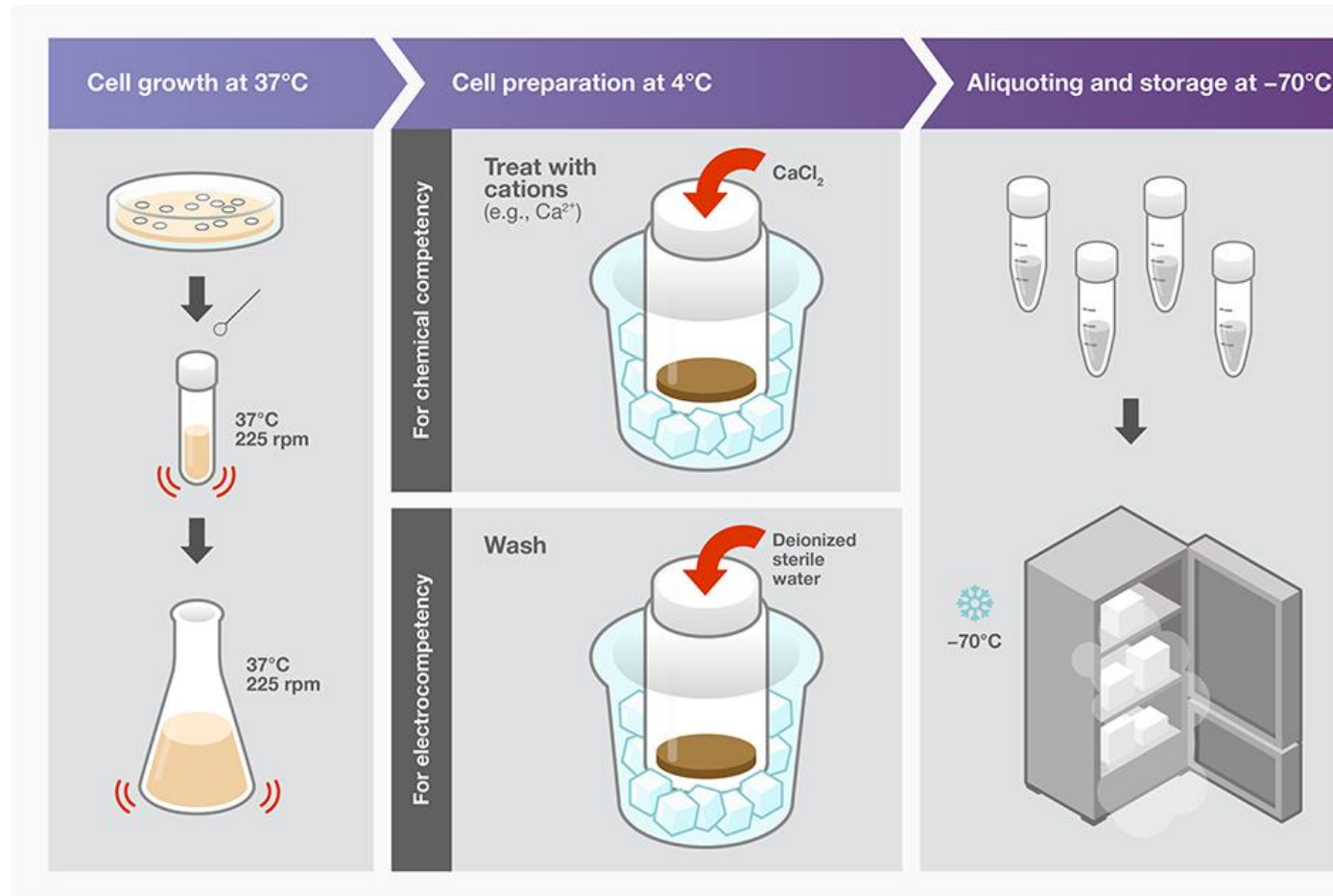
<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>>. Acesso em: 25 abr. 2023.



Preparação da célula competente



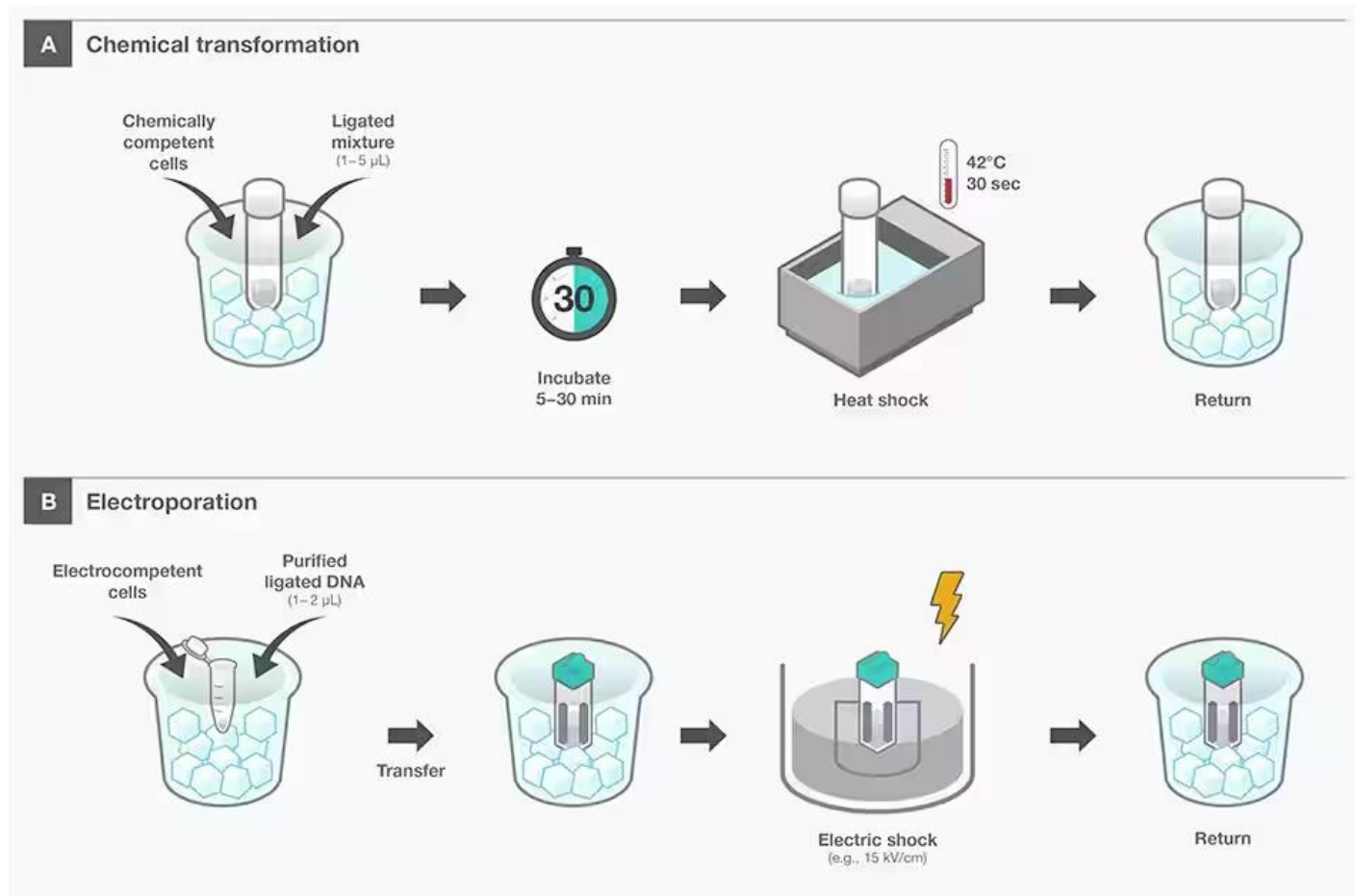
O método de preparo depende do método de transformação



THERMOFISCHER.
Bacterial Transformation Workflow-4 Main Steps - BR.
Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>.
Acesso em: 25 abr. 2023.



Transformação química x eletroporação

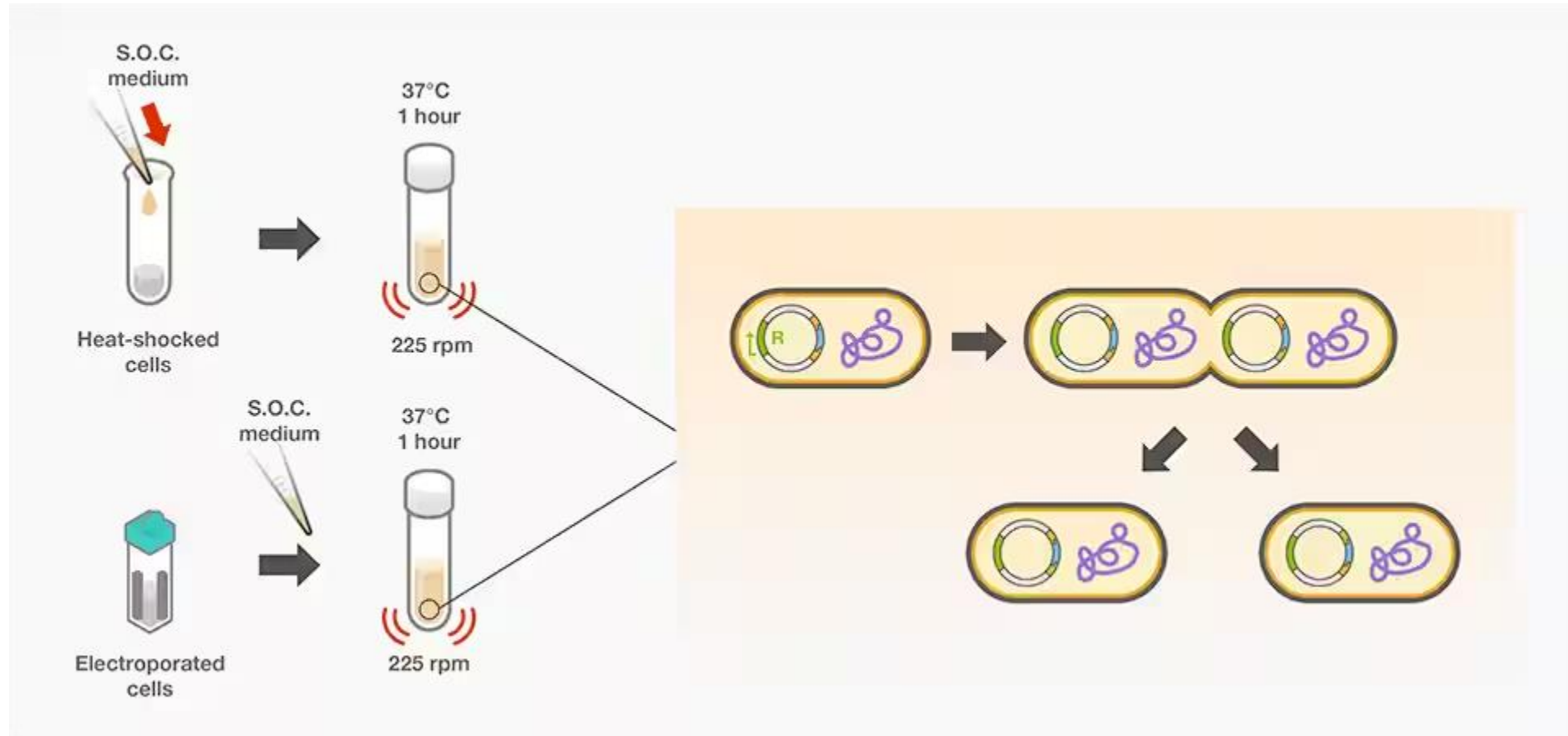


THERMOFISCHER.
Bacterial
Transformation
Workflow—4 Main
Steps - BR.
Disponível em:
<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>>.

Acesso em: 25
abr. 2022



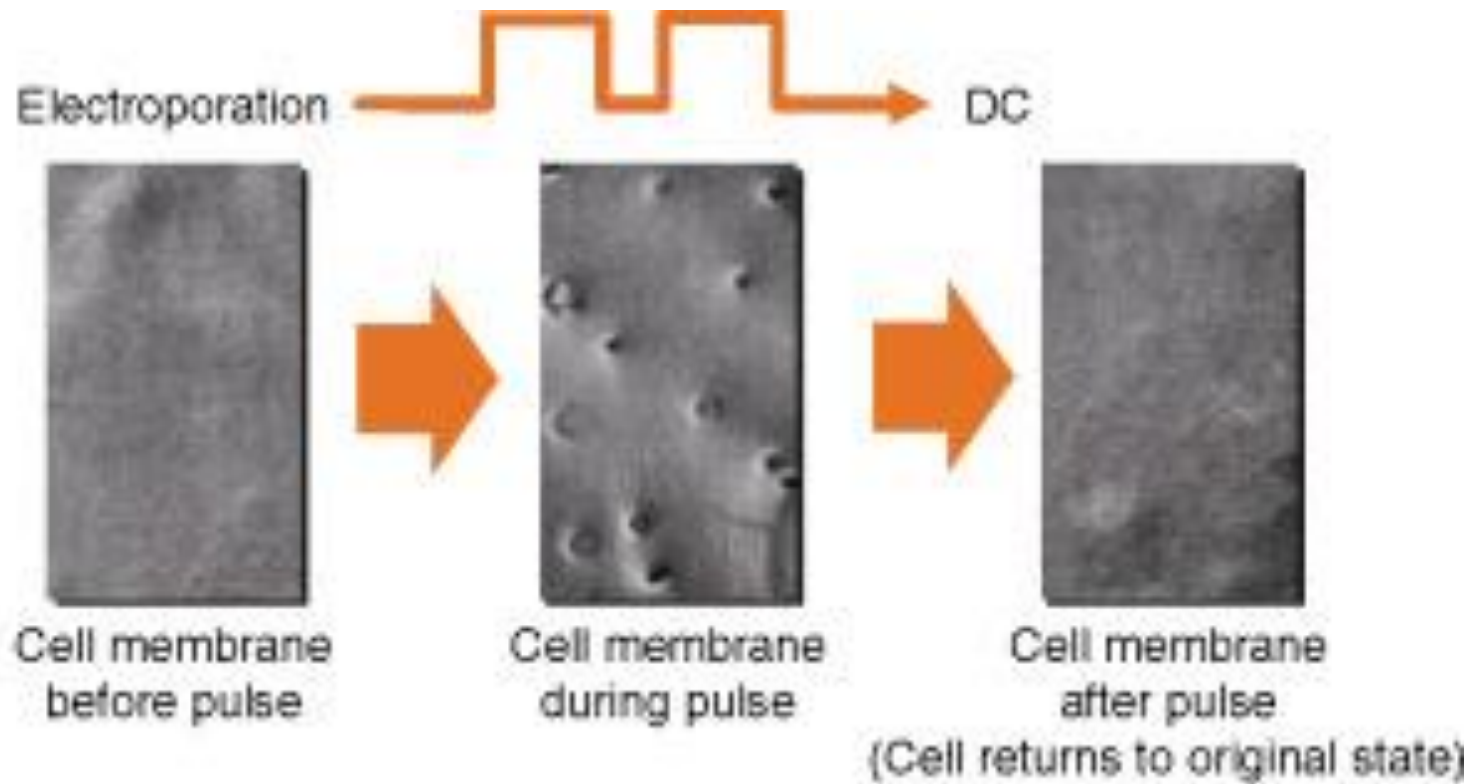
Incubação das células



THERMOFISCHER. Bacterial Transformation Workflow–4 Main Steps - BR. Disponível em:

<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>>. Acesso em: 25 abr. 2022





Plaqueamento



Recorded with Debut Home Edition. Upgrade to Pro to remove this message

Bacterial transformation

 **Animated biol...**
163 mil inscritos

Seja membro Inscrever-se

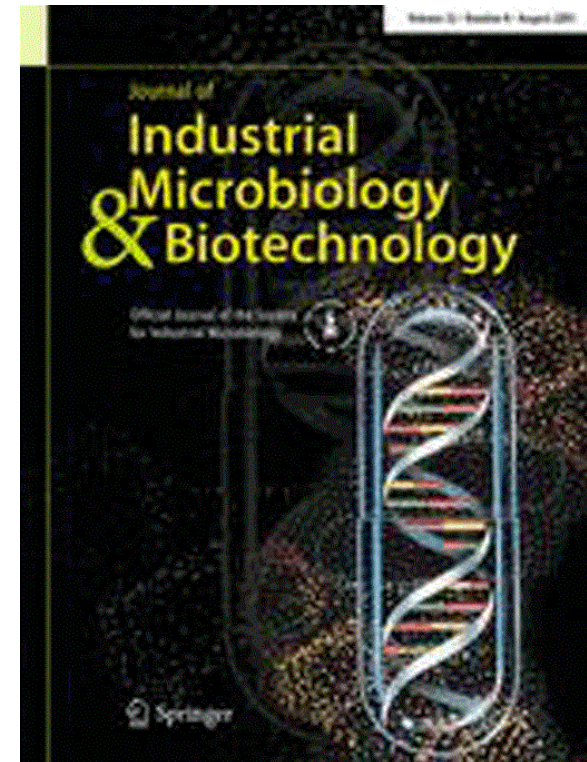
 1,6 mil   Compartilhar 

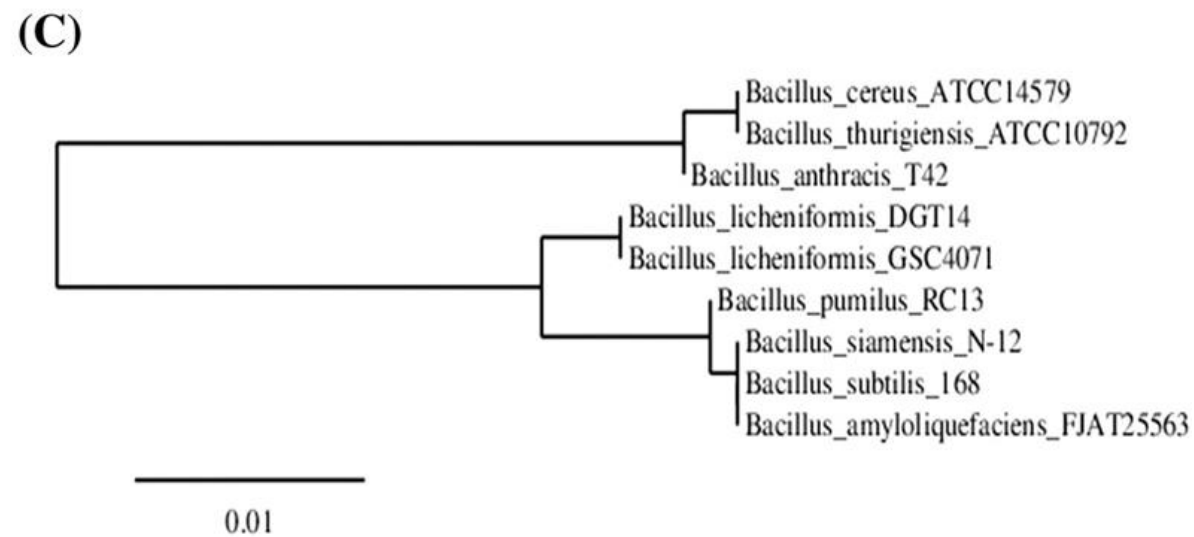
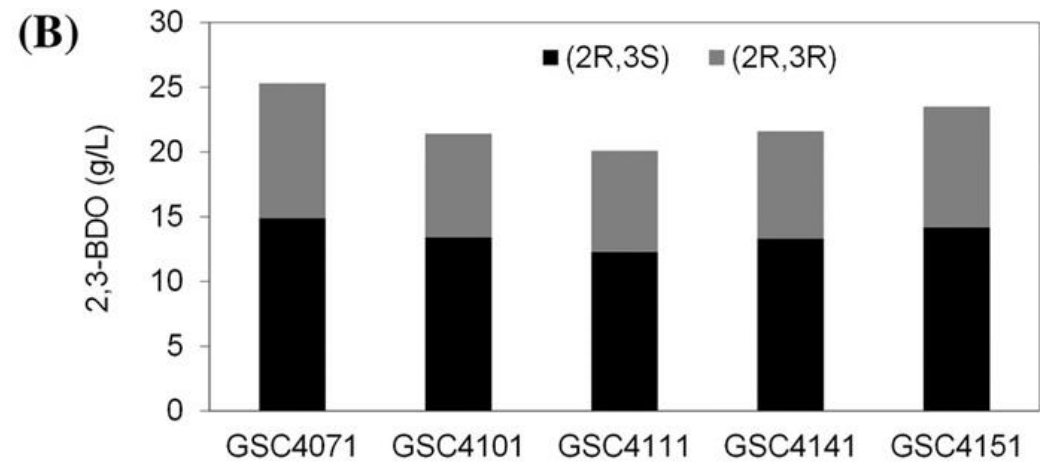
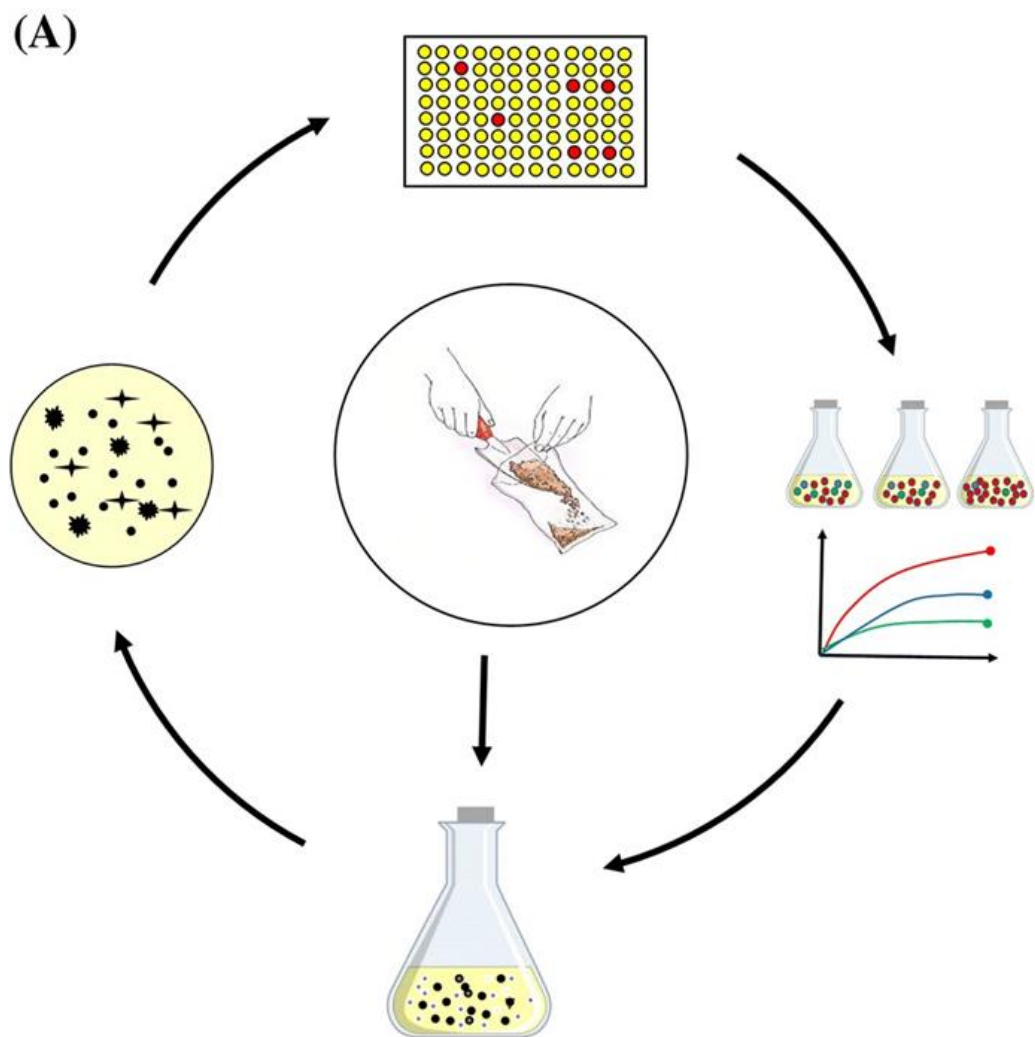


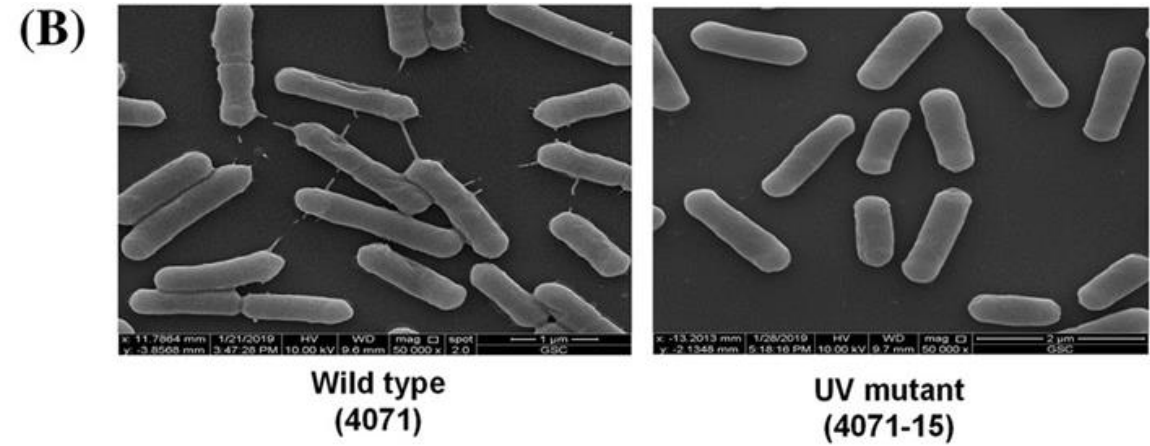
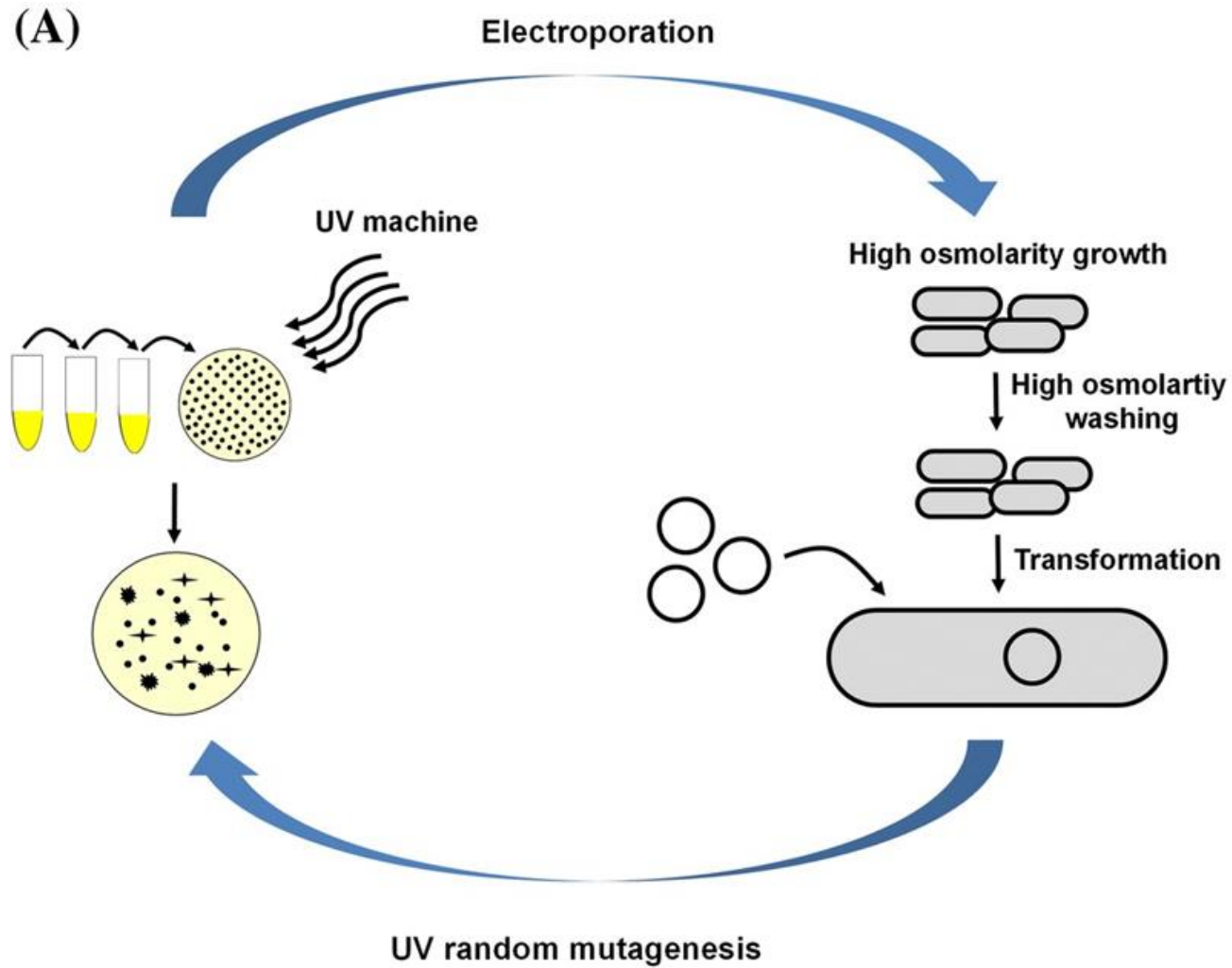
Engineering a newly isolated *Bacillus licheniformis* strain for the production of (2R,3R)-butanediol

Chan Woo Song, Rathnasingh Chelladurai, Jong Myoung Park, Hyohak Song

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Volume 47, Issue 1, 1 January 2020, Pages 97–108,
<https://doi.org/10.1007/s10295-019-02249-4>



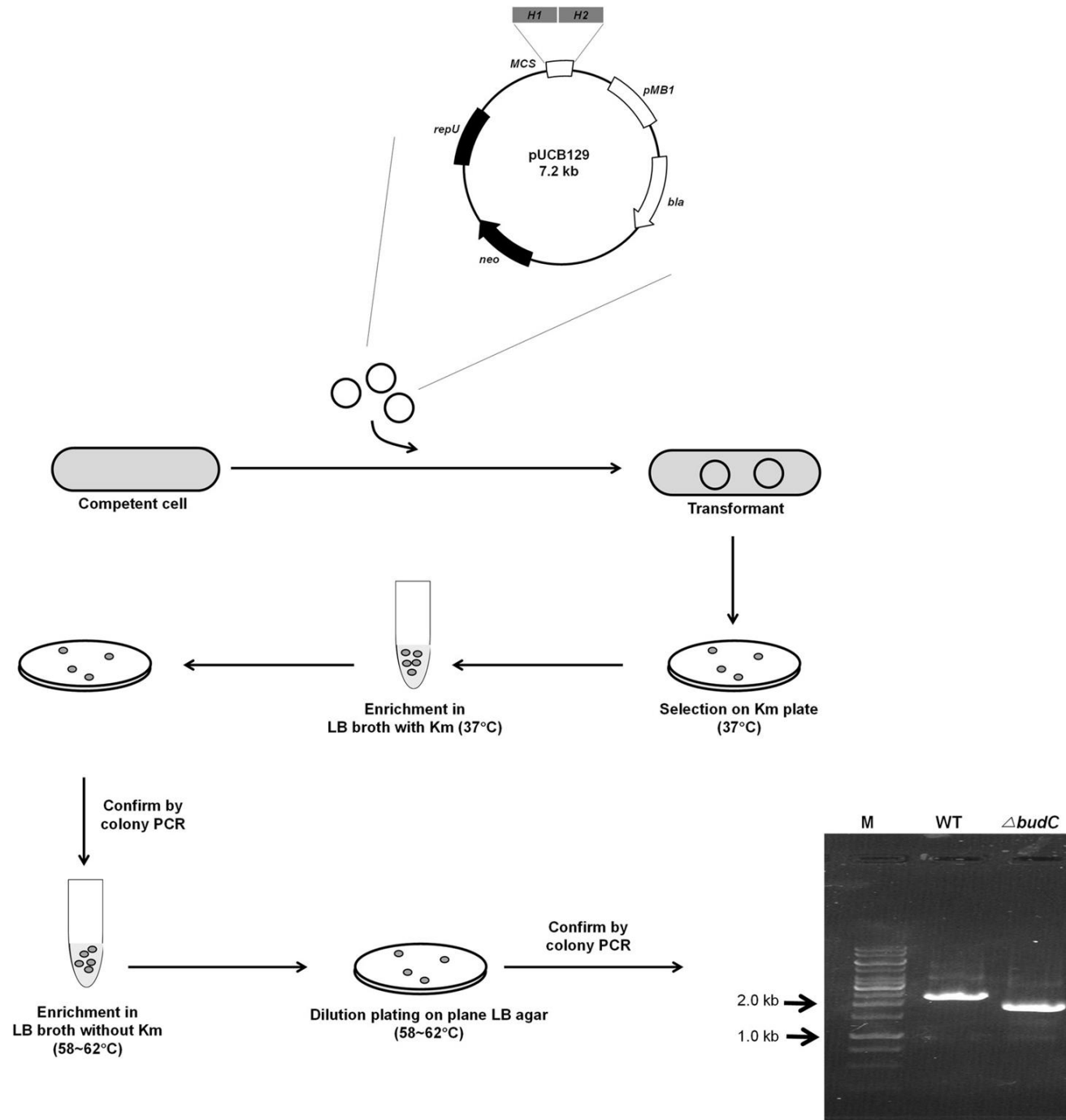


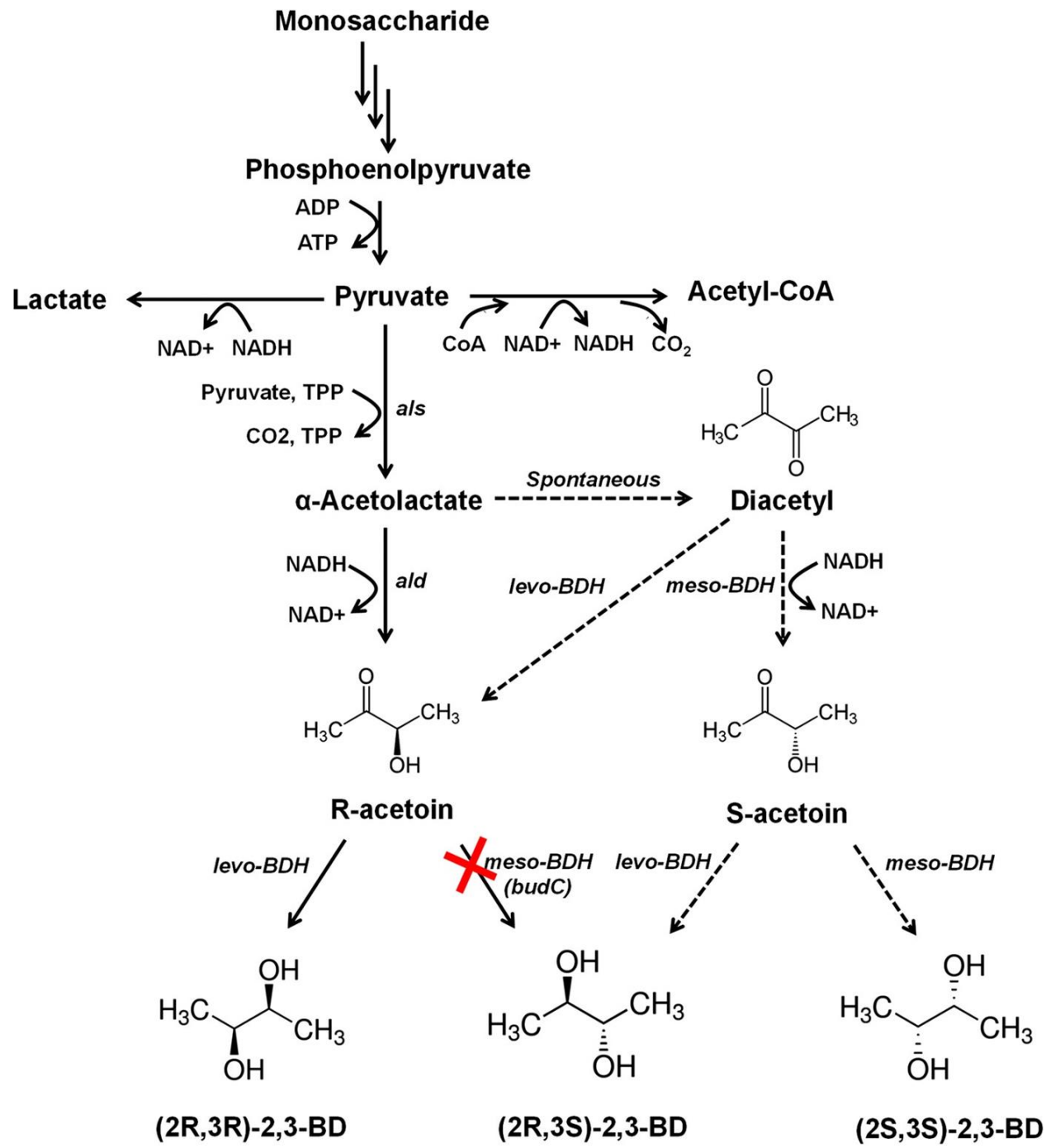


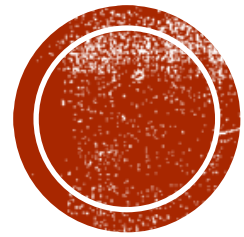
(C)

Plasmid	Efficiency (CFU/ μ g DNA)	
	4071	4071-15
pC194	0	2.8×10^2
pUB110	2.0×10	1.5×10^2
pUCB129	1.0×10	6.0×10









Transformação em Eucariotos



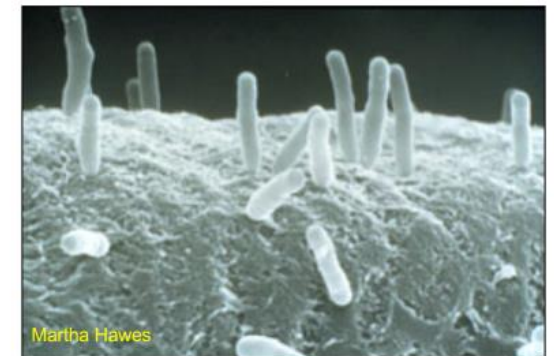
Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

- Bactéria de solo Gram-negativa, tipo bacilo
- Causa galha da coroa: roseiras, macieiras, videiras
- Afeta mais dicotiledôneas e pouco monocotiledôneas
- Cromossomo linear de 2 Mb e um circular de 2.8 Mb
- Plasmídeo Ti (tumor-inducing) de até 250 Kb
- Família *Rhizobiaceae*



❑ Outras espécies:

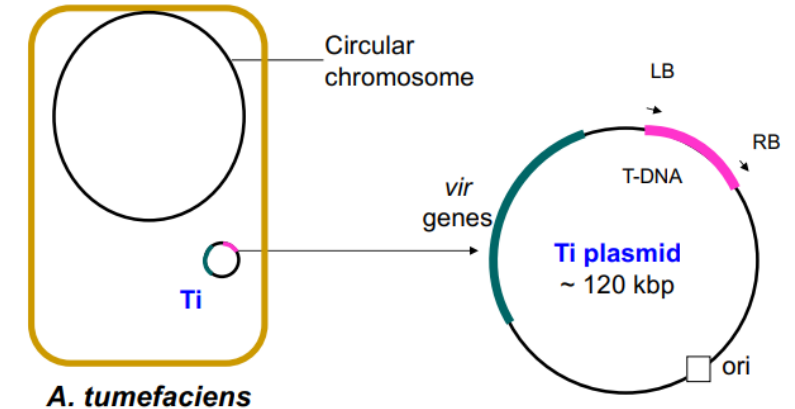
- *Agrobacterium rhizogenes* - raiz em cabeleira
- *Agrobacterium rubi* - hospedeiros limitados
- *Agrobacterium radiobacter* - não tumorogênica (sem Ti)



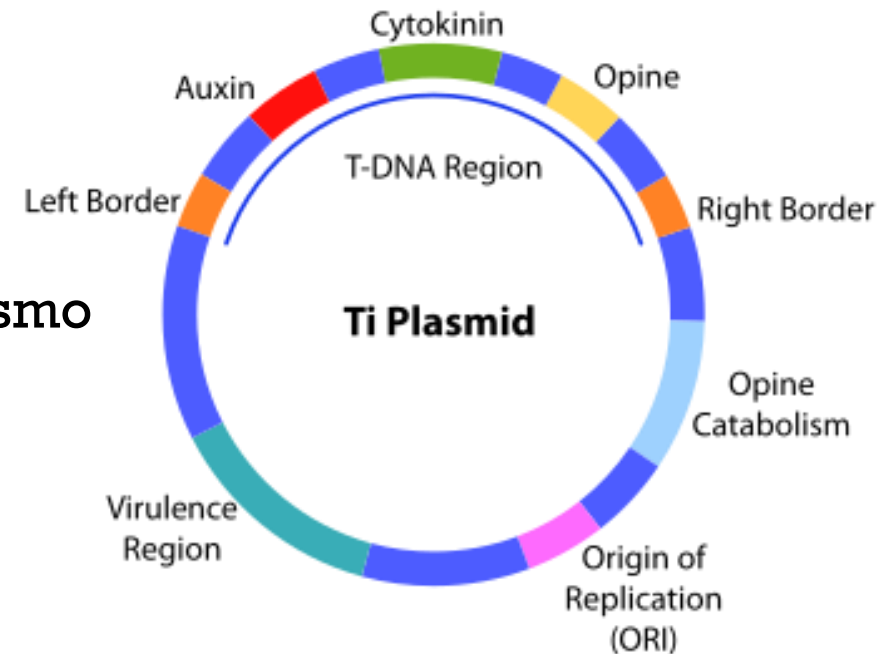
Agrobacterium tumefaciens attached to plant tissue

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

- Infecção natural - ferimentos
- Quimiotactismo - fenóis, açúcares, aminoácidos
- Expressão de genes da bactéria transferidos e integrados de forma estável ao genoma vegetal
- Capacidade tumorigênica - plasmídeo Ti = Tumor Inducing

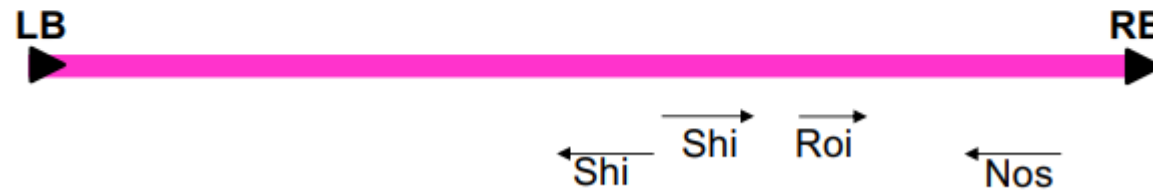
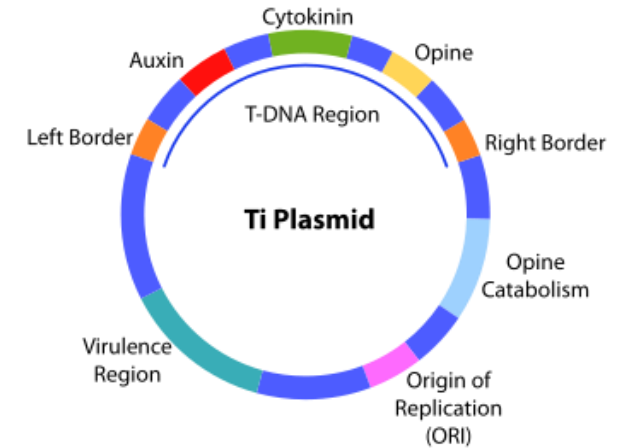


- Regiões importantes do plasmídeo Ti:
 - região T-DNA - Transfer DNA
 - transferem genes para direcionar metabolismo visando manutenção da *Agrobacterium*
 - região vir - genes de virulência



Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens T-DNA Structure

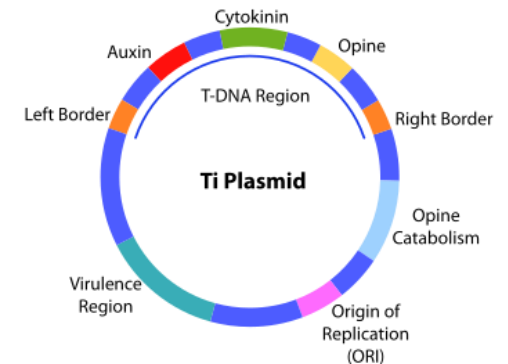
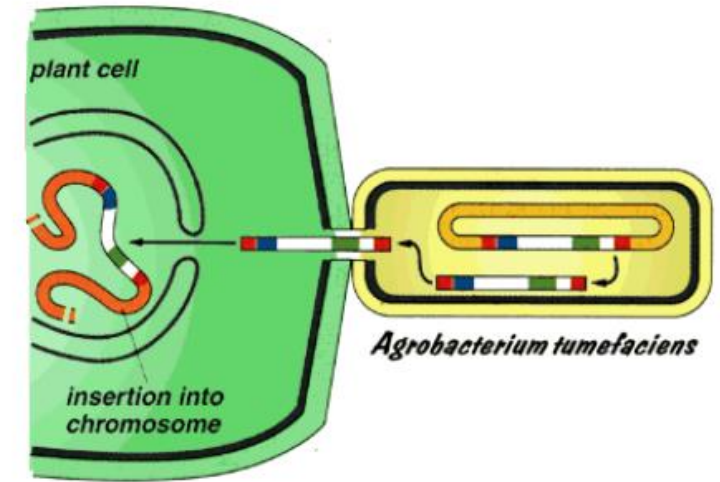


- *LB* e *RB* – repetições diretas de 25 bp
- *Nos* - nopalina sintase - gene para síntese de opina
- *Shi* - indução de brotos - 2 genes para síntese de auxina
- *Roi* - indutor de raiz - gene para síntese de citocinina



Transferência de T-DNA em plantas

- Ativada quando entra em contato com tecido vegetal danificado
- O T-DNA é cortado na RB, replicado até LB e transferido para a célula vegetal, catalisados por produtos de genes *vir*
- O T-DNA é inserido no genoma nuclear da planta em locais **aleatórios**
- A célula transformada começa a se proliferar após a integração do DNA, resultando em formação de tumores

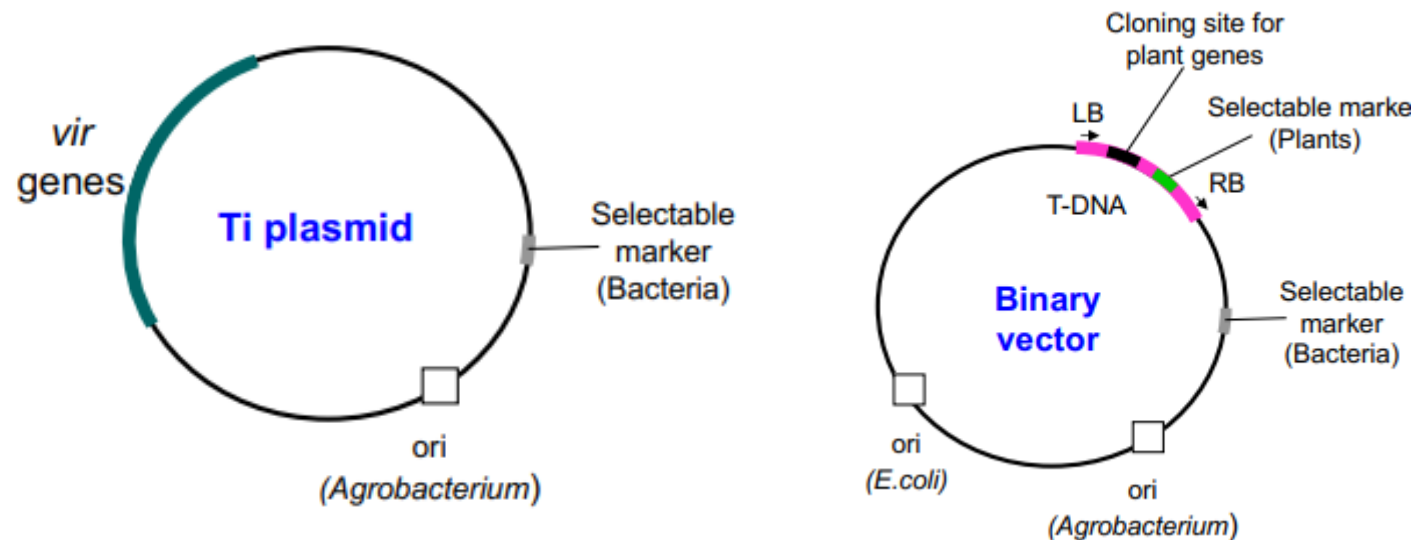


- Células transformadas produzem opinas = nutrientes ricos em N (derivados de aminoácidos) para bactéria (“colonização genética”)



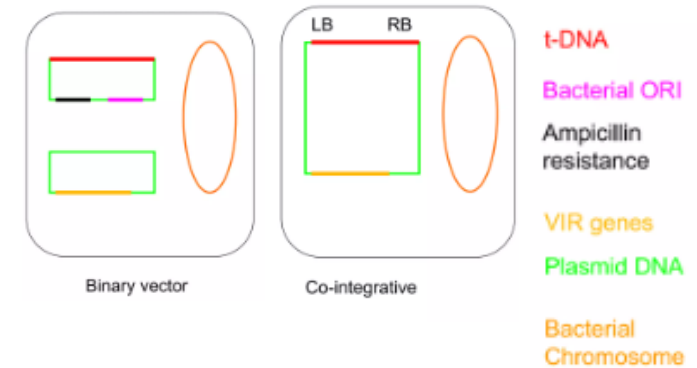
Agrobacterium como uma ferramenta na engenharia genética

- Exclusão: genes de auxina, citocinina e opina
- Manutenção: *vir*, LB, RB e ori
- O plasmídeo Ti é enorme (~120 kb) - precisa torná-lo menor
- Genes *vir* e T-DNA podem estar em plasmídeos separados
- Apenas as bordas esquerda e direita (LB e RB) são necessárias para o T-DNA ser transferido



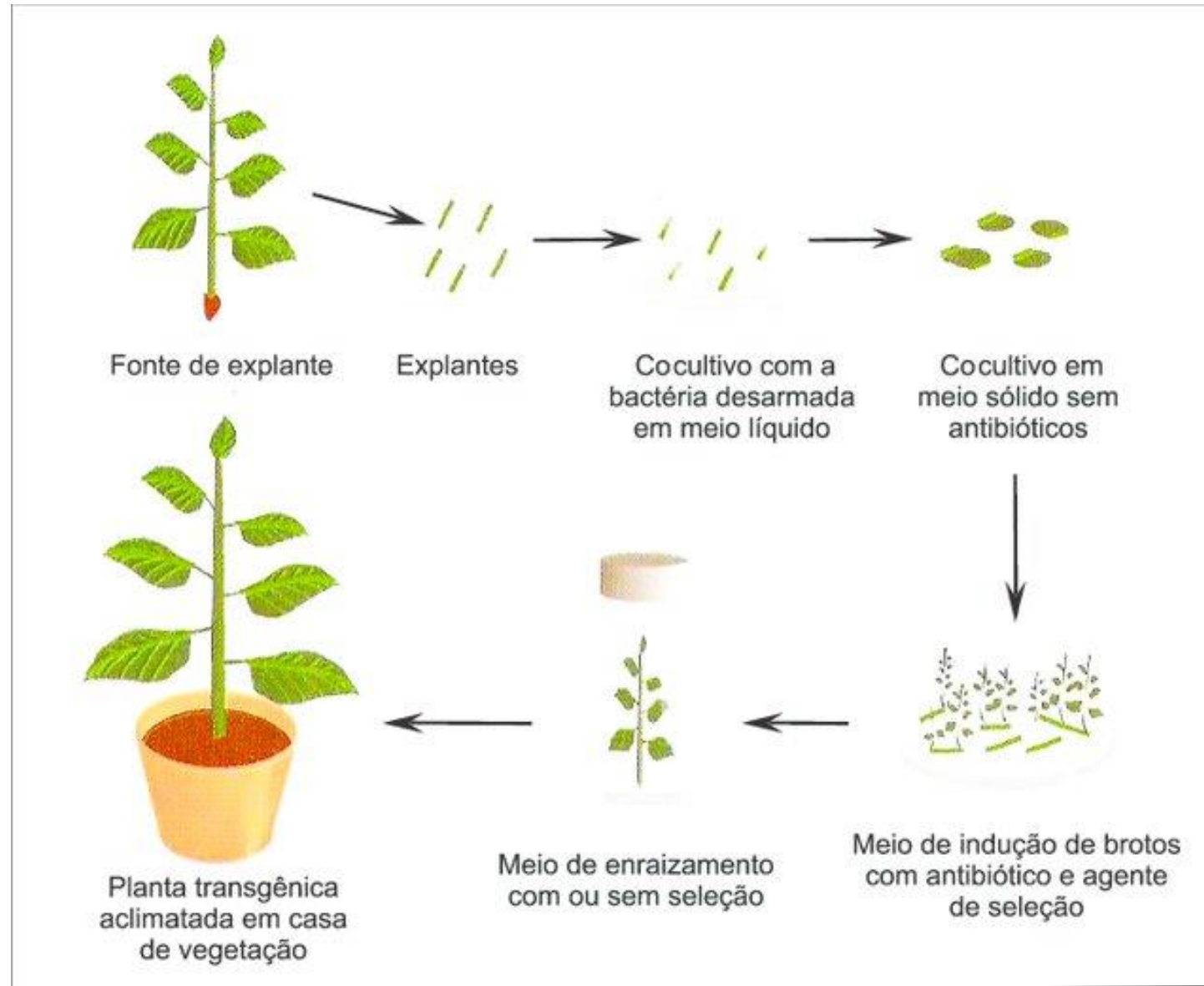
Passo a passo na transformação mediada por *Agrobacterium*

1. Propagar vetor binário em *E. coli*
2. Isolar o vetor binário de *E. coli* e inserir um gene de interesse
3. Reintroduzir o vetor modificado em *E. coli* para amplificá-lo
4. Isolar o vetor manipulado de *E. coli* e introduzir em *Agrobacterium* já contendo um Plasmídeo Ti modificado (menor) com genes *vir*
5. Infectar o tecido da planta com *Agrobacterium* modificada



- ❑ Em cada célula, o T-DNA é integrado em um local diferente no genoma
- ❑ Cada célula é hemizigótica para a inserção – apenas 1 dos cromossomos homólogos recebe a inserção
- ❑ Transformação de células vegetais em meio de cultura, seleção de células transformadas e regeneração de toda a planta a partir da célula transformada.





Transformação mediada por protoplastos

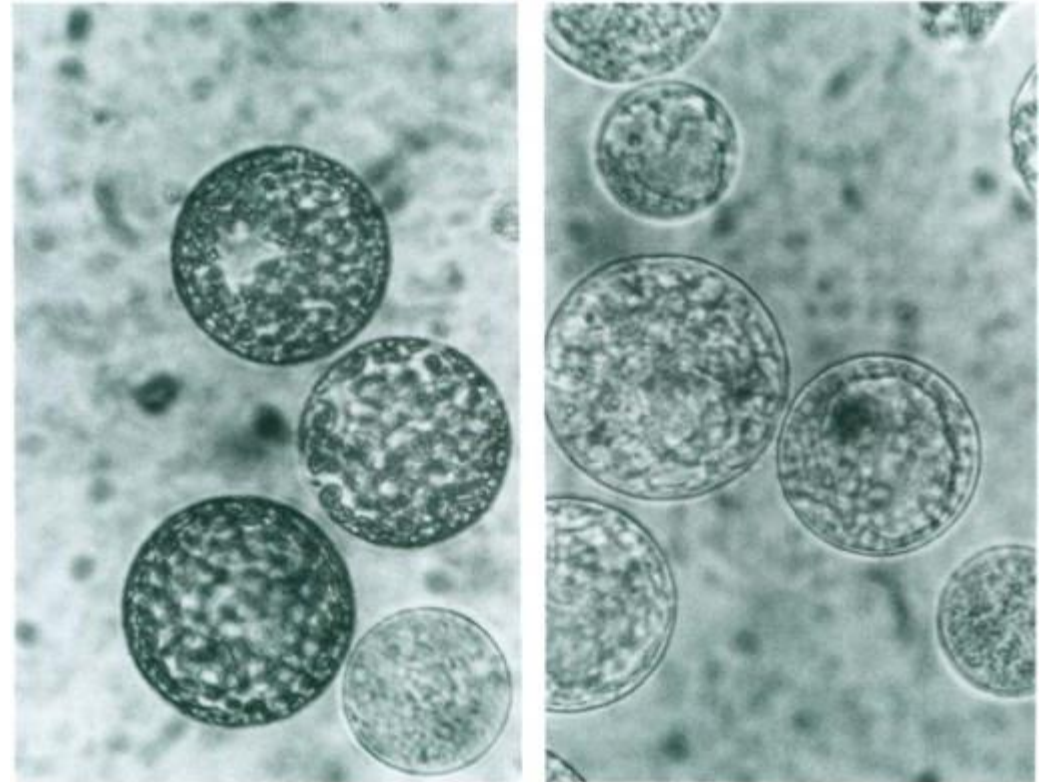
Protoplastos - Células livres de parede celular



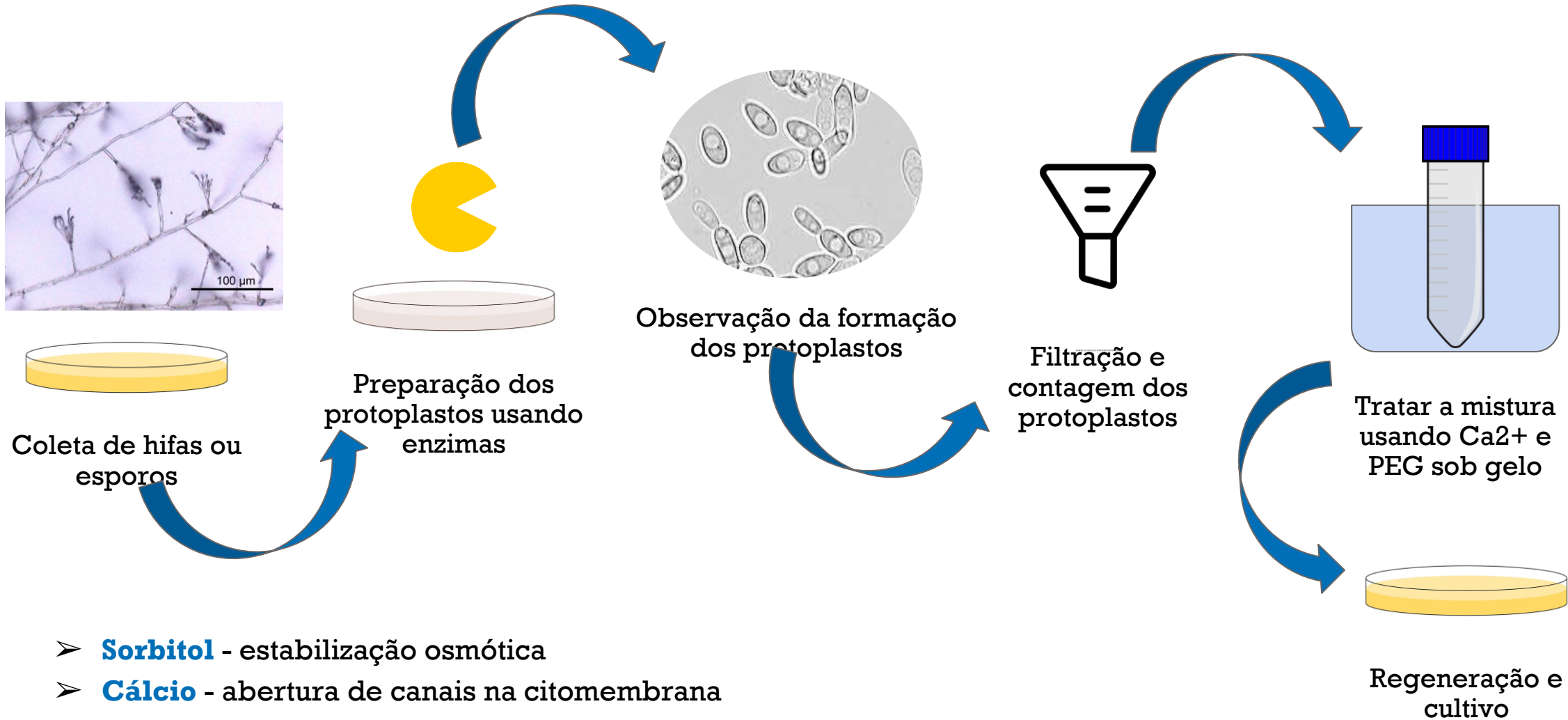
Algumas enzimas removem a parede celular
(planta, fungos)- Celulases e quitinases



Reagentes químicos são utilizados para promover
a fusão entre protoplastos e DNA exógeno



Transformação mediada por protoplastos

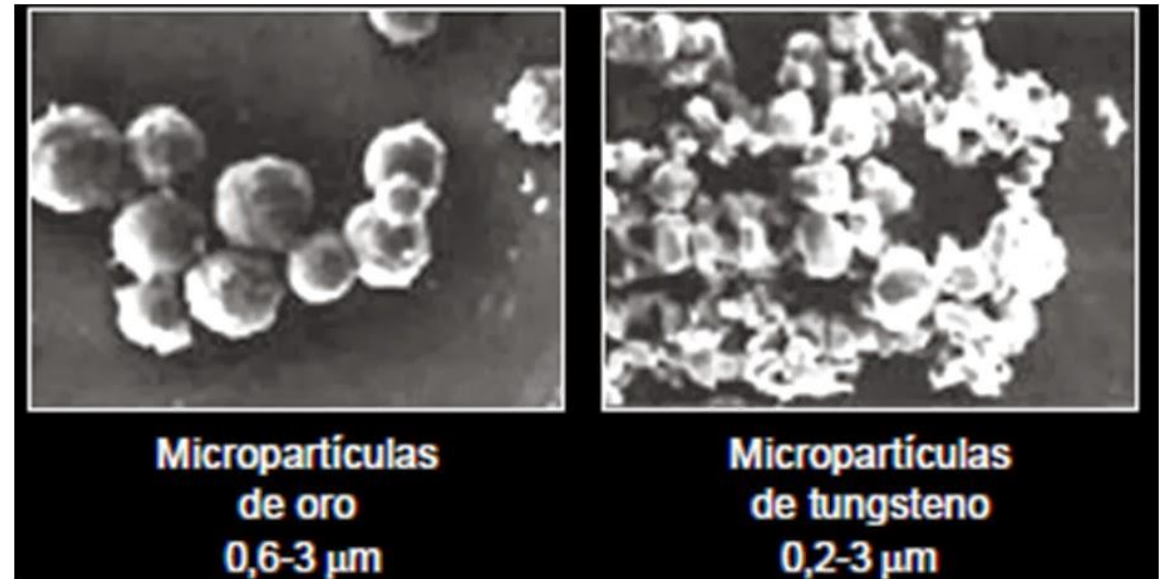
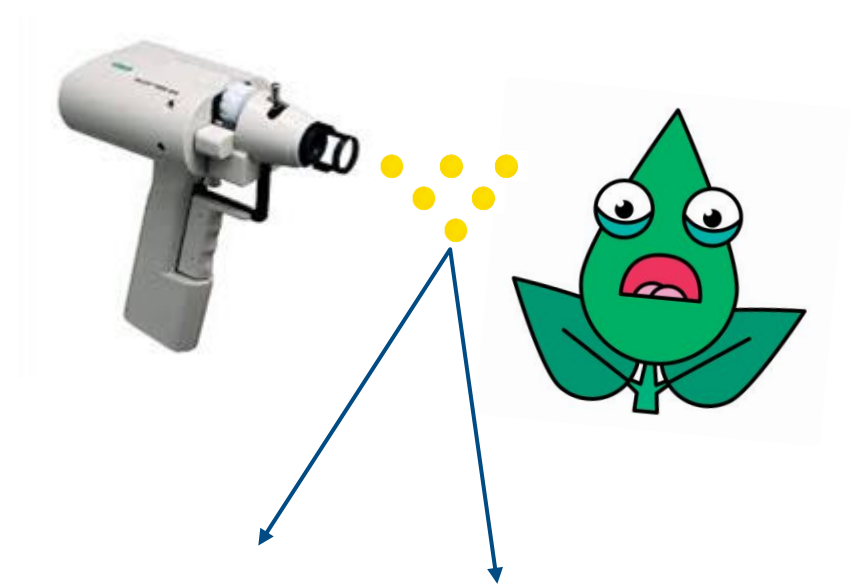


- **Sorbitol** - estabilização osmótica
- **Cálcio** - abertura de canais na citomembrana
- **PEG** - Promotor de fusão nuclear
- Regeneração sem pressão seletiva

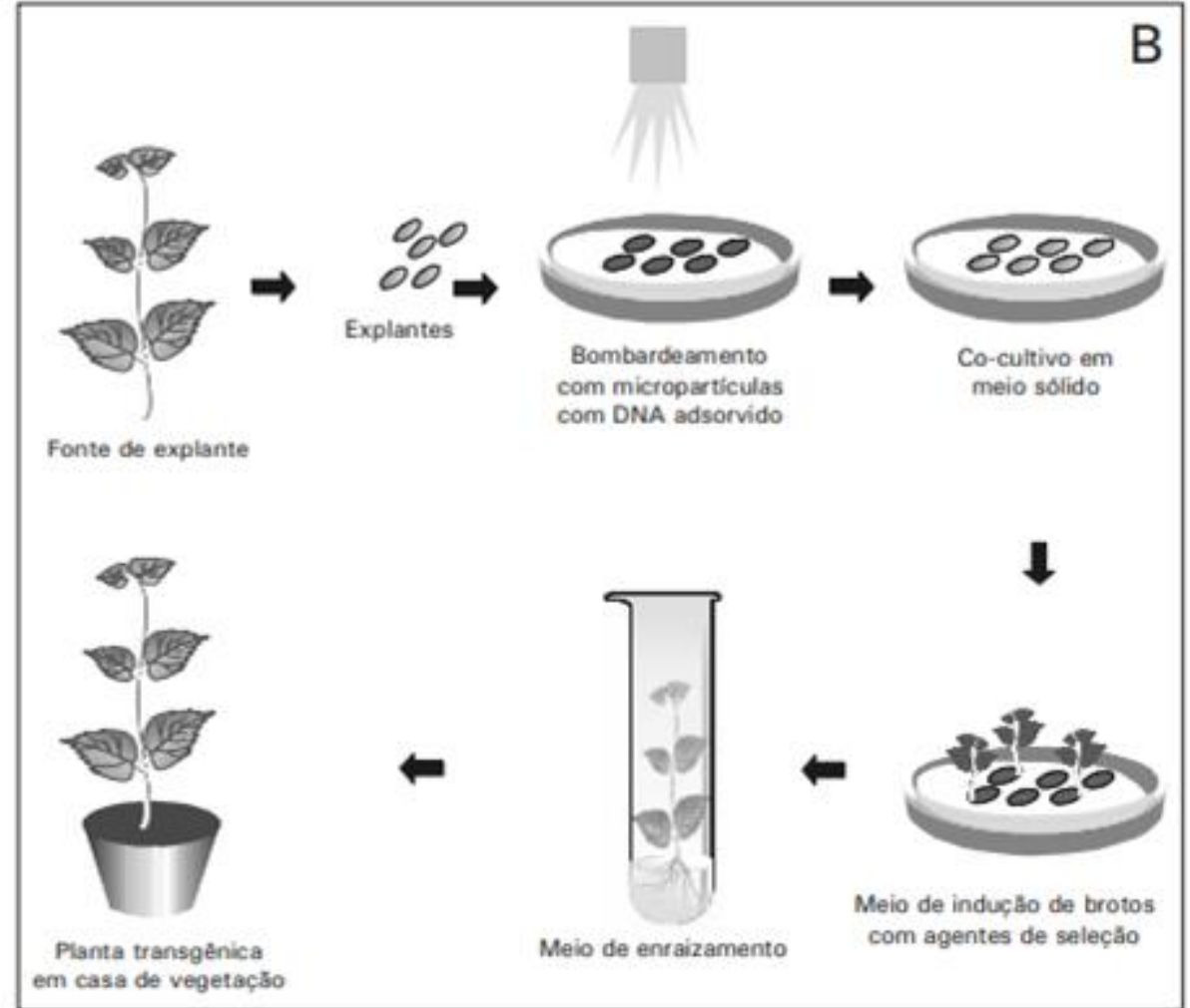
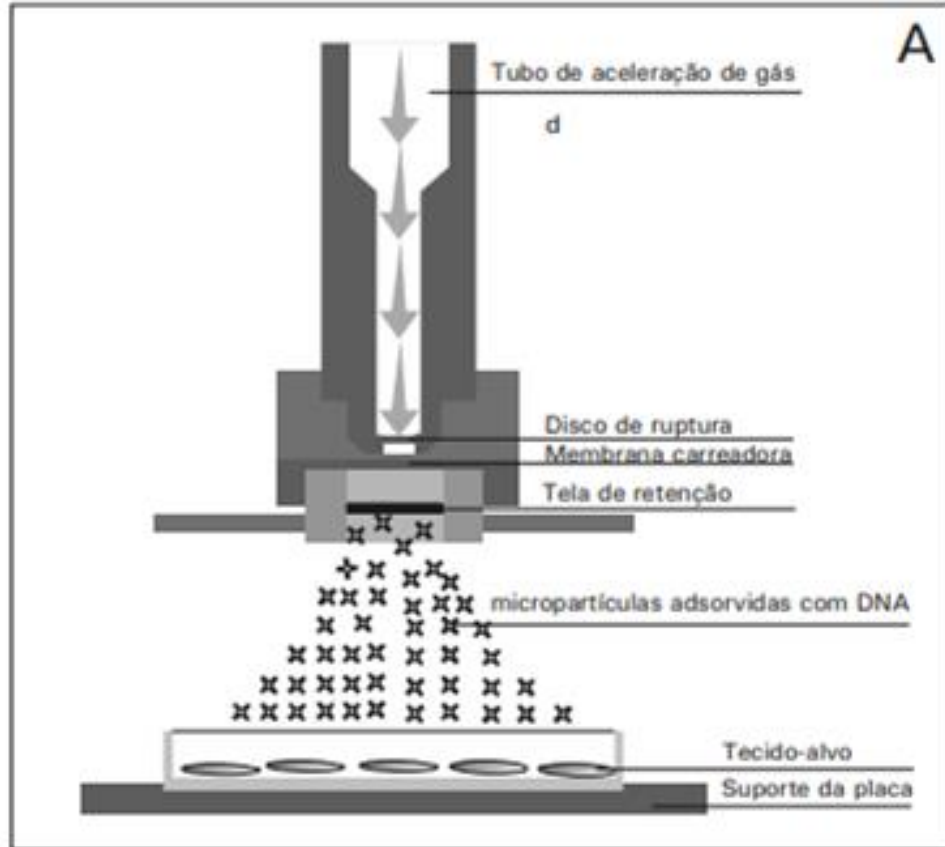


Biolística - Gene gun

- Ampla variedade de células.
- DNA immobilizado em MPs de ouro ou tungstênio (0,5–5 μm).
- Descarga elétrica ou pulso de hélio pressurizado.
- Superam a parede celular e epiderme.
- Transfecção *in vivo* e *in vitro*.
- Uso em organismos difíceis de cultivar ou com difícil preparo de protoplastos.

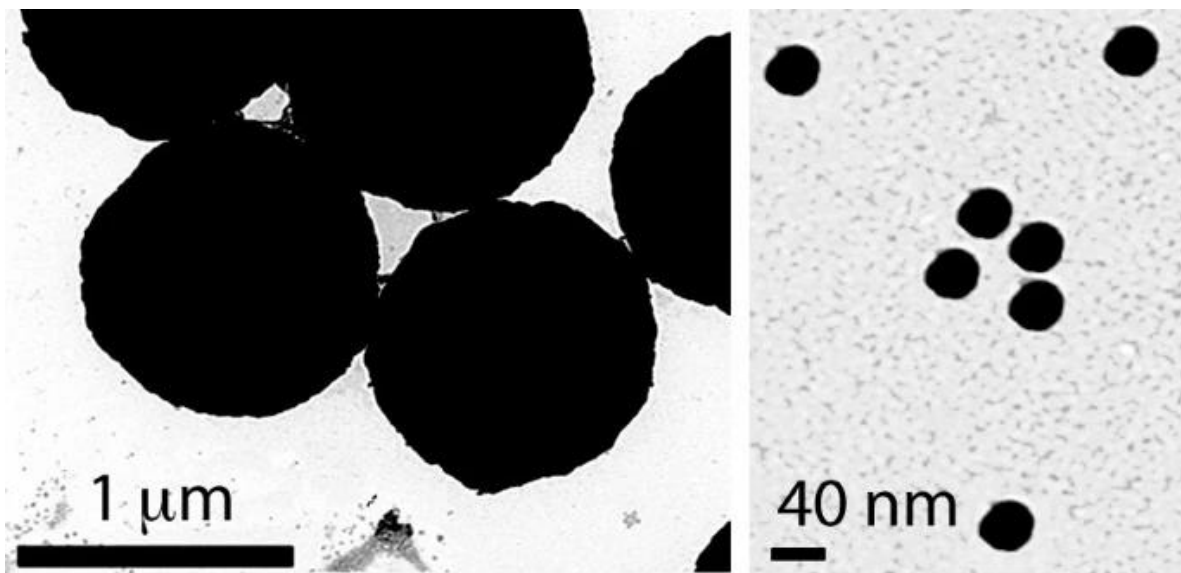


Biolística - Gene gun



Nano-biolytics: a method of biolytic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles

John A O'Brien¹ and Sarah CR Lummis^{1,2*}

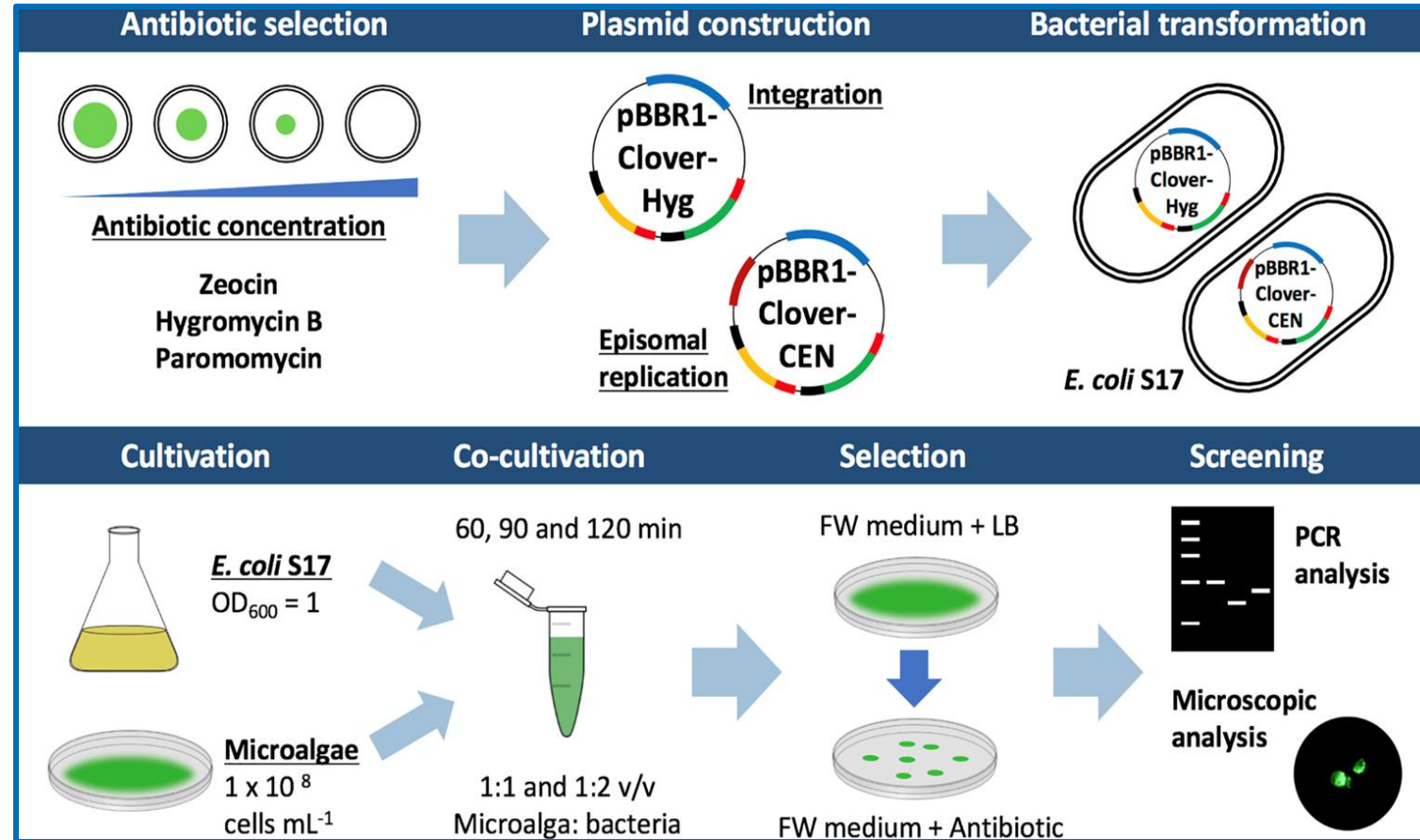
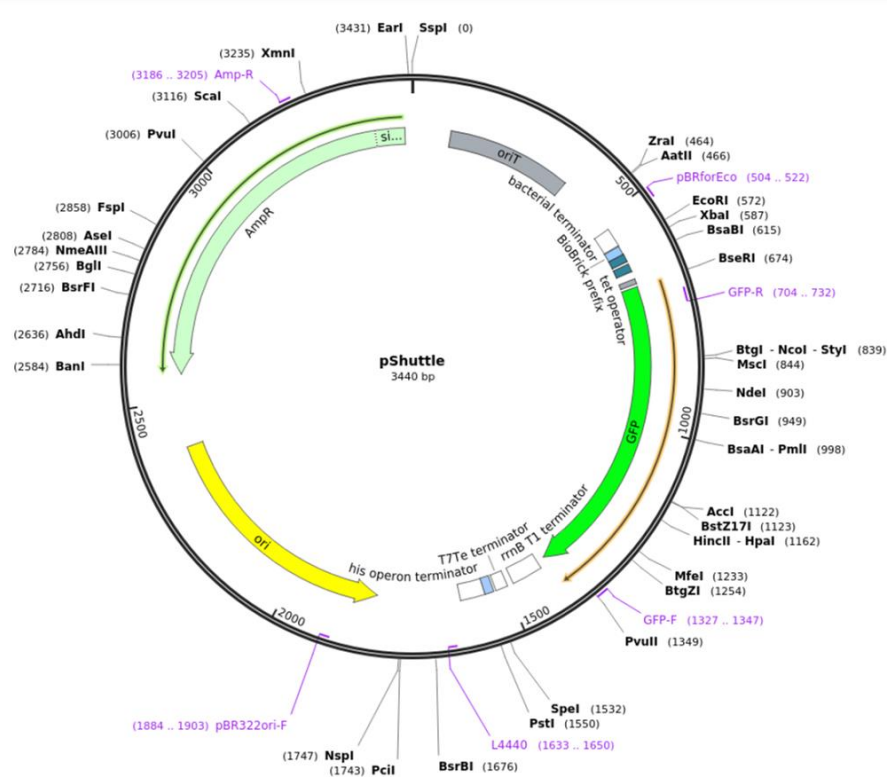


- **Nanobiolística** - Uma modificação do método biolístico.
- Partículas menores do que **40 nm**.
- Adequado para uso em células pequenas e para entrega no cloroplasto ou mitocôndria.



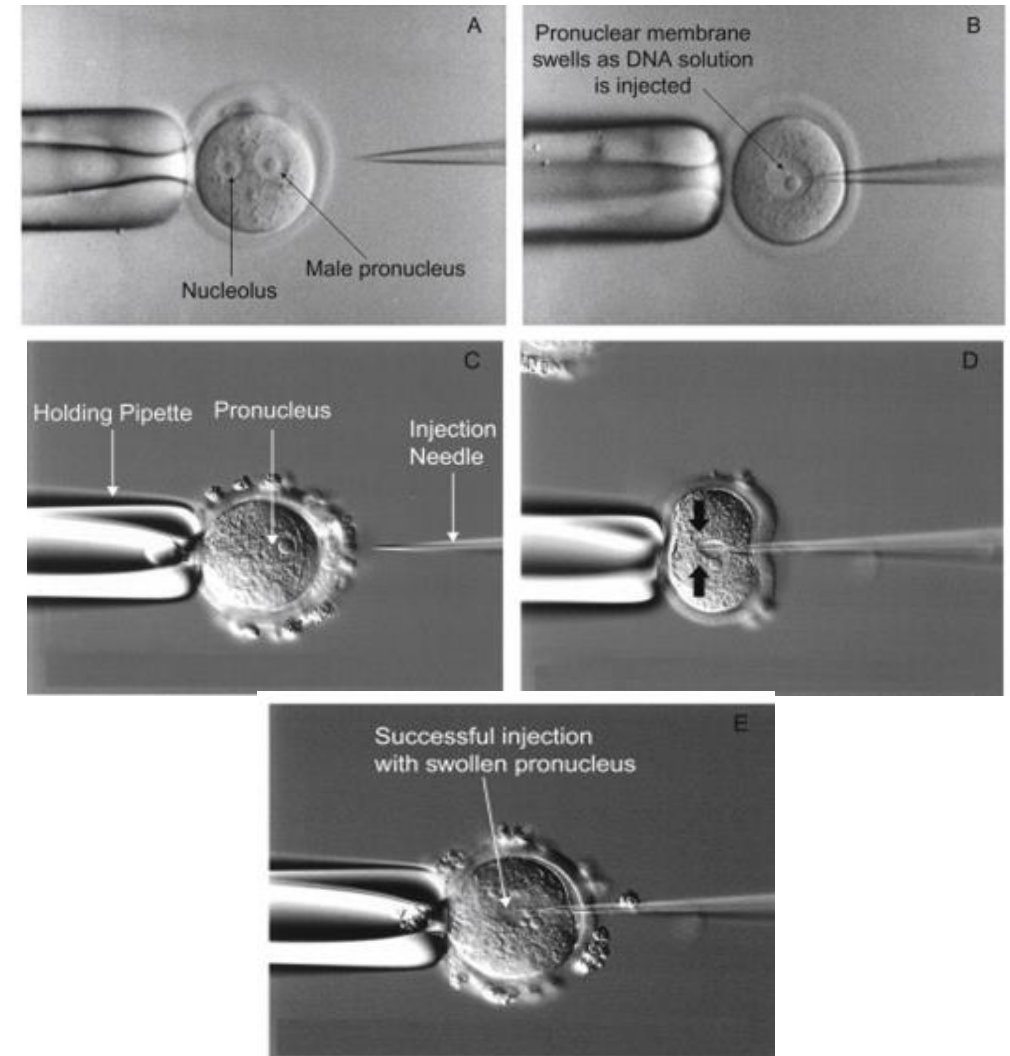
Conjugação

Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation



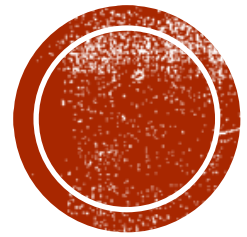
Microinjeção

- Método direto para introduzir DNA no citoplasma ou no núcleo de uma célula.
- Pipeta microcapilar de vidro + dispositivo de posicionamento de precisão (200 a 400 x de ampliação) para controlar o movimento da micropipeta + microinjetor.
- Extrusão do material genético através da micropipeta por pressão hidrostática.



Métodos de Transformação	Vantagens	Desvantagens
Mediada por <i>Agrobacterium</i>	Meio natural de transferência Eficiente Grandes fragmentos de genes Integração do T-DNA é precisa Excelente estabilidade do gene	Genótipo específica Variação somaclonal Regeneração lenta Incapacidade de transferir múltiplos genes
Fusão de Protoplastos	Sem necessidade de equipamentos caros Rápido Alta taxa de transformantes estáveis	Muitas etapas Citotoxicidade Baixa regeneração
Biobalística	Capacidade de superar barreiras físicas como a parede celular Transfecção de grandes quantidades de células por uso único Reduzida degradação do gene Versátil e adaptável a uma ampla gama de células e tecidos Genótipo independente	Requer dispositivos e reagentes caros Dano tecidual Capacidade de regeneração limitada Integração de sequências de DNA rearranjadas ou truncadas
Conjugação	Não requer equipamentos caros Poucas etapas	Baixa eficiência
Microinjeção	Simples Eficiência de até 100% em células viáveis Dosagem precisa do material Entrega seletiva do material no citosol ou núcleo	Difícil de aplicar Procedimento trabalhoso Não é possível injetar mais de 100-200 células em cada tratamento

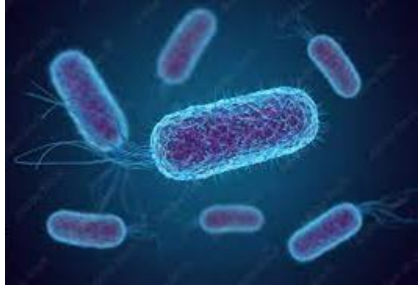




Organismos modelos e desafios



Organismos Modelos



E. coli



Chlamydomonas reinhardtii



Drosophila melanogaster



Mus musculus



Saccharomyces cerevisiae



Danio rerio



Caenorhabditis elegans



Arabidopsis thaliana

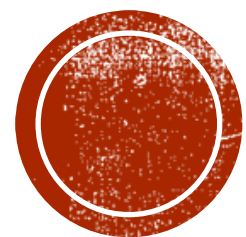
Estudos funcionais, desenvolvimento biotecnológico, terapia gênica, melhoria de plantas e animais, medicina...



Desafios

- Regulamentação: muitos países têm regulamentações rigorosas sobre a produção e uso de OGMs, além da dificuldade em harmonizar as regulamentações de diferentes países, o que pode limitar seu uso global;
- Baixa eficiência de transformação e regeneração em espécies de plantas recalcitrantes e protocolos genótipo dependentes;
- Desenvolvimento de métodos de transformação eficientes para espécies não modelo;
- Ciclo de vida heterocariótico em fungos (cél. monocarióticas) e espessura da parede celular;
- O escurecimento e a necrose dos tecidos após a infecção por *Agrobacterium* na transformação genética de cereais - agentes inibidores de necrose, como nitrato de prata, para aumentar a eficiência da transformação;
- Na infecção por patógenos, um dos primeiros mecanismos de defesa ativado é a produção de espécies reativas de oxigênio - explosão oxidativa, que ativa a morte celular programada (HR). Foi demonstrada correlação entre a redução na morte celular e a melhora na frequência de transformação;
- A supressão da resposta de defesa do hospedeiro pode ser um fator para a transformação bem-sucedida da planta.





Referências



Referência

S

- Sartoretto, L. M., Saldanha, C. W., Corder, M. P. M. (2008). Transformação genética: Estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, 38(3), 861–871. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000300046>
- Hutchison, H. T., Hartwell, L. H. (1967). Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. *Journal of Bacteriology*, 94(5), 1697–1705. <https://doi.org/10.1128/jb.94.5.1697-1705.1967>
- Cai, Y., Hartnett, B., Gustafsson, C., & Peccoud, J. (2007). A syntactic model to design and verify synthetic genetic constructs derived from standard biological parts. *Bioinformatics*, 23(20), 2760–2767. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm446>
- Anton, B. P. (2013). Vectors. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 277–280). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.01621-1>
- Alam, J.; Cook, J. L. (1990). Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry*, 188(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90601-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90601-5)
- Li, D., Tang, Y., Lin, J. et al. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microb Cell Fact* 16, 168 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>
- O'Brien, J.A., Lummis, S.C. Nano-biostics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC Biotechnol* 11, 66 (2011). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-66>
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 206–209. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x>
- Muñoz, C. F., Sturme, M. H. J., D'Adamo, S., Weusthuis, R. A., & Wijffels, R. H. (2019). Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. *Algal Research*, 39, 101453. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101453>
- Barber MA (1911) A technique for the inoculation of bacteria and other substances into living cells. *J. Infec. Diseases* 8: 348–352
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of plant transformation- A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>





OBRIGADO!!!!

