

Clonagem de DNA e Biologia Sintética

Prof. Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química – USP

QBQ 1354
Química noturno

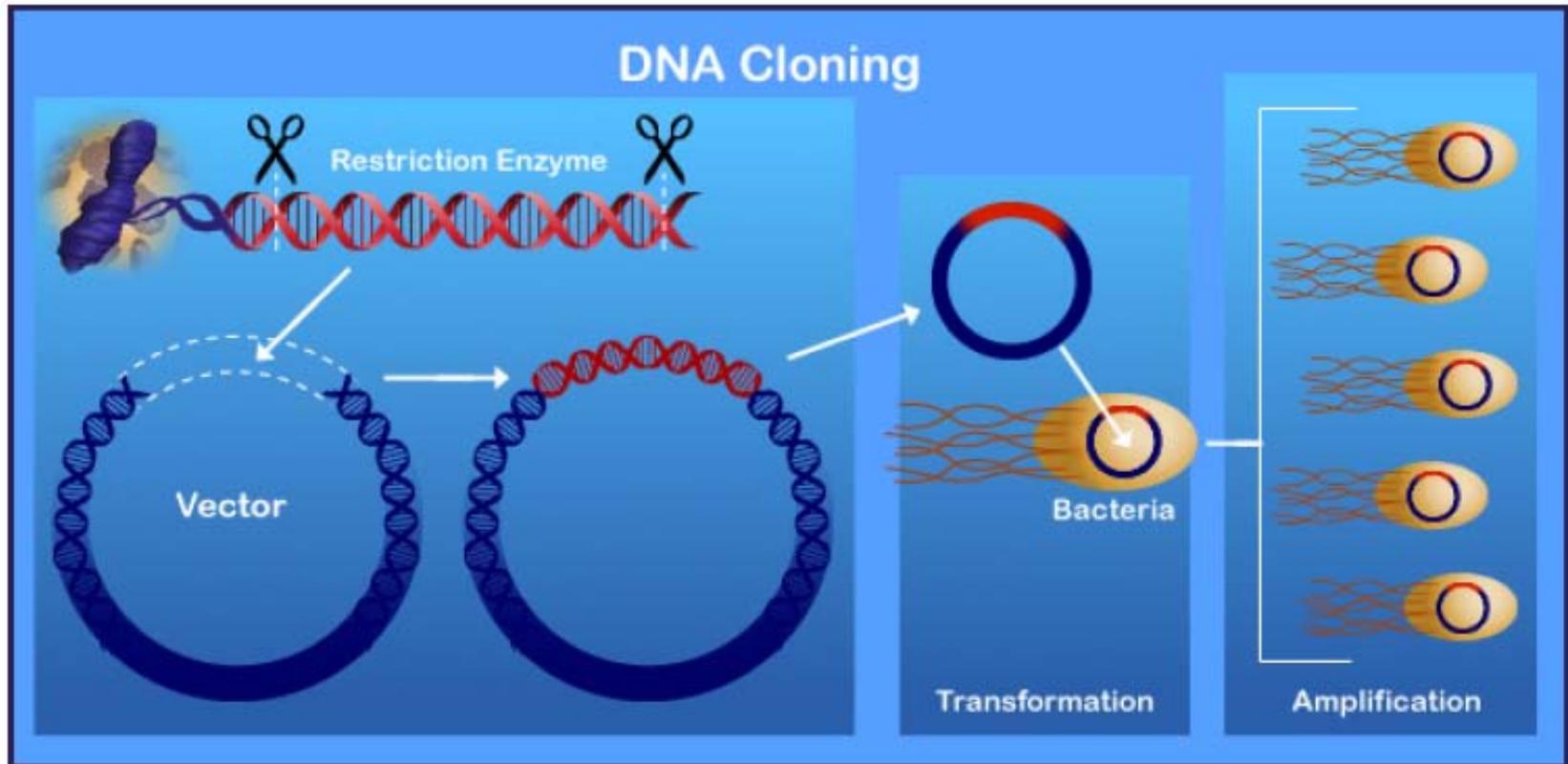
Clonagem de DNA

Permite a produção de cópias *in vivo* de um fragmento específico de DNA

Algumas aplicações:

- Isolamento de genes de interesse para análises moleculares
- Determinação da sequência de bases de genes de interesse para inferir sobre a sequência de aminoácidos (sequenciamento de DNA)
- Expressão heteróloga de proteínas de interesse farmacêutico ou biotecnológico (ex. Insulina, fator de crescimento humano, proteínas virais para vacinas, etc.)

Tecnologia do DNA recombinante



para cortar DNA e juntar pedaços diferentes de DNA necessita-se de enzimas

Enzimas de restrição

endonucleases que digerem DNA de dupla fita em sequências específicas (**palíndromos**)

Socorram-me subi no ônibus em Marrocos

Anotaram a data da maratona

Erro comum ocorre

corde com pontas cegas

*Sma*I

T A C T C C C C | G G G C C G A T
A T G A G G G G | C C C G G C T A

corte com pontas coesivas

EcoRI

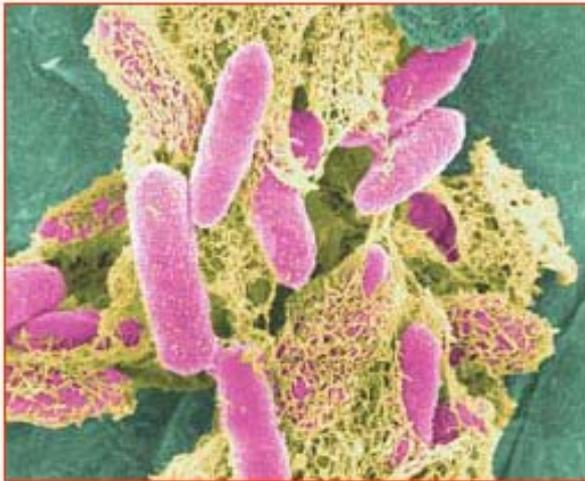
T A C T C G A A T T | C C C G A T
A T G A G C | T T A A G G G C T A

A nomenclatura é dada de acordo com a bactéria de origem

Escherichia coli

gênero

espécie

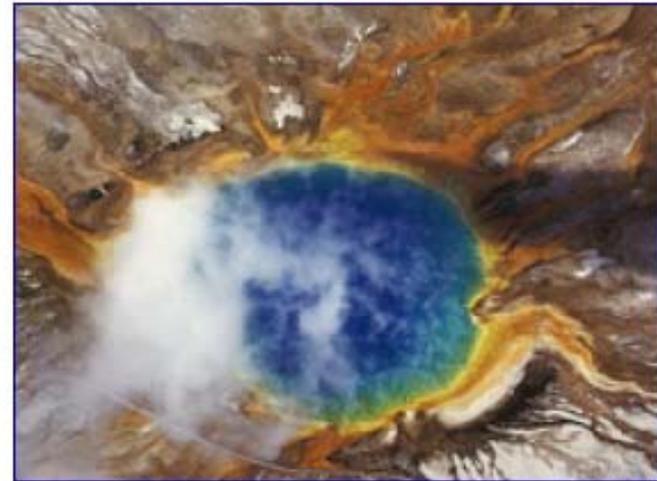


Eco RI

Thermus aquaticus

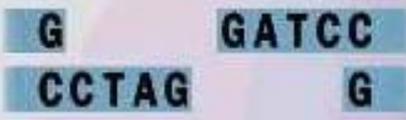
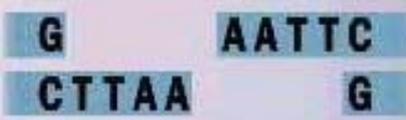
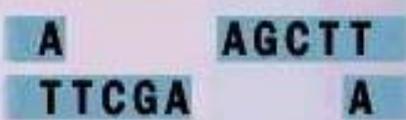
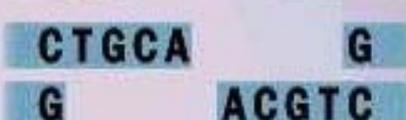
gênero

espécie

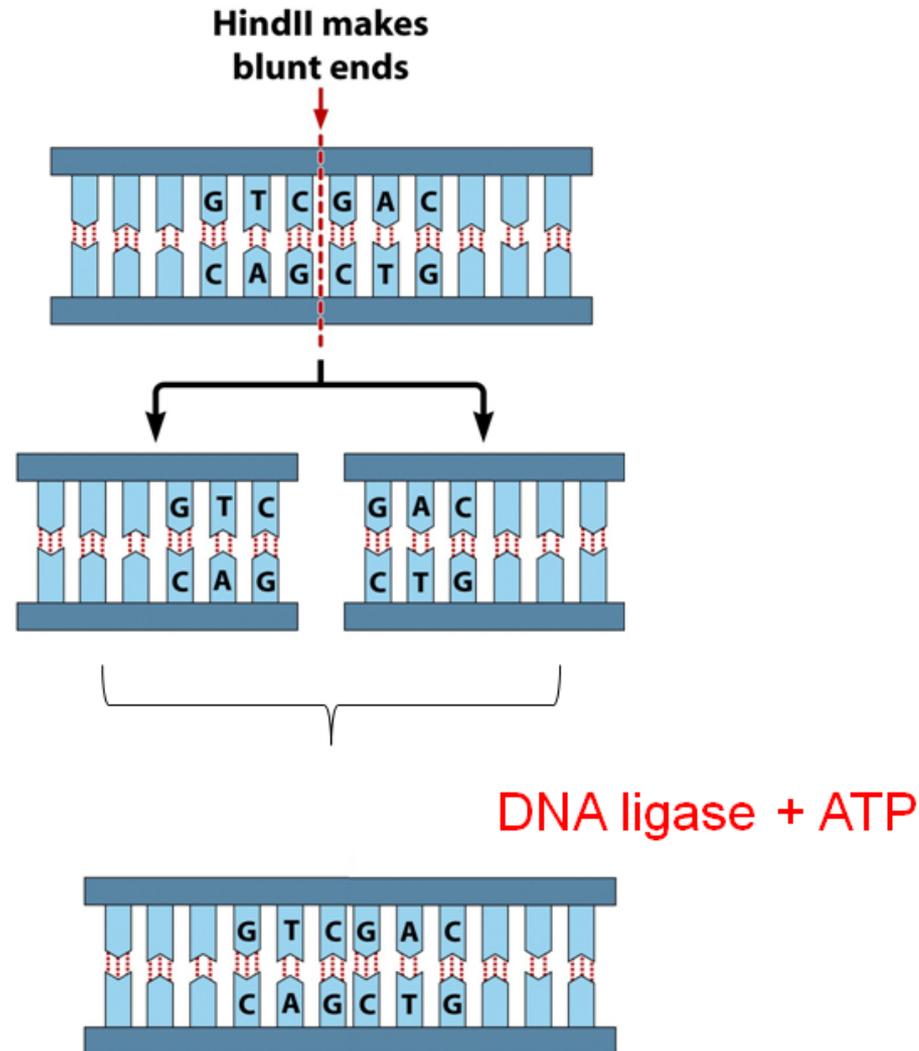


Taq I

Há centenas de enzimas de restrição diferentes

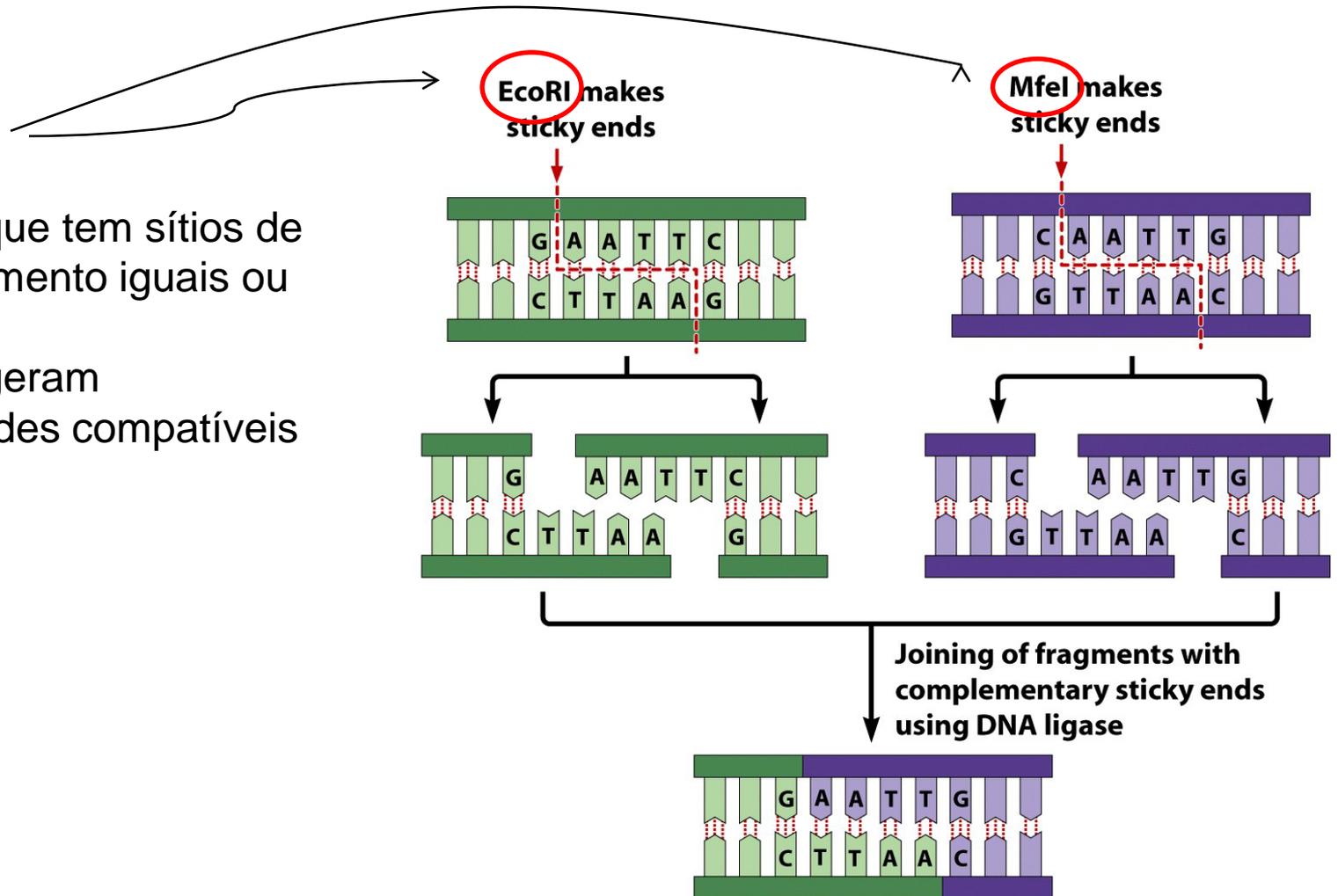
<i>Enzima</i>	<i>Seqüência</i>		<i>Produto</i>
<i>Bam</i> HI		→	
<i>Eco</i> RI		→	
<i>Hind</i> III		→	
<i>Hae</i> III		→	
<i>Pst</i> I		→	
<i>Sma</i> I		→	

Fitas duplas de DNA com extremidades compatíveis podem ser religadas



Fitas duplas de DNA com extremidades compatíveis podem ser religadas

Enzimas que tem sítios de reconhecimento iguais ou distintos, mas que geram extremidades compatíveis

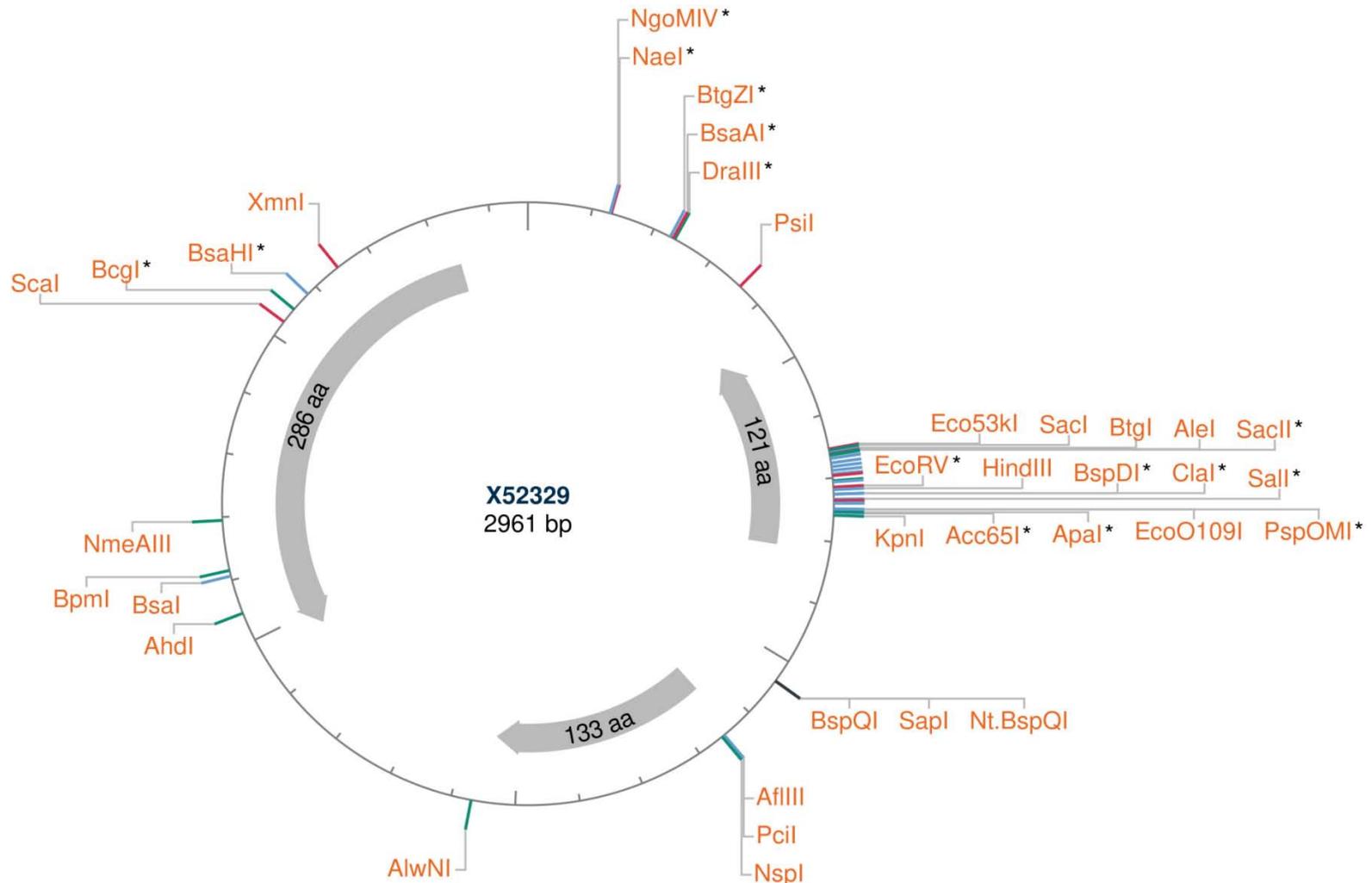


Sítios de corte de enzimas de restrição em um plasmídeo

Gene Bank number: X52329

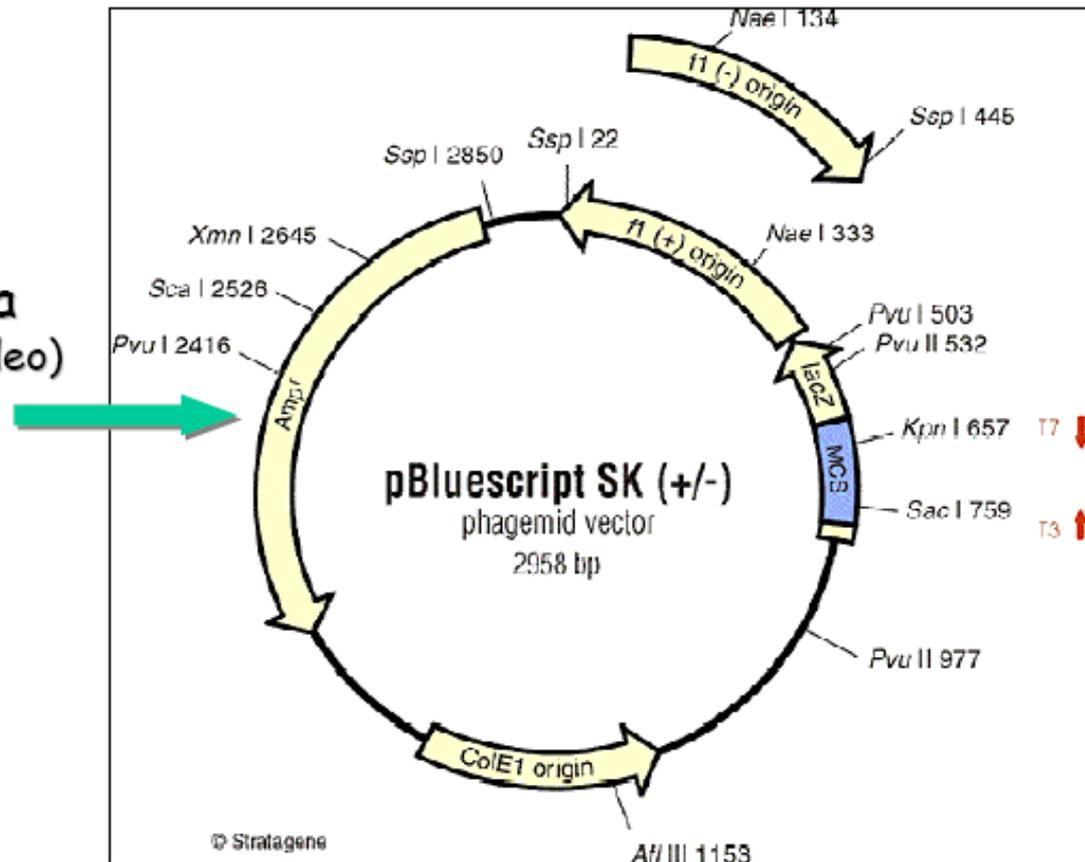
pBluescript II KS(-) vector

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>



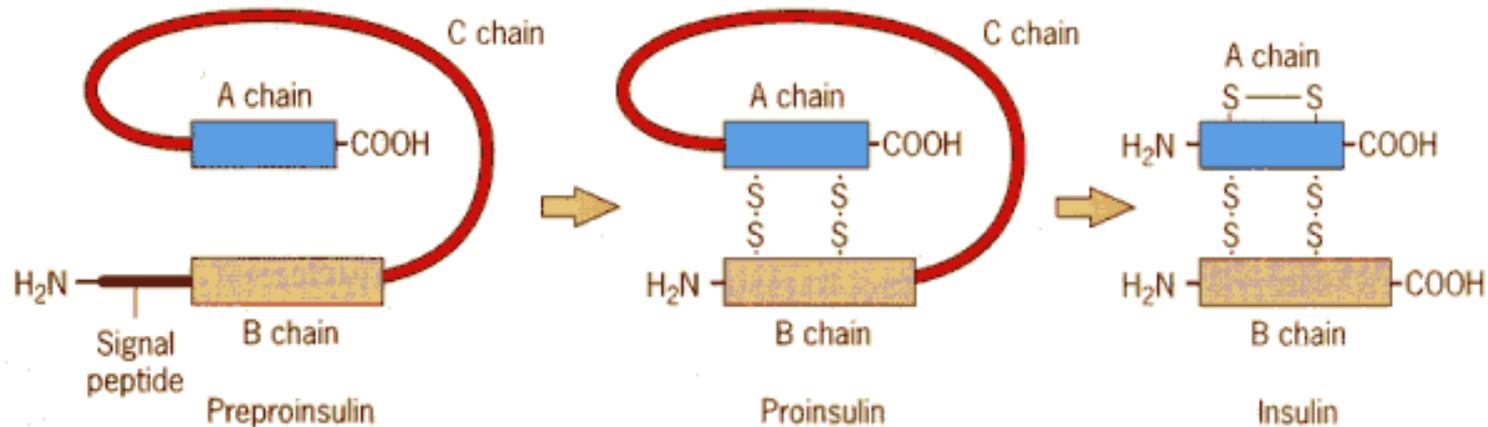
Clonagem de um gene em um plasmídeo

gene de resistência
(um dos genes do plasmídeo)



Ex. Clonagem do gene da preproinsulina (PPI)

Insulina: controle dos níveis de glicose no sangue, metabolismo de açúcares, proteínas e lipídeos



• **Preproinsulina:** 110 a.a

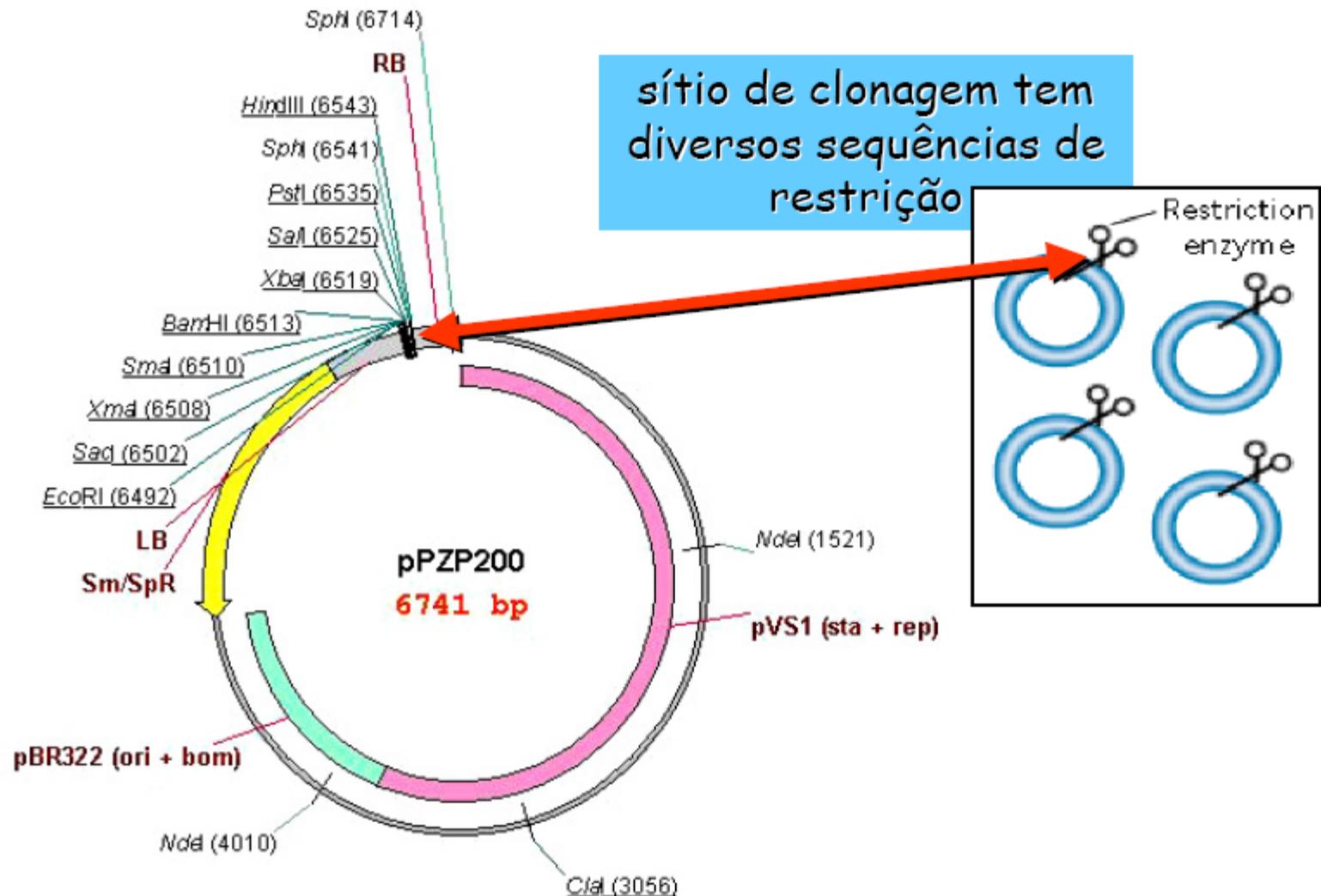
Peptídeo sinal, cadeia A, B e C

• **Proinsulina:** remoção do peptídeo sinal para localização no] Retículo Endoplasmático

• **Insulina:** 51 a.a.

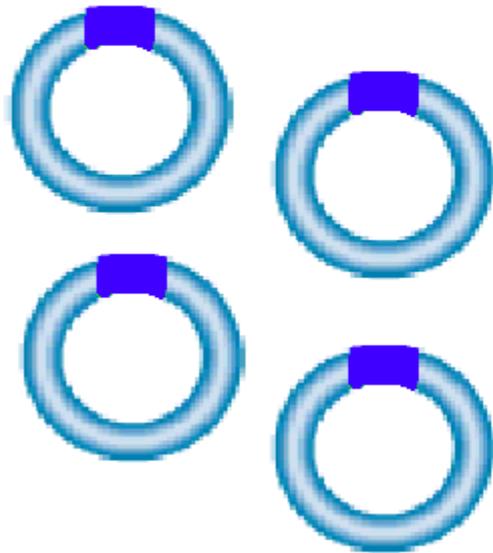
clivagem enzimática do peptídeo C, formação de pontes dissulfeto.

Digestão do plasmídeo com enzimas de restrição

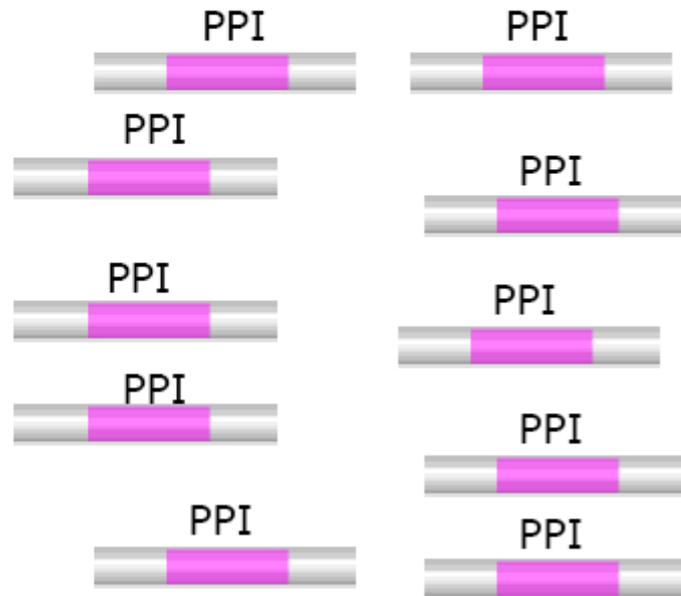


Clonagem do gene da preproinsulina (PPI)

PLASMÍDEOS BACTERIANOS
"VETORES"

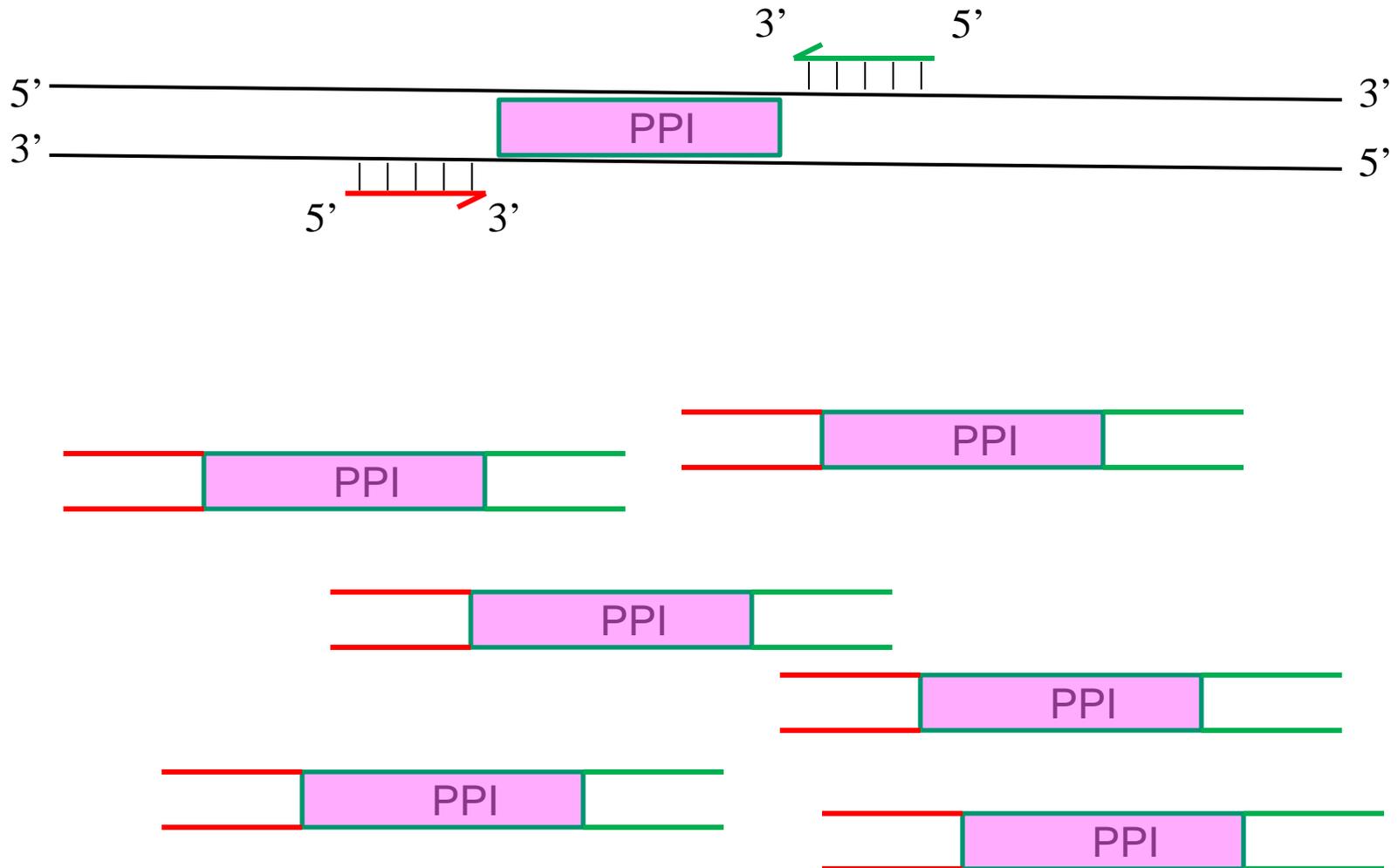


FRAGMENTOS DE PCR
"INSERTO"



Como obter o fragmento de DNA de interesse?

Amplificação por PCR



Adição de sítios de enzimas de restrição apropriados para a ligação utilizando PCR

O anelamento de algumas bases na extremidade 3' do primer é suficiente para que a DNA polimerase sintetize a fita complementar

A extremidade 5' é desenhada para criar o sitio de ligação da enzima de restrição que será usada para a clonagem do fragmento

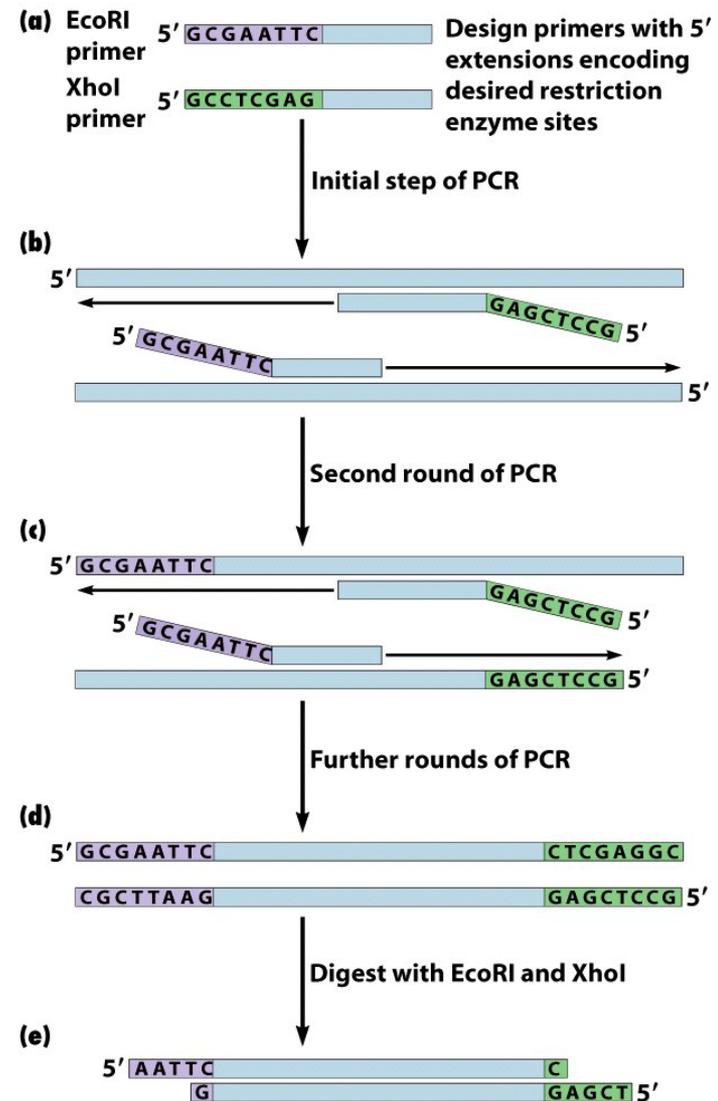
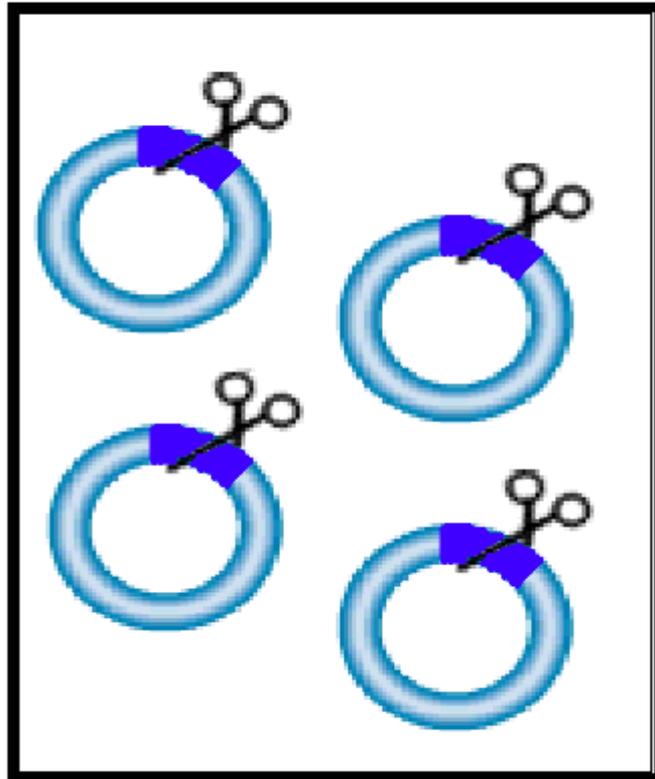
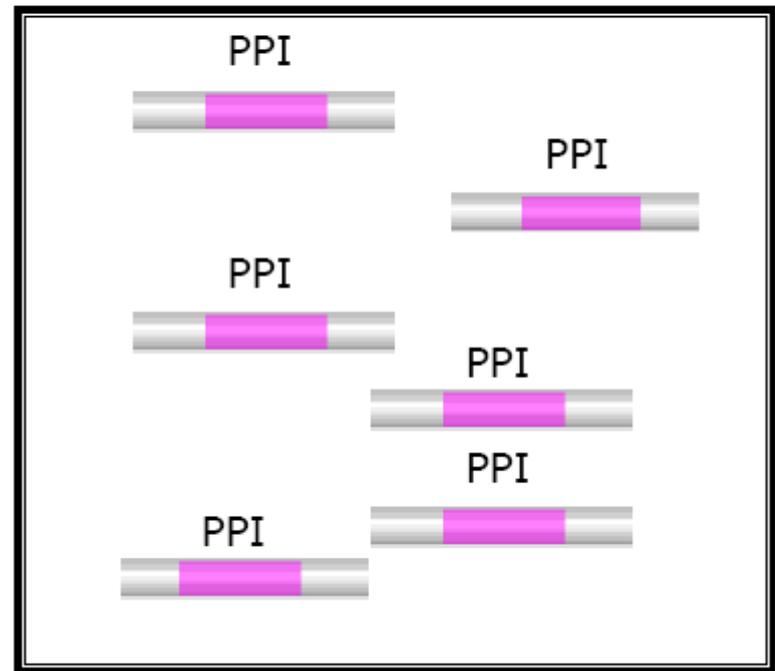


Figure 6-1
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W.H. Freeman and Company

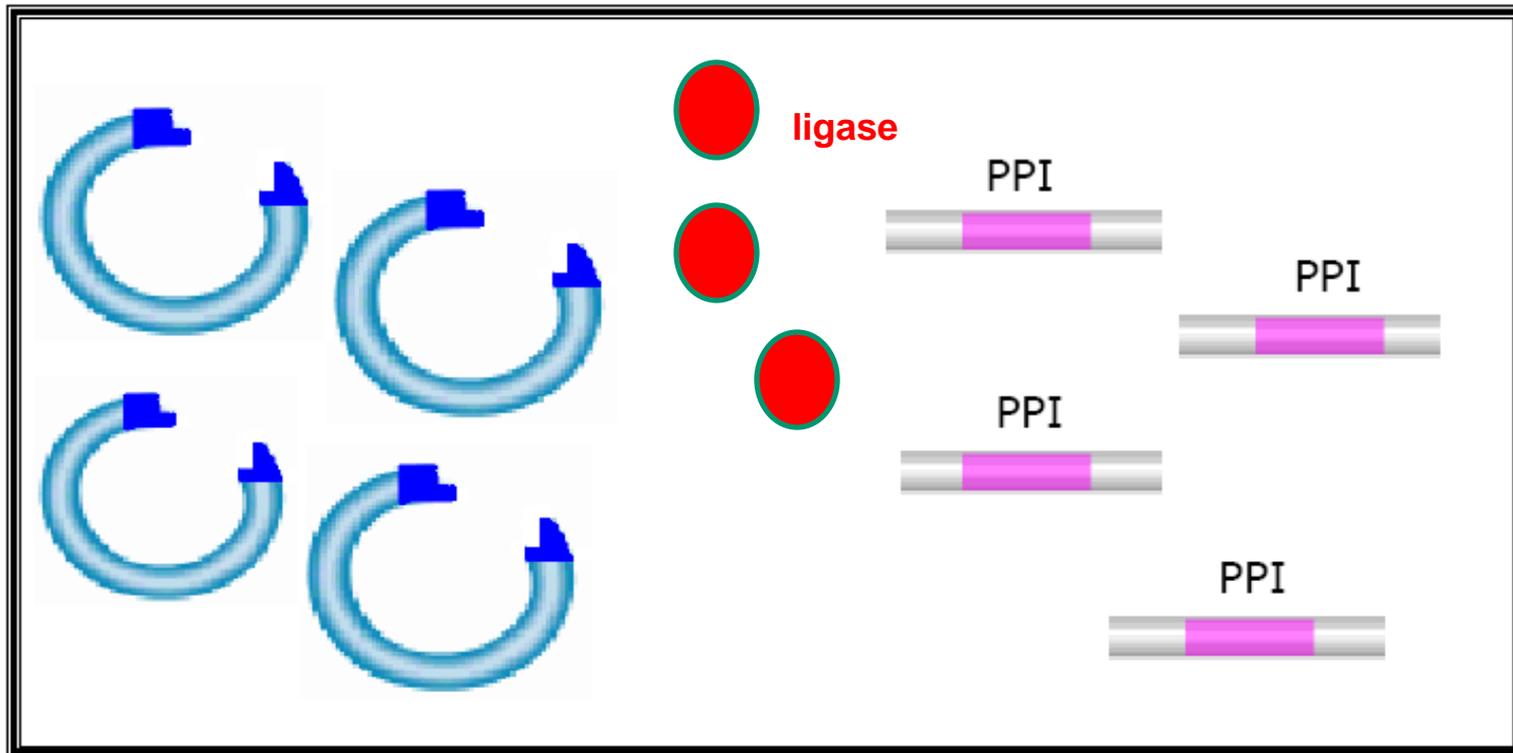
ENZIMA DE RESTRIÇÃO



INSERTOS PURIFICADOS

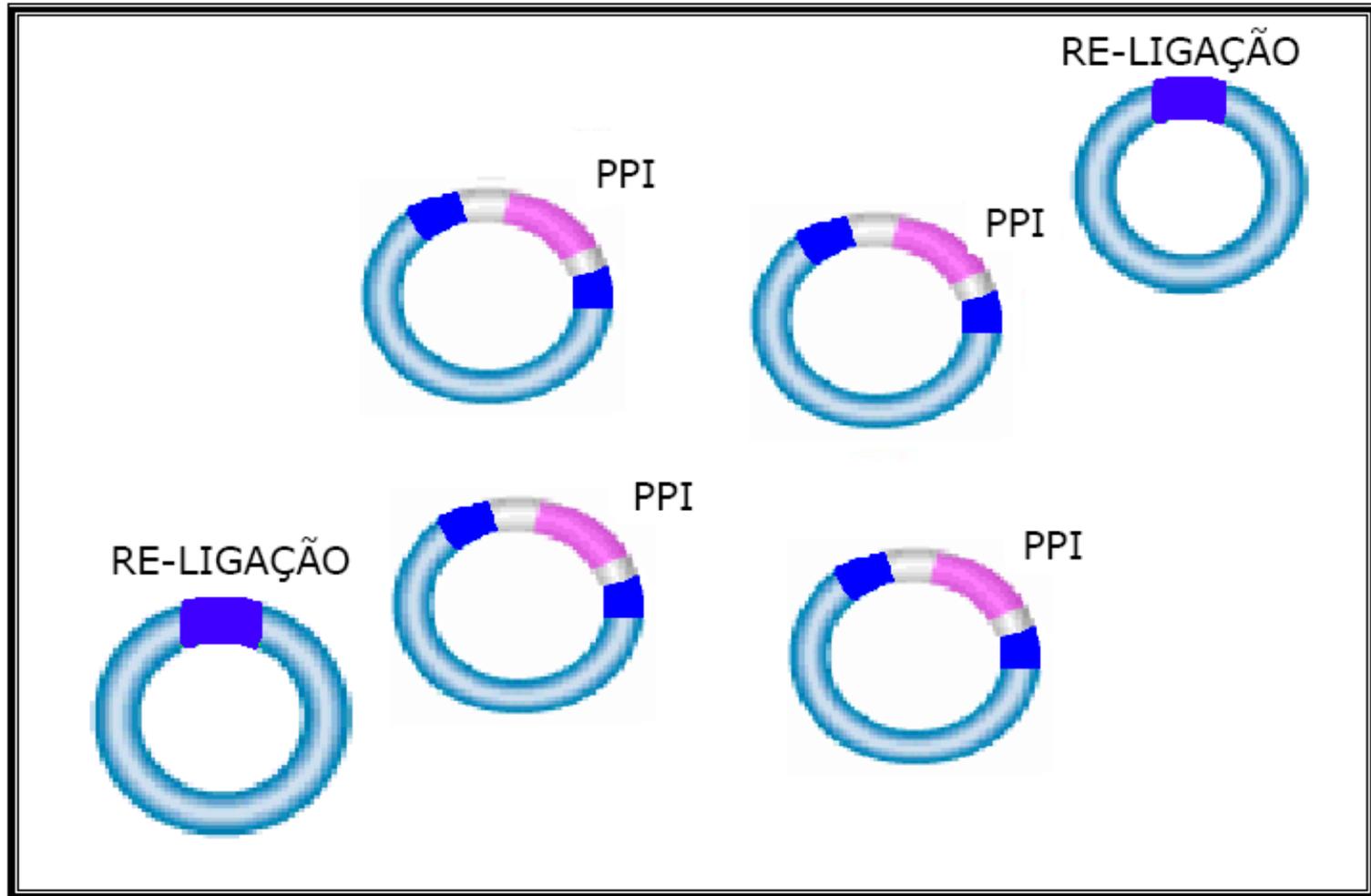


Ligação do vetor com inserto

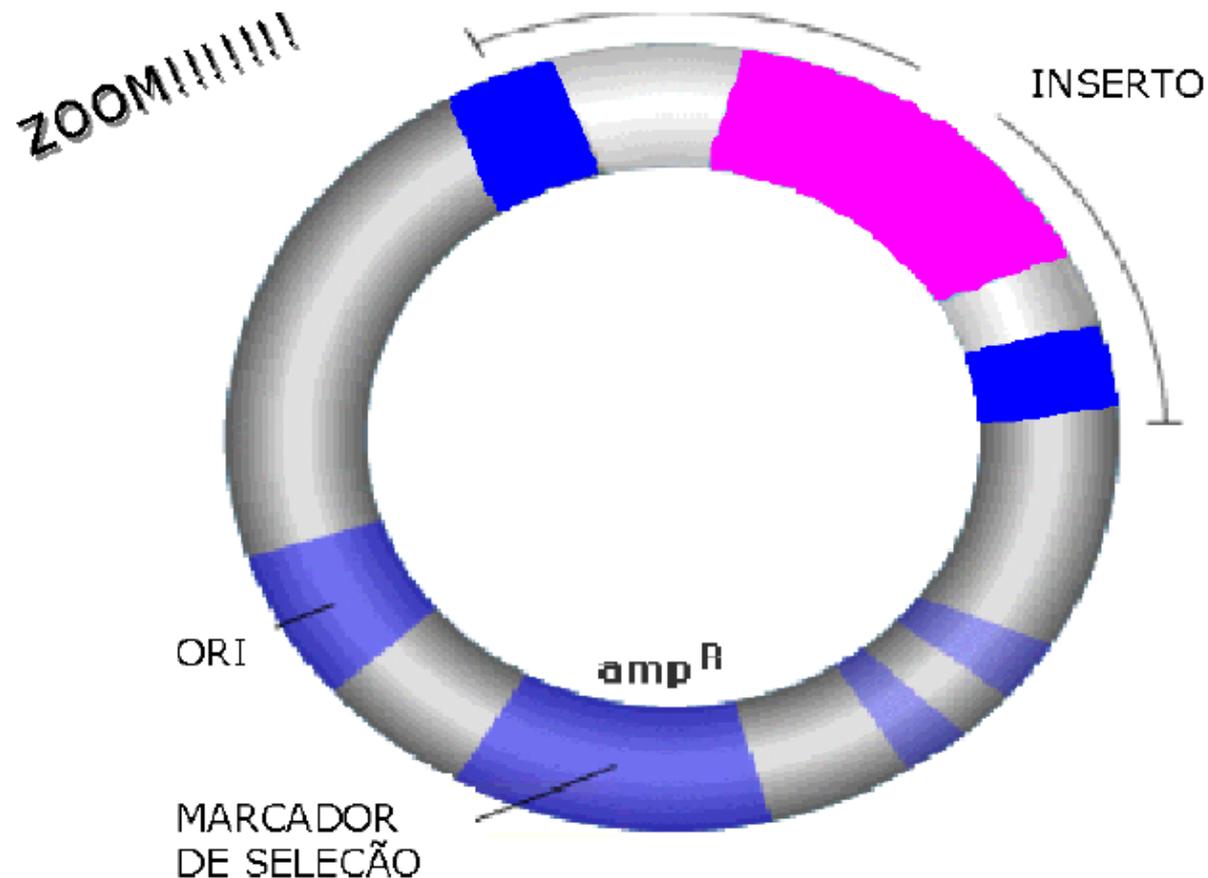


- Fragmento de DNA (PPI) + vetor digerido com extremidades compatíveis
- **DNA ligase**

Ligação do vetor com inserto

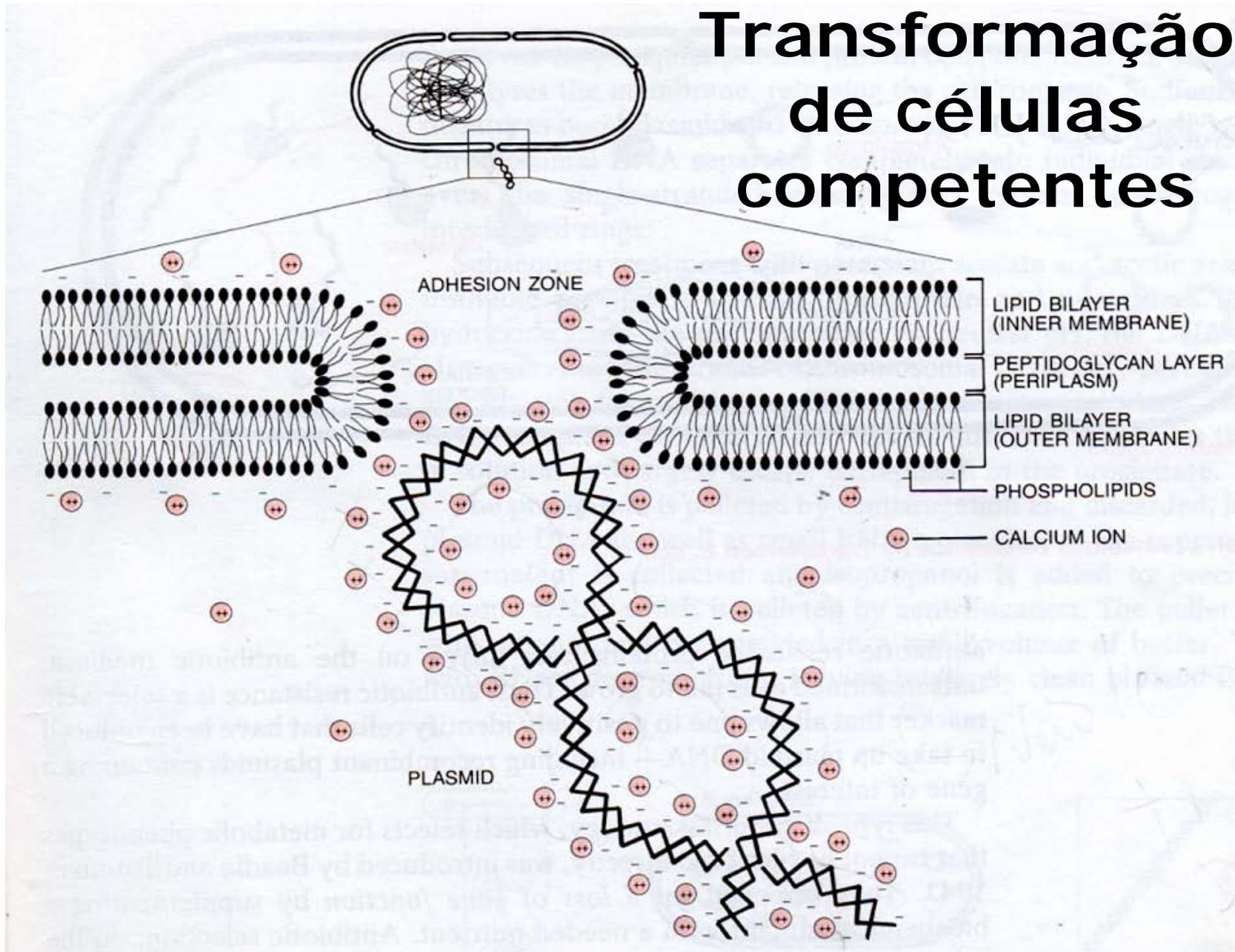


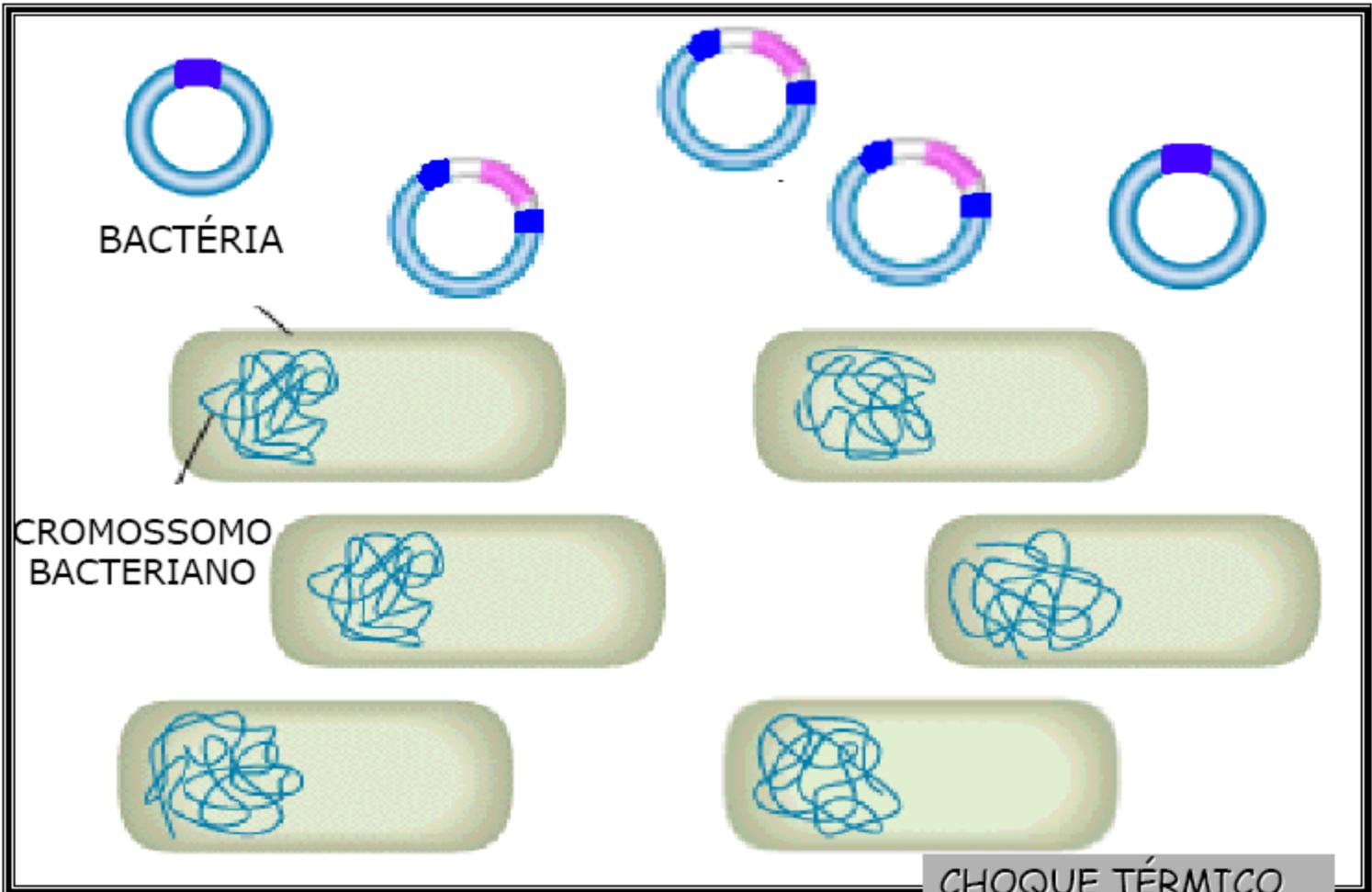
Após ligação do inserto o plasmídio se encontra novamente circularizado



COMO FAZER CÓPIAS DESTES PLASMÍDEO RECOMBINANTE?

Transformação de células competentes



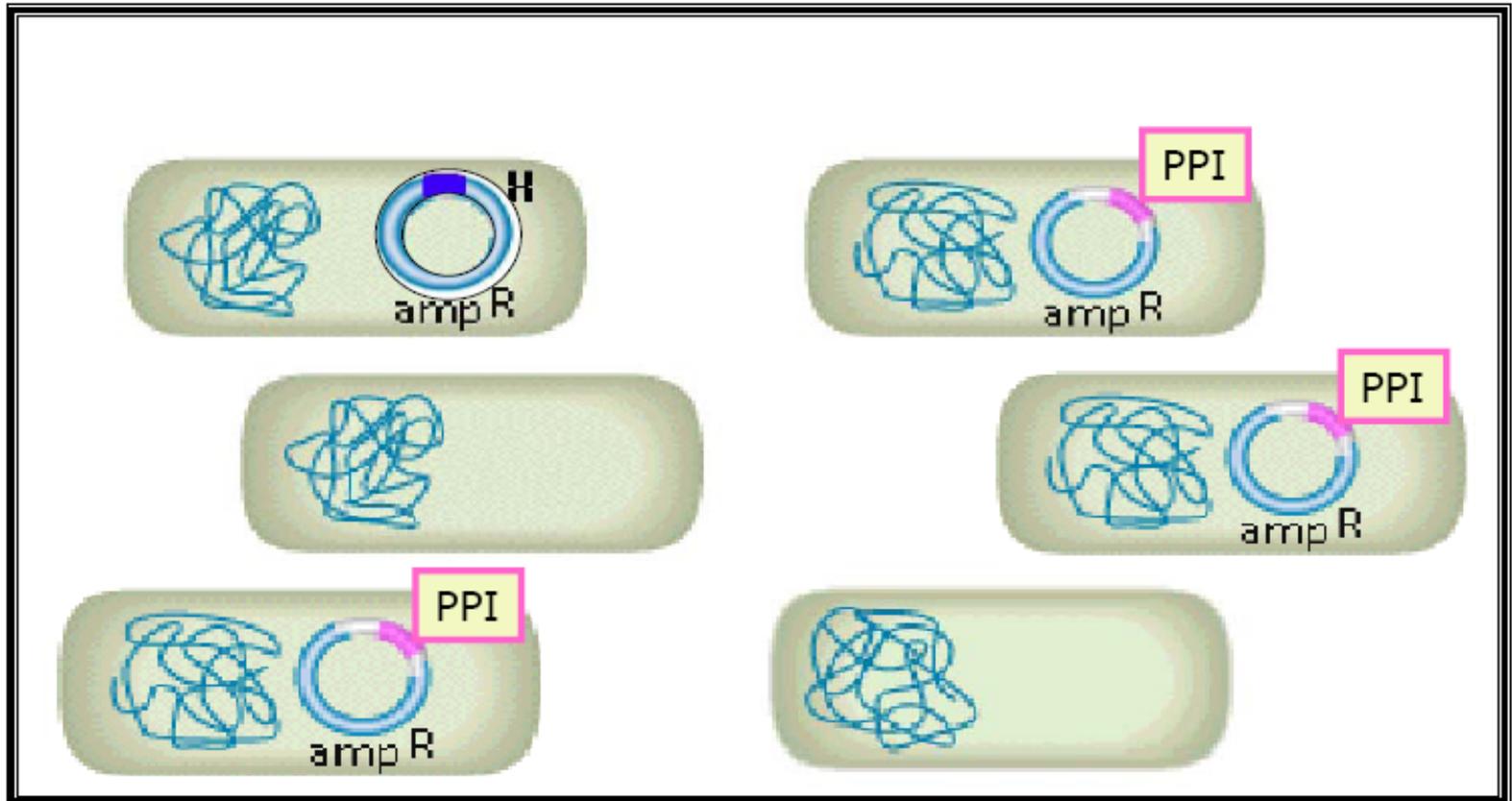


BACTÉRIA

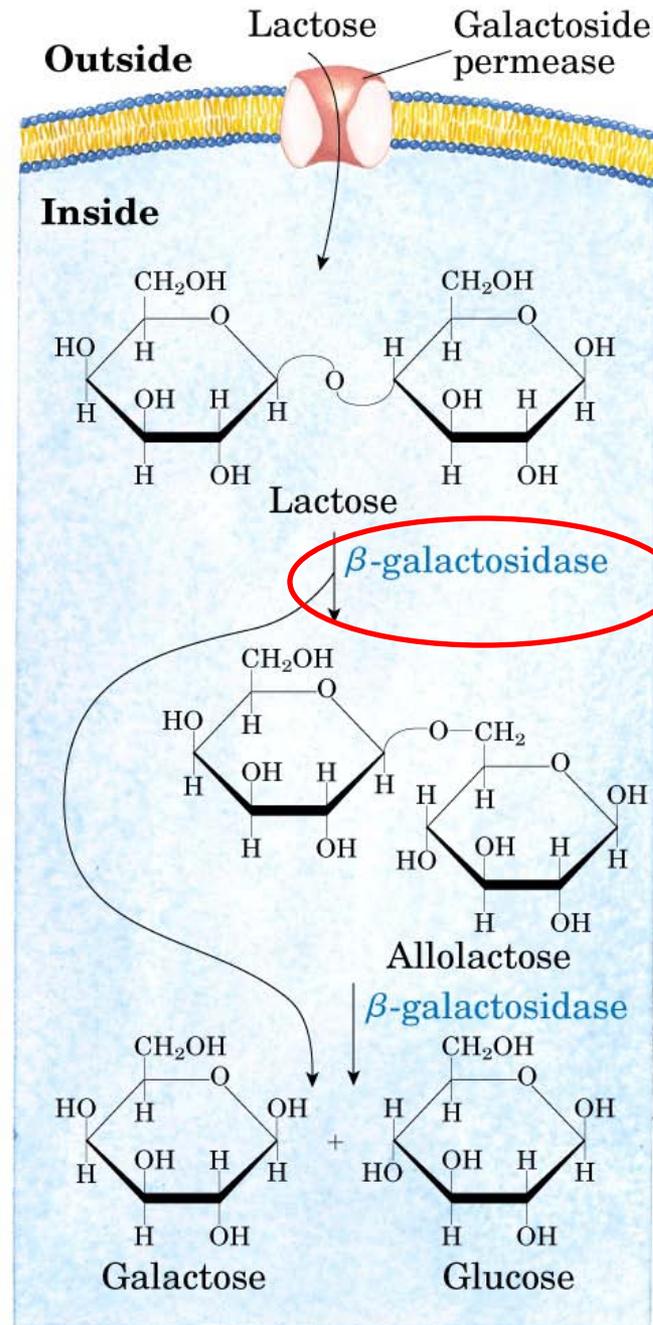
CROMOSSOMO BACTERIANO

CHOQUE TÉRMICO
CLORETO DE CÁLCIO

COMO SEPARAR AS BACTÉRIAS QUE RECEBERAM O PLASMÍDEO DAS QUE NÃO RECEBERAM? QUAIS RECEBERAM O PLASMÍDEO RECOMBINANTE?



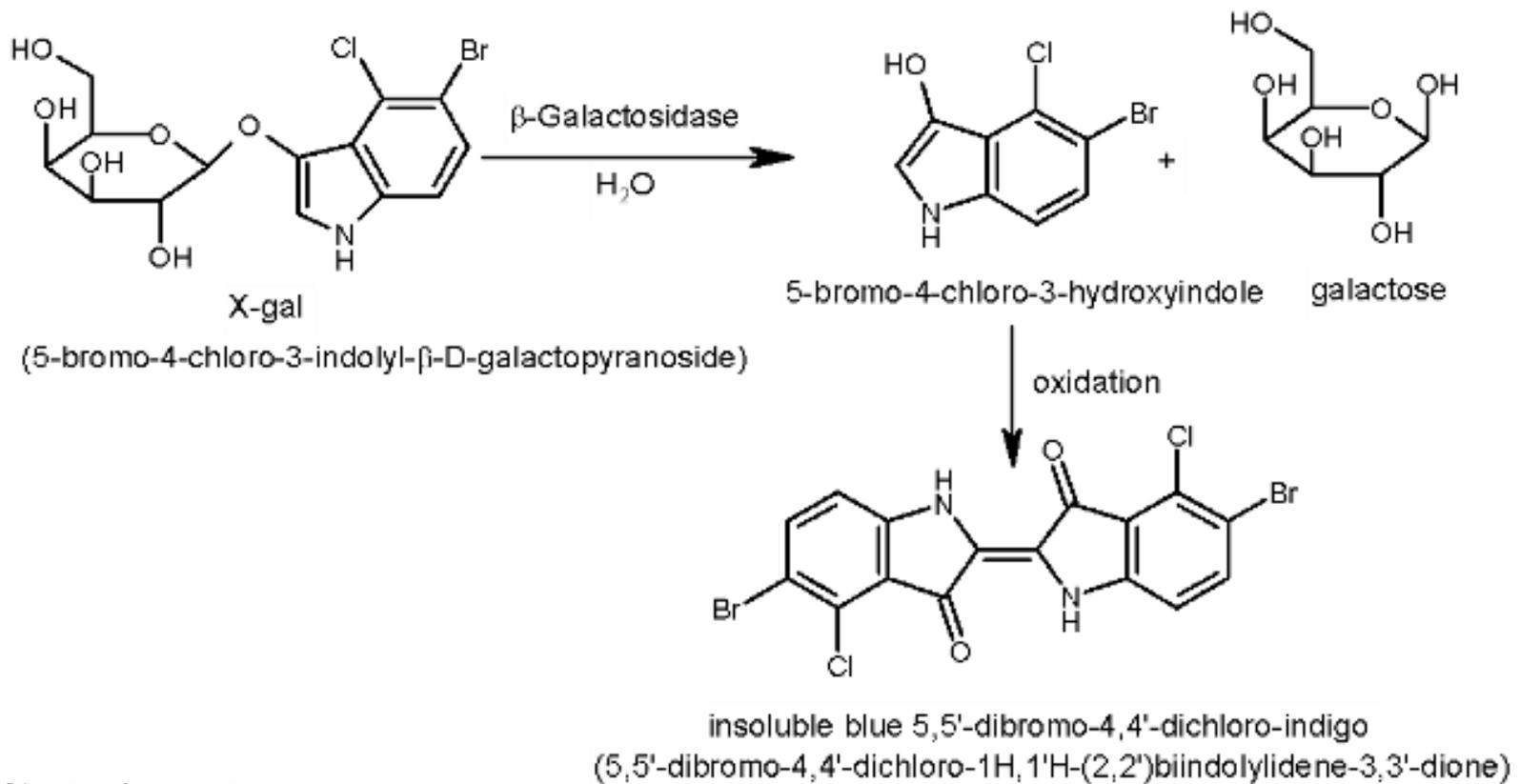
Rota de utilização da lactose como fonte de carbono pelas células



Ligação glicosídica β 1-4

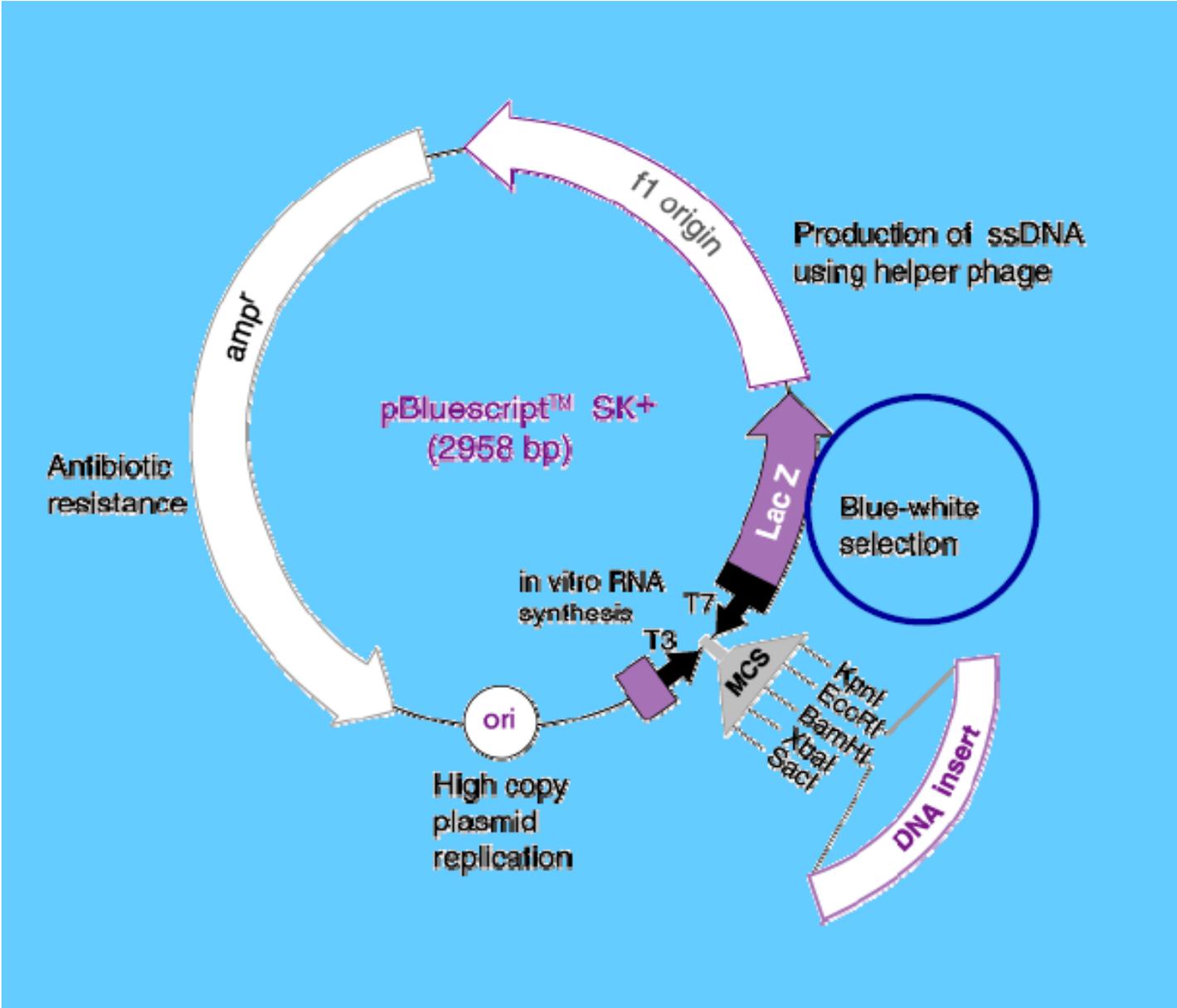
Ligação glicosídica β 1-6

X-Gal: substrato análogo de lactose cuja hidrólise gera produto Insolúvel com coloração azul

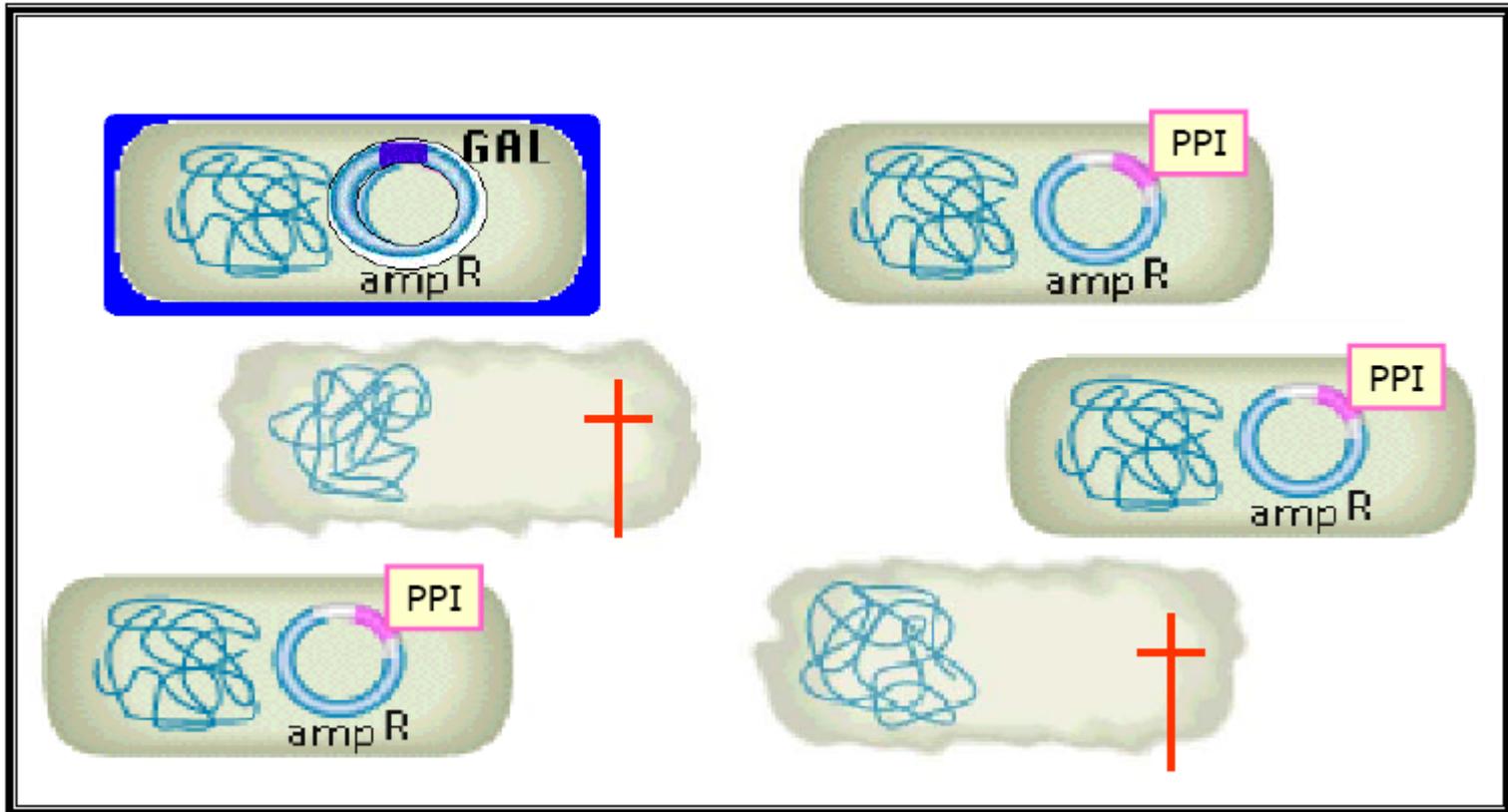


X-Gal: incolor

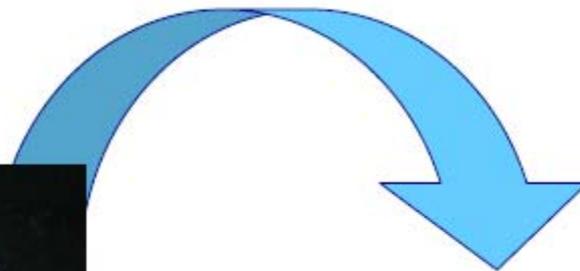
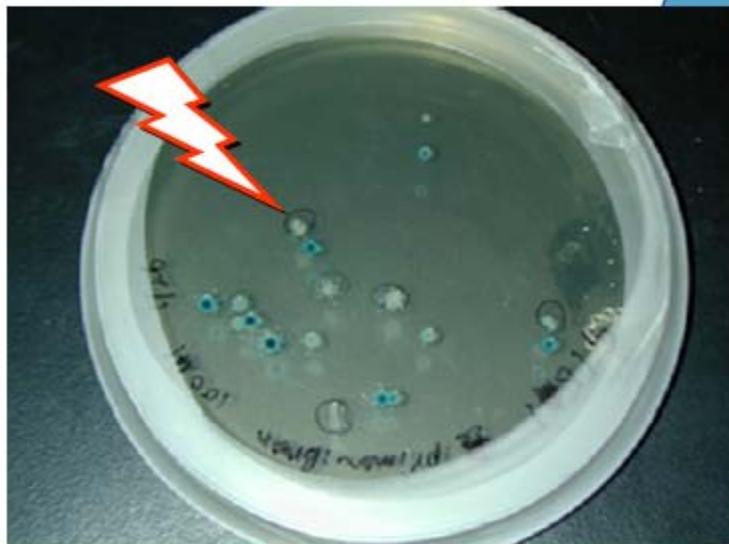
5,5'-dibromo-4-4'-dicloro indigo: azul



SELEÇÃO COM AMPICILINA E X-GAL



SELEÇÃO DAS COLÔNIAS
BRANCAS



INÓCULO EM MEIO LÍQUIDO



Confirmação da presença do inserto de DNA correto no clone selecionado

- Digestão com enzimas de restrição seguida de separação em gel por eletroforese
- sequenciamento de DNA

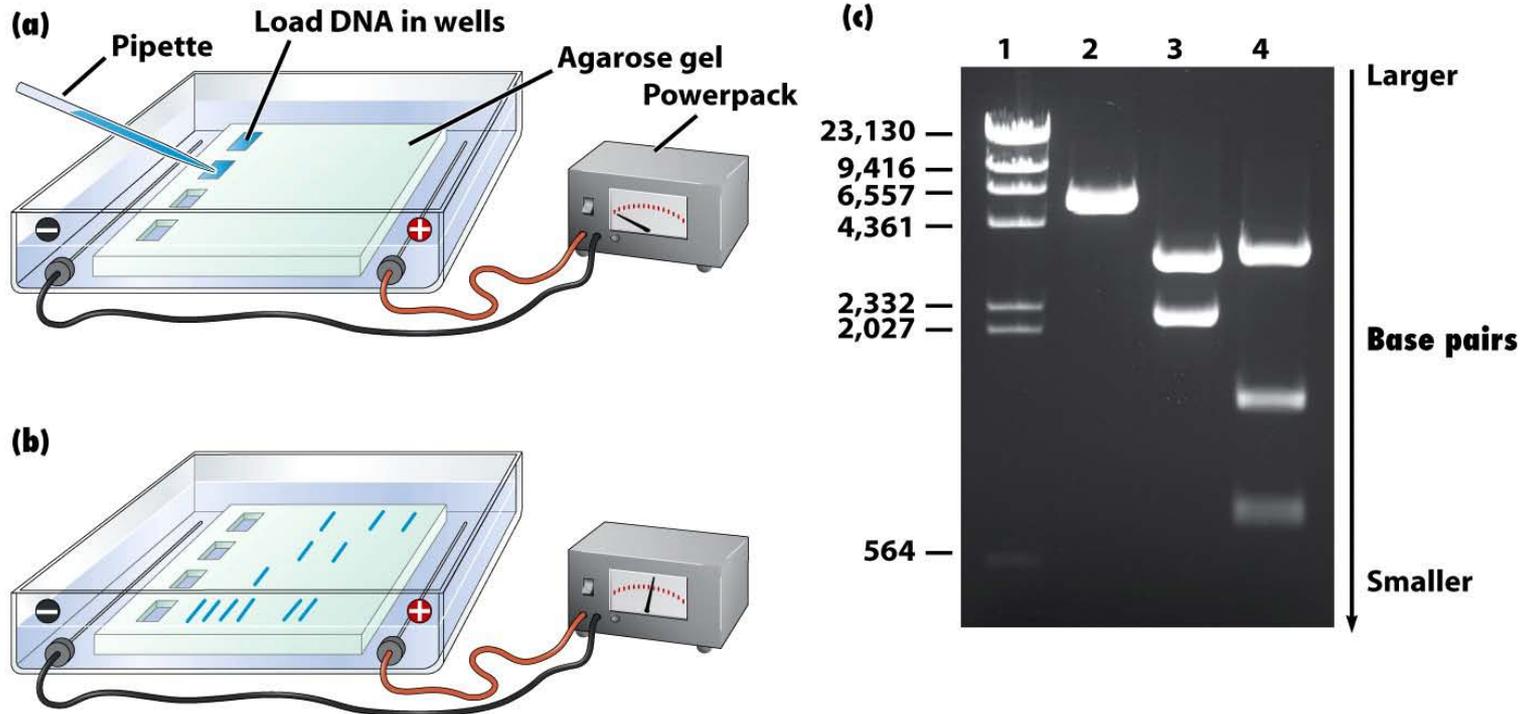
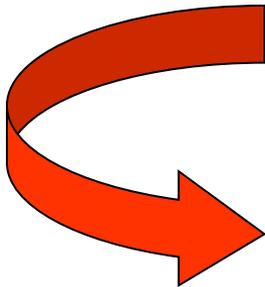


Figure 4-1
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W.H. Freeman and Company

Expressão recombinante de genes

- proteínas recombinantes
 - produção de vacinas recombinantes
 - produtos de interesse farmacêutico
 - produtos de interesse industrial



- bactérias
- leveduras
- células eucarióticas em cultura
- plantas
- animais

Biologia sintética

- Campo interdisciplinar que combina princípios da biologia, química, engenharia e ciência da computação
- Criação de sistemas biológicos artificiais com funções desejadas ou a modificação de sistemas biológicos existentes para fins específicos.

Principais componentes envolvidos:

Manipulação de DNA: síntese de novas sequências de DNA ou a modificação de sequências existentes. Técnicas de clonagem do DNA

Edição de Genomas: Tecnologias como CRISPR-Cas9 para edição precisa do DNA. Adição, exclusão ou substituição de sequências genéticas específicas no genoma de um organismo.

Circuitos Genéticos: conhecimento de conjuntos de genes que interagem entre si para desempenhar funções específicas. Por exemplo, componentes de uma via metabólica ou de sinalização.

Engenharia Metabólica: Modificação das vias metabólicas das células para aumentar a produção de substâncias desejadas, como biocombustíveis, produtos farmacêuticos ou outros produtos químicos valiosos.

Bioinformática: Analisar dados biológicos, projetar construções genéticas e simular o comportamento de sistemas biológicos projetados.

Biologia sintética

- Campo interdisciplinar que combina princípios da biologia, química, engenharia e ciência da computação
- Criação de sistemas biológicos artificiais com funções desejadas ou a modificação de sistemas biológicos existentes para fins específicos.

Principais componentes envolvidos:

Manipulação de DNA: síntese de novas sequências de DNA ou a modificação de sequências existentes. Técnicas de clonagem do DNA



CRISPR, CRISPRi

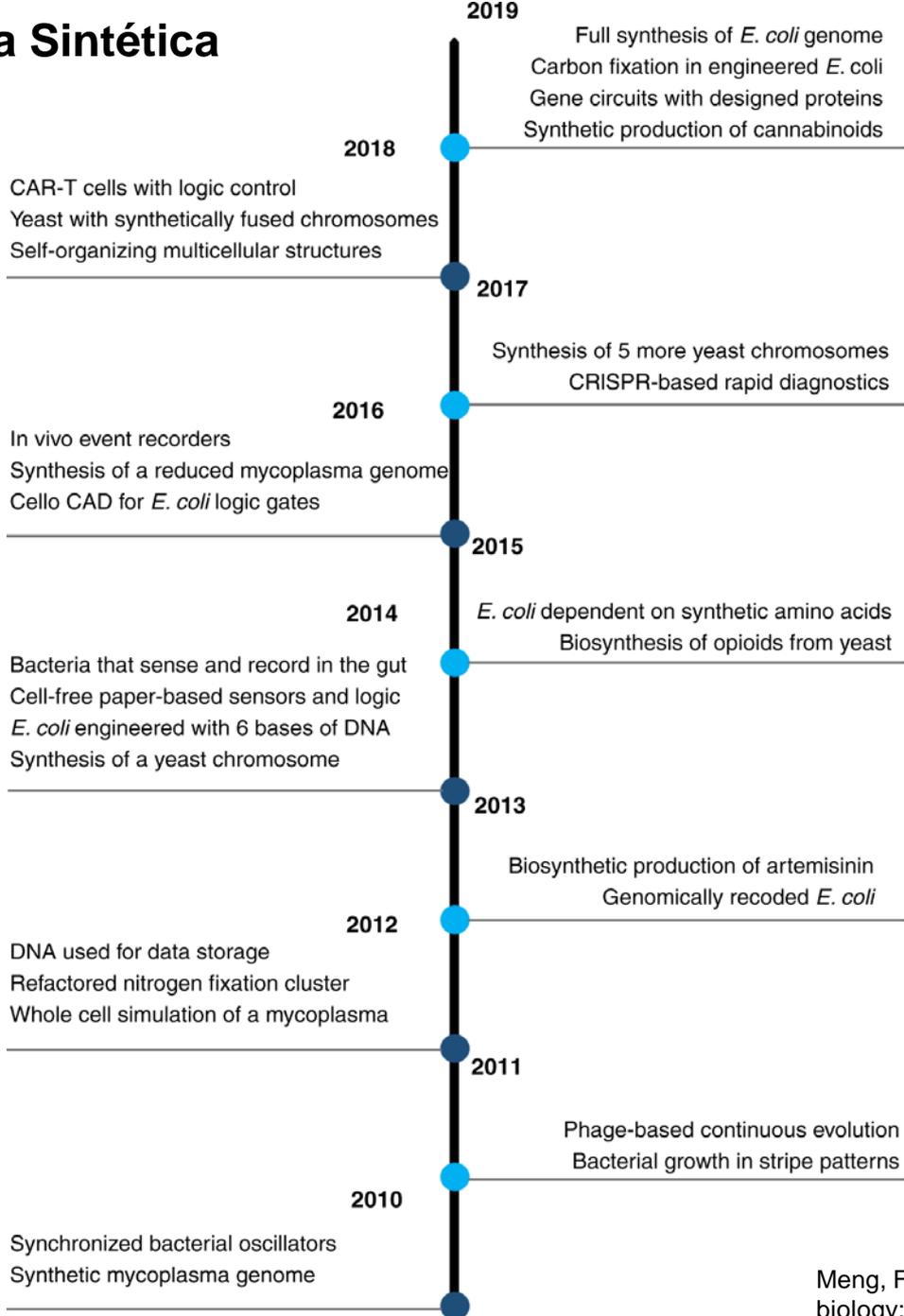
Edição de Genomas:

Tecnologias como CRISPR-Cas9 para edição precisa do DNA. Adição, exclusão ou substituição de sequências genéticas específicas no genoma de um organismo.

Circuitos Genéticos: conhecimento de conjuntos de genes que interagem entre si para desempenhar funções específicas. Por exemplo, componentes de uma via metabólica ou de sinalização.

Engenharia Metabólica: Modificação das vias metabólicas das células para aumentar a produção de substâncias desejadas, como biocombustíveis, produtos farmacêuticos ou outros produtos químicos valiosos.

Marcos da Biologia Sintética



Meng, F., Ellis, T. The second decade of synthetic biology: 2010–2020. *Nat Commun* **11**, 5174 (2020)

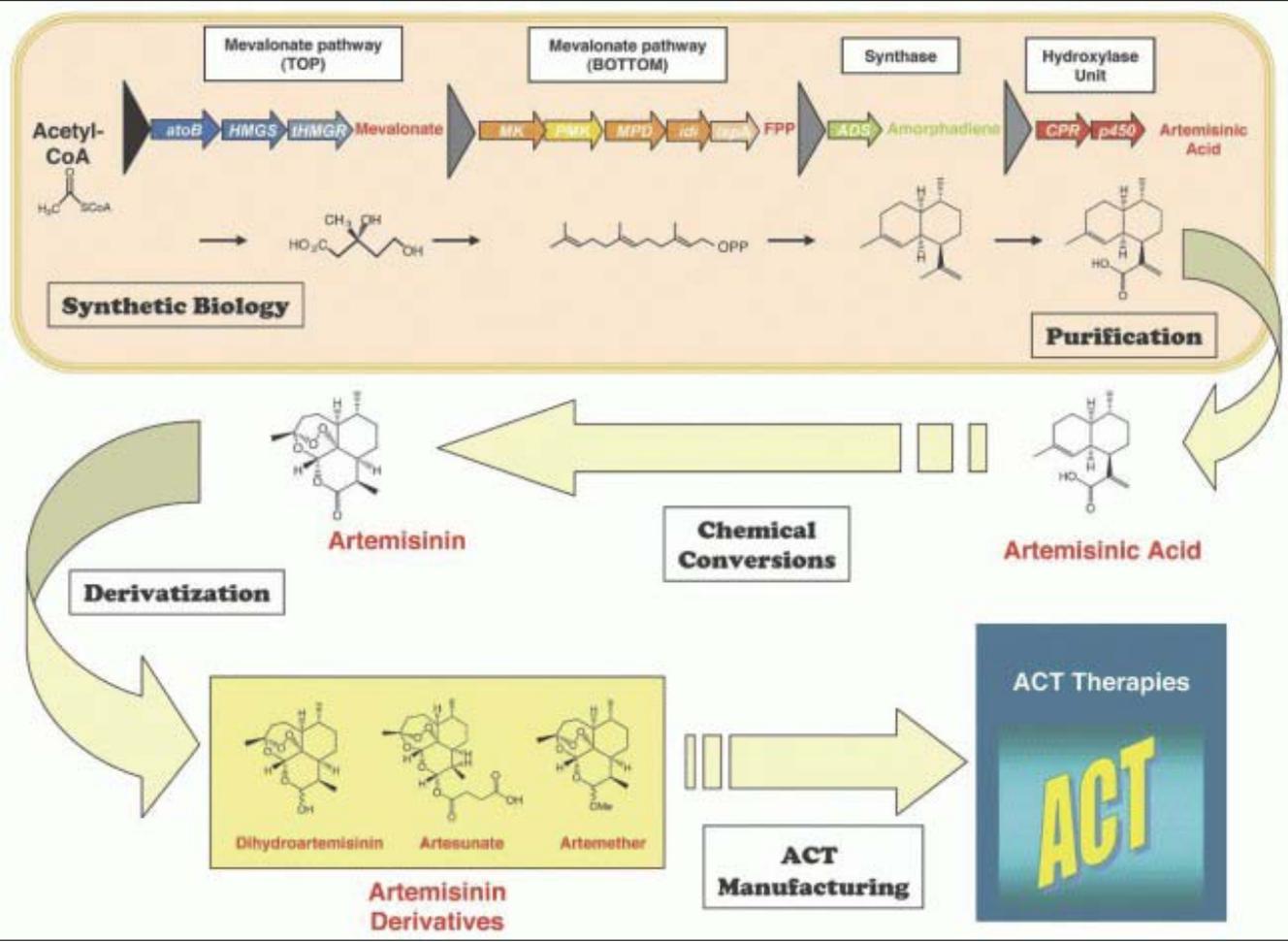
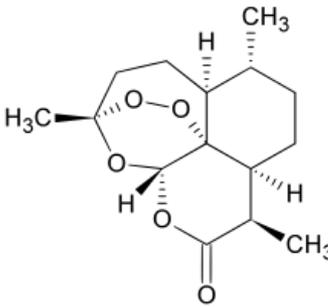
Aplicações da biologia sintética

- desenvolvimento de **novos medicamentos**
- produtos secundários do metabolismo e outros **materiais de base biológica para indústria química**
- **biocombustíveis** e soluções ecologicamente corretas
- **biosensores** para monitoramento ambiental
- **animais e plantas transgênicas** com maior produtividade, resistência a pragas e estresses ambientais (temperatura, água, nutrientes)

Importância de considerações éticas e de segurança e implicações sociais da manipulação de organismos vivos a nível genético.

Produção da droga antimalária artemisinina em microorganismos

Derivados de artemisinina, isolados da planta *Artemisia annua* possuem potente atividade antimalária, doença causada pelo parasita *Plasmodium falciparum*



O metabolismo do microorganismo (bactéria, levedura) pode ser “engenheirado” pela clonagem de genes de que codificam enzimas necessárias para converter acetil-CoA em ácido artemisinico, um precursor da artemisinina

Hale V, Keasling JD, Renninger N, et al. Microbially Derived Artemisinin: A Biotechnology Solution to the Global Problem of Access to Affordable Antimalarial Drugs. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1717/>

Biorefinarias de 3ª geração (3G)

Utilizam microorganismos como fábricas para converter fontes renováveis de energia e CO₂ atmosférico em combustíveis e produtos químicos.

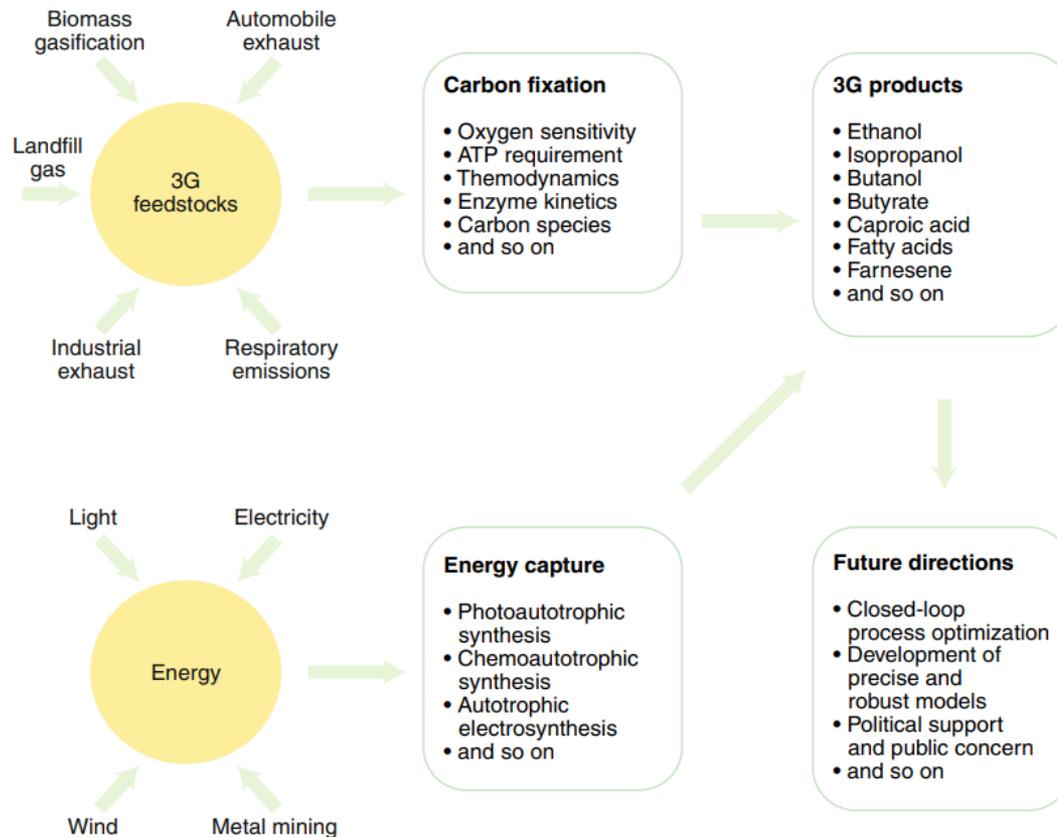
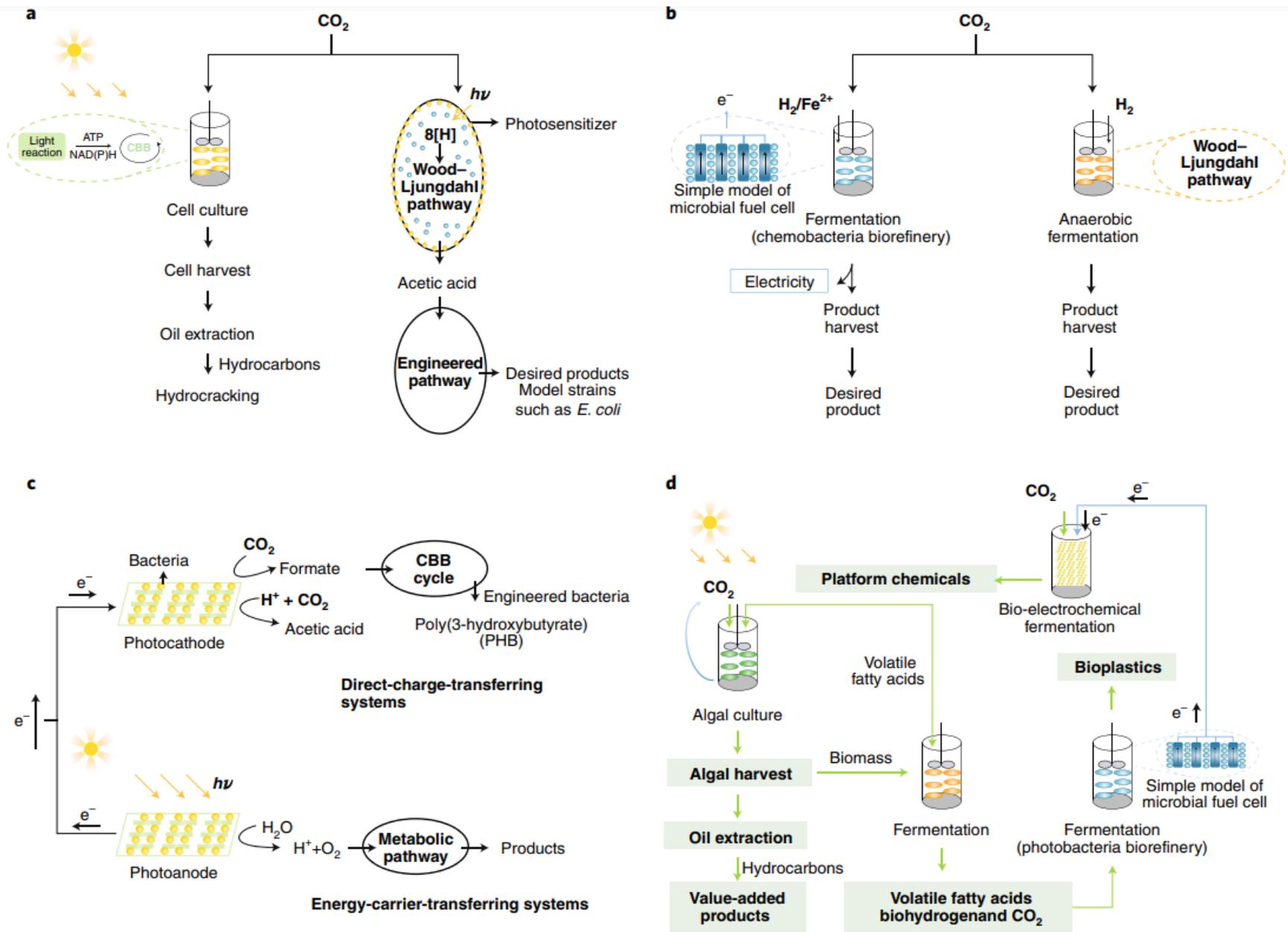


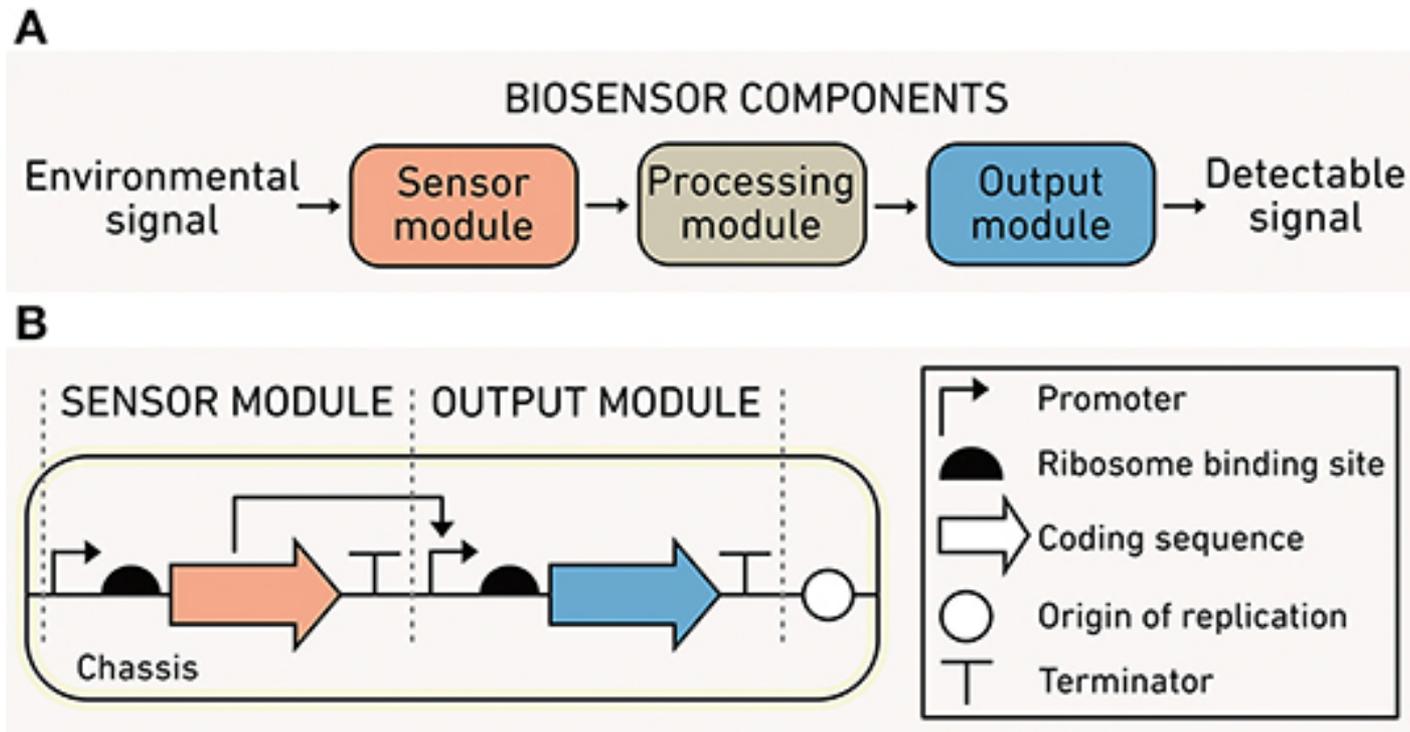
Fig. 2 | Key steps in 3G biorefineries. Overall, carbon fixation and energy capture are the two critical techniques for 3G biorefineries. CO₂ from various sources can be captured and fixed through different mechanisms, using energy from light, chemicals and electricity. To date, a wide variety of 3G-based products have been reported, with several commercial plants already running. However, public awareness and political support, including increased research funding and carbon taxes, will be important for the further development of 3G biorefineries.



Liu, Z., Wang, K., Chen, Y., Tan, T., & Nielsen, J. (2020). *Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂*. *Nature Catalysis*, 3(3), 274–288. doi:10.1038/s41929-019-0421-5

Biosensores

- (A) O módulo sensor (laranja) converte informações ambientais em informações bioquímicas, o módulo de processamento (cinza) realiza cálculos usando informações bioquímicas e o módulo de saída (azul) traduz as informações processadas em um sinal detectado.
- (B) Um biossensor simples de uma entrada e uma saída ilustrado usando linguagem de biologia sintética.



Biosensores

Módulos disponíveis para detecção de metais e outros parâmetros ambientais.

Analyte sensed	Name	Mechanism	Mode of prior use	Application	References	
Metal ions	Mn(II)	MntR Mn	TR	<i>B. subtilis</i>	N/A	Huang et al., 2017
		<i>yypP-ykoY</i>	RS	Purified RNA, <i>B. subtilis</i>	N/A	Martin et al., 2019
	Zn(II)	ZraSR	TCS	<i>E. coli</i>	Synthetic wastewater	Ravikumar et al., 2012a
		CoaR	TR	<i>Synechocystis</i> sp.	Soil extract	Peca et al., 2008
		SmtB	TR	Cell-free	Municipal water	Jung et al., 2020
		CzcSR	TCS	<i>P. putida</i>	Soil extract	Liu et al., 2012
		ZntR	TR	Cell-free	Serum	McNerney et al., 2019
	Ni(II)	NrsSR	TCS	<i>Synechocystis</i> sp.	Soil extract	Peca et al., 2008
		RcnR	TR	<i>E. coli</i>	N/A	Cayron et al., 2017
		CnrYXH	TR	<i>R. eutropha</i>	Soil	Tibazarwa et al., 2001
	Co(II)	RcnR	TR	<i>E. coli</i>	N/A	Cayron et al., 2017
		CnrYXH	TR	<i>R. eutropha</i>	Soil	Tibazarwa et al., 2001
	Cu(II)	CusSR	TCS	<i>E. coli</i>	N/A	Ravikumar et al., 2012a,b
		CueR	TR	<i>P. putida</i>	N/A	Li et al., 2014
	Cu(I/II)	CsoR	TR	Cell-free	Municipal water	Jung et al., 2020
	Fe(III)	BasSR	TCS	<i>E. coli</i>	N/A	Hagiwara et al., 2004
		PmrAB	TCS	<i>S. enterica</i>	N/A	Wösten et al., 2000
	Fe(II)	BqsSR	TCS	<i>P. aeruginosa</i>	N/A	Kreamer et al., 2012, 2015
	As(III)	ArsR	TR	<i>E. coli</i>	N/A	Wan et al., 2019
	Hg(II)	MerR	TR	Cell-free	N/A	Gräwe et al., 2019
Cd(II)	CadC	TR	<i>E. coli</i>	Soil extract	Liao et al., 2006	
	CadC	TR	Cell-free	N/A	Jung et al., 2020	
Pb(II)	CadC	TR	<i>E. coli</i>	Soil extract	Liao et al., 2006	
	PbrR	TR	Gram-negative bacteria	Tap water, Groundwater	Bereza-Malcolm et al., 2016	
Cr(VI)	ChrB	TR	<i>E. coli</i> , <i>O. tritici</i>	River water	Branco et al., 2013	
Environmental parameters	O ₂	FNR	TR	<i>E. coli</i>	N/A	Myers et al., 2013
		ANR	TR	<i>P. fluorescens</i>	Soil	Højberg et al., 1999
		FixJL	TCS	<i>E. coli</i>	N/A	de Philip et al., 1990
	H ₂	HoxJA	TCS	<i>R. eutropha</i>	N/A	Lenz and Friedrich, 1998
		HupUV	TCS	<i>R. capsulatus</i>	N/A	Elsen et al., 2003

Perspectiva de aplicação da biologia sintética na saúde:

Circuito conceitual para uma bactéria terapêutica que coloniza um nicho no microbioma humano e sintetiza/libera drogas após detectar a presença de uma doença

