

Quando nasceu?

R: Há muito tempo!!! Desde que o homem procurou no mundo natural formas de:

- Curar doenças
- Aumentar a produção de alimentos
- Fazer cerveja, vinho, pão, queijos, etc... (Desde o Egito Antigo!)

Ou seja, tudo o que envolve a manipulação de organismos para o desenvolvimento e fabricação de produtos úteis ao homem.

Biotecnologia

O que vocês pensam:



Como começou:

Karl Ereky
(1878-1952)



Engenheiro, considerado o pai da biotecnologia.

Karl Ereky
(1878-1952)



Cunhou o termo [Biotecnologia](#) para descrever um processo para a produção em larga escala de porcos, utilizando beterrabas como alimento.

Definiu como:

“Todas as linhas de trabalho pelas quais produtos são obtidos a partir de matéria bruta com a ajuda de seres vivos.”

Uma boa definição é: **“Conjunto de tecnologias que permite a modificação ou utilização dos organismos para a obtenção de novos produtos para fins práticos ou industriais.”** (Jorge Canhoto, *Biotecnologia Vegetal*, 2010, Universidade de Coimbra).

Como era possível melhorar um processo Biotecnológico, antes da era moderna da Biologia Molecular?

Buscando variantes (mutantes) dos organismos com propriedades melhoradas: “Mutação e Seleção”

- Que ocorrem naturalmente nas populações.
- Mutagenizando microrganismos, sementes de plantas, etc. com agentes químicos e físicos.
- Cruzamentos planejados (plantas, animais).

P: qual é a limitação destes métodos?

Essa abordagem se limita a aprimorar um processo biológico já existente.

Hoje, a **Biotecnologia Molecular** se baseia amplamente na nossa capacidade de manipulação genética.

- Isolar (clonar) genes
- Manipular geneticamente organismos de interesse

“Tecnologia do DNA recombinante”

OU

“Engenharia Genética”

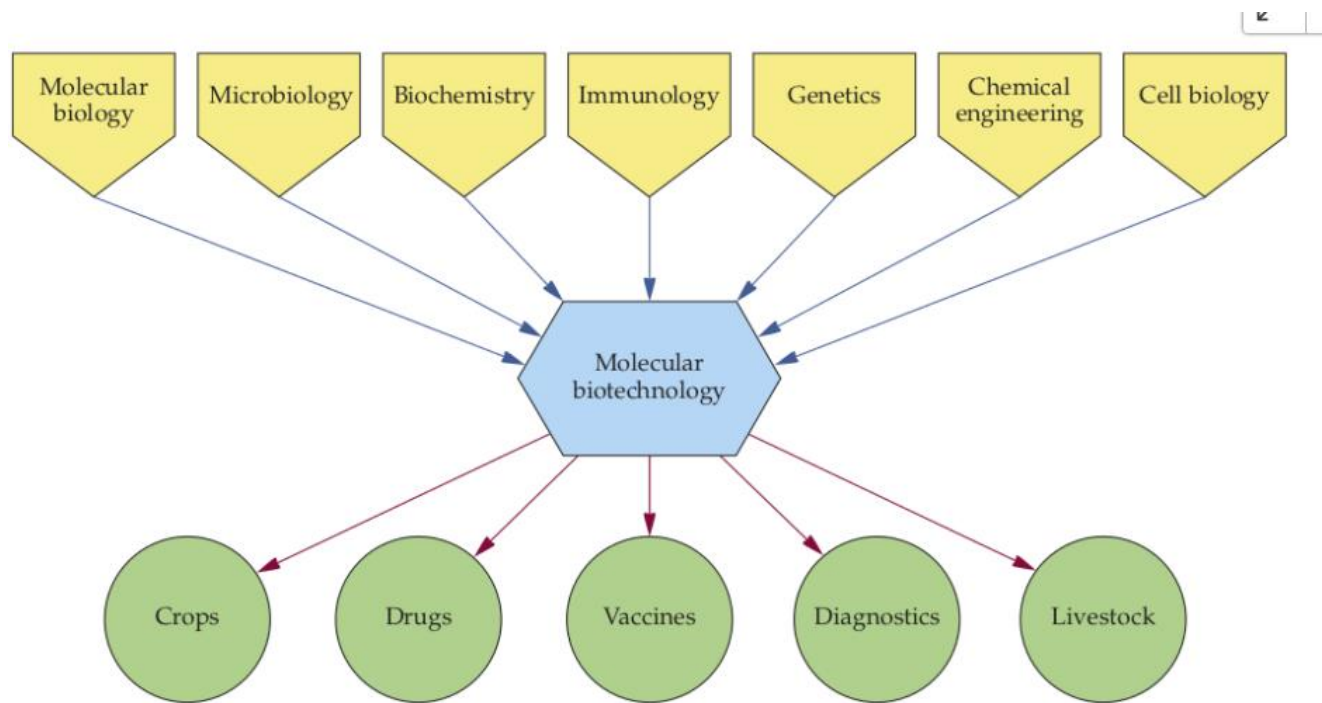
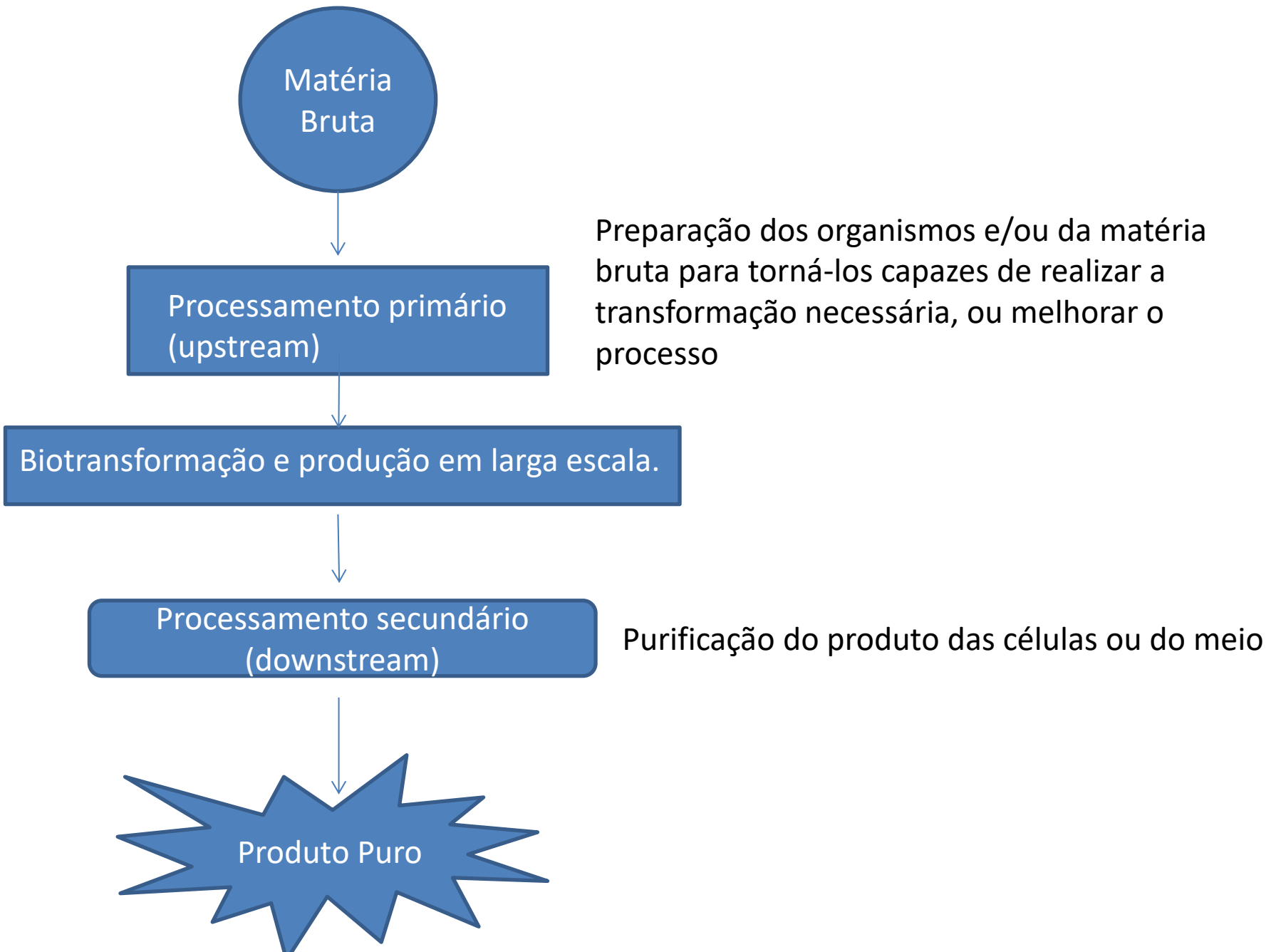


Figure 1.1 Many scientific disciplines contribute to molecular biotechnology, which generates a wide range of commercial products.

O Processo Biotecnológico



Tecnologia do DNA Recombinante (Engenharia Genética)

Durante o almoço, numa conferência no Havaí...



Stanley Cohen



Herbert Boyer



Pesquisava plasmídeos + Pesquisava enzimas de restrição = Engenharia Genética!

Perceberam que podiam desenvolver uma tecnologia onde seriam capazes de introduzir genes de interesse em plasmídeos, que poderiam ser expressos e mantidos em bactérias!

“It may be possible to introduce in *E. coli*, genes specifying metabolic or synthetic functions such as photosynthesis or antibiotic production indigenous to other biological classes”

Proc. Nat. Acad. Sci. USA

Vol. 70, No. 11, pp. 3240-3244, November 1973

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

STANLEY N. COHEN*, ANNIE C. Y. CHANG*, HERBERT W. BOYER†, AND ROBERT B. HELLING†

* Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and † Department of Microbiology, University of California at San Francisco, San Francisco, Calif. 94122

Tecnologia do DNA Recombinante (Engenharia Genética)

Com o advento da Tecnologia do DNA recombinante, passou a ser possível:

- A criação de organismos com novas capacidades (ex., bactérias produtoras de hormônios humanos).

- Desenho racional de melhorias em processos biológicos (Biologia sintética!!)

Definição:

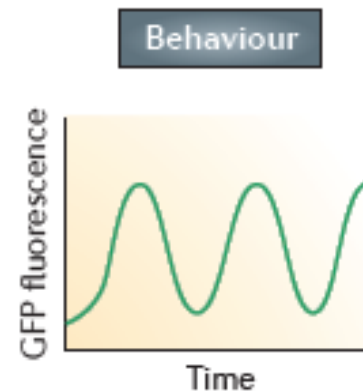
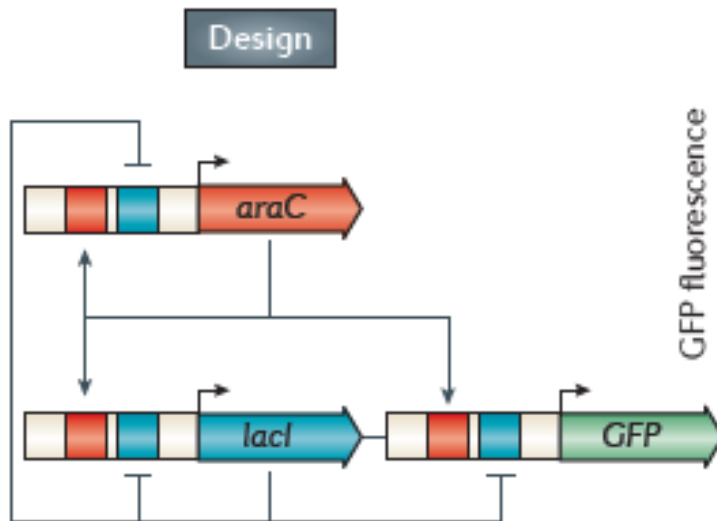
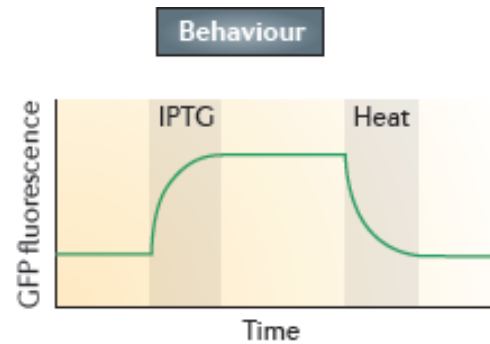
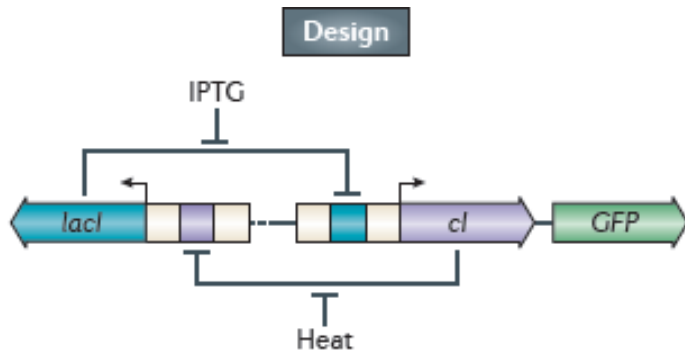
Uso de ferramentas da biologia molecular para engenharia direta do comportamento celular

Cameron et al. 2014 Nature Reviews in Microbiology

- Redirecionamento ou construção de novos circuitos biológicos ou até mesmo desenho e construção racional de organismos vivos inteiros.
- Aplicações biotecnológicas imediatas ou trabalhos de “prova de conceito”.

Próximo passo: Biologia Sintética

Exemplos de circuitos biológicos sintéticos



\$\$\$ O Negócio da Biotecnologia \$\$\$

Primeiro produto comercial produzido usando a tecnologia do DNA Recombinante: [Insulina](#)

Empresa **Genentech**: Fundada por Boyer e Swanson em 1980 para produção de insulina.

- No dia de lançamento de suas ações no mercado, em vinte minutos, o valor de cada uma subiu de U\$35 para U\$89. Maior e mais rápida valorização de todos os tempos da bolsa americana.
- Em 1991, 60% da empresa foram vendidos para Roche por **2 bilhões de dólares!**

Panorama atual:

Mais de 300 drogas (anticorpos, hormônios, etc.) produzidos através da tecnologia do DNA recombinante.

E mais:

- **Fontes de energia**
- **Produtos têxteis**
- **Produtos agrícolas**
- **Produtos da pecuária**
- **etc**

\$\$\$ O Negócio da Biotecnologia \$\$\$

Panorama:

Em 2017:

2500 Biotecs nos EUA

2100 na Europa

Brasil: aproximadamente 200 empresas

Fonte: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/empresas-de-biotecnologia-e-biocincias-no-brasil-um-panorama-26643>

2024: 771 empresas de base biotecnológica no Brasil

(<https://www.econodata.com.br/empresas/todo-brasil/busca-biotecnologia>)

Consequências e questões éticas

globo.com g1 globoesporte gshow videos

MENU G1

CIÊNCIA E SAÚDE

23/04/2015 14h58 - Atualizado em 23/04/2015 17h26

Pela primeira vez, cientistas 'editam' DNA de embrião humano

Pesquisadores chineses tentaram modificar gene que levaria a doença. Publicação dos resultados levantou discussões éticas.

Do G1, em São Paulo



GALILEU

Home

Notícias

Ciência

Sociedade

Cultura

Vestibular e Enem

Revista

TechTudo



ASSINE JÁ

GALILEU

CIÊNCIA

OMS

Cientistas espanhóis criam ser híbrido de humano e macaco na China

A criatura não chegou a nascer pois a gestação foi interrompida pelos próprios cientistas

31/07/2019 - 15H54 / ATUALIZADO 15H54 / POR REDAÇÃO GALILEU



Consequências e questões éticas

- Will some genetically engineered organisms, or their products, be harmful to humans or other organisms, or to the environment?
- Will the development and use of genetically engineered organisms reduce natural biological diversity?
- Should humans be genetically manipulated?
- Will new diagnostic procedures, especially those based on genome sequencing, undermine individual privacy?
- Will financial support for molecular biotechnology constrain the development of other important technologies?
- Will the emphasis on commercial success mean that the benefits of molecular biotechnology will be available only to wealthy individuals or nations?
- Will agricultural molecular biotechnology undermine traditional farming practices?
- Will medical therapies based on molecular biotechnology supersede equally effective traditional treatments?
- Will the quest for patents inhibit the free exchange of ideas between researchers?

De: Glick, Patten, **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA** 5th Edition

Fundamentos de Biologia Molecular:

- A tecnologia do DNA recombinante (clonagem de genes)
- PCR

Qual organismo é vetor para tecnologia do DNA recombinante?


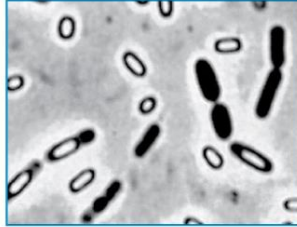
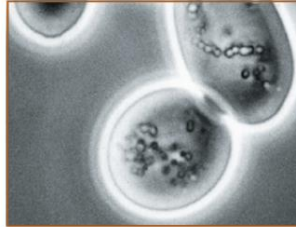


Procariotos		Eucarioto
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		
Genética bem desenvolvida Muitas linhagens disponíveis Procarioto mais bem conhecido	Facilmente transformável Não patogênico Proteínas secretadas naturalmente A formação de endósporo simplifica a cultura	Genética bem desenvolvida Não patogênico Pode processar mRNA e proteínas De fácil crescimento
Potencialmente patogênica Proteínas retidas no periplasma	Geneticamente instável Genética menos desenvolvida que em <i>E. coli</i>	Plasmídeos instáveis Não replica a maioria dos plasmídeos procarióticos
 Vantagens	 Desvantagens	

Figura 12.16 Hospedeiros para clonagem molecular. Um resumo das vantagens e desvantagens de alguns hospedeiros comuns para clonagem.

Clonagem – A tecnologia do DNA recombinante

- Obter, através da tecnologia do DNA recombinante , um fragmento de DNA de interesse (um ou mais genes), carregado por um vetor (plasmídeo, fago, etc...).
- Estas técnicas também se aplicam à construção de **bibliotecas** de genes ou cDNAs

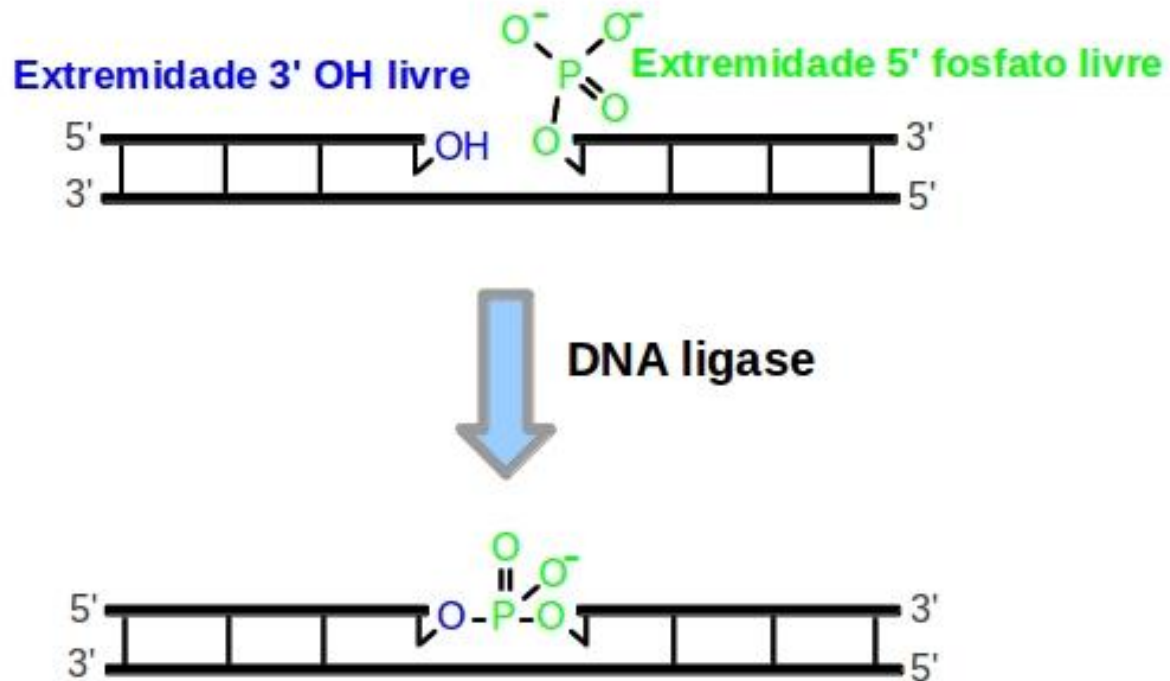
Clonagem

Para que serve?

Muita coisa! Mas em termos de Biotecnologia, podemos destacar:

- Expressar genes para modificar características desejáveis de um organismo, ou introduzir novas;
- Introduzir alterações no genoma de um organismo;
- Expressar e purificar proteínas de interesse;
- Obter bibliotecas visando isolar um gene de interesse a partir da mesma.

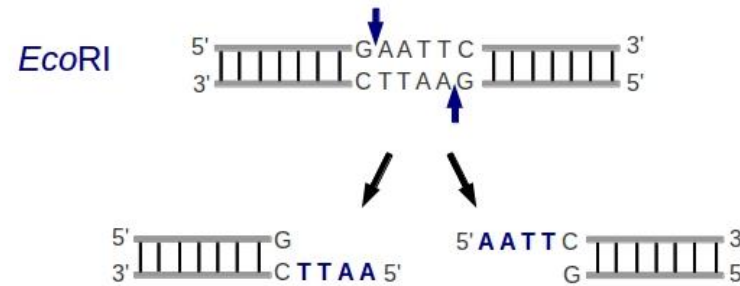
Enzimas usadas em clonagem – **DNA ligase**



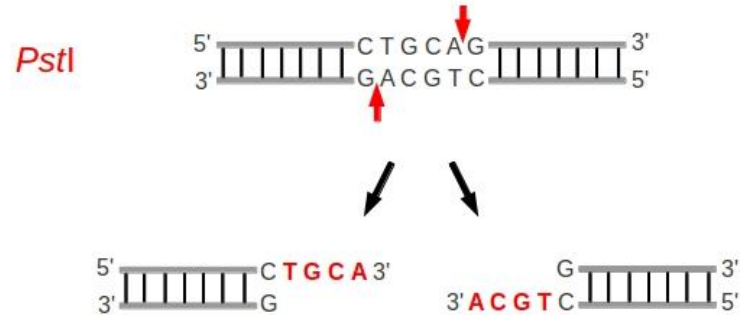
Enzimas usadas em clonagem – **Enzimas de Restrição**

- Enzimas produzidas por bactérias, para defesa contra DNA exógeno (bacteriófagos)
- Mais usadas em Biologia Molecular: Enzimas do tipo 2
- Reconhecem sequências palindrômicas no DNA, e clivam uma ligação fosfodiéster em uma posição específica.

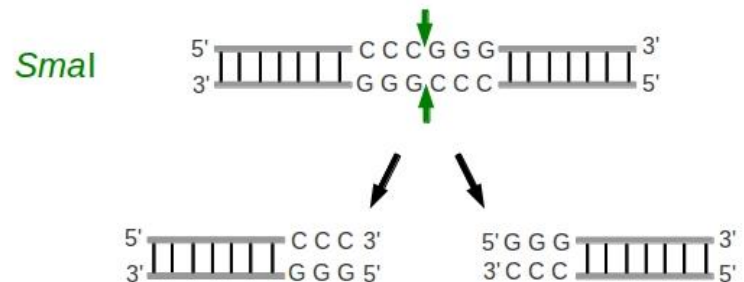
Enzimas usadas em clonagem – Enzimas de Restrição



O corte com a enzima *EcoRI* gera pontas coesivas com extremidades protuberantes 5'

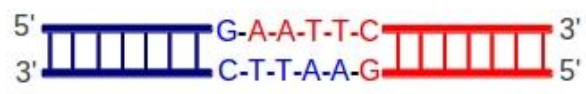


O corte com a enzima *PstI* gera pontas coesivas com extremidades protuberantes 3'



O corte com a enzima *SmaI* gera pontas cegas

Clonagem – a tecnologia do DNA recombinante



DNA recombinante produzido pela ligação de duas extremidades coesivas produzidas pela enzima *EcoRI*

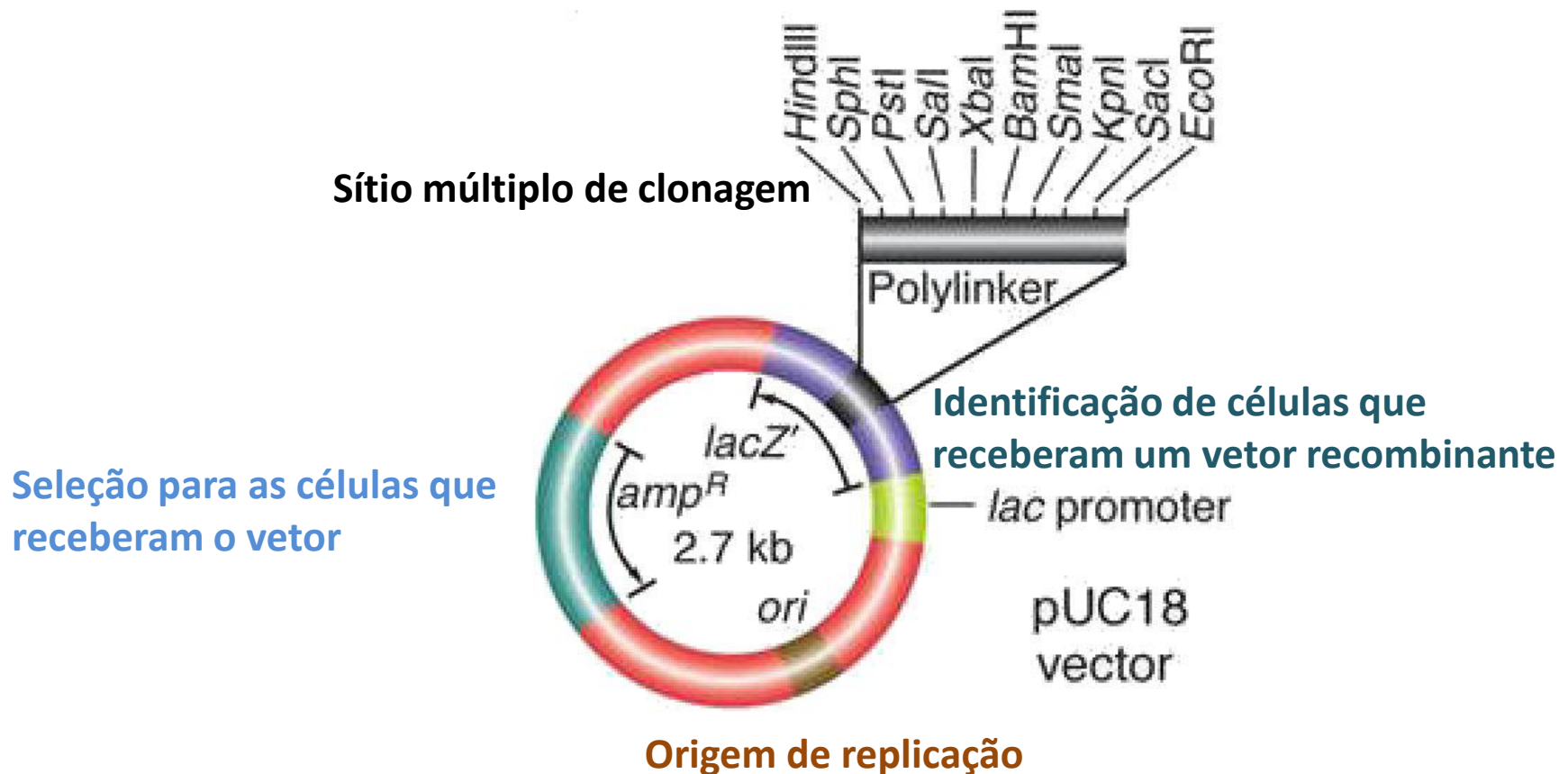


DNA recombinante produzido pela ligação de duas extremidades cegas produzidas pela enzima *SmaI*

Ligação de duas extremidades coesivas é muito mais eficiente do que de duas extremidades cegas!!!

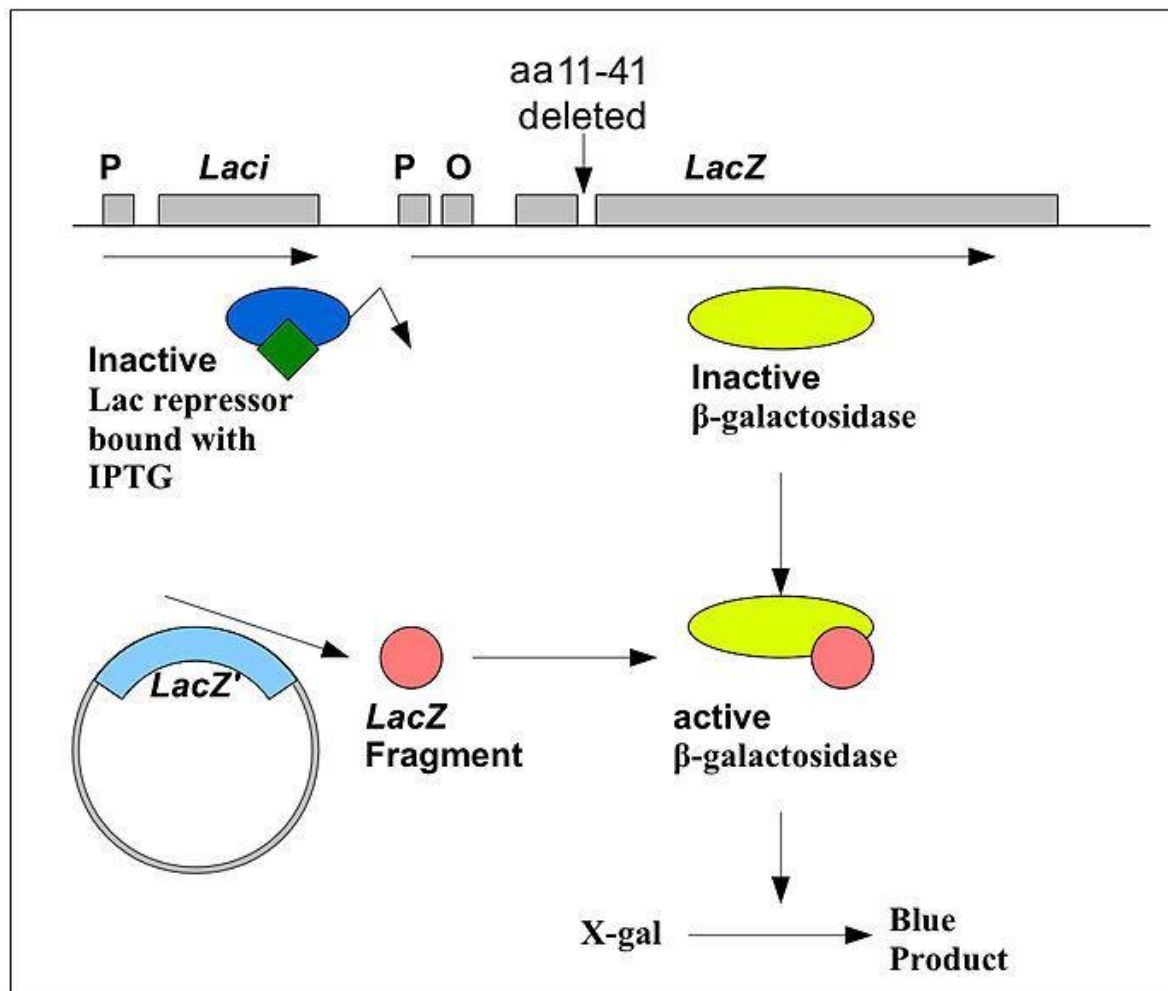
Vetor Plasmidial Moderno Típico

Suportam bem fragmentos de no máximo 10 Kpb.



Vetor Plasmidial Moderno Típico

Como funciona o gene *lacZ'* (fenômeno de complementação α)



Clonagem

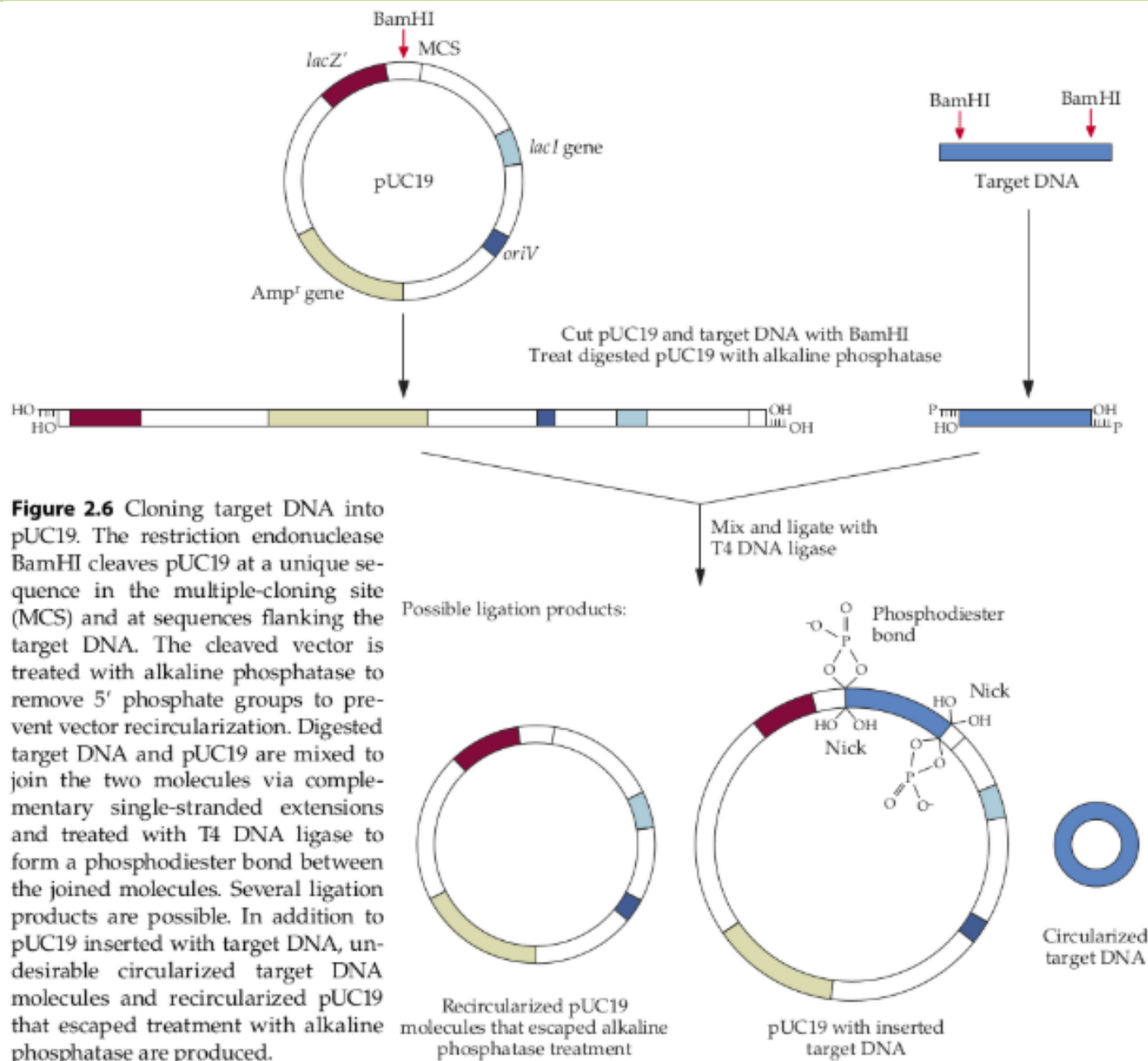
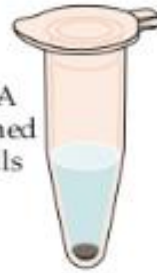


Figure 2.6 Cloning target DNA into pUC19. The restriction endonuclease BamHI cleaves pUC19 at a unique sequence in the multiple-cloning site (MCS) and at sequences flanking the target DNA. The cleaved vector is treated with alkaline phosphatase to remove 5' phosphate groups to prevent vector recircularization. Digested target DNA and pUC19 are mixed to join the two molecules via complementary single-stranded extensions and treated with T4 DNA ligase to form a phosphodiester bond between the joined molecules. Several ligation products are possible. In addition to pUC19 inserted with target DNA, undesirable circularized target DNA molecules and recircularized pUC19 that escaped treatment with alkaline phosphatase are produced.

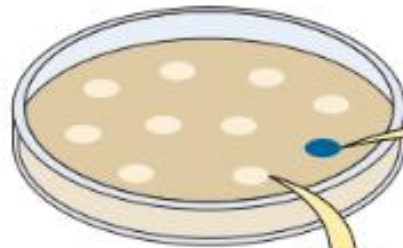
Clonagem

A

Mixture of pUC19-target DNA ligation products is transformed into competent *E. coli* host cells



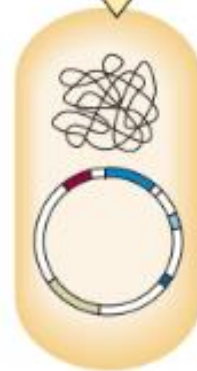
Transformation mixture is plated on medium containing ampicillin, X-Gal, and IPTG



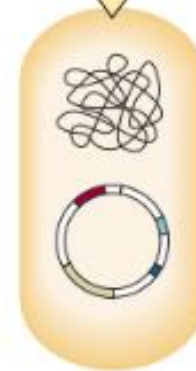
No plasmid
Amp^s, no growth
on ampicillin



Circularized
target DNA
Amp^s, no growth
on ampicillin



pUC19 with cloned
target DNA
Amp^r, no β -galacto-
sidase activity



Recircularized
pUC19
Amp^r, β -galacto-
sidase activity

Vetores para clonagem - Plasmídeos

Plasmídeos são moléculas de DNA de ocorrência natural, de tamanho variado.

Plasmídeos de virulência

Plasmídeos de resistência

Plasmídeos de atividades metabólicas

Etc...

Entretanto, todos os plasmídeos usados rotineiramente em Biologia Molecular são derivados de plasmídeos naturais, que foram extensamente modificados para uso em clonagem.

Vetores para clonagem - Plasmídeos

Variam quanto à:

- Número de cópias por célula (de 1-2 a centenas)
- Gama de hospedeiros
- Tamanho
- Estabilidade
- Grupos de compatibilidade (plasmídeos do mesmo grupo não podem coexistir estavelmente na célula)

Outros vetores para clonagem

Qual vetor usar?

R: Depende do tamanho do fragmento a ser clonado e da aplicação!

Type of vector	Insert size (kb)
Plasmids	10
λ replacement	18
Cosmid, fosmid	40
P1	125
BAC, PAC	300
YAC	600
Mega-YAC	1400

Outros vetores de clonagem – BACs

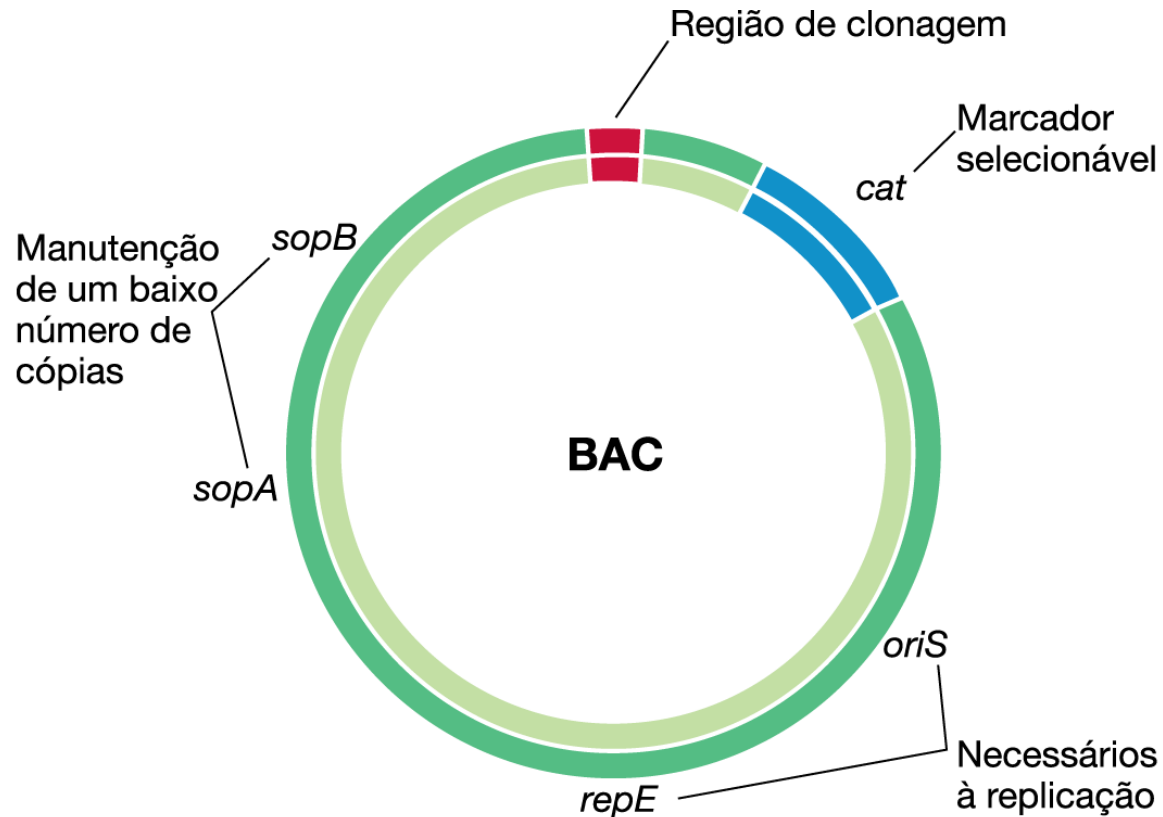


Figura 12.25 Mapa genético de um cromossomo artificial bacteriano. O BAC esquematizado na figura contém 6,7 kb. A região de clonagem contém vários sítios únicos de enzimas de restrição. Esse BAC contém apenas uma pequena porção do plasmídeo F₁ de 99,2 kb.

Outros vetores de clonagem – BACs

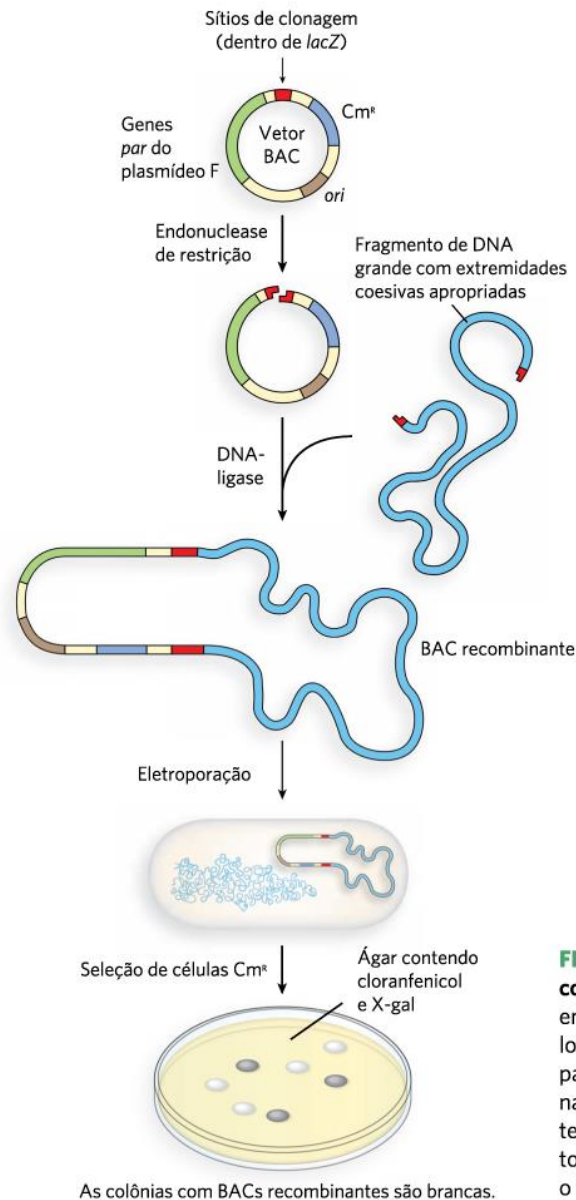


FIGURA 7-6 Cromossomos bacterianos artificiais (BACs) como vetores de clonagem. Após o tratamento com uma endonuclease de restrição apropriada, BAC e um fragmento longo de DNA são ligados. O BAC recombinante é transferido para *E. coli* por eletroporação, e colônias com BACs recombinantes são selecionadas pelo seu crescimento em meio contendo tanto o antibiótico cloranfenicol como X-gal, o substrato para β -galactosidase que produz um produto colorido. Veja o texto para detalhes.

Cromossomos artificiais de levedura



Figura 12.26 Um cromossomo artificial de levedura contendo DNA exógeno. O DNA exógeno foi clonado no vetor, em um sítio de restrição *NotI*. Os telômeros são indicados por TEL e o centrômero, por CEN. A origem de replicação é assinalada por ARS (sequência de replicação autônoma). O gene utilizado na seleção é denominado *URA3*. O hospedeiro, no qual o clone é transformado, possui uma mutação em *URA3*, requerendo uracila para seu crescimento (Ura^-). Células hospedeiras contendo esse YAC tornam-se Ura^+ . O diagrama não se encontra em escala; o DNA do vetor contém somente 10 kb, ao passo que o DNA clonado pode apresentar até 800 kb.

Fragmentos de 1080 pb foram agrupados em fragmentos cada vez maiores, através de recombinação homóloga in vivo em leveduras, até formar o genoma completo em um único YAC

Mas como clonar um gene específico?

Basicamente, de três maneiras diferentes:

- ✓ Obter um clone com o gene desejado realizando uma varredura de uma biblioteca genômica.
- ✓ Síntese química *in vitro* da sequência desejada para posterior clonagem
- ✓ Obter o gene por PCR para posterior clonagem

P: O que as duas últimas opções tem em comum??

Requerem que você conheça a sequência do gene!

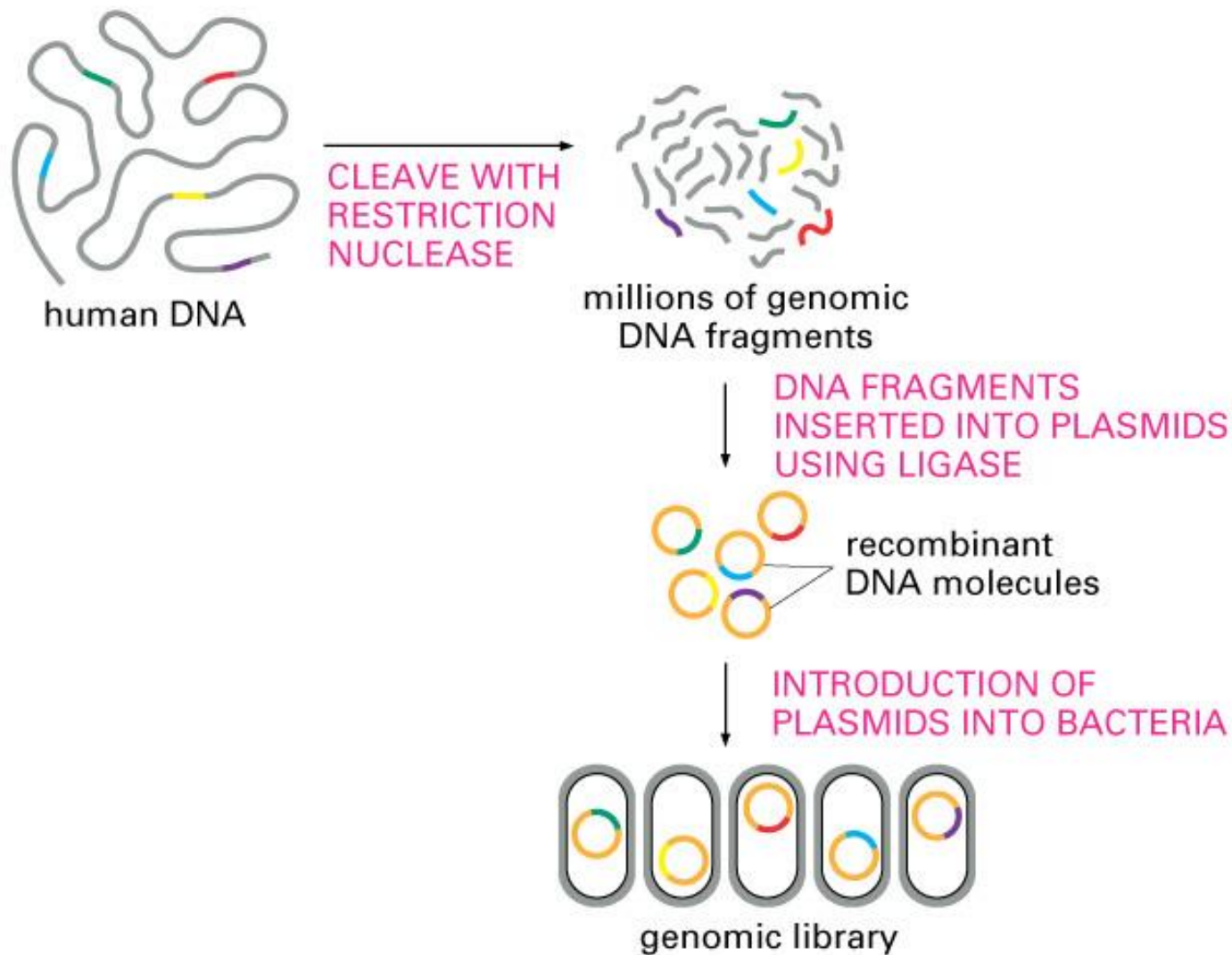
Bibliotecas genômicas

Bibliotecas genômicas: conjunto de diferentes fragmentos de DNA que compõem um genoma clonados em vetor.

Servem para:

- ✓ Repositório de genes de um determinado organismo.
- ✓ Sequenciamento de genomas
- ✓ **Uso em diferentes tipos de varredura, para isolar um gene de interesse.**
- ✓ **Uso em diferentes experimentos. P. ex., detecção de interações proteína-proteína.**

Construção de bibliotecas genômicas



Como encontrar seu gene de interesse na biblioteca?

Procurando pela atividade ou expressão da proteína codificada

- Ensaio funcionais
- Ensaio imunológicos

Procurando um gene conhecido pela sua sequência

- Colony Blotting, PCR

Clonagem de genes eucarióticos

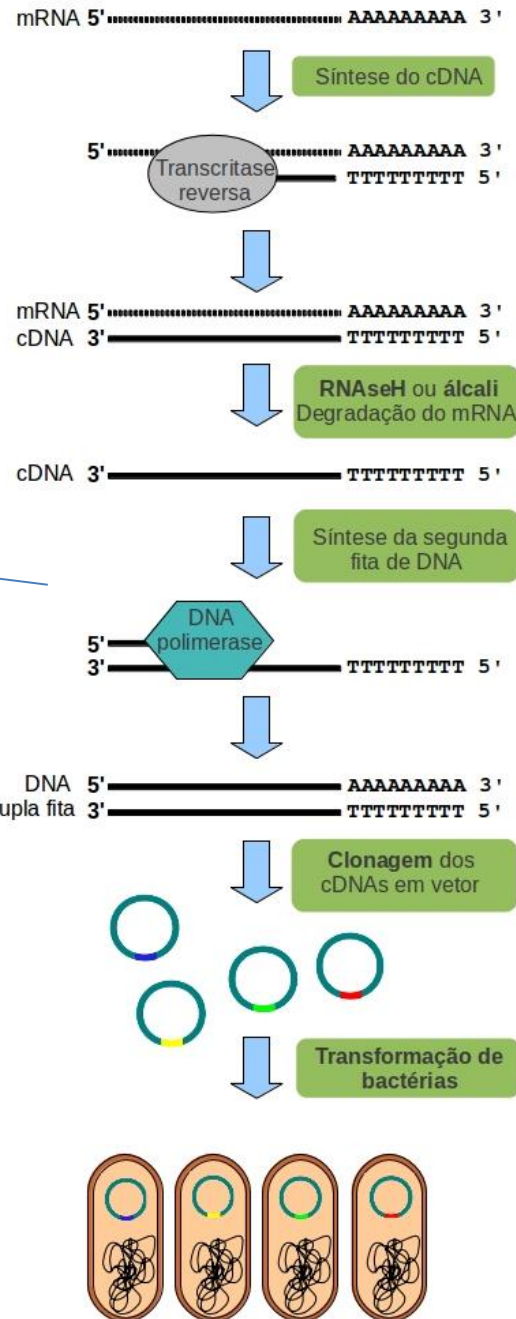
Para fins práticos, os **íntrons** que interrompem os genes eucarióticos são **indesejáveis**

Solução?

Clonar o cDNA!!

Corresponde ao RNAm maduro, já processado (**sem íntrons**)

Obtendo cDNA



O que falta aqui nesse esquema?

R: Primer para a síntese da segunda fita!!

Obtendo cDNA – segunda fita!

Método da
transferase
terminal

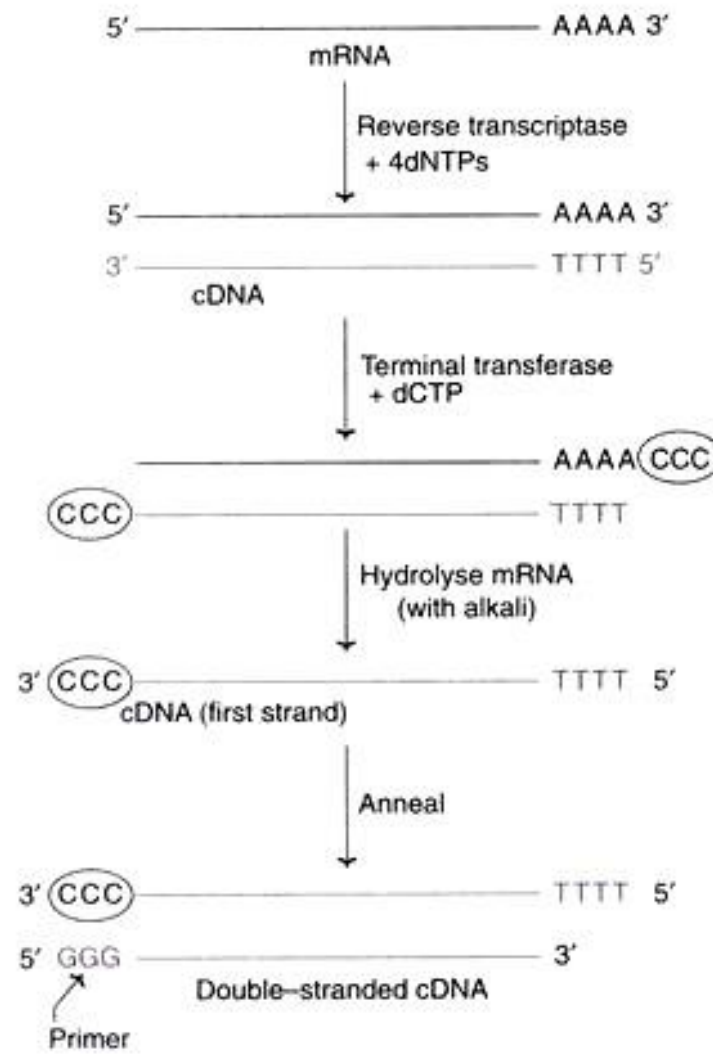
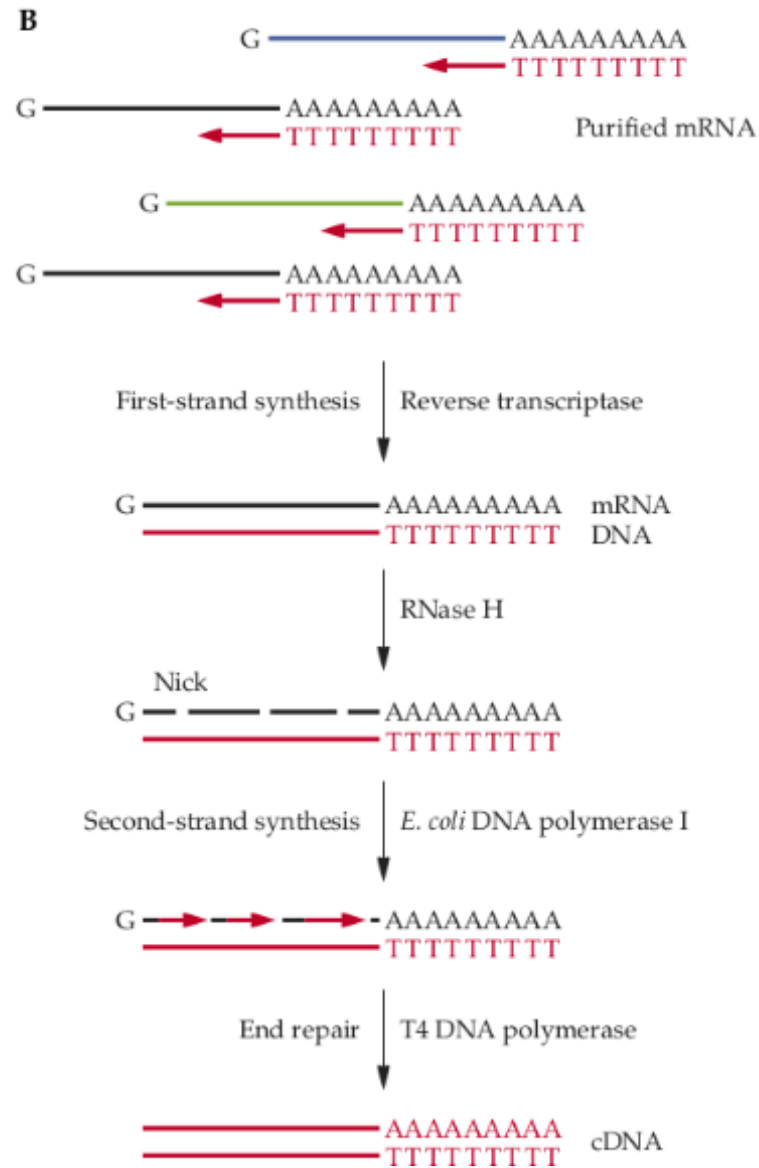


Fig. 9.4 : Improved method for complementary DNA synthesis.

Clonagem de genes eucarióticos



Método de “nick translation”

Exemplo de uso de bibliotecas genômicas

Identificando clones de interesse através de ensaios funcionais



Planta que vive em ambientes com alta salinidade.

Collect rhizosphere sample

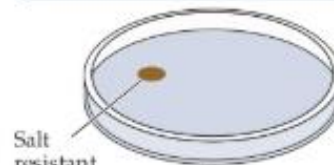
Recover bacterial fraction

Extract genomic DNA from entire bacterial community

Clone DNA fragments to construct a metagenomic library in *E. coli*

192,000 clones
 1.2×10^9 bp of metagenomic DNA

Plate on media containing 3% NaCl



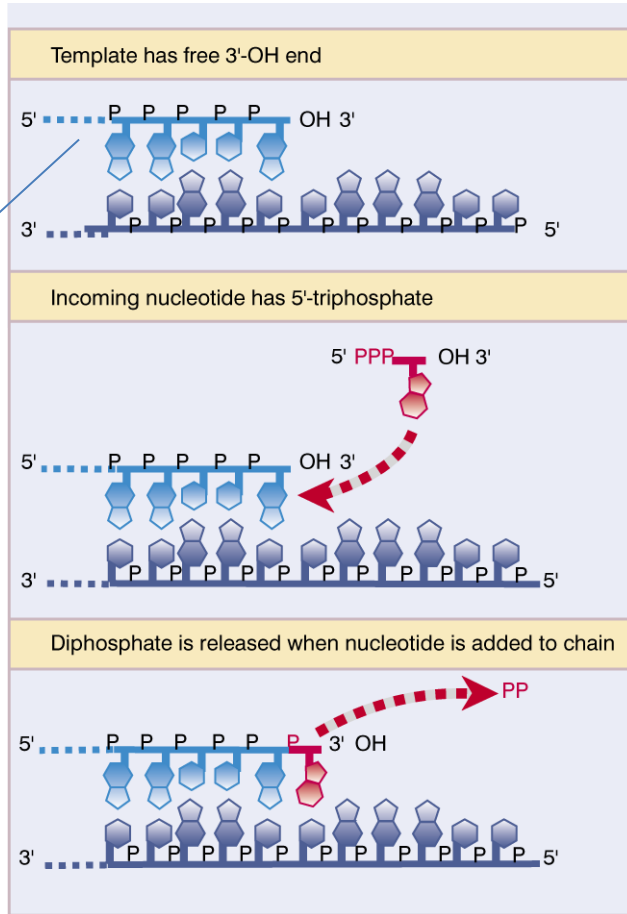
Sequence inserted genomic DNA fragments to identify genes that confer salt resistance

Objetivo: isolar genes eu conferem maior resistência ao sal, provenientes das bactérias da rizosfera

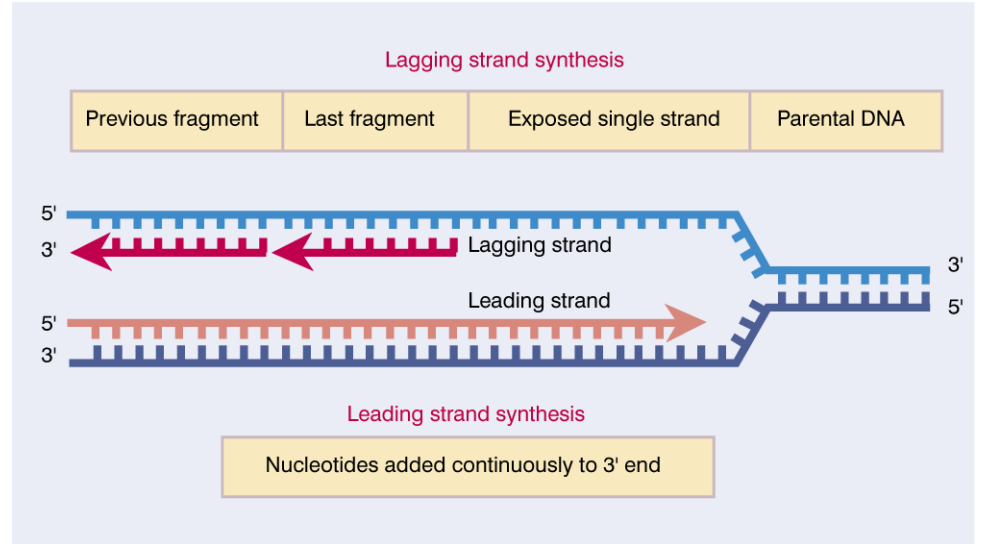
Reação da polimerase em Cadeia (PCR)



Como a célula copia o DNA?

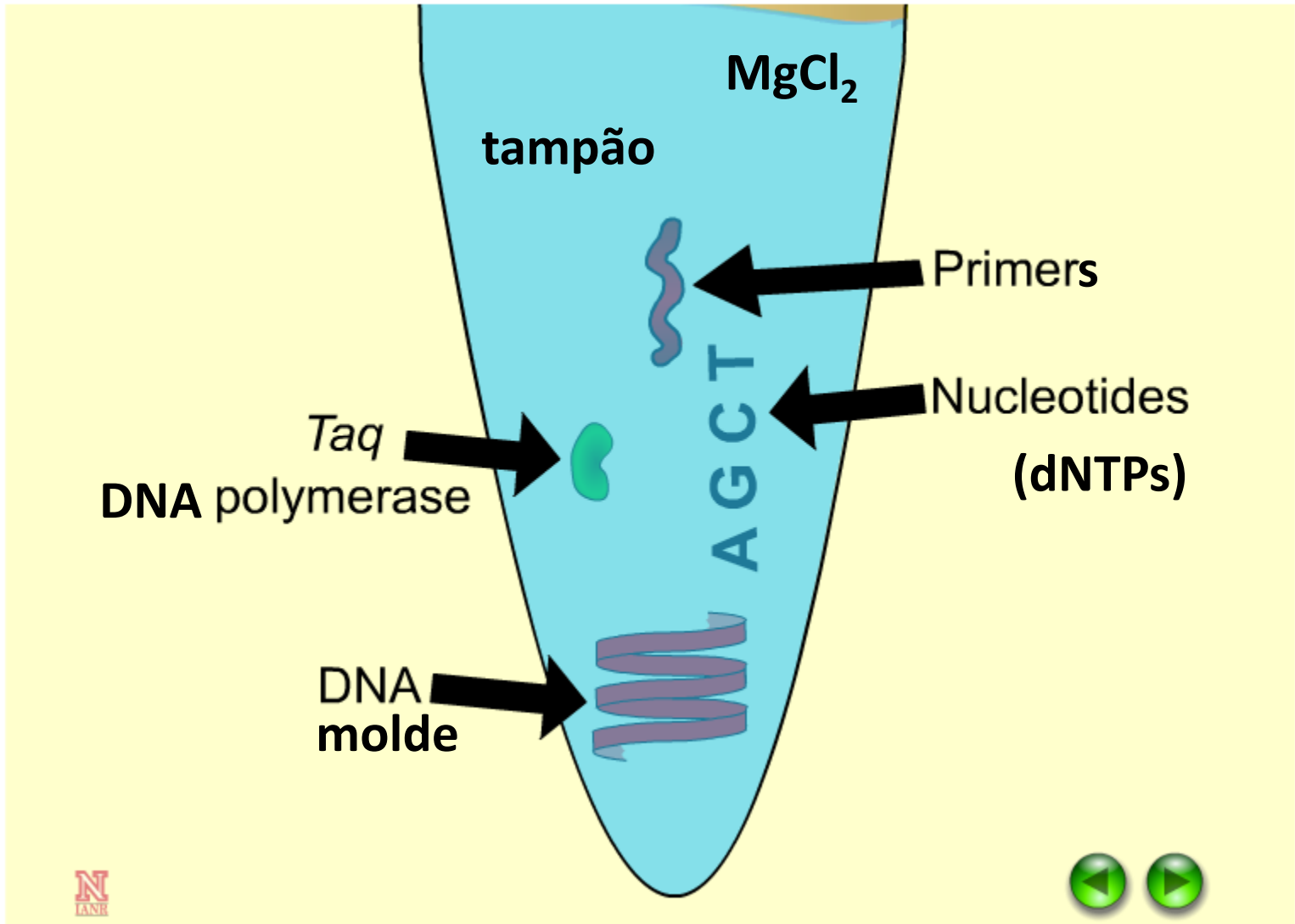


Iniciador (Primer)!

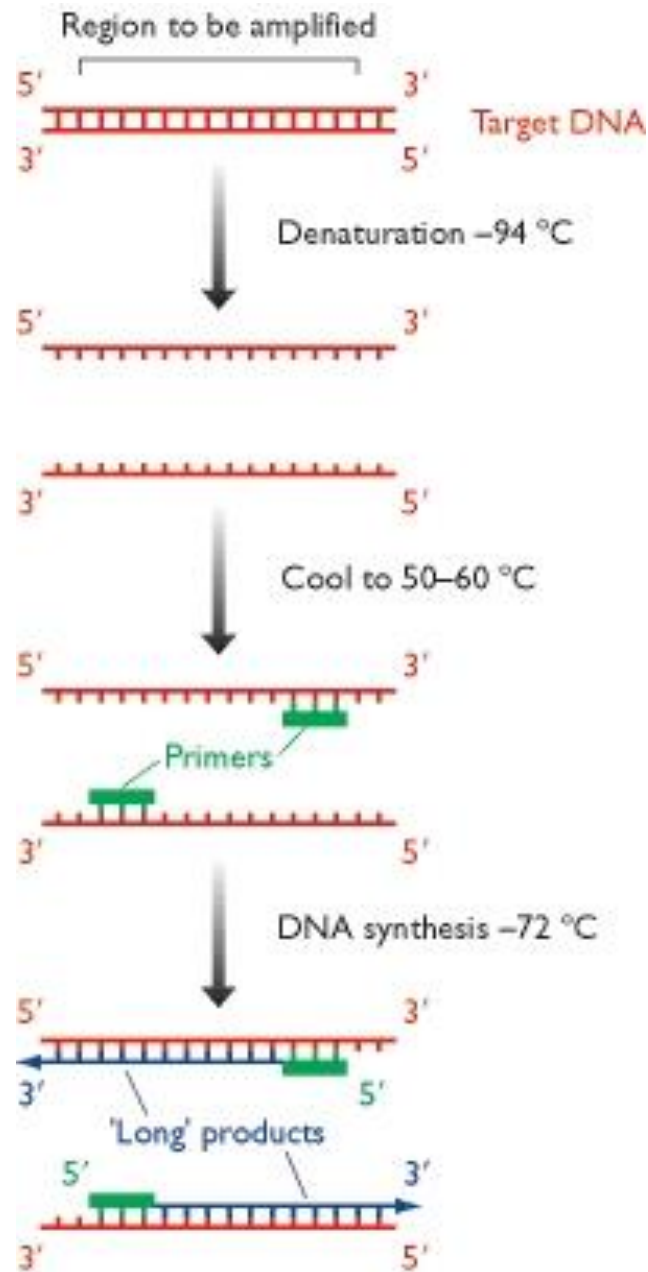


Quais são os componentes básicos necessários para reproduzir esta reação in vitro?

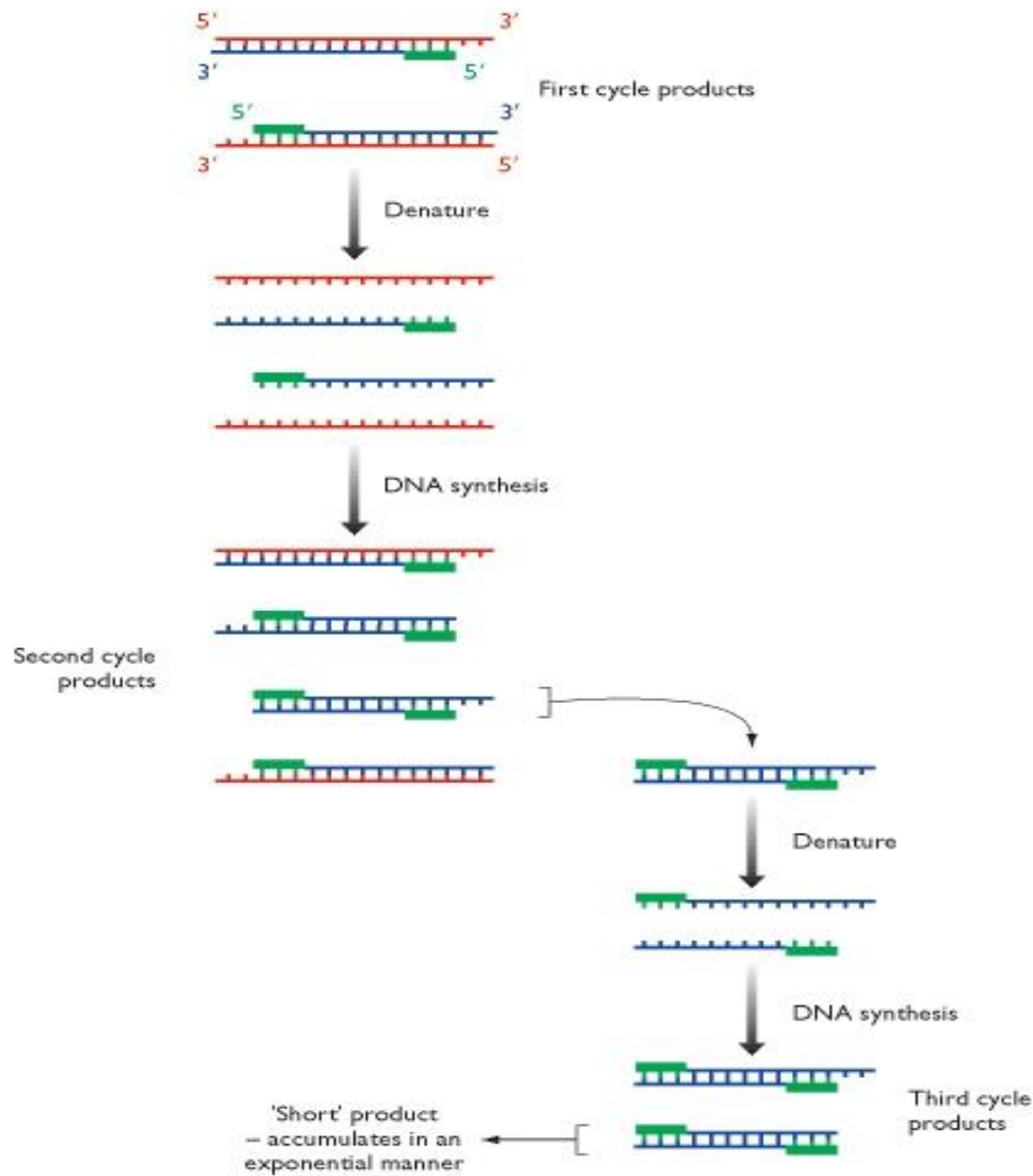
O que é necessário para reproduzir a síntese de DNA in vitro?



Reação da polimerase em Cadeia (PCR)



Reação da polimerase em Cadeia (PCR)



Desenho de iniciadores:

- Usualmente, entre 15 e 25 nucleotídeos
- Devem flanquear a sequência a ser amplificada
- Idealmente, os dois iniciadores devem ter Tms semelhantes
 $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$
- Não devem conter alta quantidade de GC na sua porção 3', mas devem terminar preferencialmente em G.

Especificidade e Fidelidade da PCR

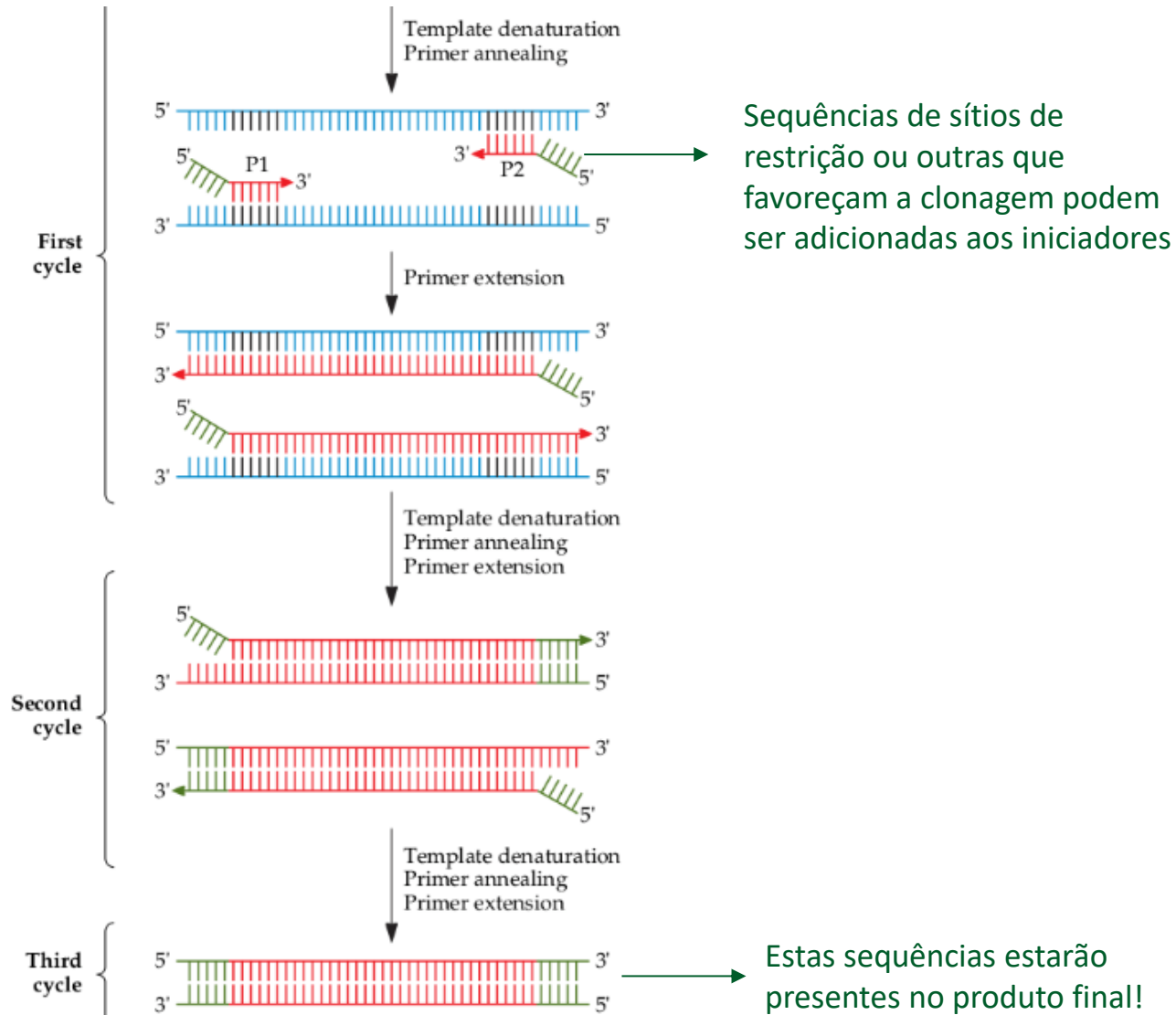
Especificidade da PCR:

- Desenho dos iniciadores
- Temperatura de anelamento usada nos ciclos (geralmente, 5 graus abaixo da T_m dos oligos)

Fidelidade da PCR:

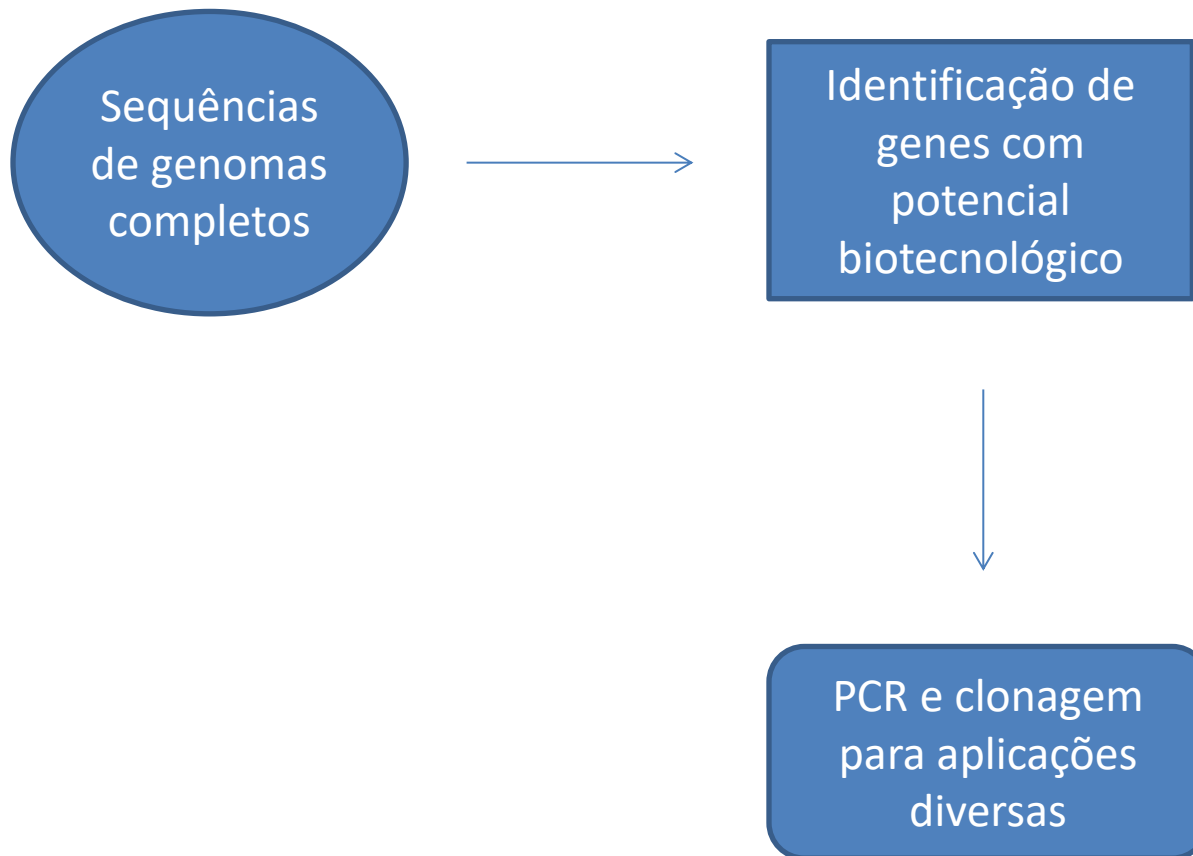
- Concentração de magnésio
- Concentração de dNTPs
- Enzima utilizada

Clonando produtos de PCR



PCR e a nova revolução da Biotecnologia

Com o advento do PCR e da era genômica, a tarefa de clonar um gene de interesse pode dispensar bibliotecas!



Outros métodos de clonagem:

➤ Clonagem Recombinacional

➤ SLIC (sequence and ligation-independent cloning):

Li M.Z. & Elledge S.J. (2007), “Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC”, *Nature Methods*, 2007, **4** (3), 251-256

➤ Gibson assembly (ideal para fragmentos grandes)

Daniel G Gibson, Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J Craig Venter, Clyde A Hutchison III & Hamilton O Smith

Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases

Nature Methods volume 6, pages 343–345 (2009)

doi:10.1038/nmeth.1318

Métodos alternativos de clonagem - Recombinacional

Integração e excisão de bacteriófagos mediada por recombinação sítio-específica

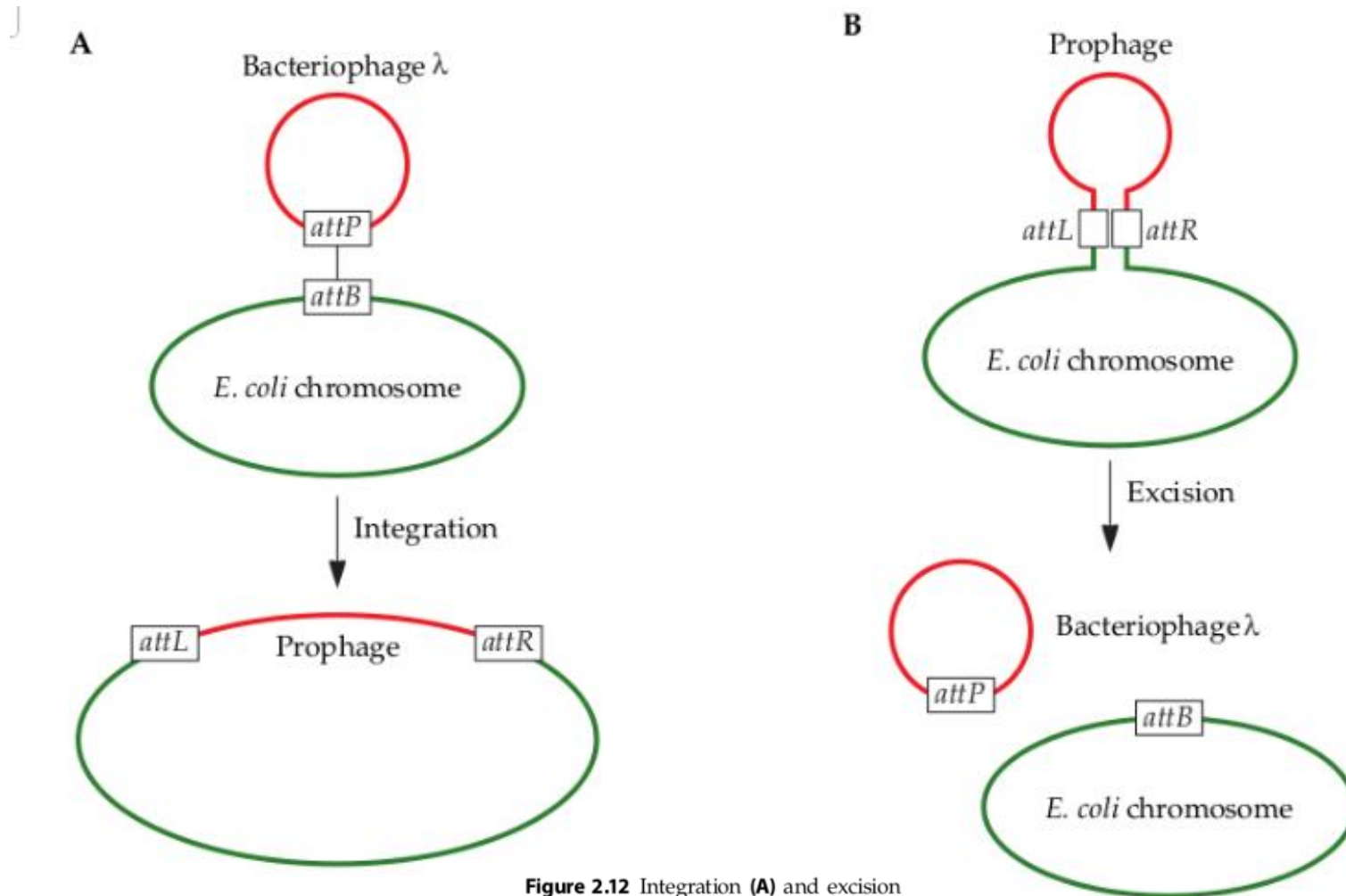


Figure 2.12 Integration **(A)** and excision **(B)** of bacteriophage λ into and from the *E. coli* genome via recombination between attachment (*att*) sites in the bacterial and bacteriophage DNA.

Métodos alternativos de clonagem - Recombinacional

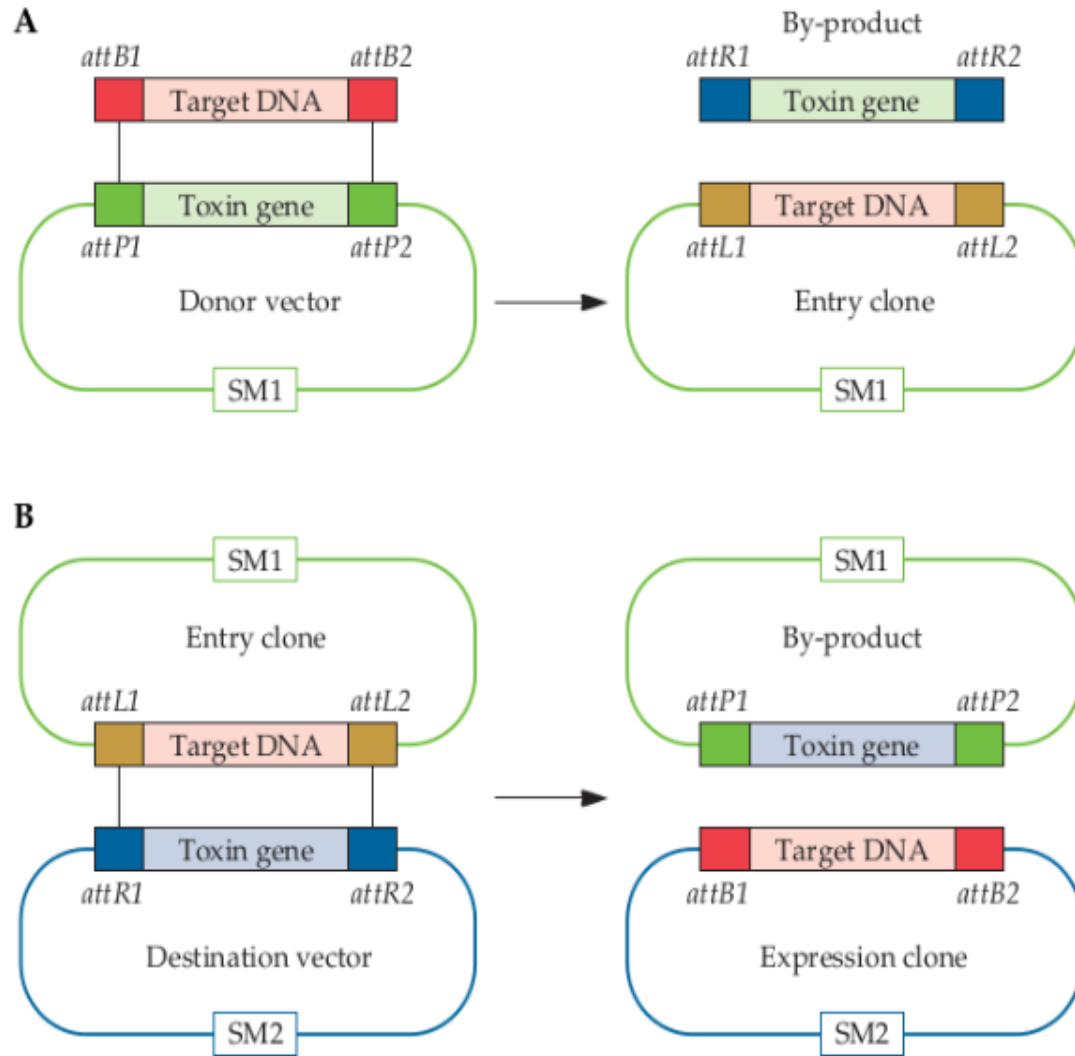
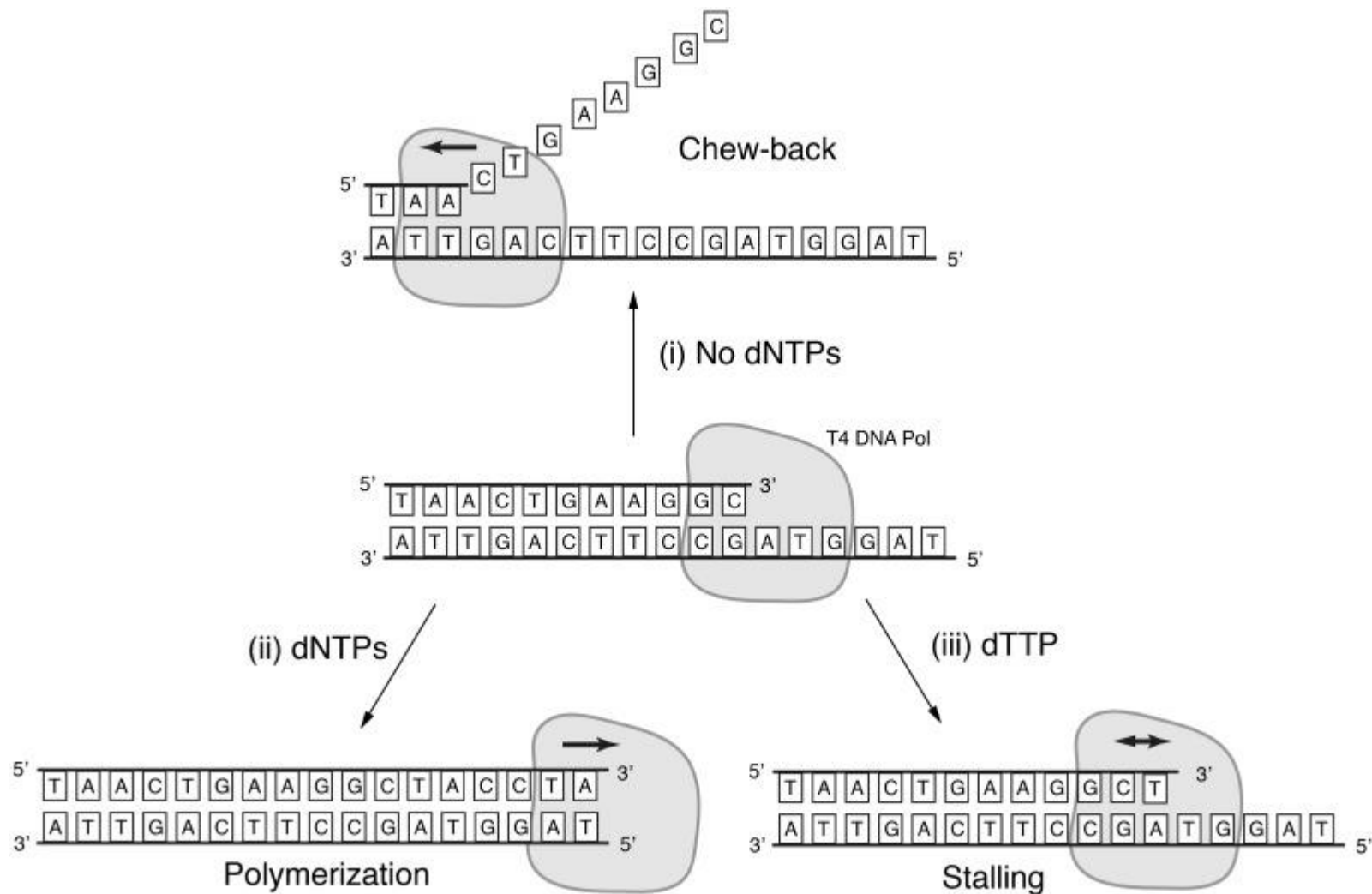
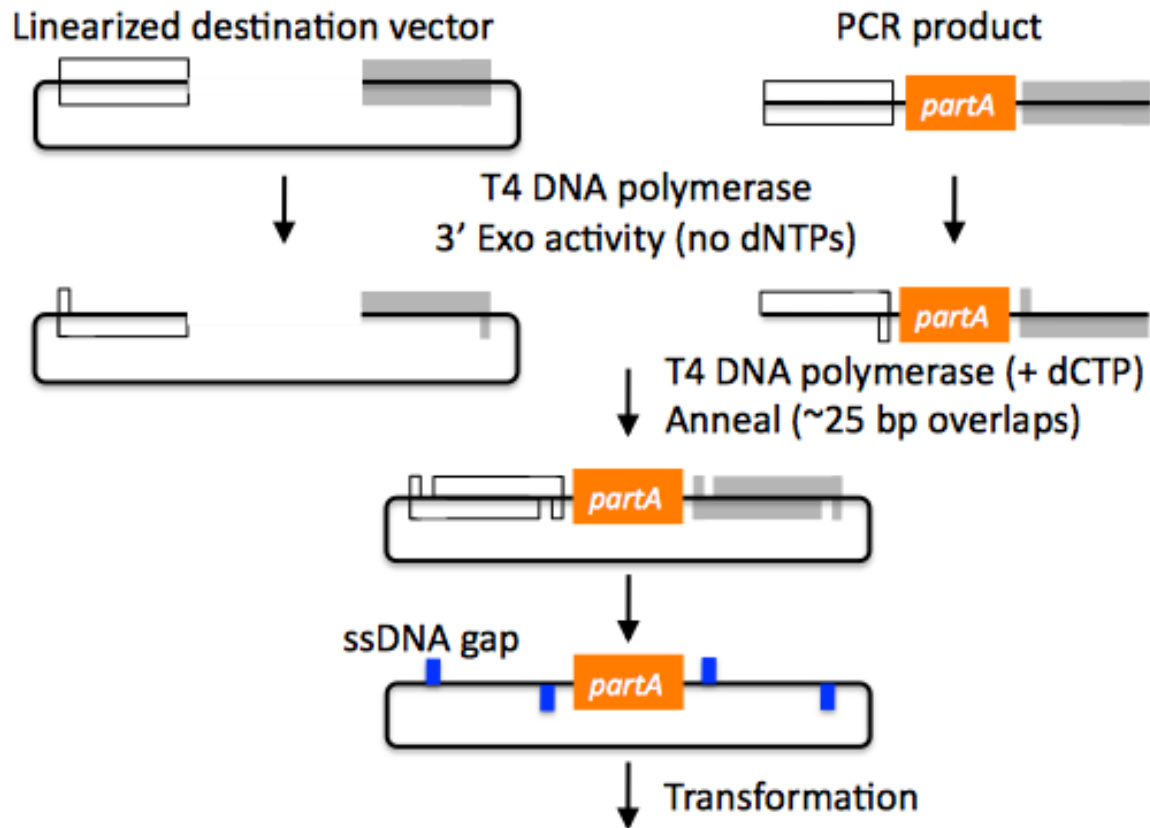


Figure 2.13 Recombinational cloning. **(A)** Recombination (thin vertical lines) between a target gene with flanking attachment sites (*attB1* and *attB2*) and a donor vector with *attP1* and *attP2* sites on either side of a toxin gene results in an entry clone where the target gene is flanked by *attL1* and *attL2* sites. The selectable marker (SM1) enables selection of cells transformed with an entry clone. The protein encoded by the toxin gene kills cells transformed with nonrecombined donor vectors. The origin of replication of the donor vector is not shown. **(B)** Recombination between the entry clone with flanking *attL1* and *attL2* sites and a destination vector with *attR1* and *attR2* sites flanking the target gene. The selectable marker (SM2) enables selection of transformed cells with an expression clone. The second plasmid, designated as a by-product, has the toxin gene flanked by *attP1* and *attP2* sites. Cells with an intact destination vector that did not undergo recombination or that retain the by-product plasmid are killed by the toxin. Transformed cells with an entry clone, which lacks the SM2 selectable marker, are selected against. The origins of replication and the sequences for expression of the target gene are not shown.

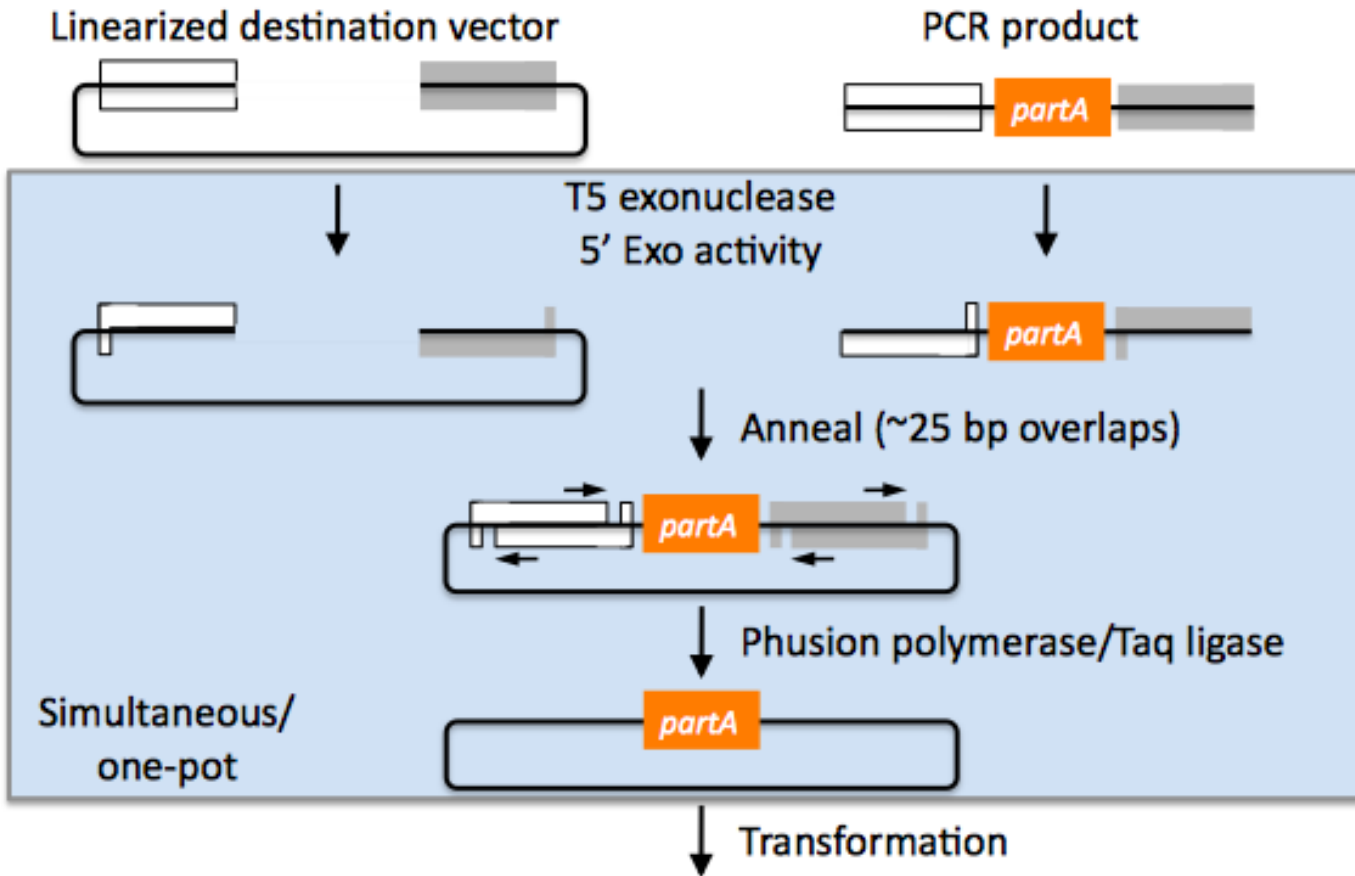
Propriedades da T4 DNA polimerase



Métodos alternativos de clonagem - SLIC

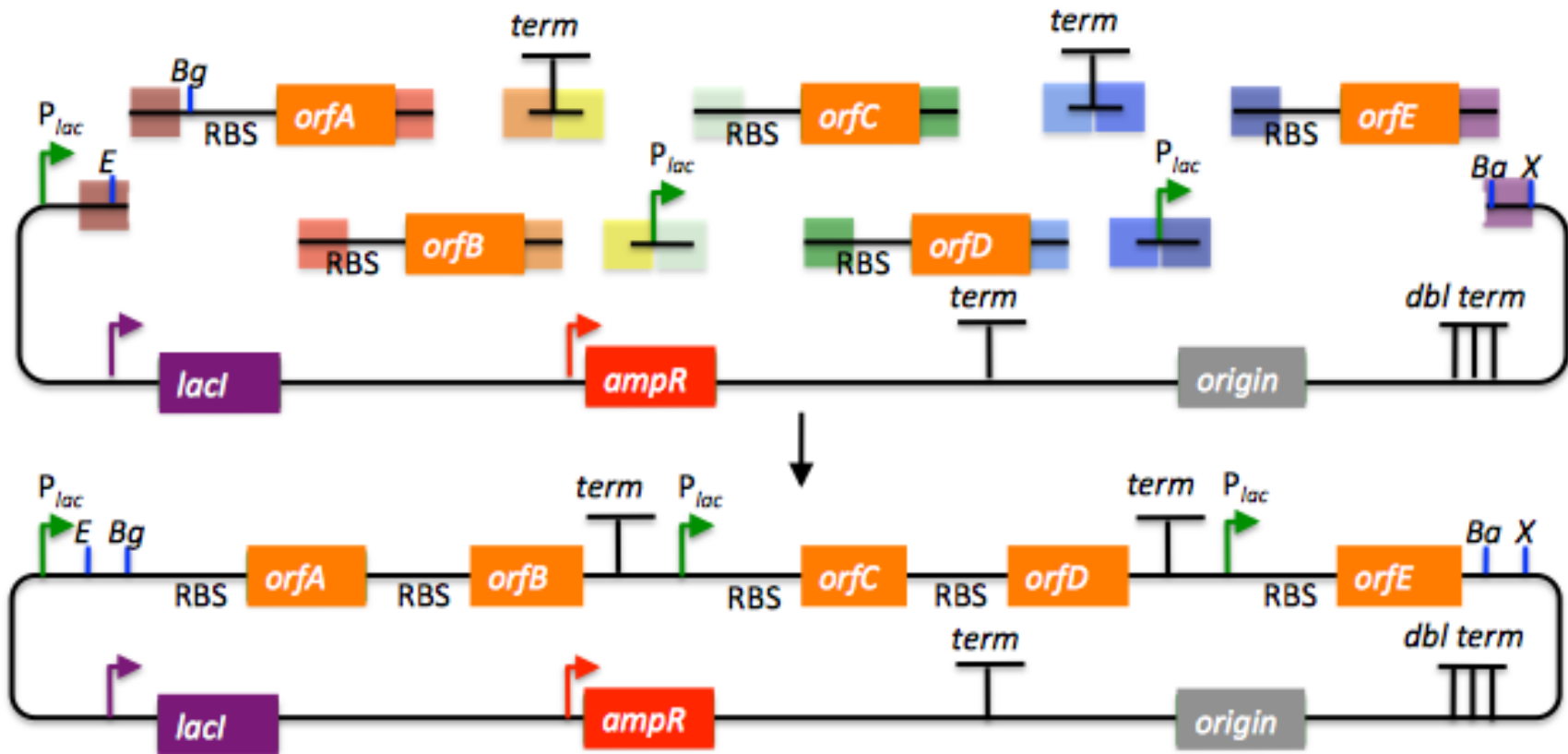


Métodos alternativos de clonagem – Gibson assembly



Métodos alternativos de clonagem

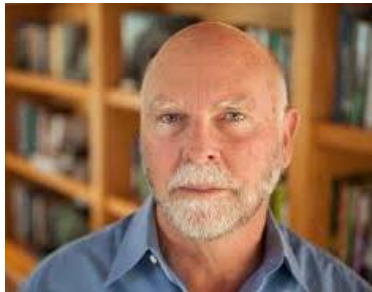
Ambos os métodos (Gibson e SLIC) podem ser usados para a montagem de construções complexas!



Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

2 JULY 2010 VOL 329 SCIENCE

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



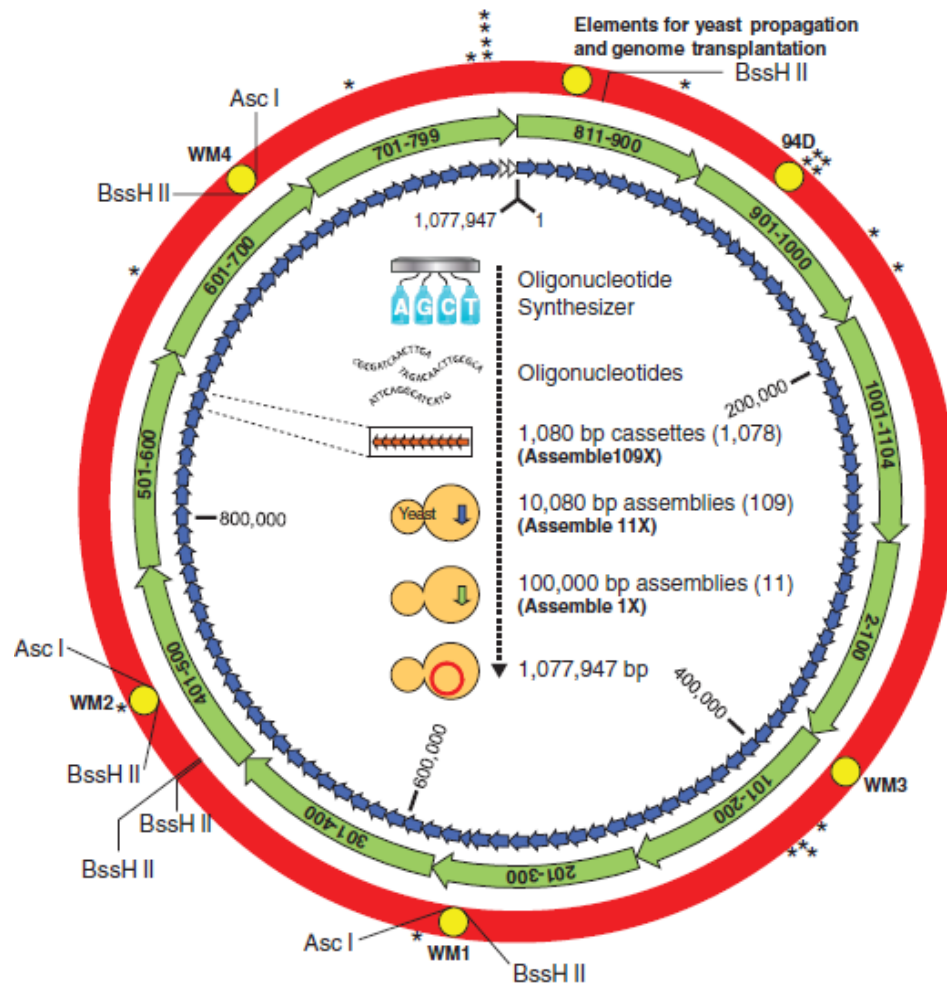
J. Craig Venter

JCVI – Instituto de Pesquisas em genômica

Construindo um genoma sintético

Baseado nos micoplasmas, procaríotos com os menores genomas!

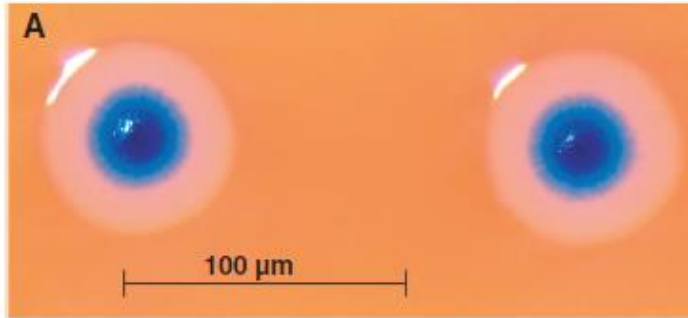
Recriou-se o genoma de *Mycoplasma mycoides*, para introdução em células de *M. capricolum*



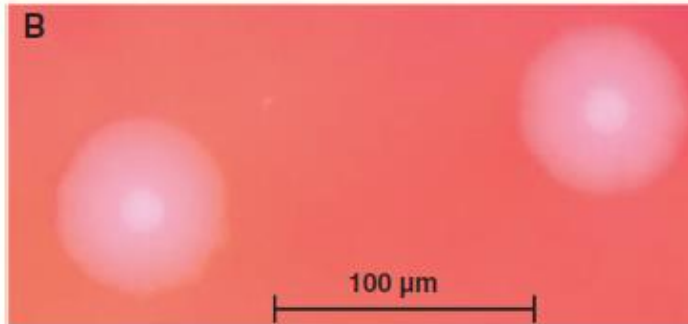
Desafios:

- Construção do genoma sintético em YAC
- Isolar DNA do cromossomo artificial de levedura intacto
- Transplantar a linhagem recipiente com o genoma sintético.
- Driblar o sistema de restrição da linhagem recipiente.

Construindo um genoma sintético



Mycoplasma mycoides JCVI-syn1.0 (foi incluído o gene *lacZ*)



M. capricolum subspecies *capricolum*
(linhagem receptora- originalmente *lac*-)

Design and synthesis of a minimal bacterial genome

25 MARCH 2016 • VOL 351 ISSUE 6280

SCIENCE

Clyde A. Hutchison III,^{1,*†} Ray-Yuan Chuang,^{1,†‡} Vladimir N. Noskov,¹
Nacyra Assad-Garcia,¹ Thomas J. Deerinck,² Mark H. Ellisman,² John Gill,³
Krishna Kannan,³ Bogumil J. Karas,¹ Li Ma,¹ James F. Pelletier,^{4,§} Zhi-Qing Qi,³
R. Alexander Richter,¹ Elizabeth A. Strychalski,⁴ Lijie Sun,^{1||} Yo Suzuki,¹
Billyana Tsvetanova,³ Kim S. Wise,¹ Hamilton O. Smith,^{1,3} John I. Glass,¹
Chuck Merryman,¹ Daniel G. Gibson,^{1,3} J. Craig Venter^{1,3*}

Construindo um genoma sintético **mínimo!**

O genoma de *Mycoplasma mycoides* (JCVI-syn1.0) foi usado como base para fazer um genoma ainda menor, contendo apenas os genes essenciais para crescimento em laboratório! **531 kb (473 genes)**

