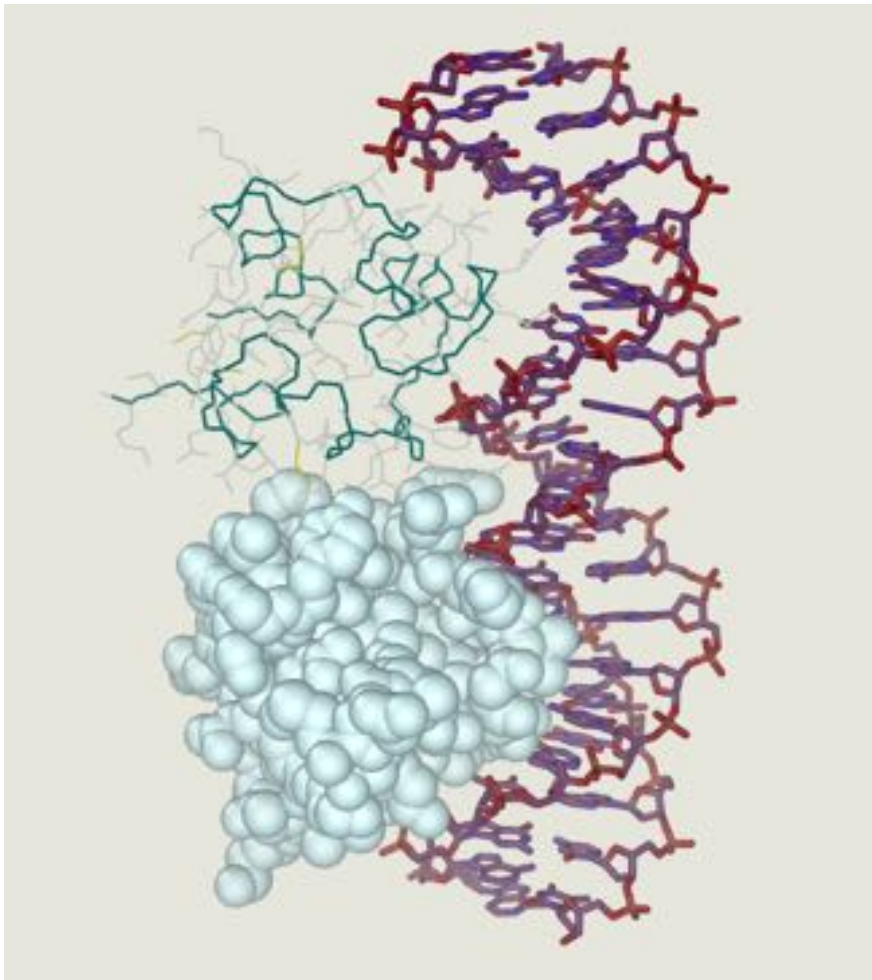


ESTUDOS DAS ÔMICAS: GENÔMICA, TRANSCRIPTÔMICA E METAGENÔMICA

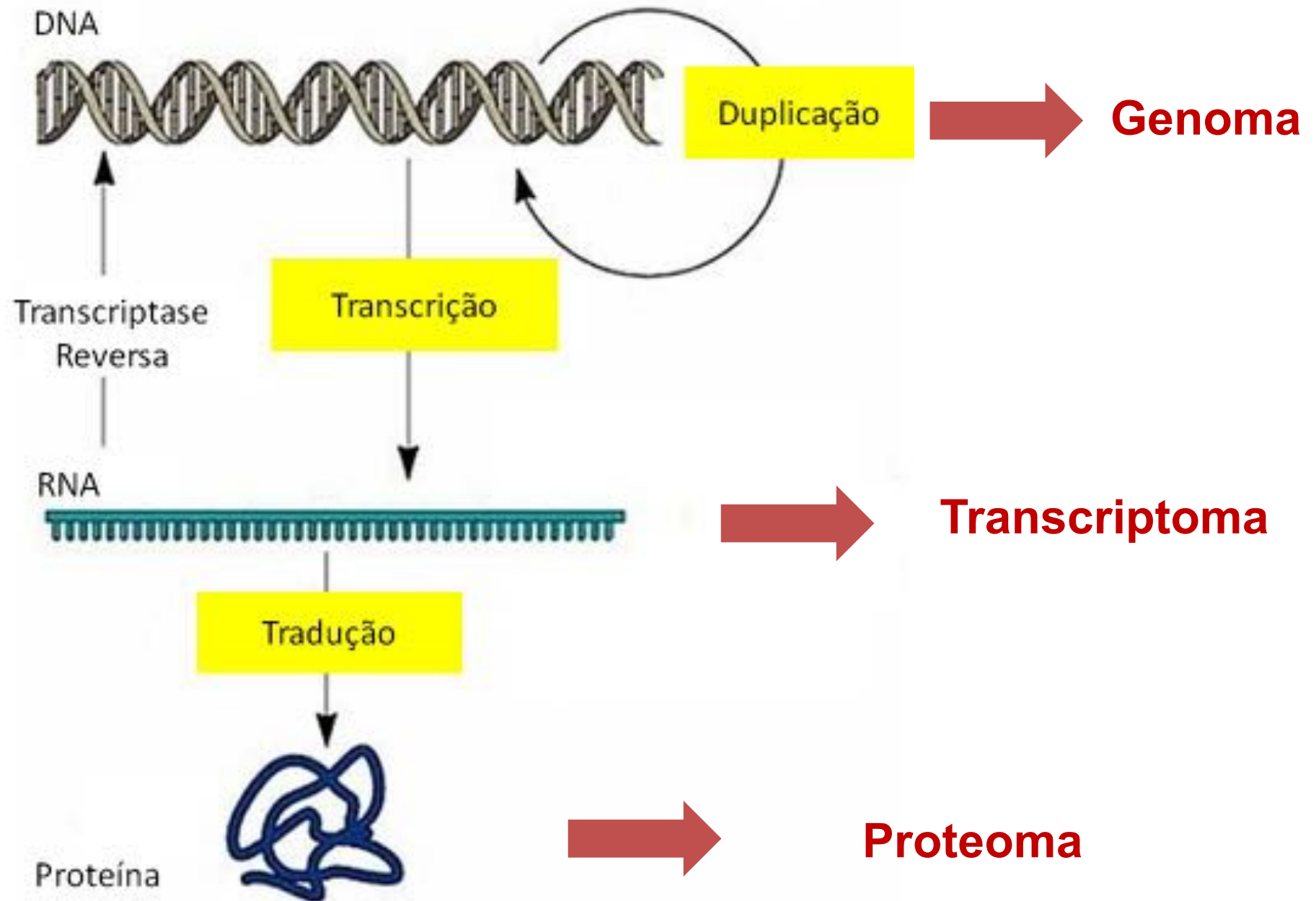


Aula 7

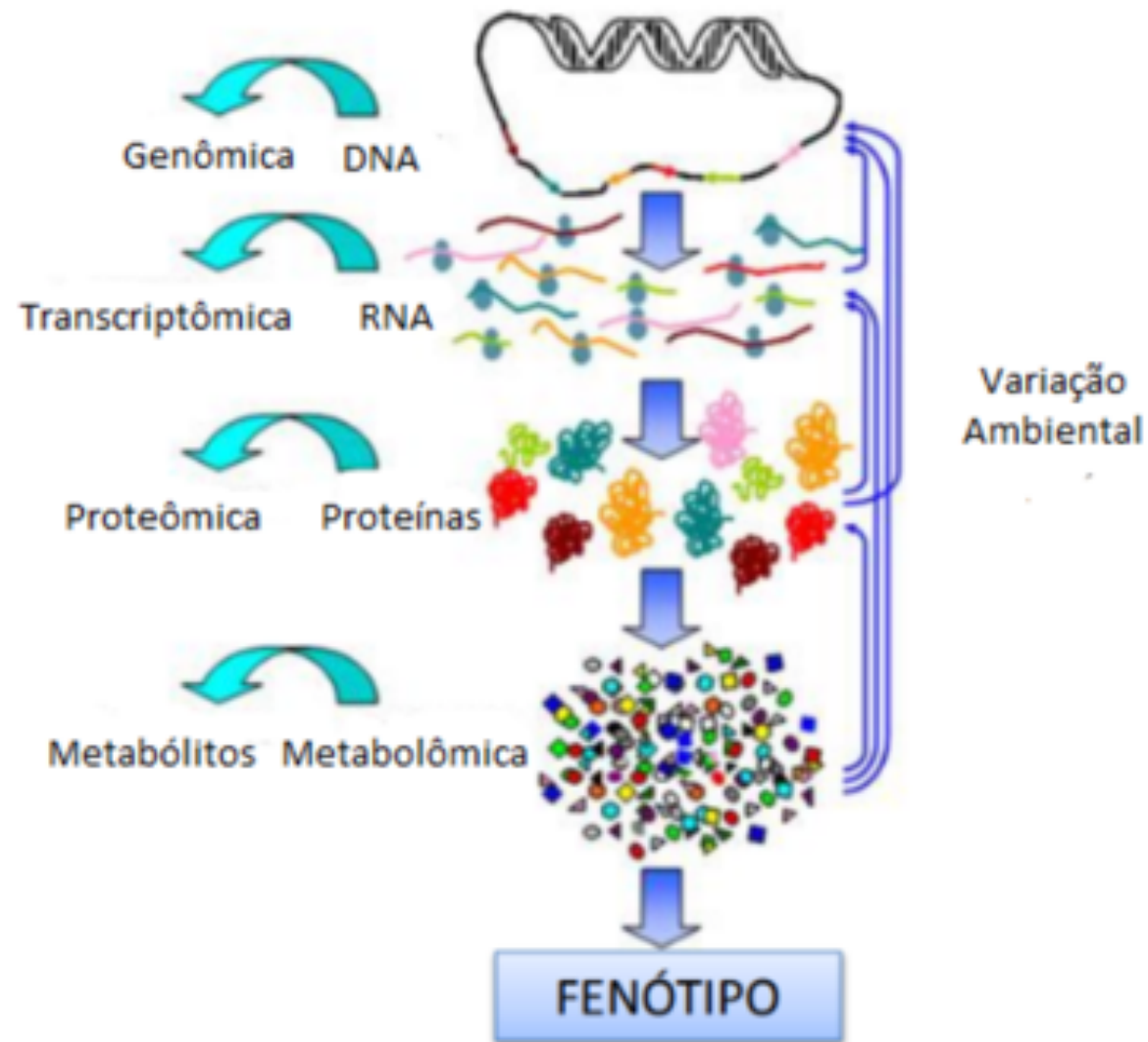
LGN232 – Genética Molecular

Maria Letícia Bonatelli
Departamento de Genética
mlbonatelli@usp.br

DOGMA DA BIOLOGIA CELULAR



Avanços tecnológicos dos últimos anos permitiram o surgimento de uma nova era nas pesquisas: **A Era das Ômicas**.



Conjunto de todas as características observáveis – que são influenciadas tanto por seu genótipo quanto pelo ambiente



Diferentes estímulos podem afetar diretamente o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma.



DEFININDO ALGUNS CONCEITOS

Genoma: toda informação hereditária de um organismo que está codificada em seu DNA (ou, em alguns vírus no RNA). Isto inclui tanto os genes como as sequências não-codificadoras.

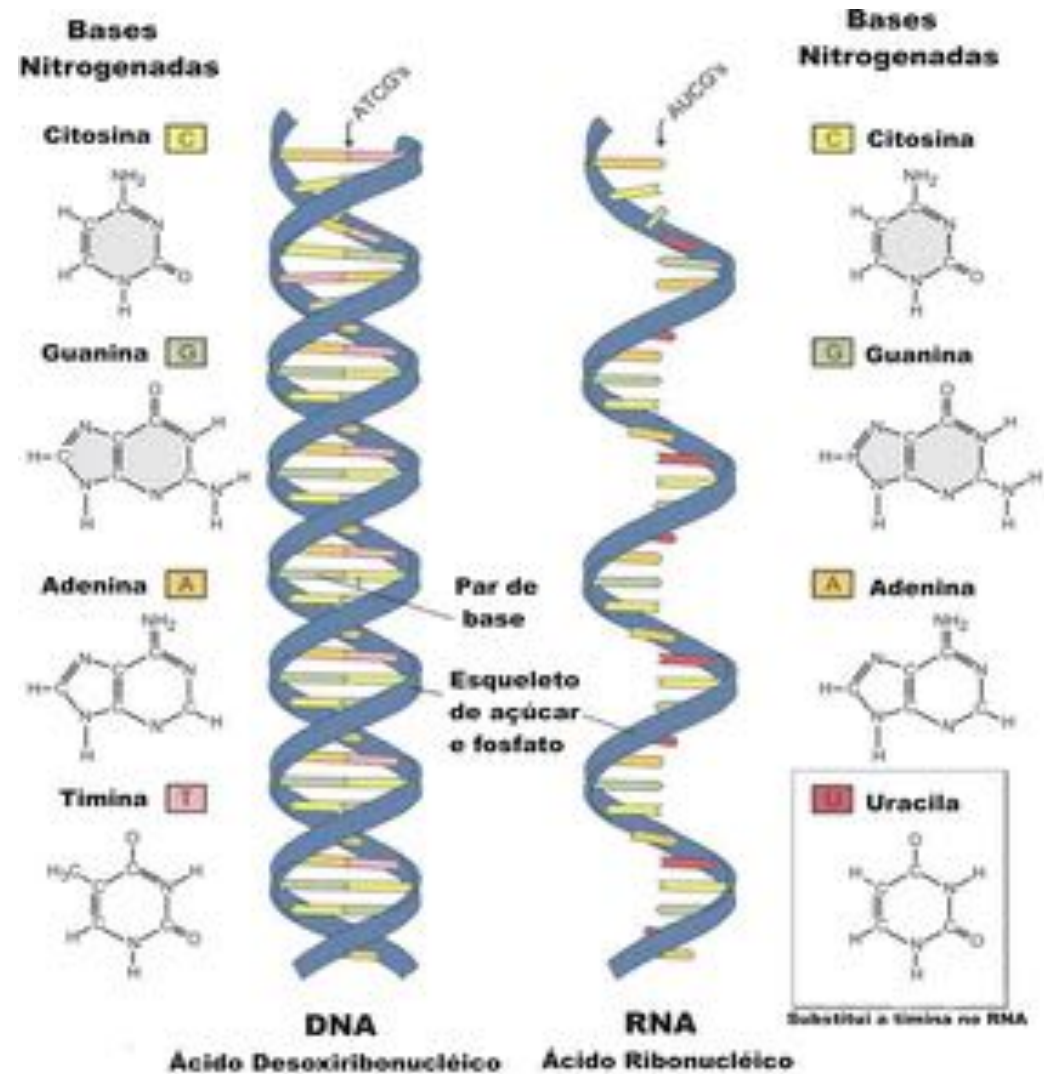
Transcriptoma: conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Portanto, ele é o reflexo direto da expressão dos genes.

Proteoma: conjunto de todas as proteínas em uma célula, organela, fluido biológico, tecido ou organismo em um dado momento.

Metaboloma: conjunto de todos os metabólitos em uma célula, fluido biológico, tecido ou organismo.

DNA e RNA:

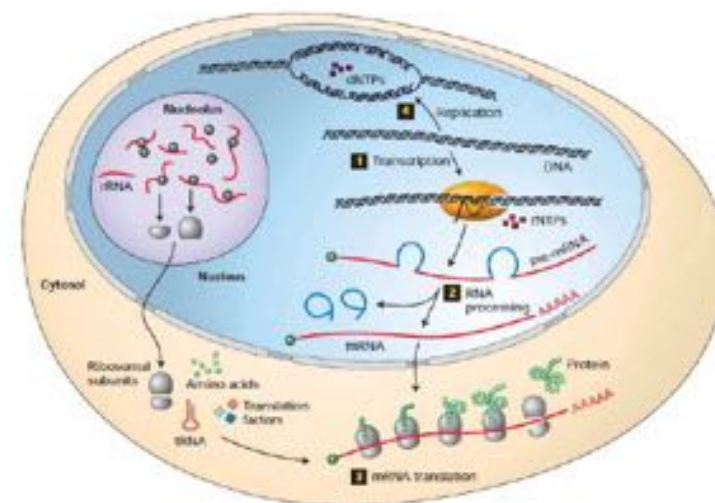
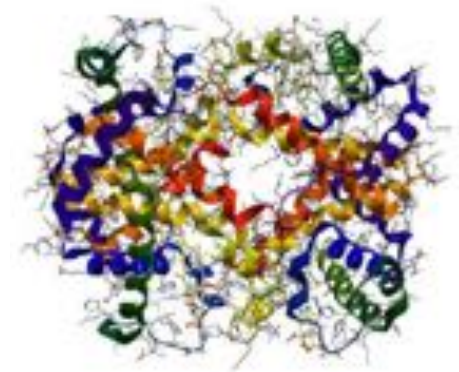
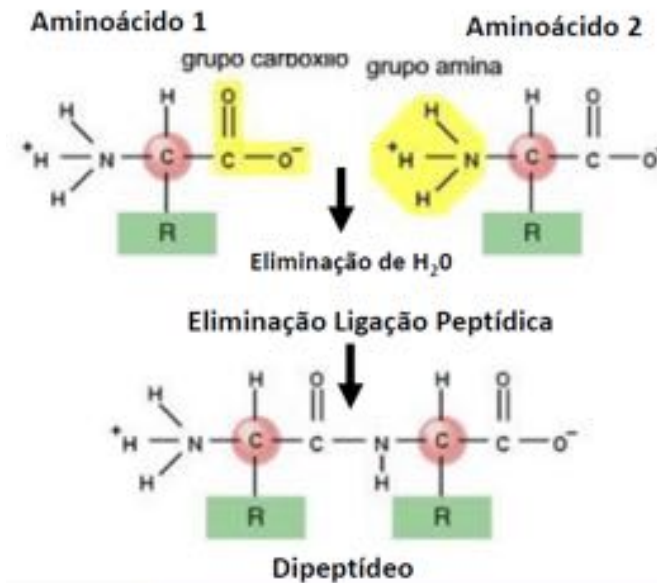
São ácidos nucleicos, encontrados em todas as células. Esses estão envolvidos na transmissão de caracteres hereditários e na produção de proteínas



Proteínas:

São moléculas orgânicas de **estrutura complexa e massa molecular elevada**. São sintetizados pelos organismos vivos através de ligações peptídicas covalentes entre aminiácidos.

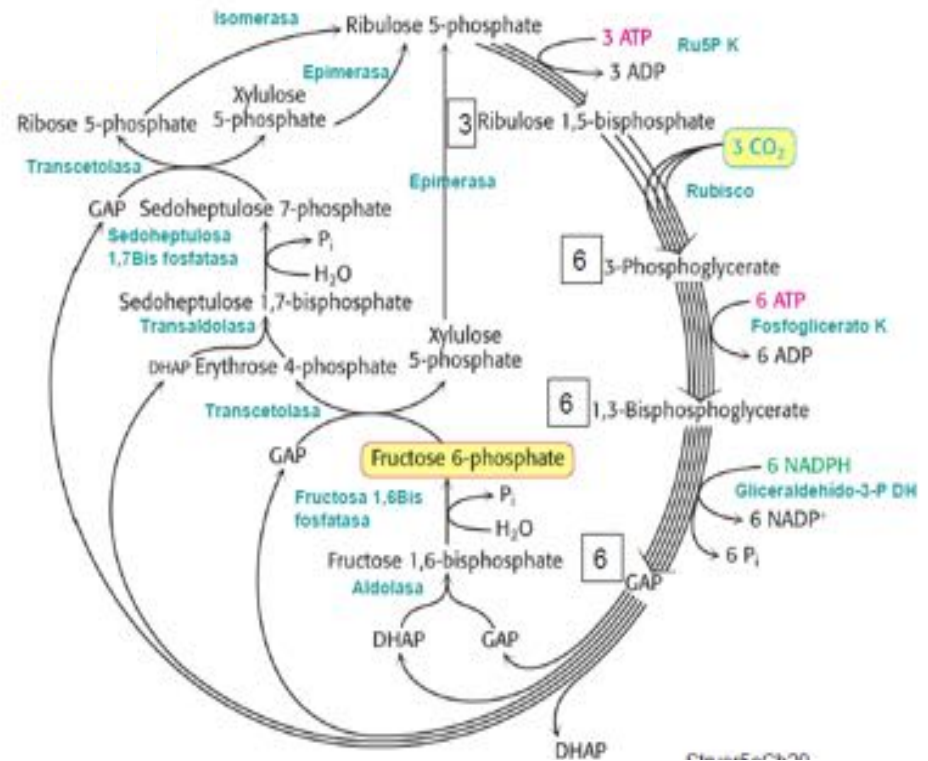
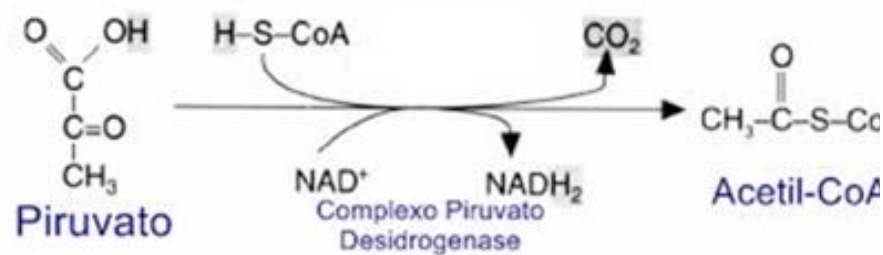
Funções: enzimas, anticorpos, componentes estruturais.



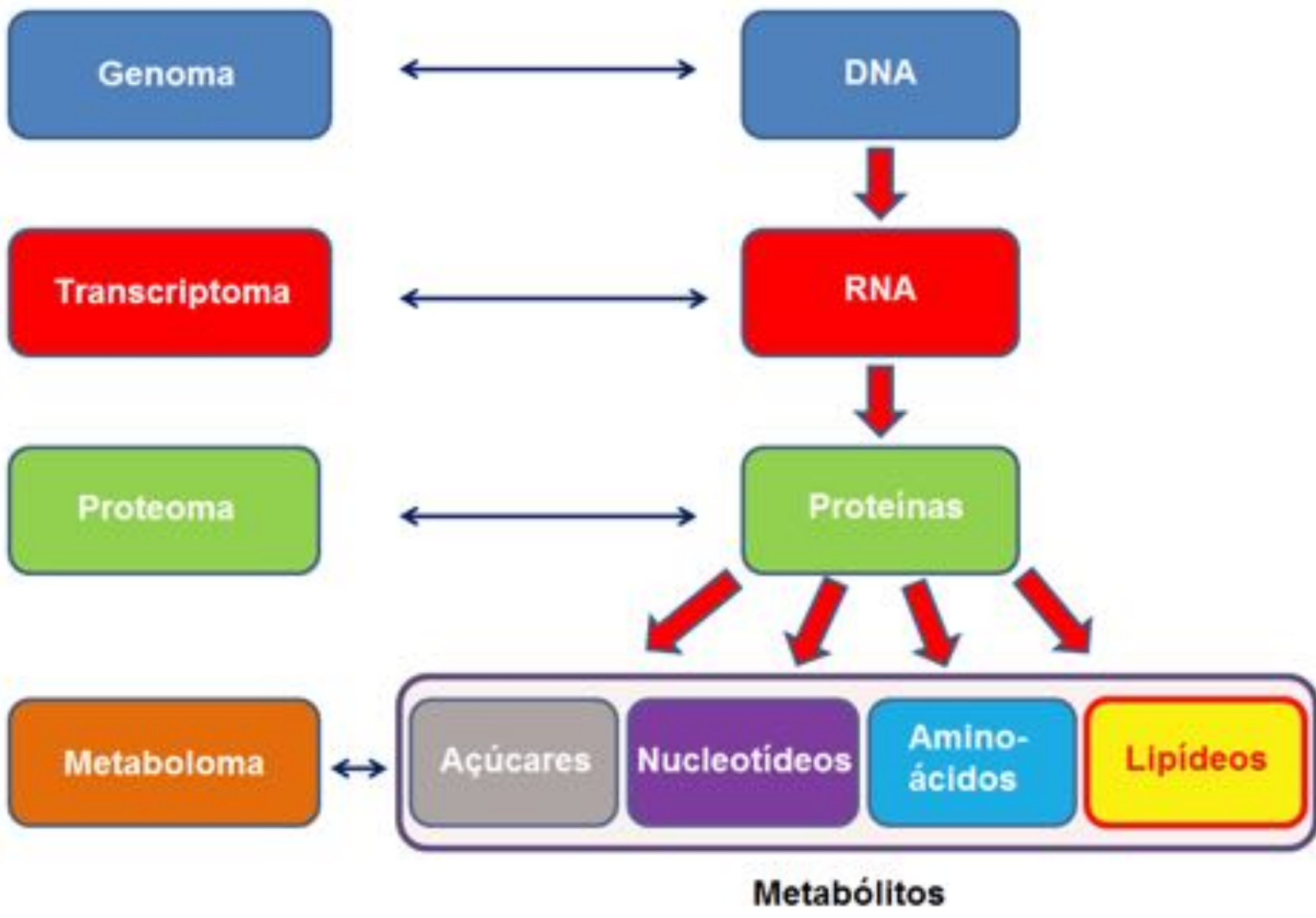
Metabólitos:

Carboidratos
Alcoóis
Aminoácidos
Ácidos orgânicos
Lipídios

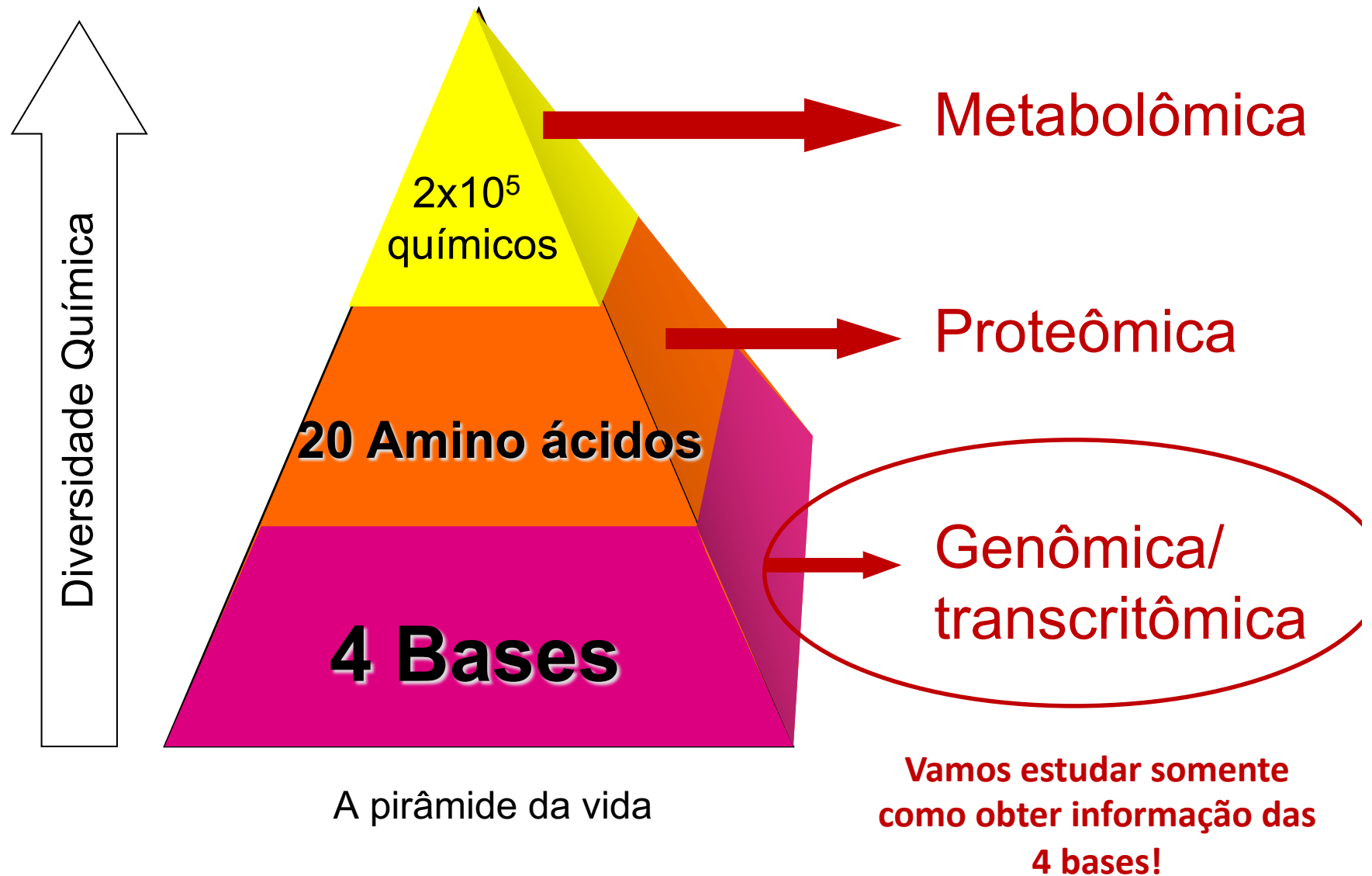
Metabólitos são os intermediários (substratos, cofatores) e produtos do metabolismo!



Ciclo de Calvin



DIFICULDADE DOS ESTUDOS DAS “ÔMICAS”



MAS COMO EU ESTUDO O GENOMA E TRANSCRIPTOMA?



SEQUENCIAMENTO DE DNA E RNA

Método clássico:

Preparo de Biblioteca Genômica: coleção de clones de DNA representando o genoma de um organismo

Preparo de Biblioteca de cDNA: coleção de clones com insertos de DNA complementar (cDNA), sintetizados a partir de moléculas de mRNA de uma célula

Método mais atual:

Sequenciamento do Genoma Completo: DNA total do organismo

Sequenciamento de cDNA: segmentos de DNA complementar (cDNA), sintetizados a partir de moléculas de mRNA de uma célula

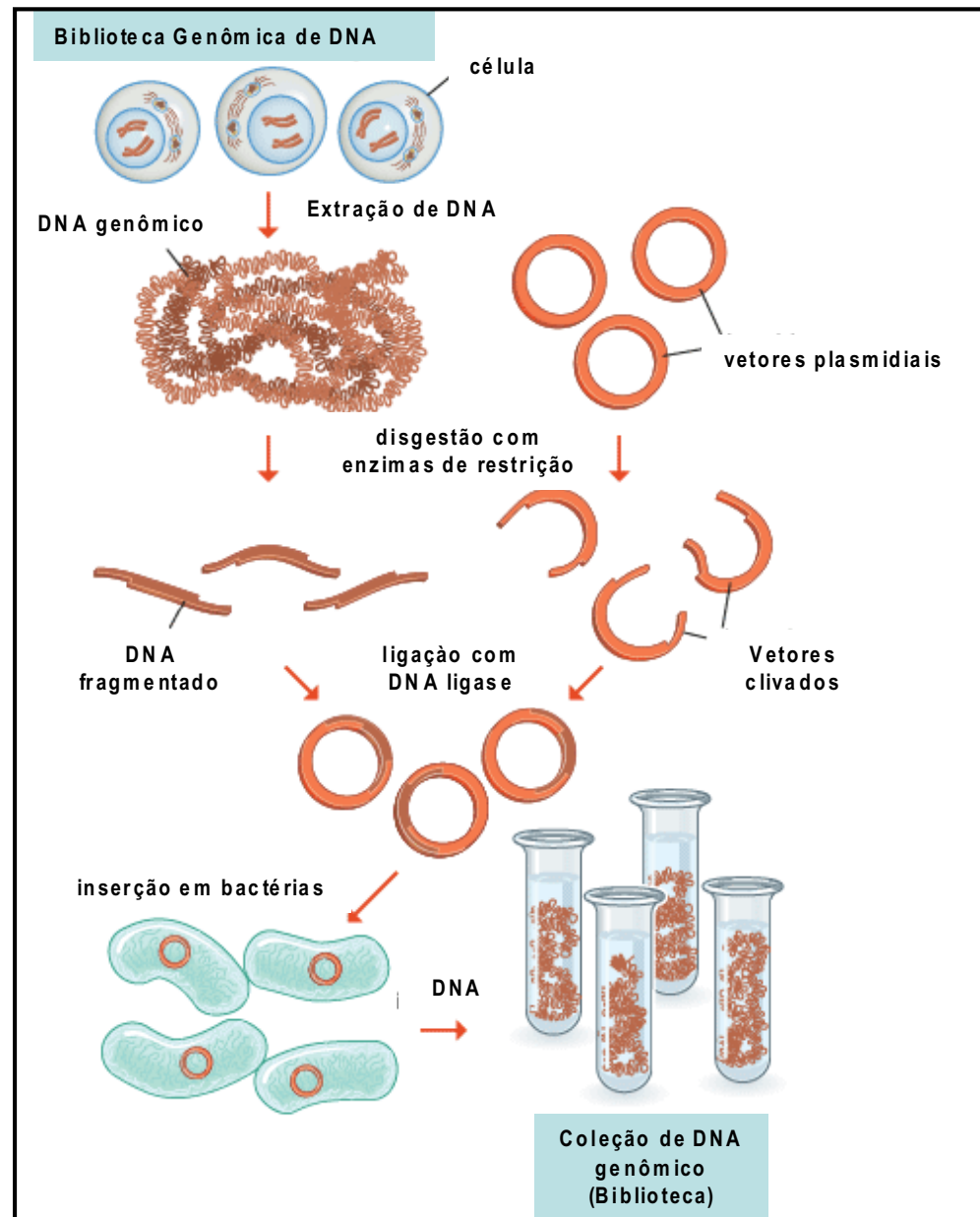
CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS

Esquema básico para construção de uma biblioteca genômica

Etapas:

- 1) Extração de DNA
- 2) Fragmentação do DNA
- 3) Ligação em vetores
- 4) Inserção em bactérias
- 5) Multiplicação (clones)

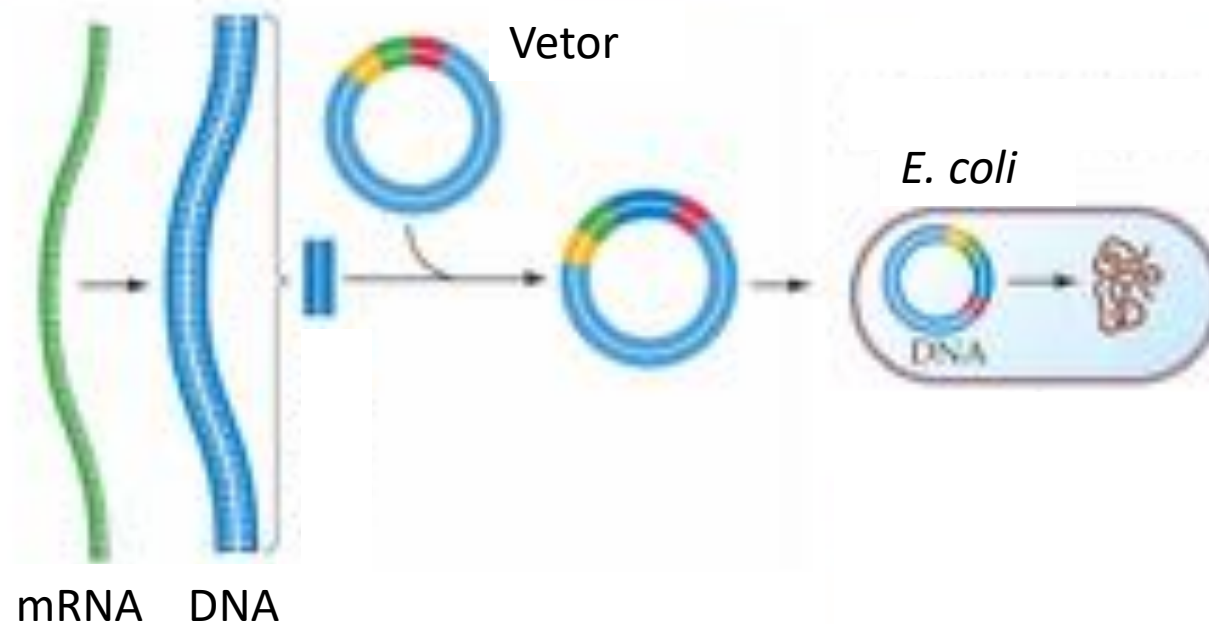
Sequenciamento



CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA

cDNA : DNA sintetizado a partir do mRNA usando a enzima *transcriptase reversa*.

*cDNA: DNA complementar ao mRNA



SÍNTESE DE cDNA

mRNA 5'  3' Cauda poli (A)

TTTTTT
Primer oligo (dT)



Síntese da primeira fita de DNA pela transcriptase reversa

RNA



DNA

Ribonuclease H degrada RNA



Síntese da segunda fita de DNA pela DNA polimerase I



Finalização da síntese da segunda fita de DNA



CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA

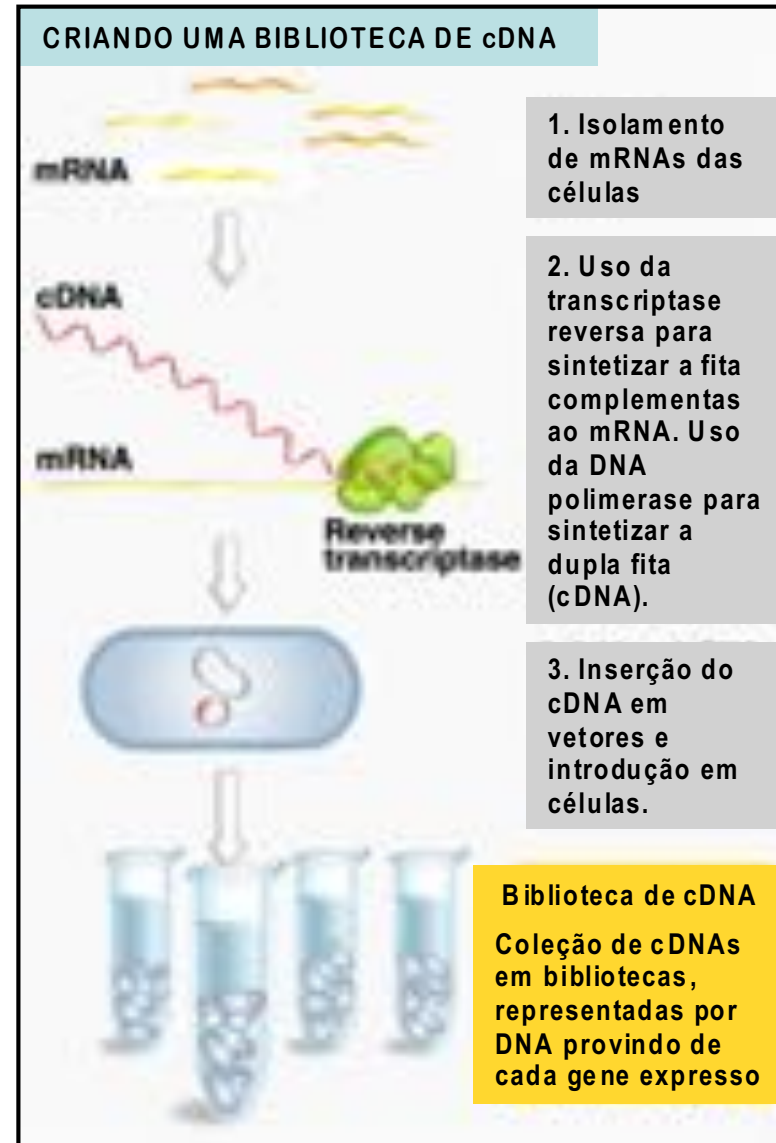
Esquema básico para construção de uma biblioteca de cDNA

Etapas:

- 1) Extração de **mRNA**
- 2) Síntese de **cDNA**
- 3) Ligação em vetores
- 4) Inserção em bactérias
- 5) Multiplicação (clones)

Vantagem: somente os genes expressos são selecionados.

Sequenciamento

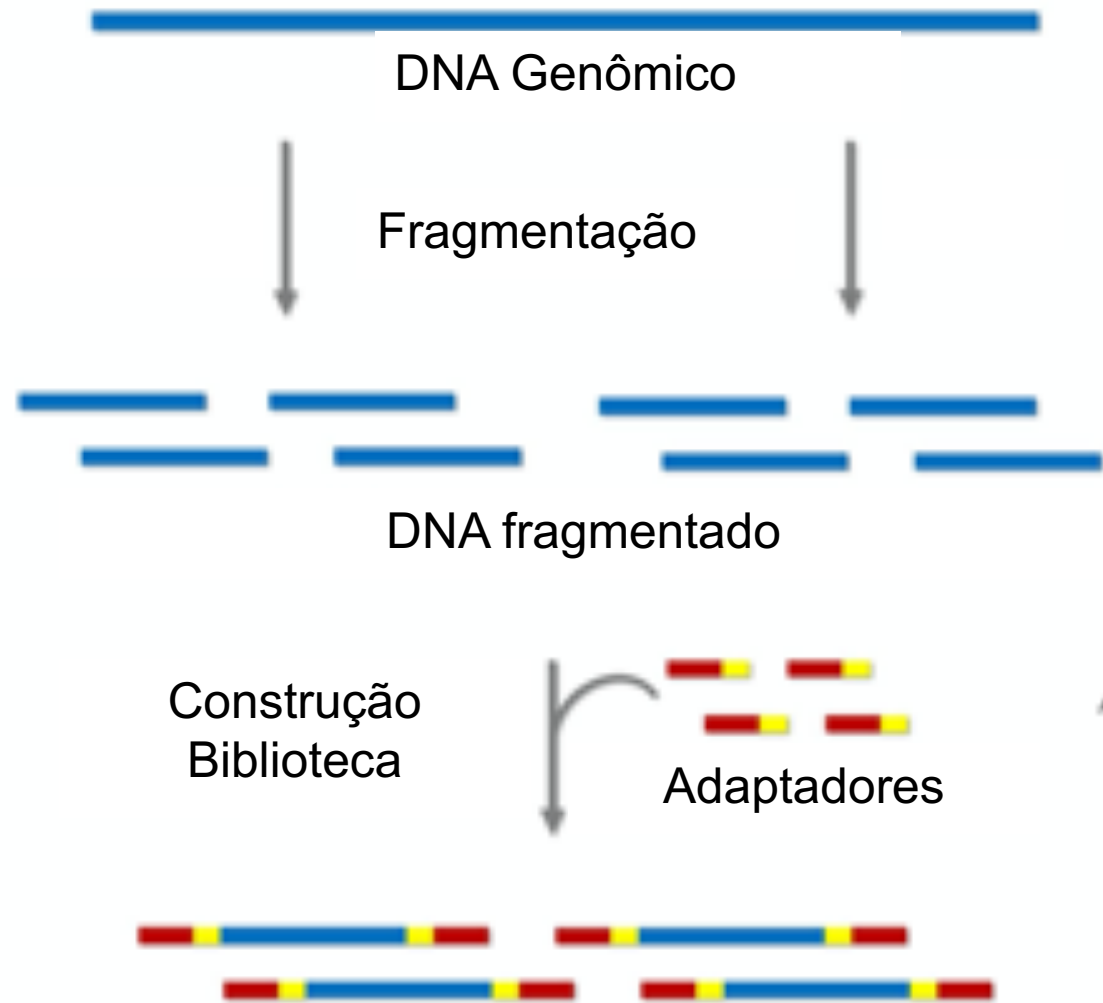


SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Esquema básico de sequenciamento de DNA

Etapas:

- 1) Extração de DNA
- 2) Fragmentação do DNA
- 3) Preparação da Biblioteca
- 4) Sequenciamento

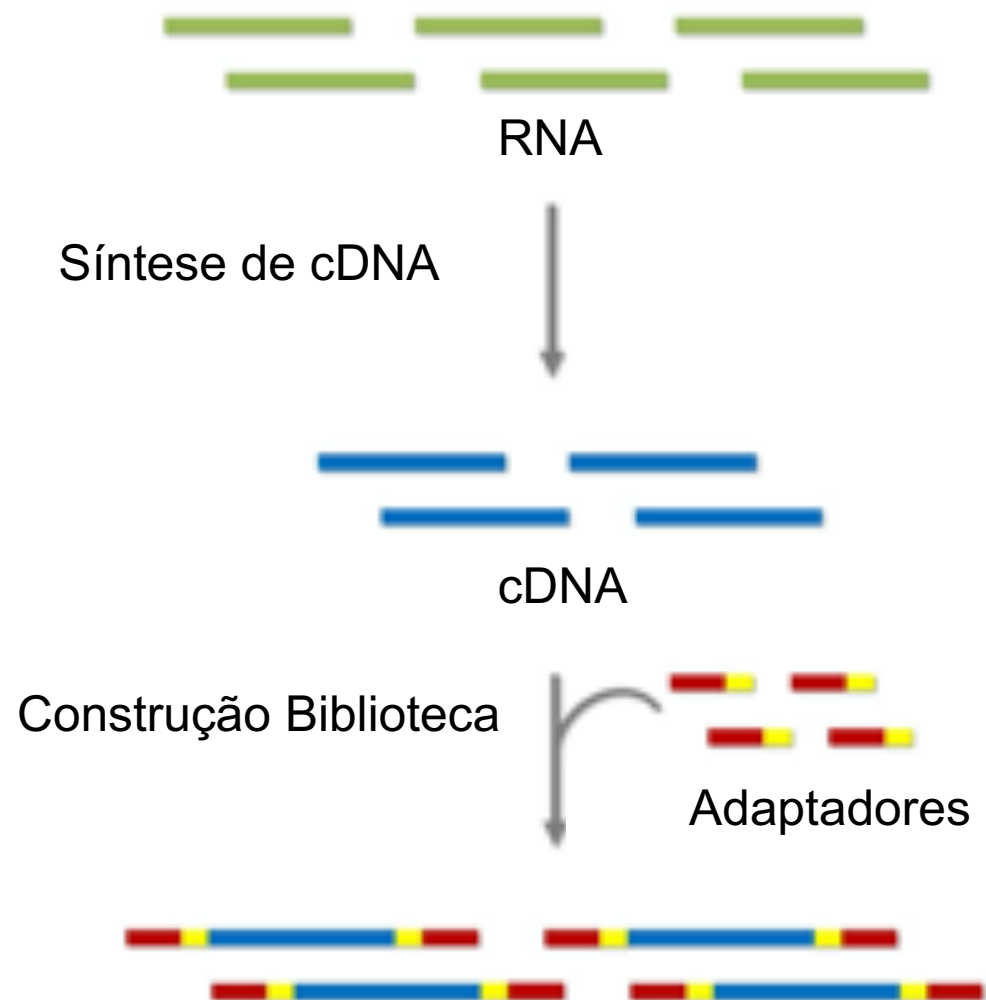


SEQUENCIAMENTO DE cDNA

Esquema básico de sequenciamento de cDNA

Etapas:

- 1) Extração de **mRNA**
- 2) Síntese de **cDNA**
- 3) Preparação da Biblioteca
- 4) Sequenciamento

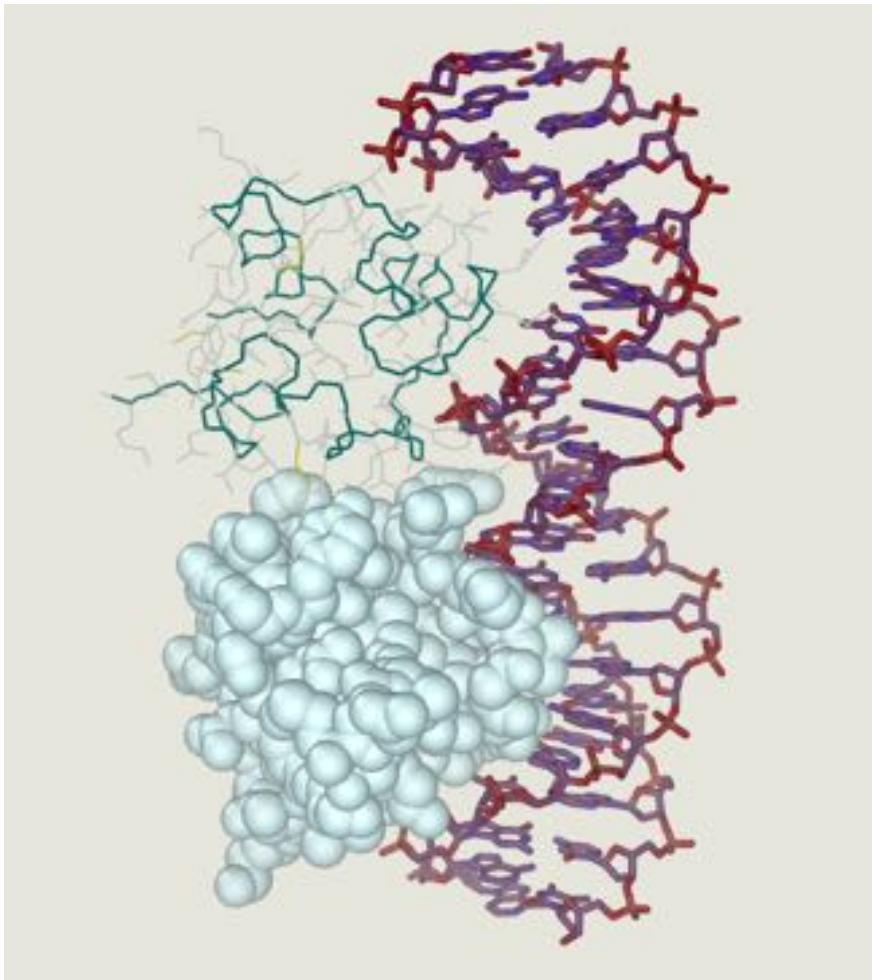


**Qual é a melhor abordagem:
sequenciar DNA ou cDNA?**



Depende de seu objetivo!

ESTUDOS DAS ÔMICAS: GENÔMICA, TRANSCRIPTÔMICA E METAGENÔMICA



Aula 7

LGN232 – Genética Molecular

Maria Letícia Bonatelli
Departamento de Genética
mlbonatelli@usp.br

Metagenômica

Metagenoma é o nome dado ao **genoma** coletivo da **microbiota** total encontrada em um determinado **habitat**.



Quem está lá?



O que eles fazem lá?

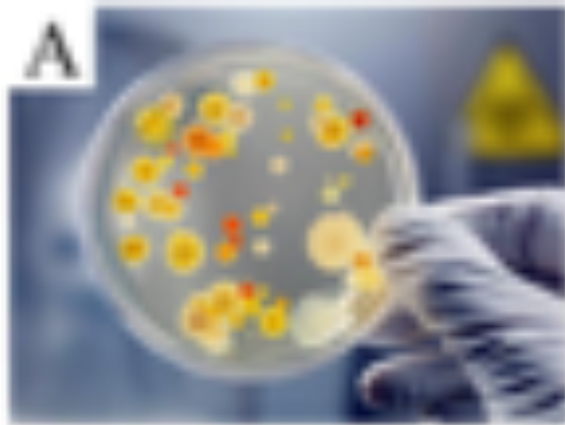


Será que conseguiremos
aproveitar o que
eles fazem?

Diversidade Microbiana



Onde estão e o que fazem?



E na gente?

Microbiome

IN NUMBERS

100 Trillion

symbiotic microbes live in and on every person and make up the human microbiota

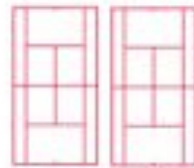
The human body has more microbes than there are stars in the milky way

95%

of our microbiota is located in the GI tract

150:1

The genes in your microbiome outnumber the genes in our genome by about 150 to one



The surface area of the GI tract is the same size as 2 tennis courts

You have **1.3X**

more microbes than human cells

>10,000

Number of different microbial species that researchers have identified living in and on the human body

2kg

The gut microbiota can weigh up to 2Kg

apc
Microbiome
Ireland

Interfacing Food & Medicine

The microbiome is more medically accessible and manipulable than the human genome

90%

It is thought that of disease can be linked in some way back to the gut and health of the microbiome

5:1

Viruses:Bacteria in the gut microbiota

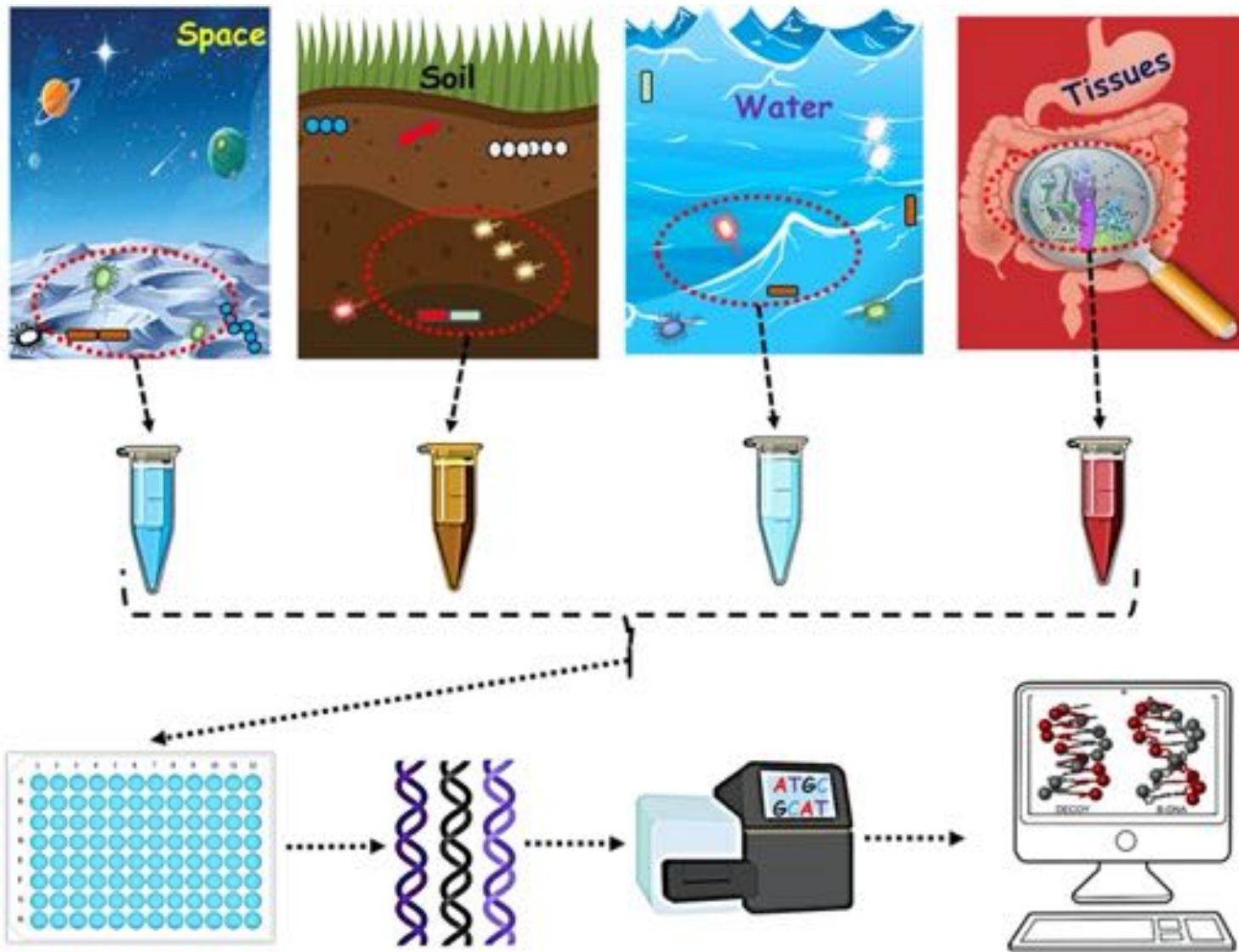


2.5

The number of times your body's microbes would circle the earth if positioned end to end

Each individual has a unique gut microbiota, as personal as a fingerprint





Fonte:
<https://sciwri.club/archives/7530>

Quem está lá?



Metagenomas



Extração
DNA



Amplificação gene 16S



Sequenciamento



Genoma conhecido



Identificação

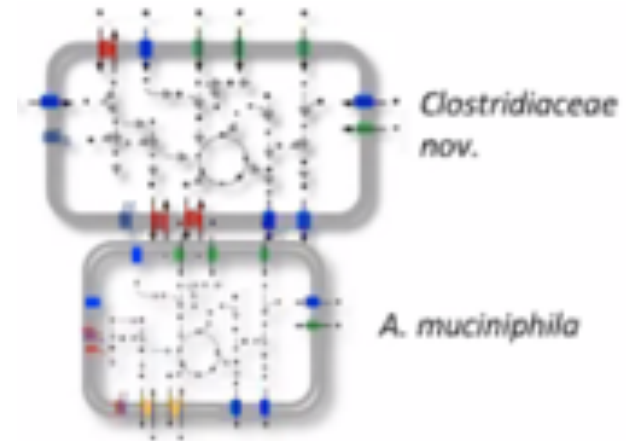
Genomas desconhecidos



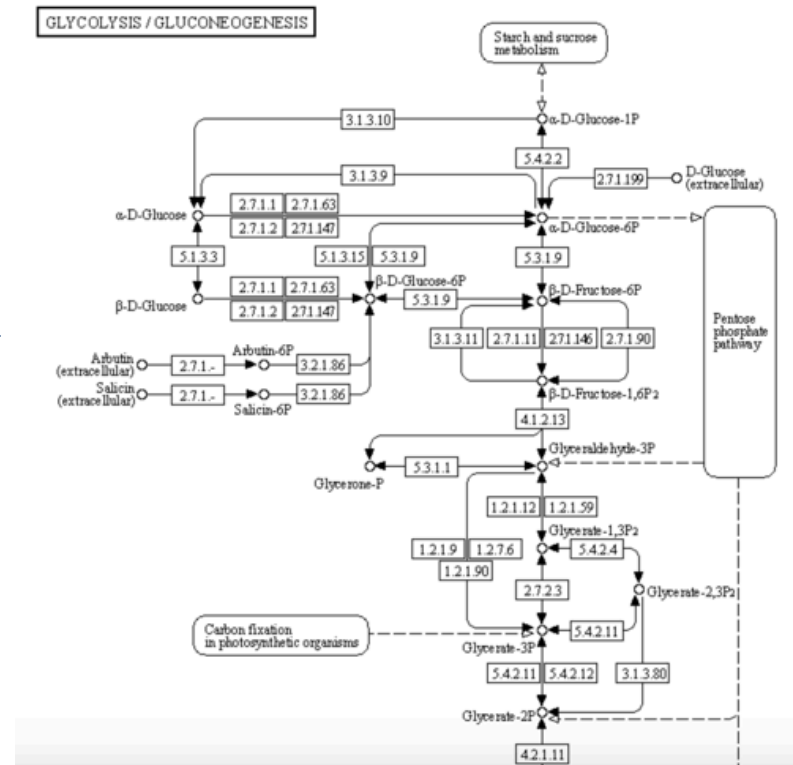
Quem está lá?



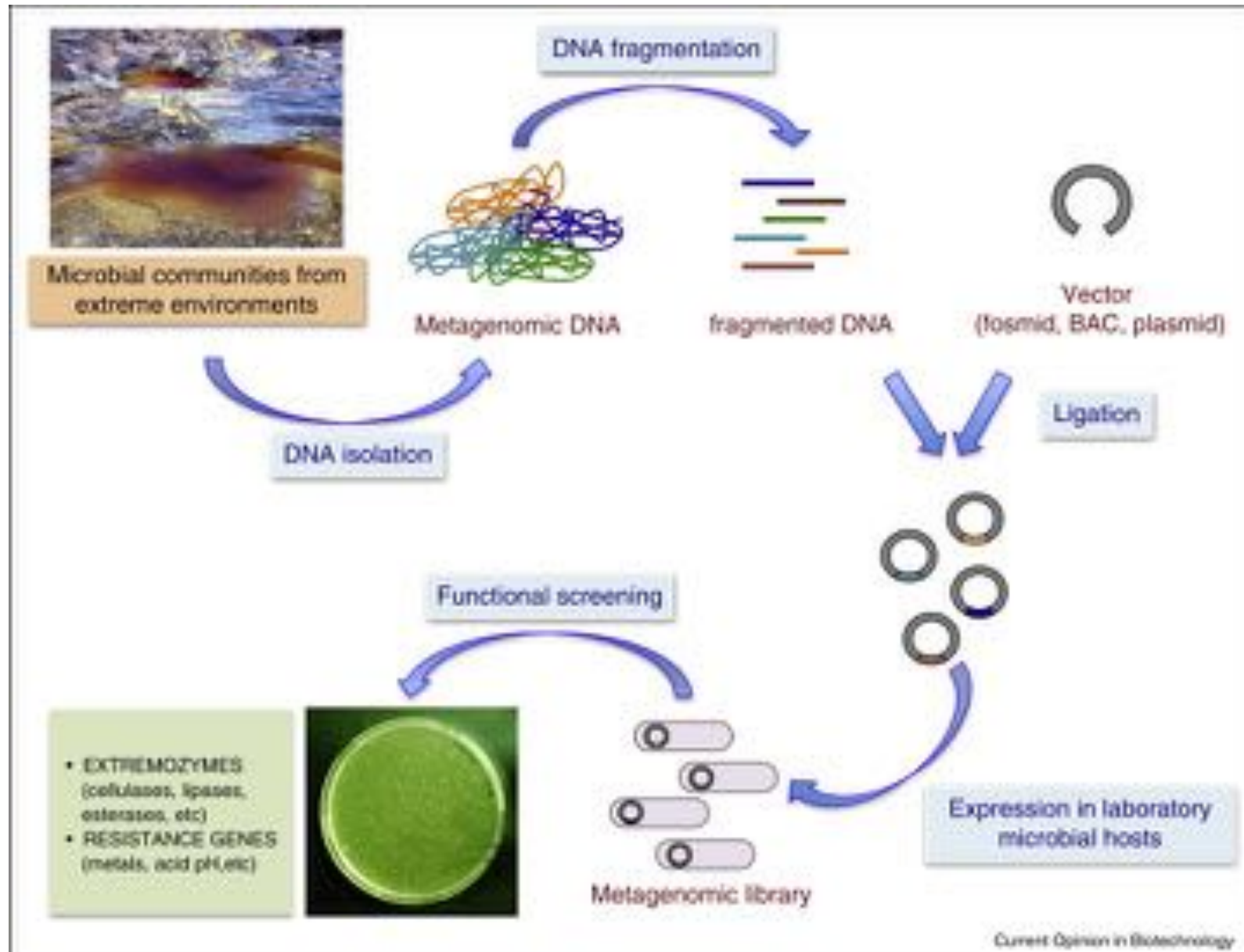
Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics



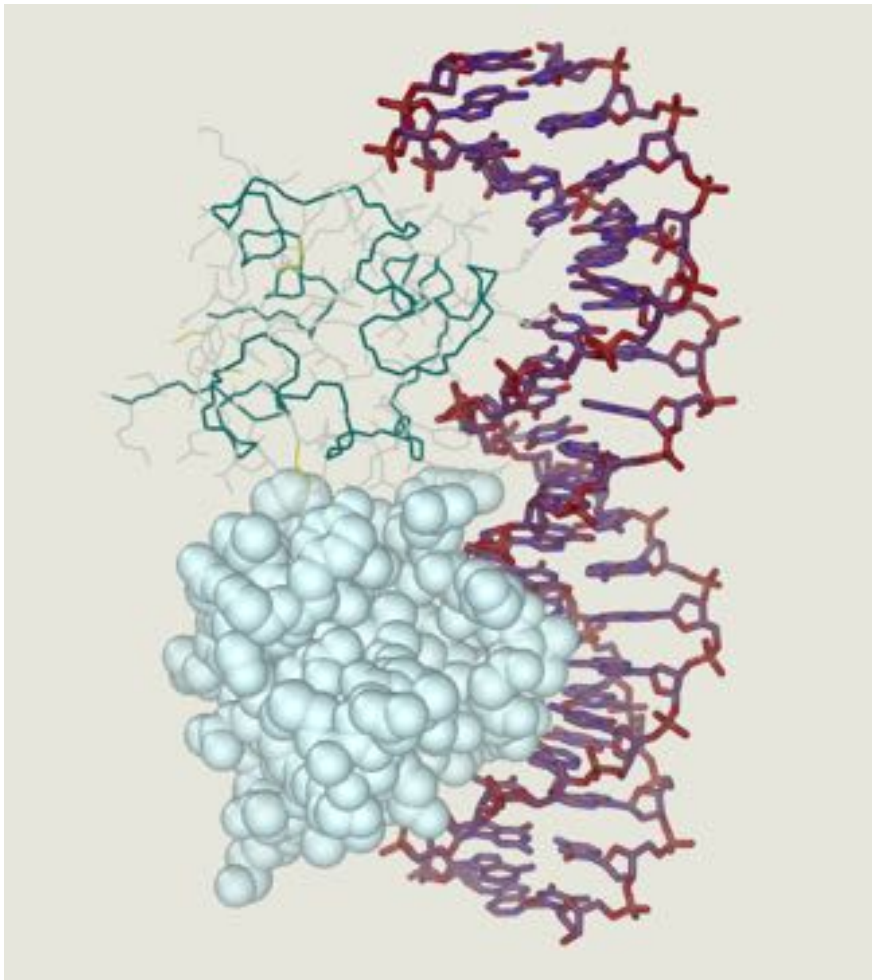
O que eles fazem lá?



Será que conseguimos aproveitar o que eles fazem?



ESTUDOS DAS ÔMICAS: GENÔMICA, TRANSCRIPTÔMICA E METAGENÔMICA



Aula 7

LGN232 – Genética Molecular

Maria Letícia Bonatelli
Departamento de Genética
mlbonatelli@usp.br



E agora, como obter as sequências?

TECNOLOGIAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE DNA

Tecnologias de primeira geração:

- **Método Maxam & Gilbert (1977)***
 - *Método de degradação química*
- **Método Sanger (1977)**
 - *Método enzimático, dideoxi ou de término da cadeia*
 - Síntese enzimática de uma fita complementar de DNA, cujo crescimento é interrompido pela adição de um dideoxinucleotídeo (ddNTP)

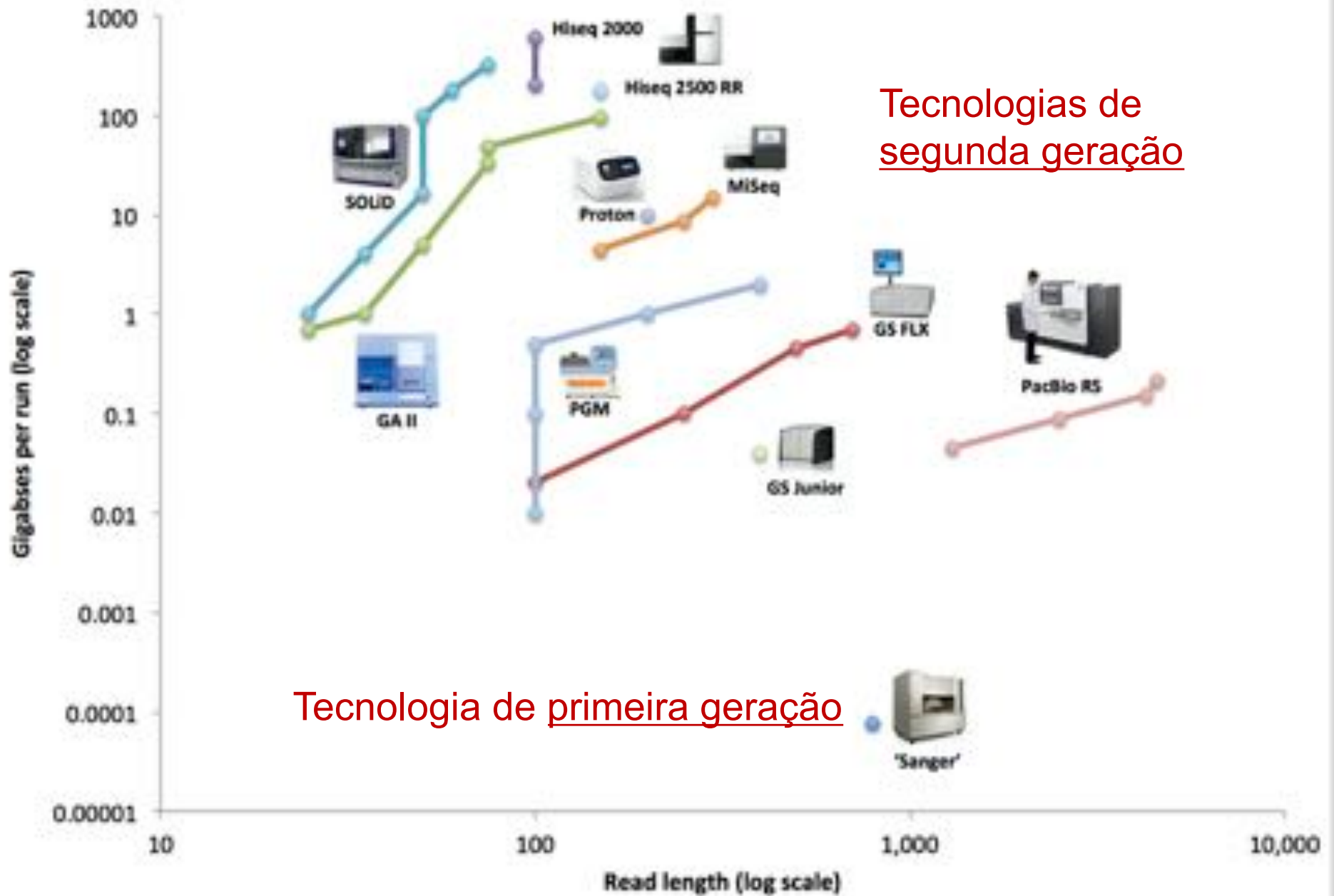


Frederick Sanger

Prêmio Nobel em Química (1980)

*Produtos tóxicos e perigosos à saúde, além da dificuldade de automatização, essencial para o sequenciamento de um genoma completo.

Developments in High Throughput Sequencing



ETAPAS DO SEQUENCIAMENTO DE DNA

Primeira Geração

Preparo do DNA



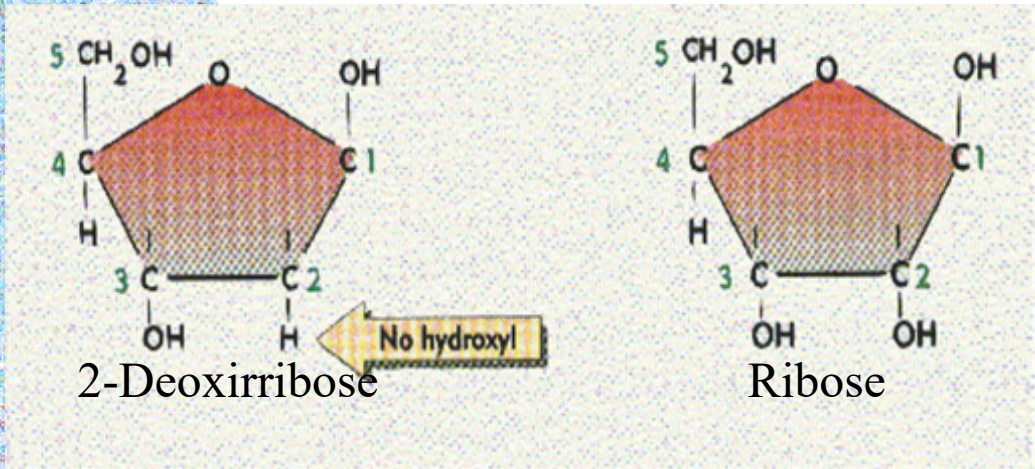
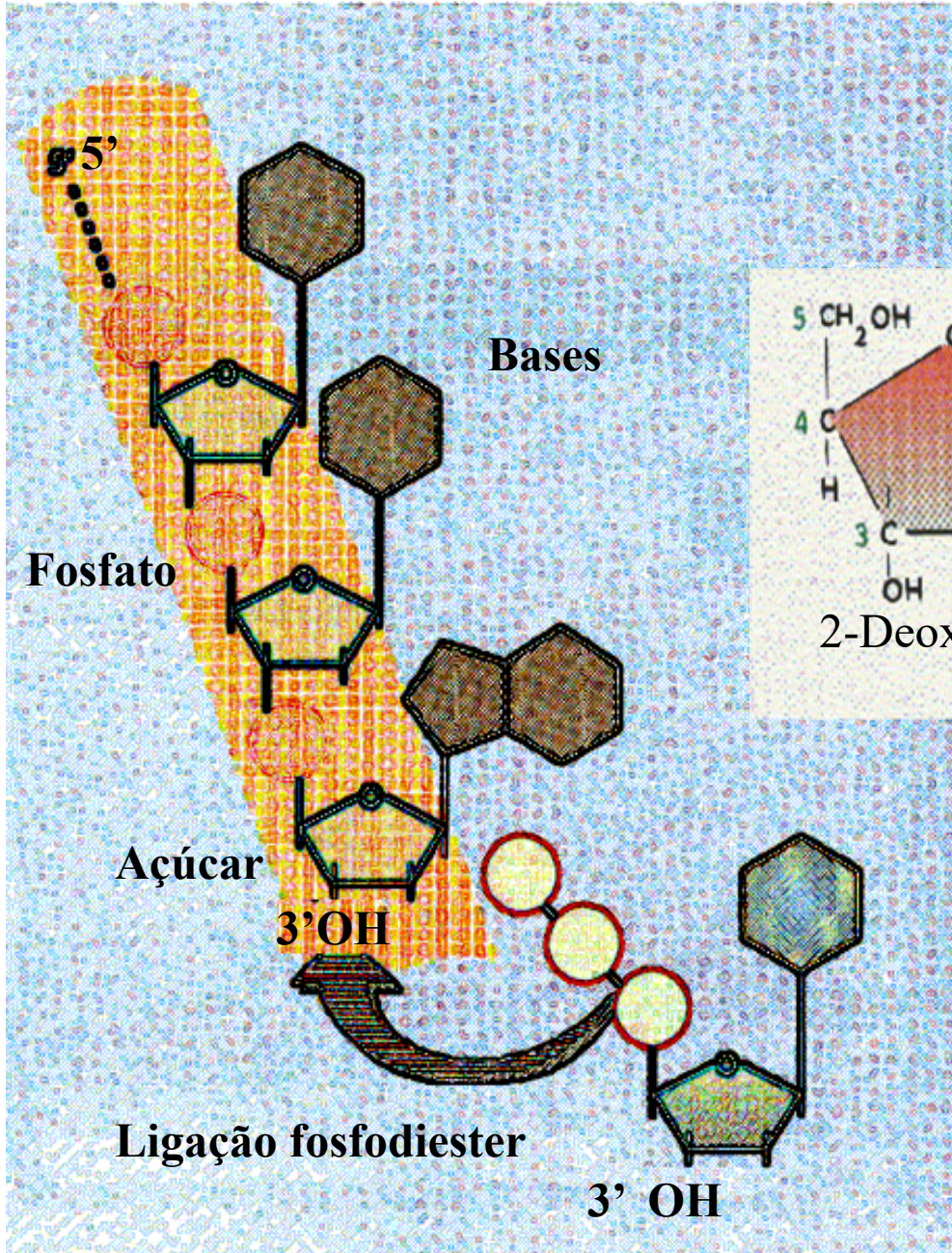
Reação de sequenciamento



Eletroforese capilar

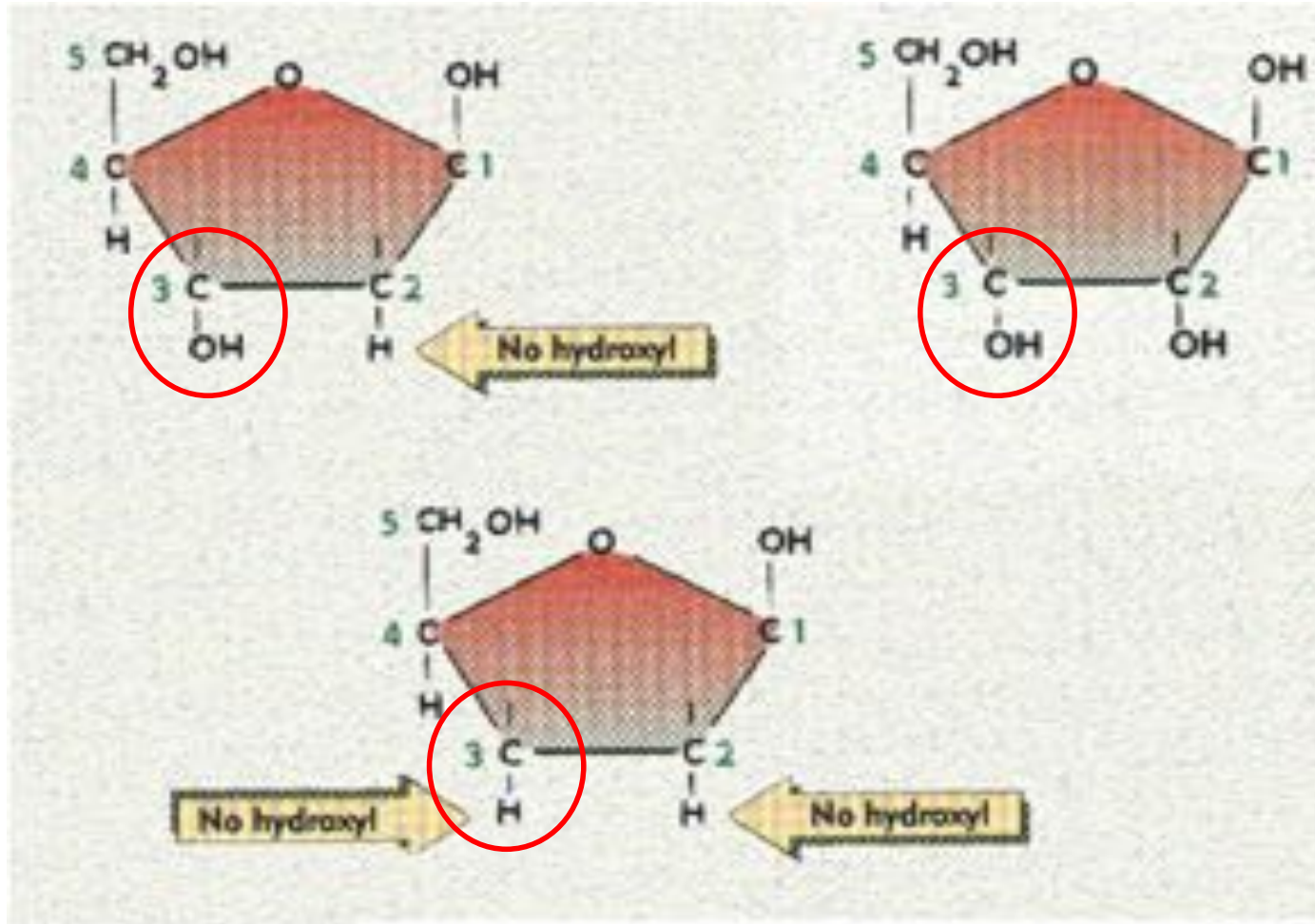


Análise computacional



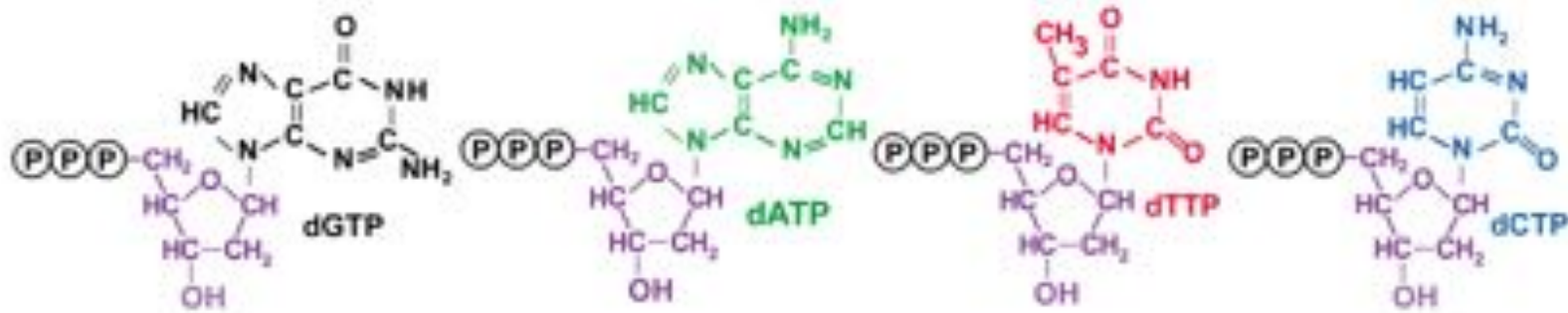
DESOXIRRIBOSE

RIBOSE



DIDESOXIRRIBOSE

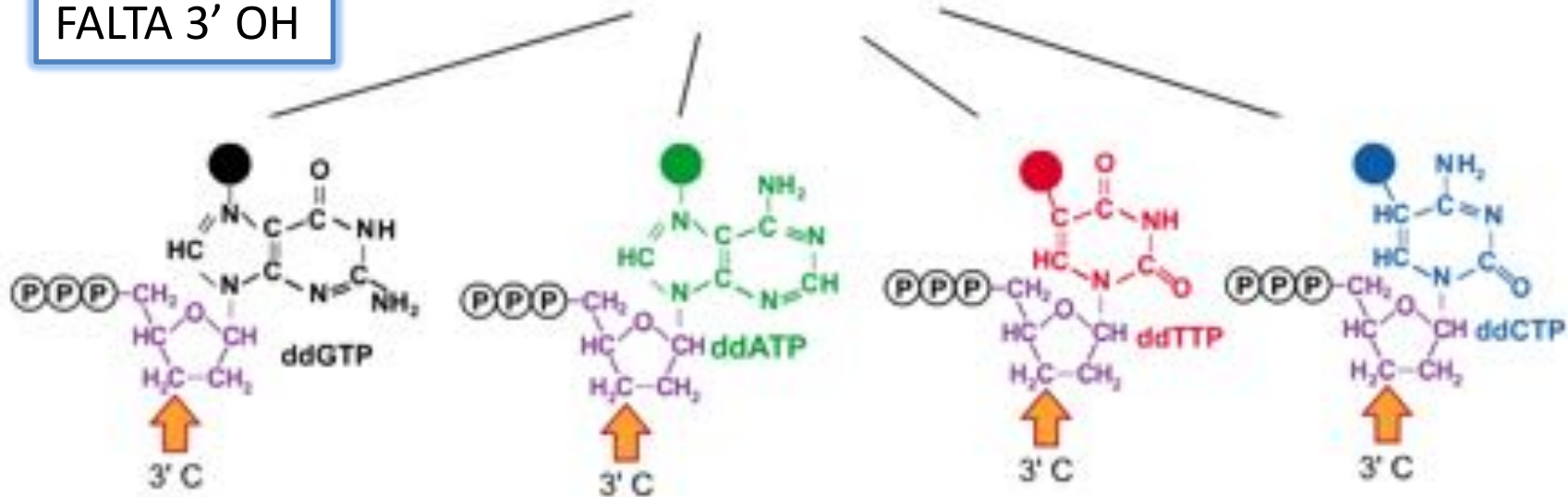
NUCLEOTÍDEOS dNTPs



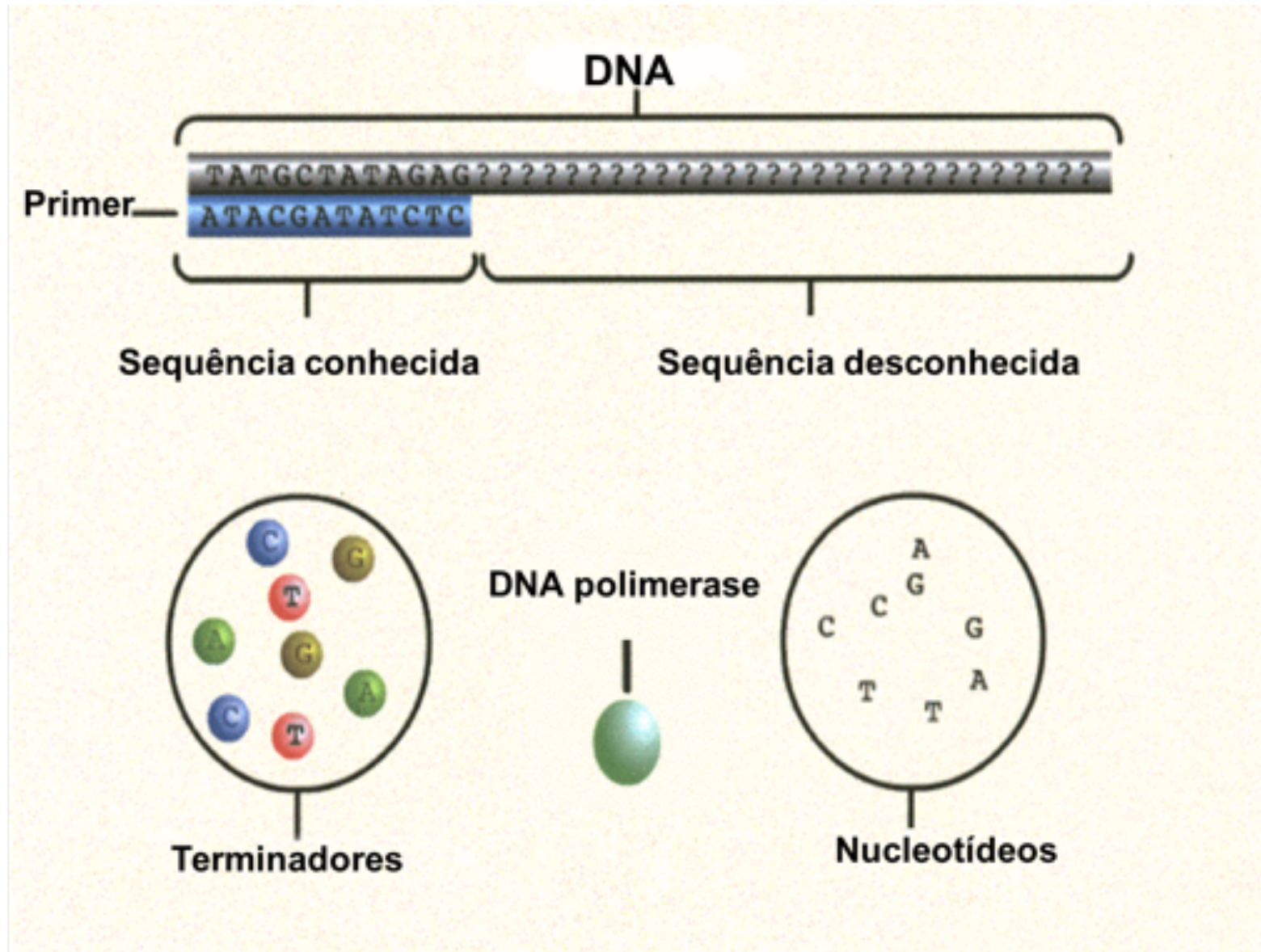
NUCLEOTÍDEOS ddNTPs (TERMINADORES)

CORANTE FLUORESCENTE

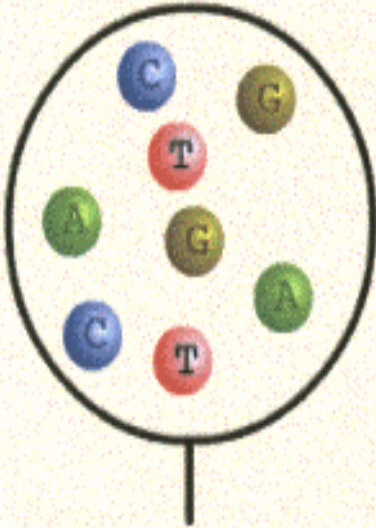
FALTA 3' OH



REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

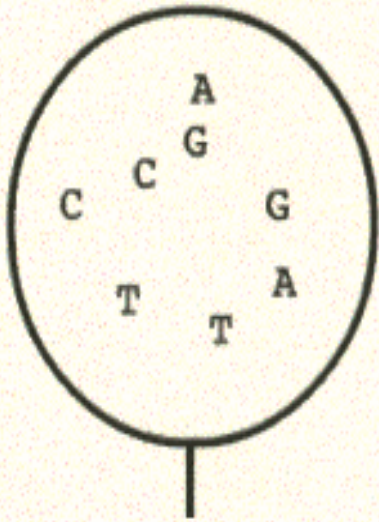


TATGCTATAGAG????????????????????????????????
ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA T
ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAAATCTTTA A
ATACGATATCTCGACTCTCGAGCT A
ATACGATATCTC



Terminadores

DNA polimerase



Nucleotídeos

TATGCTATAGAG????????????????????????????????

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAA T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTTA A

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTA A

ATACGATATCTCGACTCTCG A

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTT T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTT T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTTAAGGCA T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTTA A

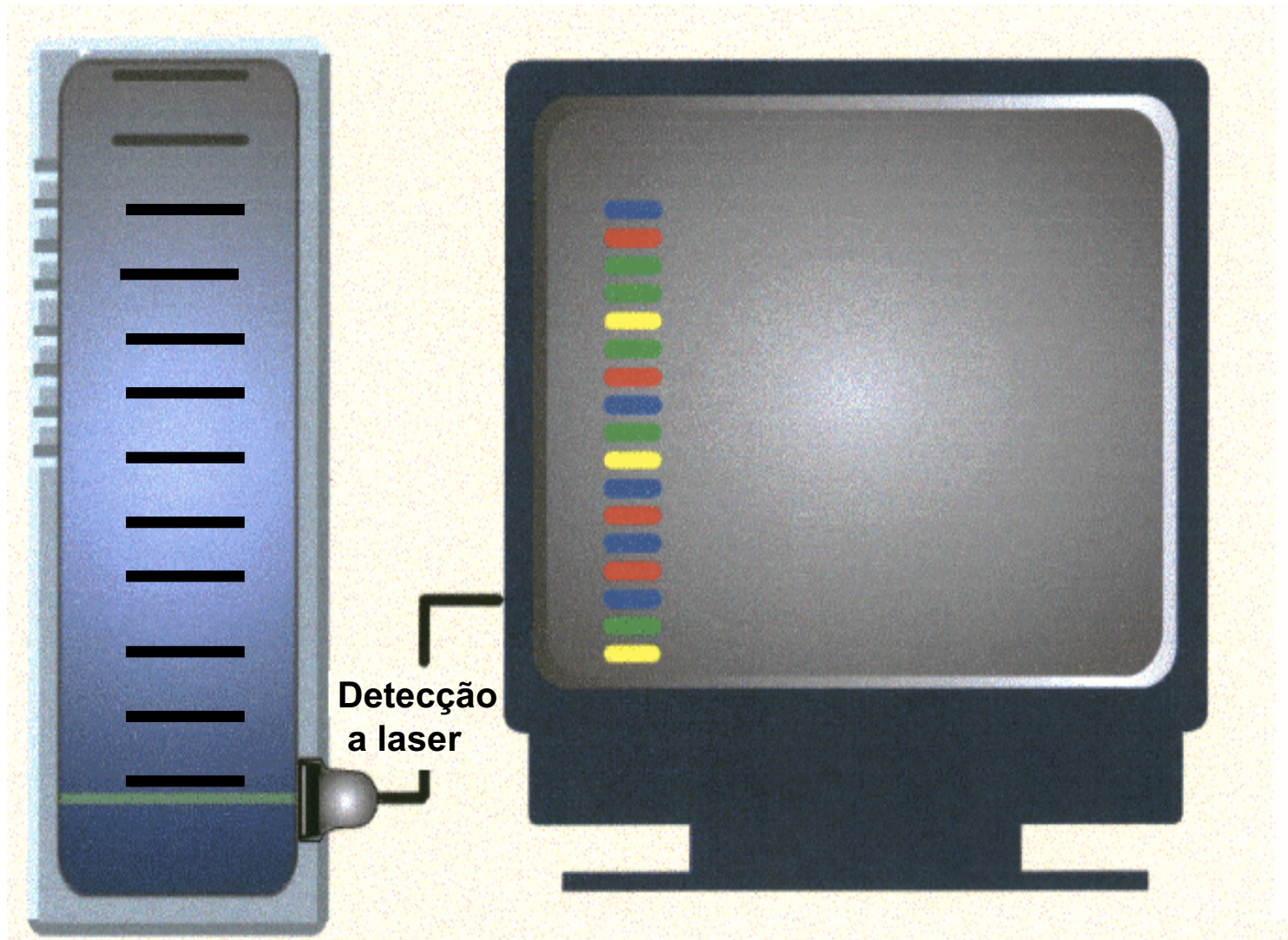
ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGA A

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTT T

ATACGATATCTCGACTCTCGA A

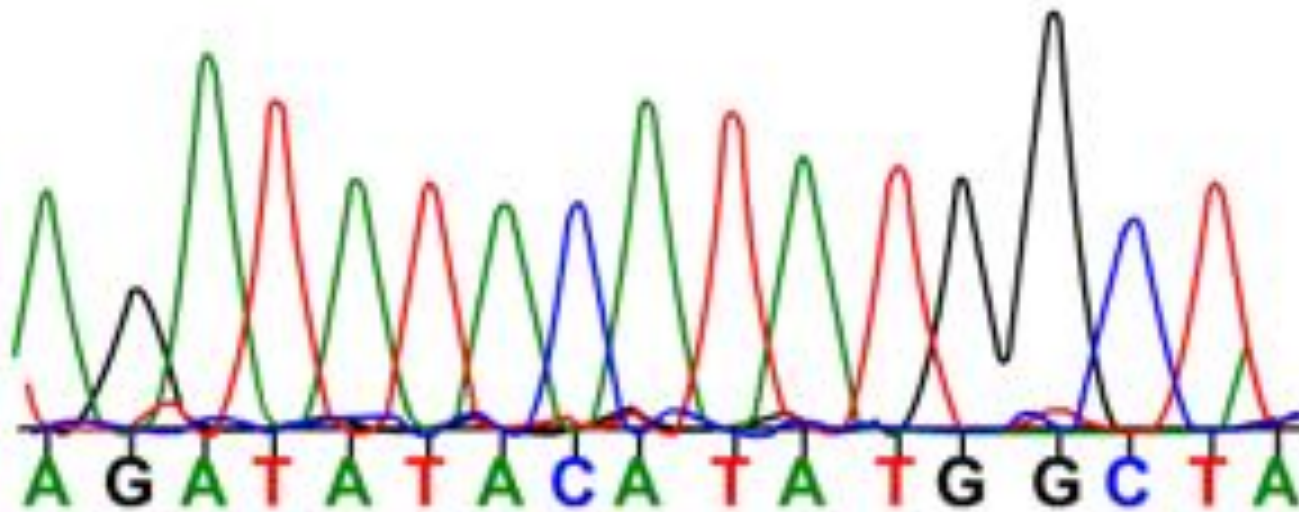
ATACGATATCTCGACTCT T

ATACGATATCTCGACTCTCGAGCTAGAATCTTTAAGGC C





ANÁLISE COMPUTACIONAL



ACTTGACGTAGCTAC
 AGCTACGTTACCTATAGGTACGTTAC
 TACGTTACGGAGGCTATCGCGAT
 TCGCGATGAGATCAAA

FRAGMENTOS DE DNA SEQUENCIADOS

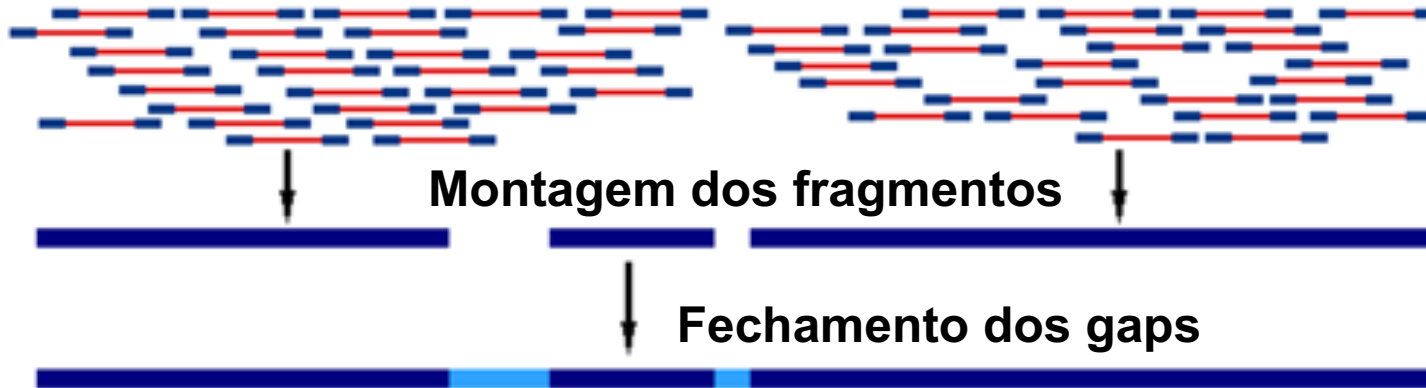
ACTTGACGTAGCTAC
 AGCTACGTTACCTATAGGTACGTTAC
 TACGTTACGGAGGCTATCGCGAT
 TCGCGATGAGATCAAA

ACTTGACGTAGCTACGTTACCTATAGGTACGTTACGGAGGCTATCGCGATGAGATCAAA

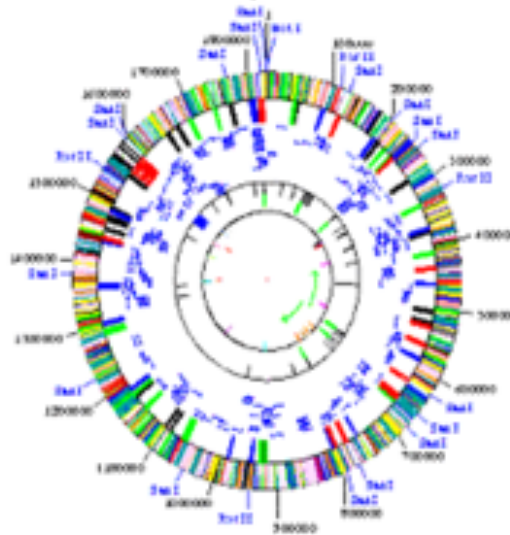
ACTTGACGTAGCTACGTTACCTATAGGTACGTTACGGAGGCTATCGCGATGAGATCAAA

FRAGMENTOS COMPLETOS

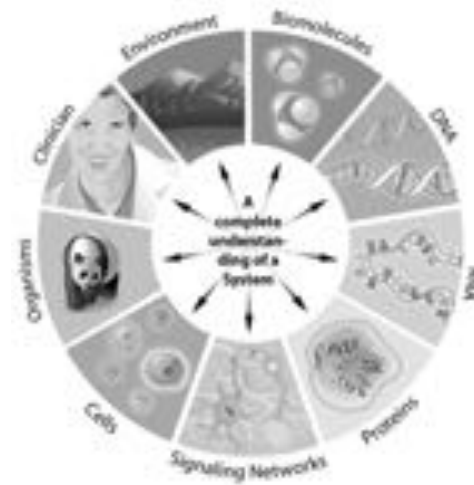
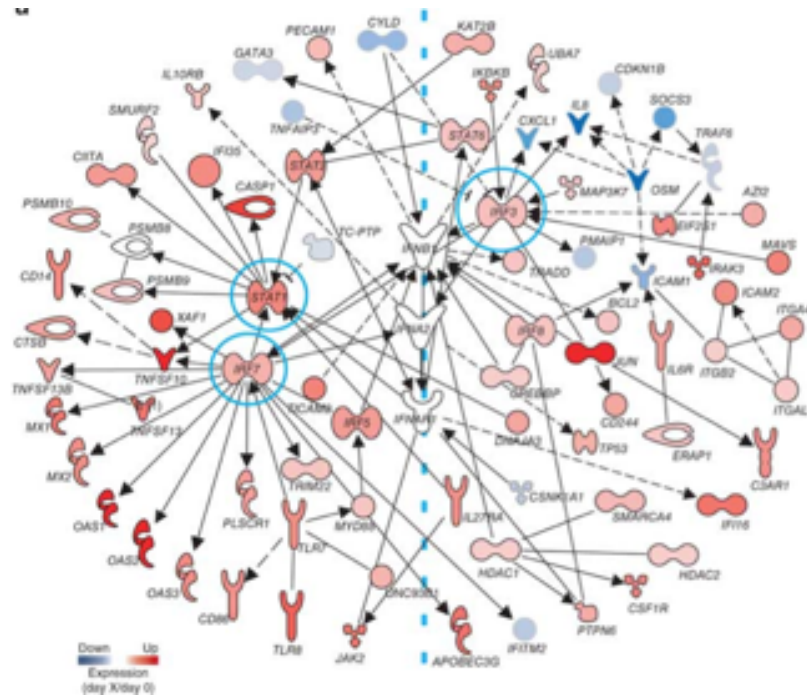
Biblioteca de insertos pequenos



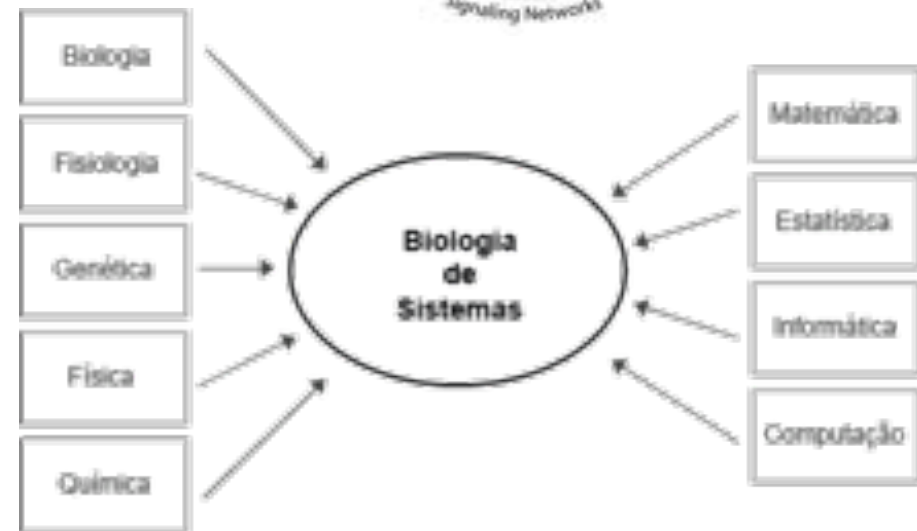
Análise



O GRANDE DESAFIO: VISÃO TRADICIONAL X HOLÍSTICA



Biologia de Sistemas!



<https://www.youtube.com/watch?v=9mUcScHdcus>

ESTUDO DIRIGIDO

1. Conceito de ômicas;
2. Construção de biblioteca genômica e cDNA;
3. Sequenciamento DNA e cDNA;
4. Conceito de metagenômica;
5. Conceito de biologia de sistemas.

Sugestão de vídeo:

<https://www.youtube.com/watch?v=i-icXZ2tMRM>

Capítulo 12 – Genômica- A revolução na análise dos genes & Capítulo 13 – Transcriptômica e Proteômica (Menck, C.F.M.; Van Sluys, M.A. **Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas**. Editora Guanabara Koogan, 2017).

Binnecc (2004). As ômicas: integrando a bioinformação.

Doc 284 Embrapa - Metagenoma do solo do cerrado

