

BMM-0271: Microbiologia básica

Genética de procariotos

Robson Francisco de Souza. Ph.D

robfsouza@gmail.com

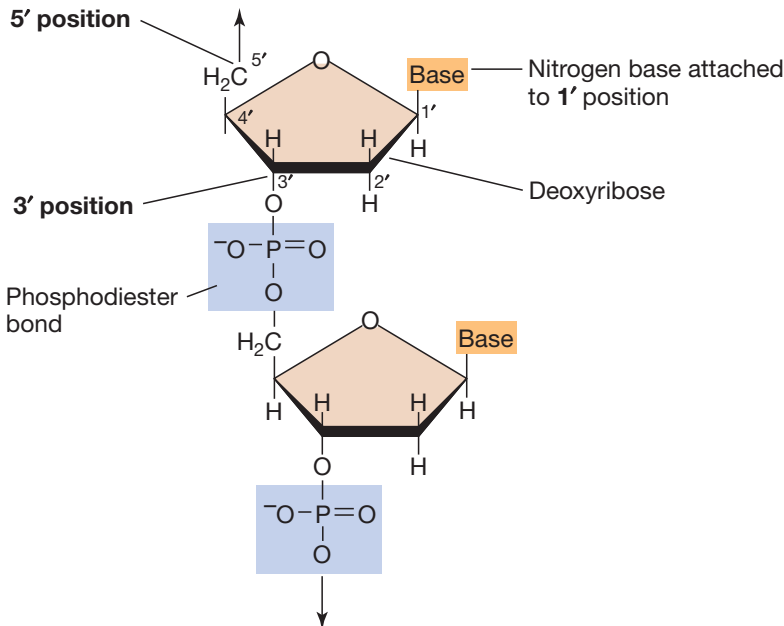
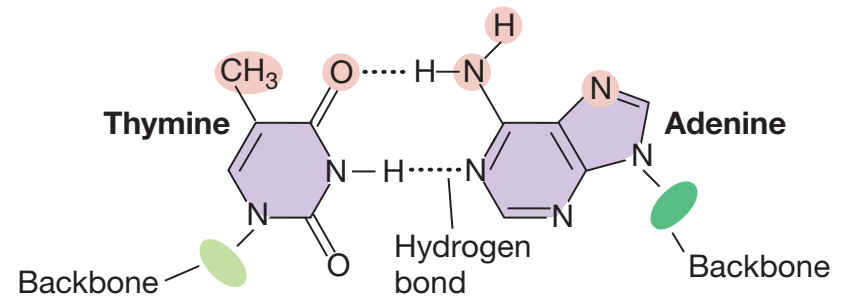
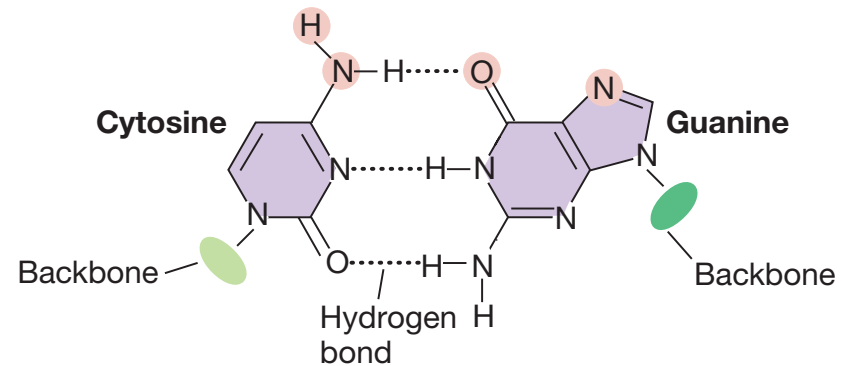
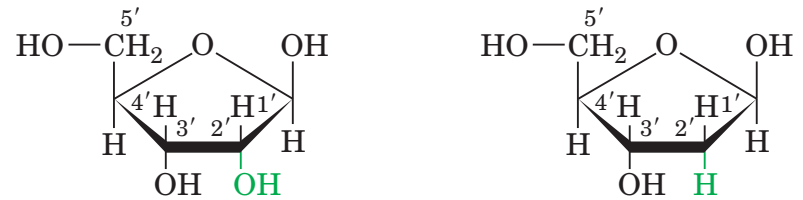
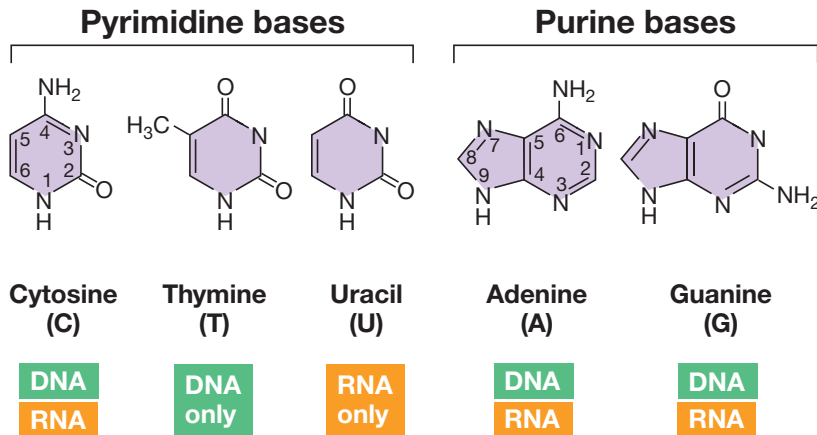
LEEP: Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas

ICB/USP – 2016

Tópicos

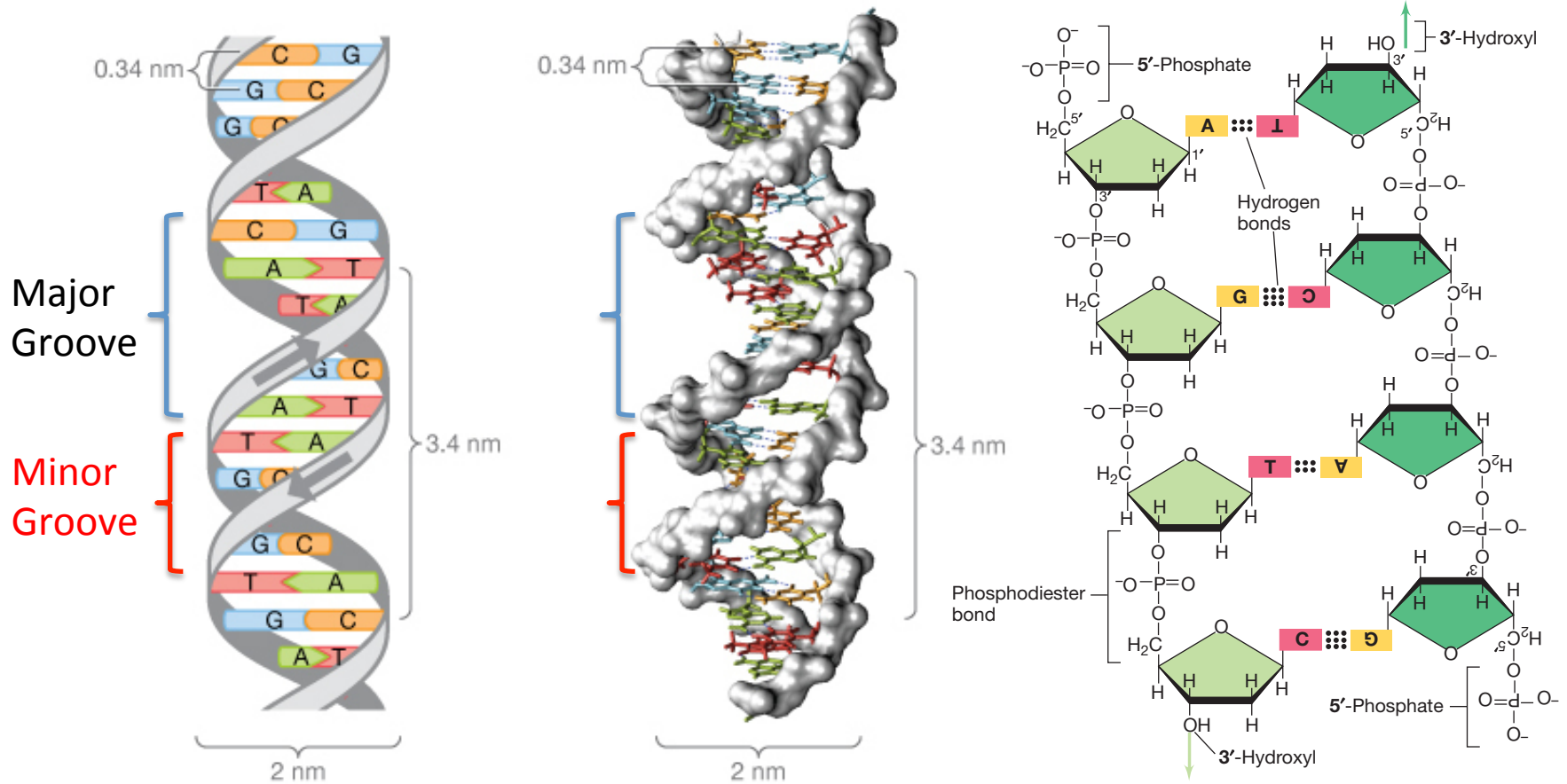
- **Origens da diversidade genética**
 - Mutação
 - Transferência lateral de genes
 - Transformação
 - Transdução
 - Conjugação

Composição dos ácidos nucleicos

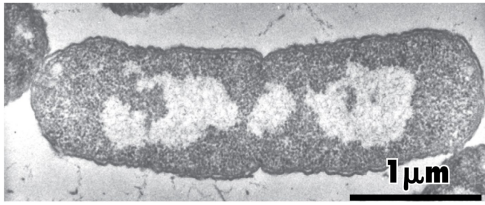


Bases moleculares da genética

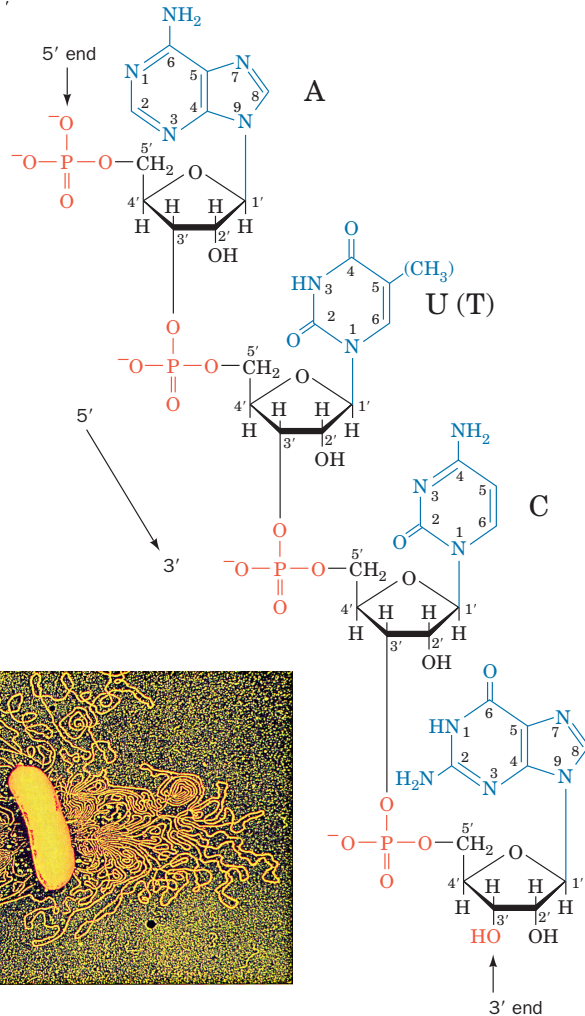
Estrutura do DNA



Cromossomos de procariotos



1500 bases perto da origem de replicação
Cromossomo de *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655



AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCT
 GATAGCAGCTTCTGAACCTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTC
 ACTAAATACTTTAACCAATATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAGAGTACACA
 ACATCCATGAAACGCATTAGCACCACCATTACCACCACCATCACCATTACCACAGGTAACG
 GTGCGGGCTGACGCGTACAGGAAACACAGAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTTTT
 TTTTCGACCAAAGGTAACGAGGTAACAACCATGCGAGTGTTGAAGTTTCGGCGGTACATCA
 GTGGCAAATGCAGAACGTTTTCTGCGTGTTGCCGATATTCTGGAAAGCAATGCCAGGCAGG
 GGCAGGTGGCCACCGTCCTCTCTGCCCCGCCAAAATCACCAACCACCTGGTGGCGATGAT
 TGAAAAAACCATTAGCGGCCAGGATGCTTTACCCAATATCAGCGATGCCGAACGTATTTTT
 GCCGAACTTTTGACGGGACTCGCCGCCGCCAGCCGGGGTTCCCGCTGGCGCAATTGAAAA
 CTTTCGTGATCAGGAATTTGCCCAAATAAAACATGTCCTGCATGGCATTAGTTTTGTTGGG
 GCAGTGCCCCGATAGCATCAACGCTGCGCTGATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTCGATCGCC
 ATTATGGCCGGCGTATTAGAAGCGCGCGGT CACAACGTTACTGTTATCGATCCGGTCGAAA
 AACTGCTGGCAGTGGGGCATTACCTCGAATCTACCGTCGATATTGCTGAGTCCACCCGCCG
 TATTGCGGAAGCCGCATTCCGGCTGATCACATGGTGCTGATGGCAGGTTTCACCGCCGT
 AATGAAAAAGGCGAAGTGGTGGTGCTTGGACGCAACGGTTCCGACTACTCTGCTGCGGTGC
 TGGCTGCCTGTTTACGCGCCGATTGTTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTCTATAC
 CTGCGACCCGCGTCAGGTGCCCGATGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCCTACCAGGAAGCG
 ATGGAGCTTTCCTACTTCGGCGCTAAAGTTCTTACCCCCGCACCATTACCCCCATCGCCC
 AGTTCAGATCCCTTGCCTGATTAATAAATACCGGAAATCCTCAAGCACCAGGTACGTCAT
 TGTTGCCAGCCGTGATGAAGACGAATTACCGGTCAAGGGCATTCCAATCTGAATAACATG
 GCAATGTTTCAGCGTTTTCTGGTCCGGGGATGAAAGGGATGGTCGGCATGGCGGCGCGCTCT
 TTGACGCGATGTCACGCGCCCGTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATCATCTTCCGAATA
 CAGCATCAGTTTCTGCGTTCACAAAGCGACTGTGTGCGAGCTGAACGGGCAATGCAGGAA
 GAGTTCTACCTGGAAGTGAAGAAGGCTTACTGGAGCCGCTGGCAGTGACGGAACGGCTGG
 CCATTATCTCGGTGGTAGGTGATGGTATGCGCACCTTGCCTGGGATCTCGGCGAAATTCTT
 TGCCGCACTGGCCCGGCCAATATCAACATTGTCGCCATTGCTCAGGGATCTTCTGAACGC
 TCAATCTCTGCTGTTAAATAACGATGATGCGACCACTGGCGTGCGGTTACTCATCAGA
 TGCTGTTCAATACCGATCAGGTTATCGAAGTGTGTTGATTGGCGTCGGTGGCGTTGGCGG
 TGCGCTGCTGGAGCAACTGAAGCGTCAGCAAAGCTGGCTGAAGAATAAACAATATCGACTTA
 CGTGTCTGCGGTGTTGCCAACTCGAAGGCTCTGCTACCAATGTACATGGCCCTTAATCTGG
 AAAACTGGCAGGAAGAAGTGGCGCAAGCCAAAGAGCCGTTTAATCTCGGGCGC

Genoma: tipos de moléculas

Organismo	Elemento	Ácido nucléico	Descrição
Procarioto	Cromosomo	DNA dupla fita	A maioria é circular, muito longo
Eucarioto	Cromosomo	DNA dupla fita	Maioria linear, extremamente longo
Todos	Plasmídeo*	DNA dupla fita	Relativamente curto, linear ou circular
Mitocondria ou cloroplasto	Genoma	DNA dupla fita	Pequeno ou médio, geralmente circular
Vírus	Genoma	DNA ou RNA, fita dupla ou simples	Relativamente curto, circular ou linear

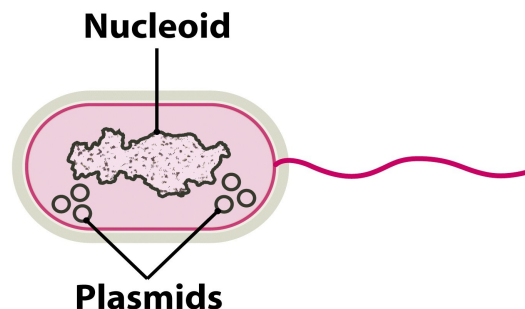
* Plasmídeos são muito raros em eucariotos

Cromossomos

- Codificam genes essenciais para o organismo
- Codificam os genes necessários para replicação e segregação

Plasmídeos

- Usam as polimerases do cromosomo
- Controlam seu número na célula
- Codificam genes para segregação

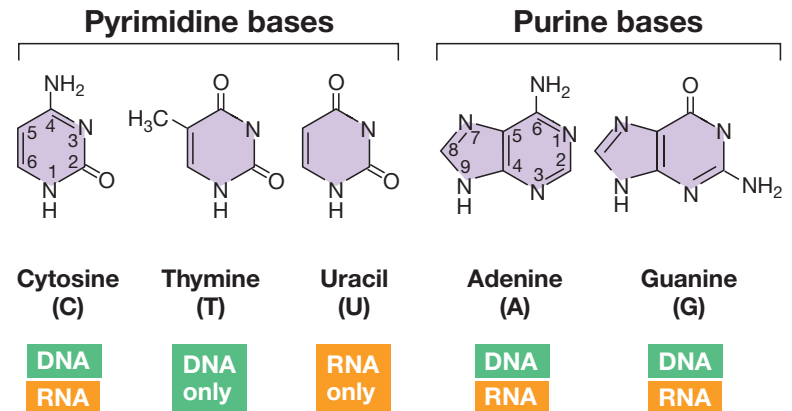


Mutação

- Definição**

Mutação é uma alteração na sequência de bases de um gene que não altera a composição química do DNA e que, pelo menos em princípio, ser transmitida aos descendentes (hereditária).

- Difere dos danos no DNA, que por impedirem a replicação, não podem ser transmitidos
- Muitas das mutações, porém, surgem a partir do reparo de danos no DNA corrigidos por mecanismos de reparo propensos a erro



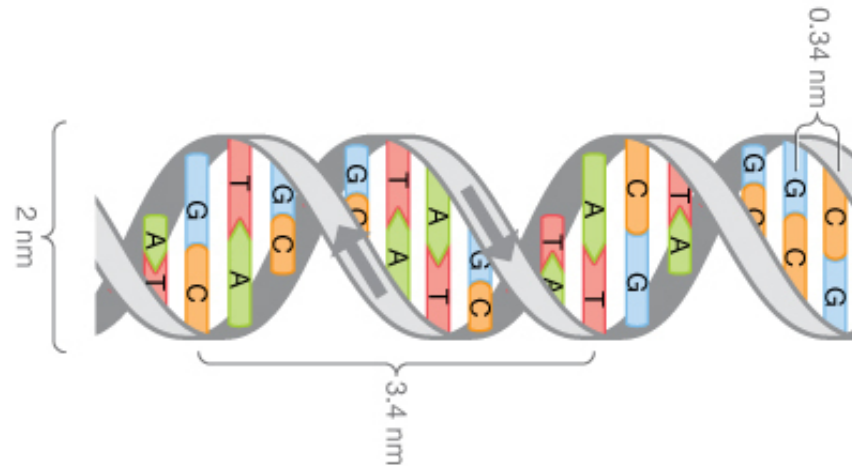
Transição	
Purina – Purina	Pirimidina – Pirimidina
A → G	C → T
G → A	T → C
Transversão	
Purina – Pirimidina	Pirimidina - Purina
A → T	T → A
A → C	T → G
G → T	C → A
G → C	C → G

Mutações pontuais correspondem à troca de uma única base no genoma
São também conhecidas como polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)

Mutagênese e Danos no DNA

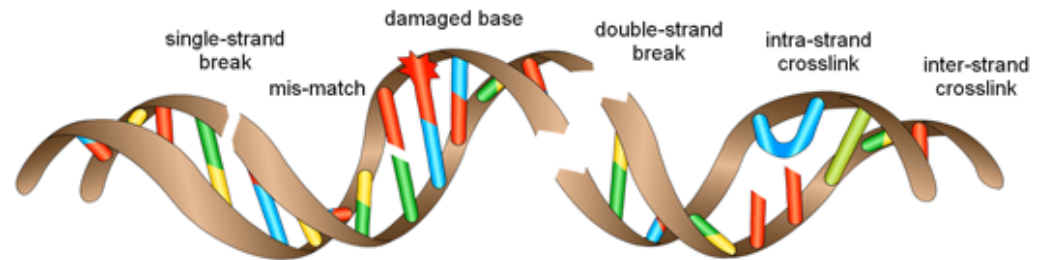
- **Mutações espontâneas**

- Causadas por erros durante a replicação
- Muito raras



- **Mutações induzidas**

- Provocadas por agentes químicos ou físicos externos à célula
- Muito frequentes quando há exposição ao agente mutagênico



A replicação não pode continuar na presença de erros: a solução é o reparo de DNA

Agentes químicos mutagênicos

Análogos de bases

5-Bromouracil	Incorporada como timina; par com guanina (G)	AT => GC, às vezes GC => AT
2-Aminopurine	Incorporada como adenina, par com citosina (C)	AT => GC, às vezes GC => AT

Compostos que reagem com o DNA

Ácido nitroso (HNO ₂)	Deamina adenina e citosina	AT => GC e GC => AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reage com citosinas	GC => AT

Agentes alquilantes

<u>Monofuncional:</u> etil-metanosulfonato	Adiciona grupos metil à guanina; pareamento com timina	GC => AT
<u>Bifuncionais:</u> mitomicina, nitrosoguanidina	Ligações cruzadas entre as fitas do DNA; região danificada removida pela DNase	Mutações de ponto e deleções

Corantes intercalantes

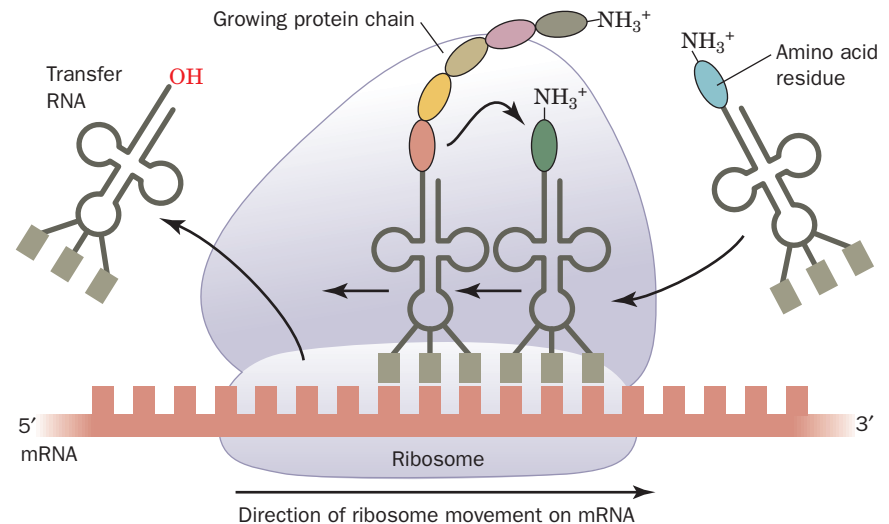
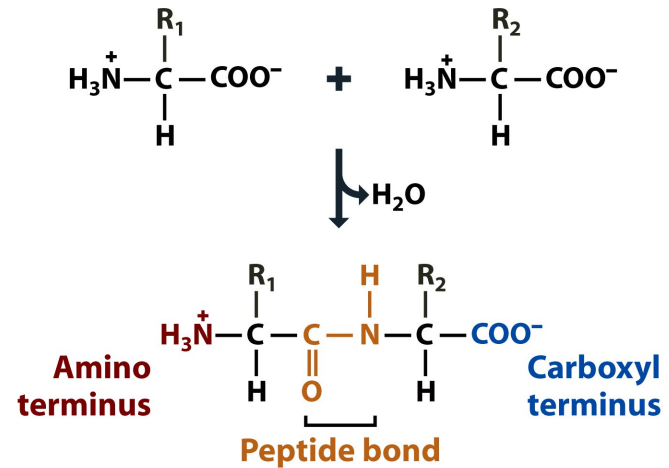
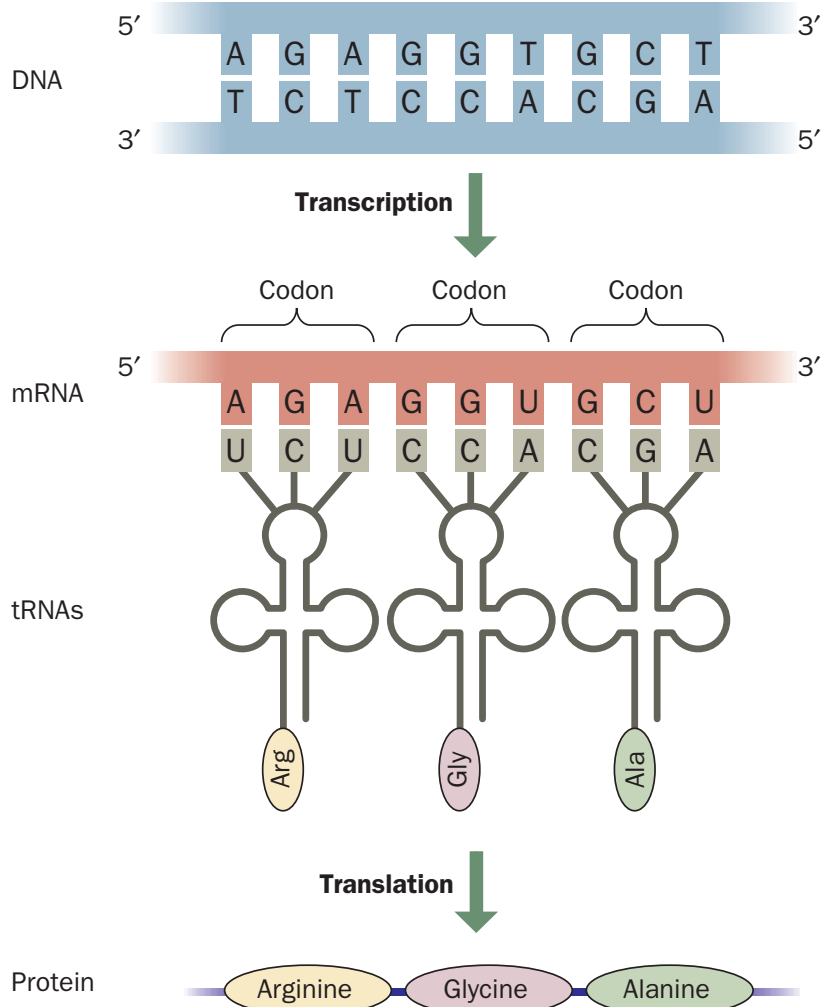
Acridinas, brometo de etídeo	Inserem-se entre dois pares de bases	Microinserções ou microdeleções
------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------

Radiação

Ultravioleta	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção
Radiação ionizante (raios-X)	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção

Síntese de Proteínas: tradução

Tradução – síntese protéica



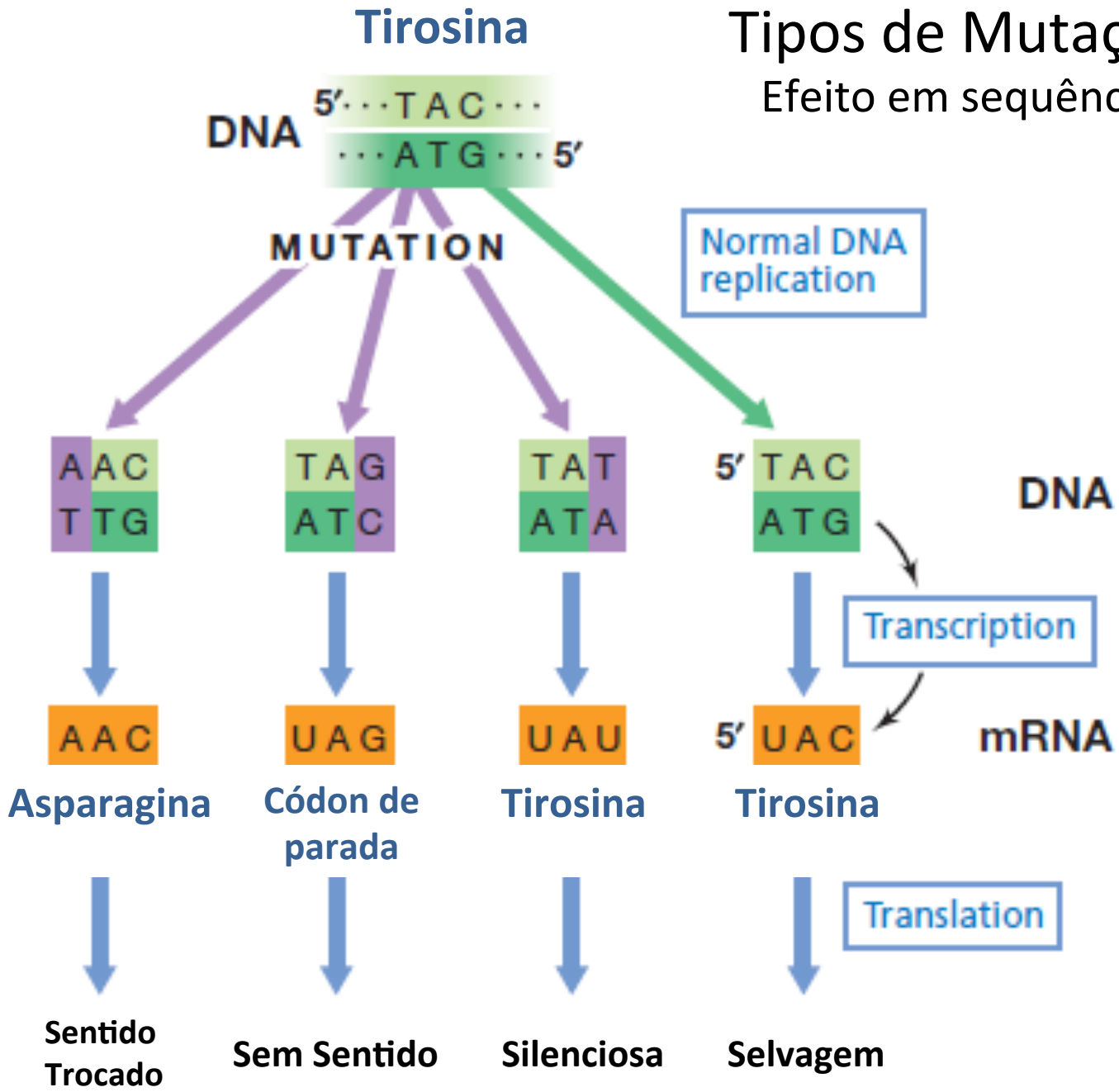
Tipos de mutações

O efeito das mutações sobre regiões codificantes será determinado pela fase de leitura e pela estrutura do código genético

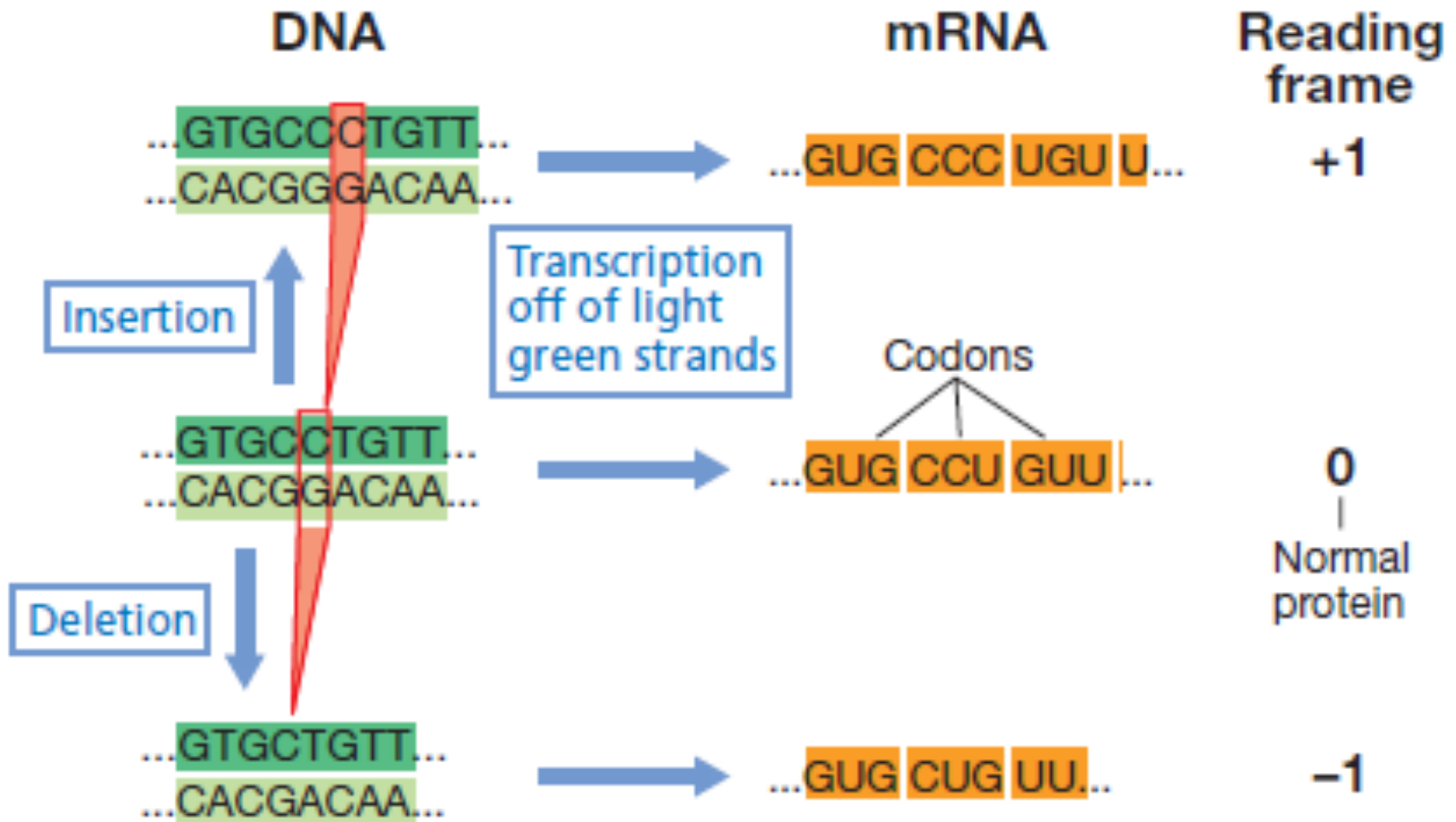
		Second Position								
		U	C	A	G					
First Position	U	UUU	Ser / S	UAU	STOP	UGU	Third Position			
		UUC		UCC		Tyr / Y		Cys / C		
		UUA		UCA		UAA		STOP	UGA	STOP
		UUG		UCG		UAG		STOP	UGG	Trp / W
	C	CUU	Pro / P	CAU	Gln / Q	CGU	Arg / R			
		CUC		CCC		CGC				
		CUA		CCA		CGA				
		CUG		CCG		CGG				
	A	AUU	Thr / T	AAU	Lys / K	AGU	Ser / S			
		AUC		ACC		AGC				
		AUA		ACA		AGA		Arg / R		
		AUG		ACG		AGG				
	G	GUU	Ala / A	GAU	Glu / E	GGU	Gly / G			
		GUC		GCC		GGC				
		GUA		GCA		GGA				
		GUG		GCG		GGG				

Tipos de Mutações Pontuais

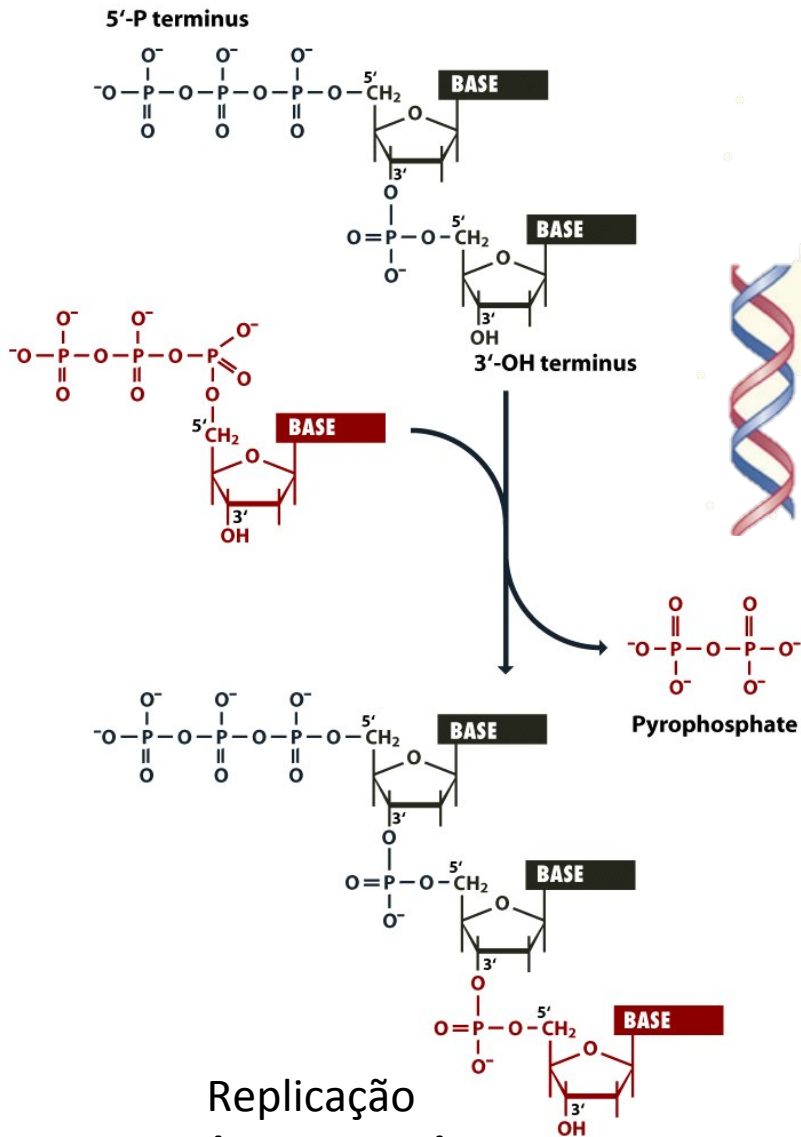
Efeito em sequências codificantes



Inserção ou Deleção de Uma base

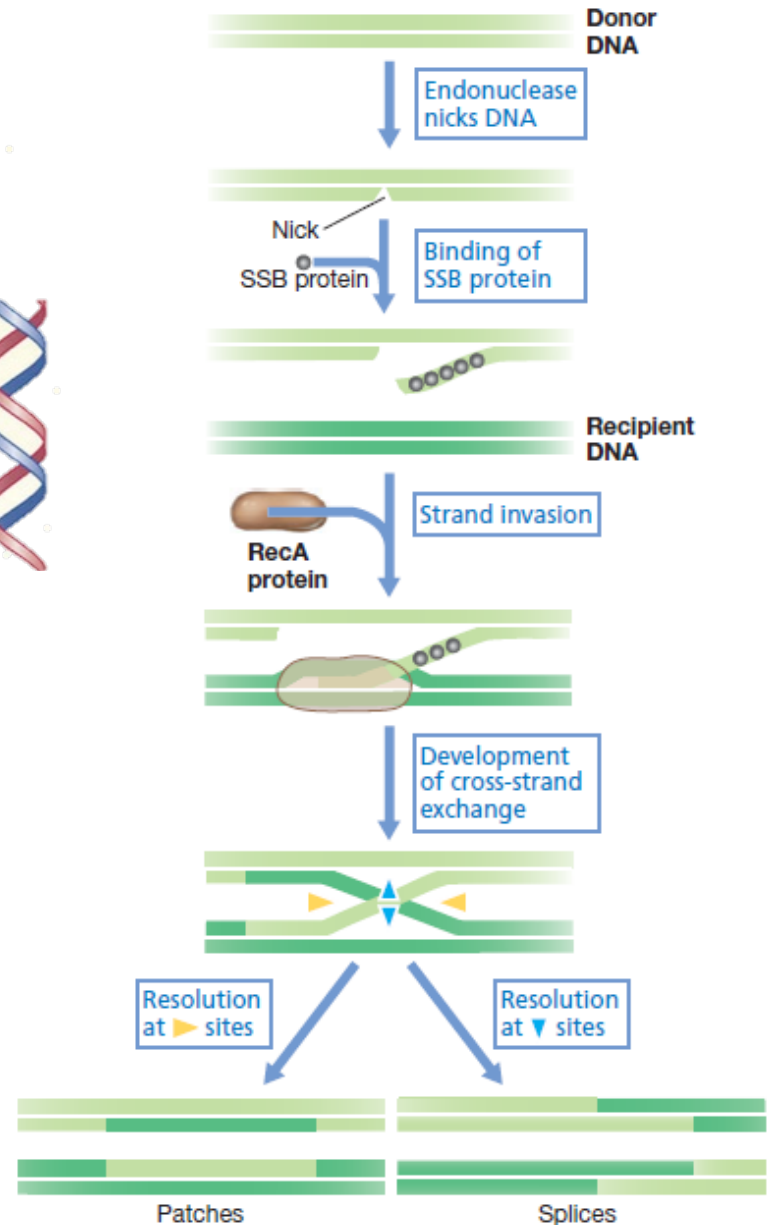


DNA: replicação



Replicação
semi-conservativa

Recombinação homóloga

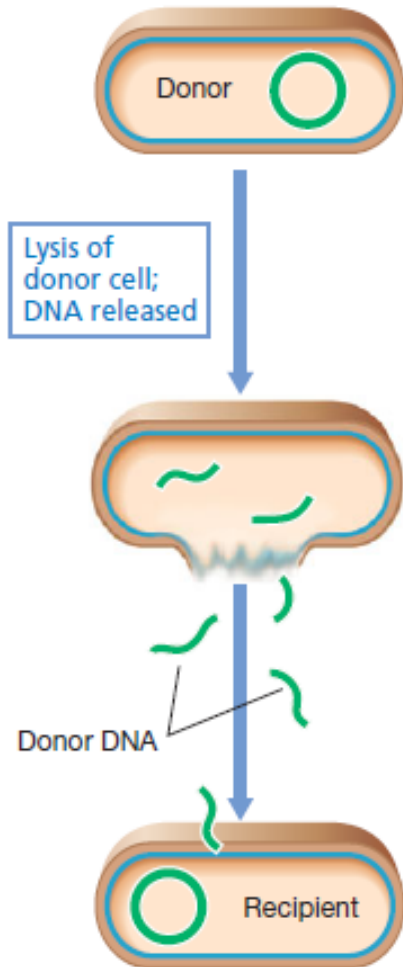


Transferência Horizontal de DNA

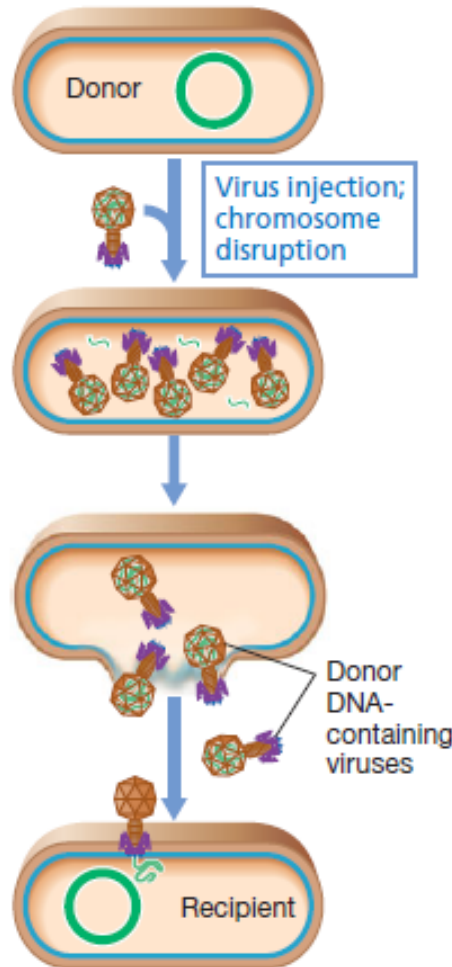
Transformação

Transdução*

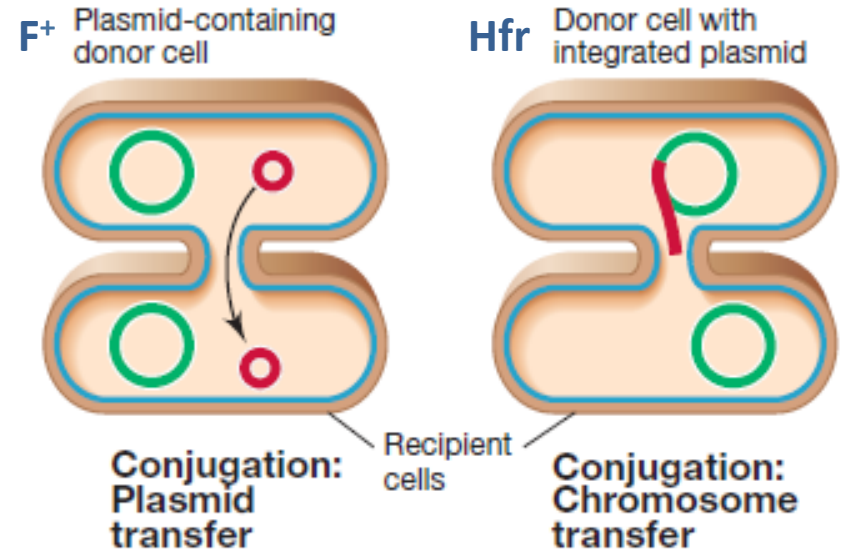
Conjugação



DNA livre



Mediado por vírus

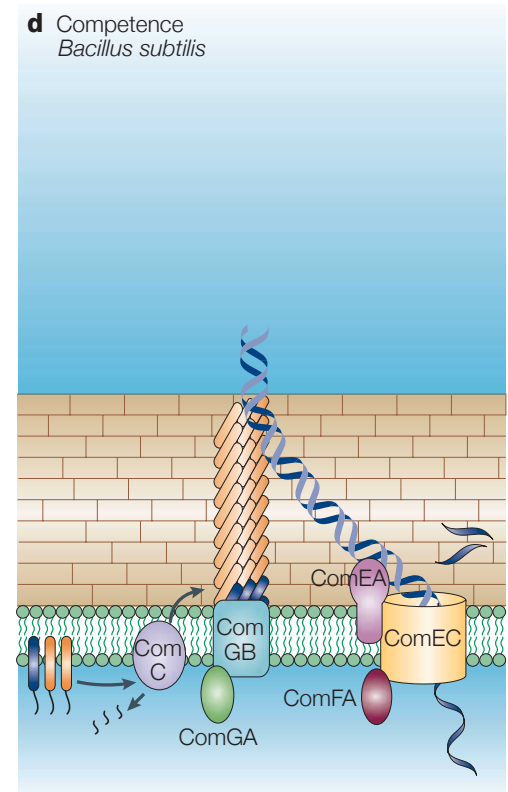
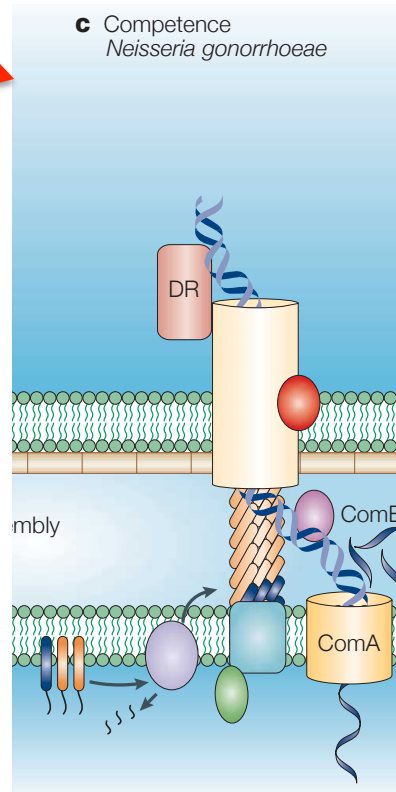
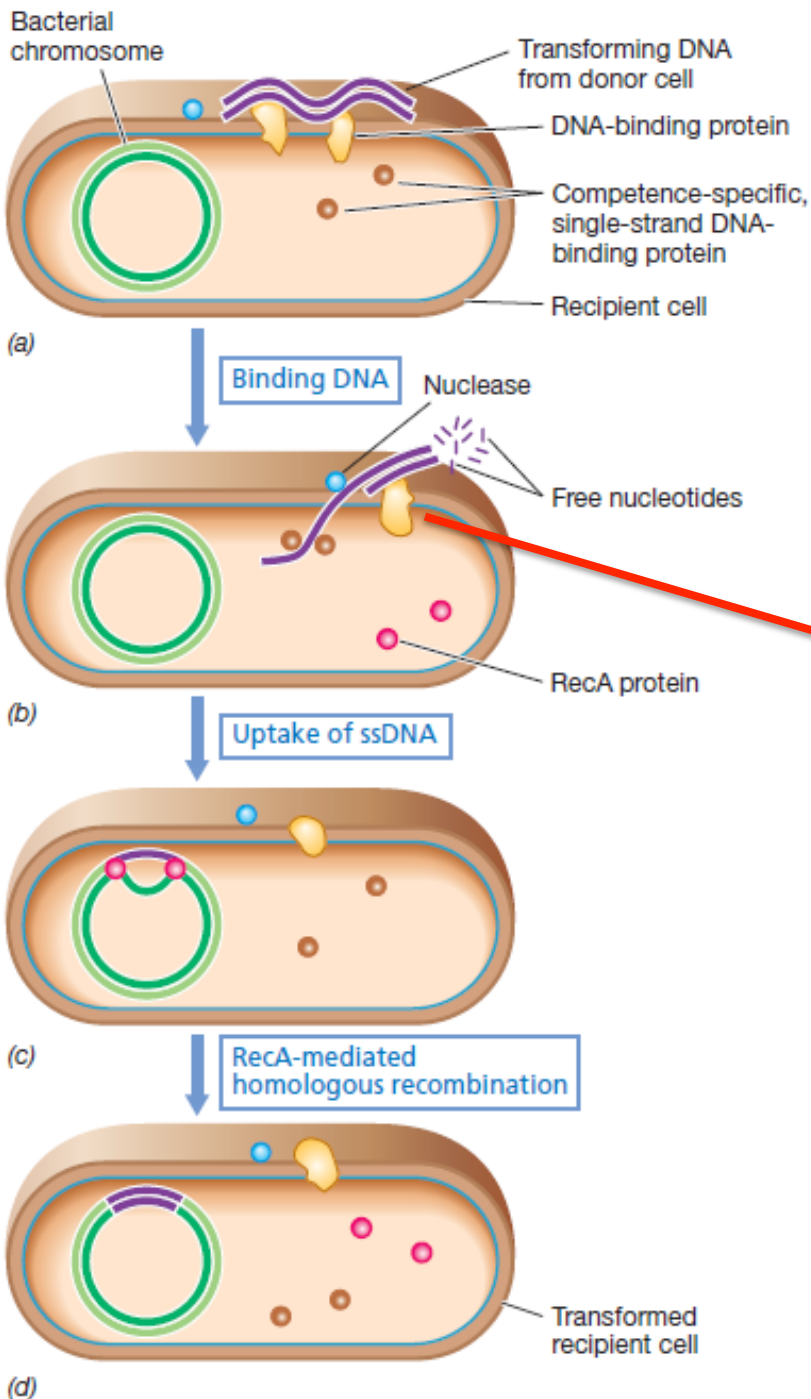


- mediado por plasmídeos
- Exige contato célula-célula
- Depende de pilus

* transdução = transfecção

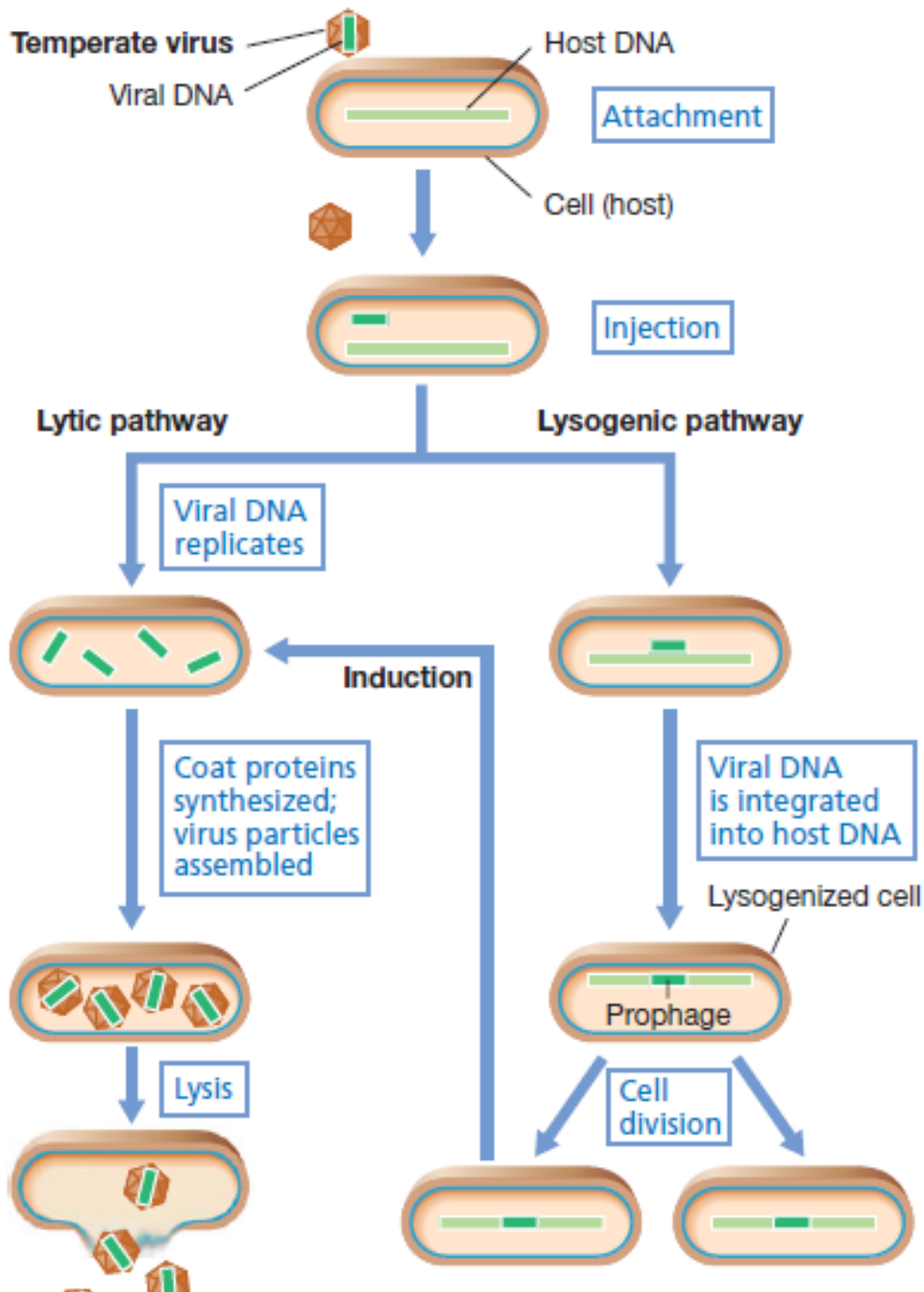
Transformação

- Em geral, são transferidos fragmentos de DNA pequenos
- Proteínas especializadas protegem o DNA da degradação intracelular
- Recombinação necessária para herança do DNA capturado



Competência na Transformação

- Bactérias naturalmente transformáveis são chamadas **competentes**. Exemplos:
 - *Bacillus*: 20% das células se tornam competentes e permanecem por horas
 - *Streptococcus* durante o ciclo de crescimento 100% ficam competentes – período curto de tempo
- Células não competentes
 - Tratamentos físicos e químicos permitem induzir a permeabilidade da parede celular
 - Cloreto de Cálcio
 - Eletroporação: aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem

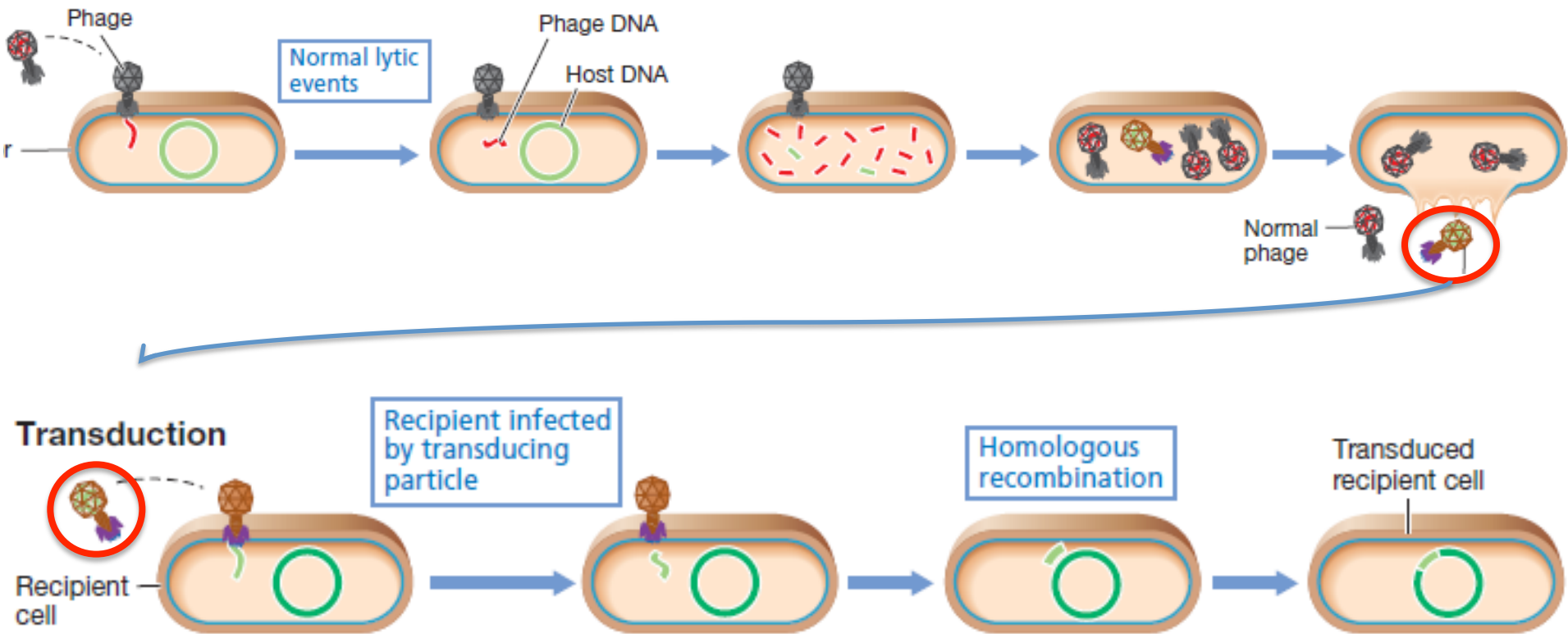


Transdução

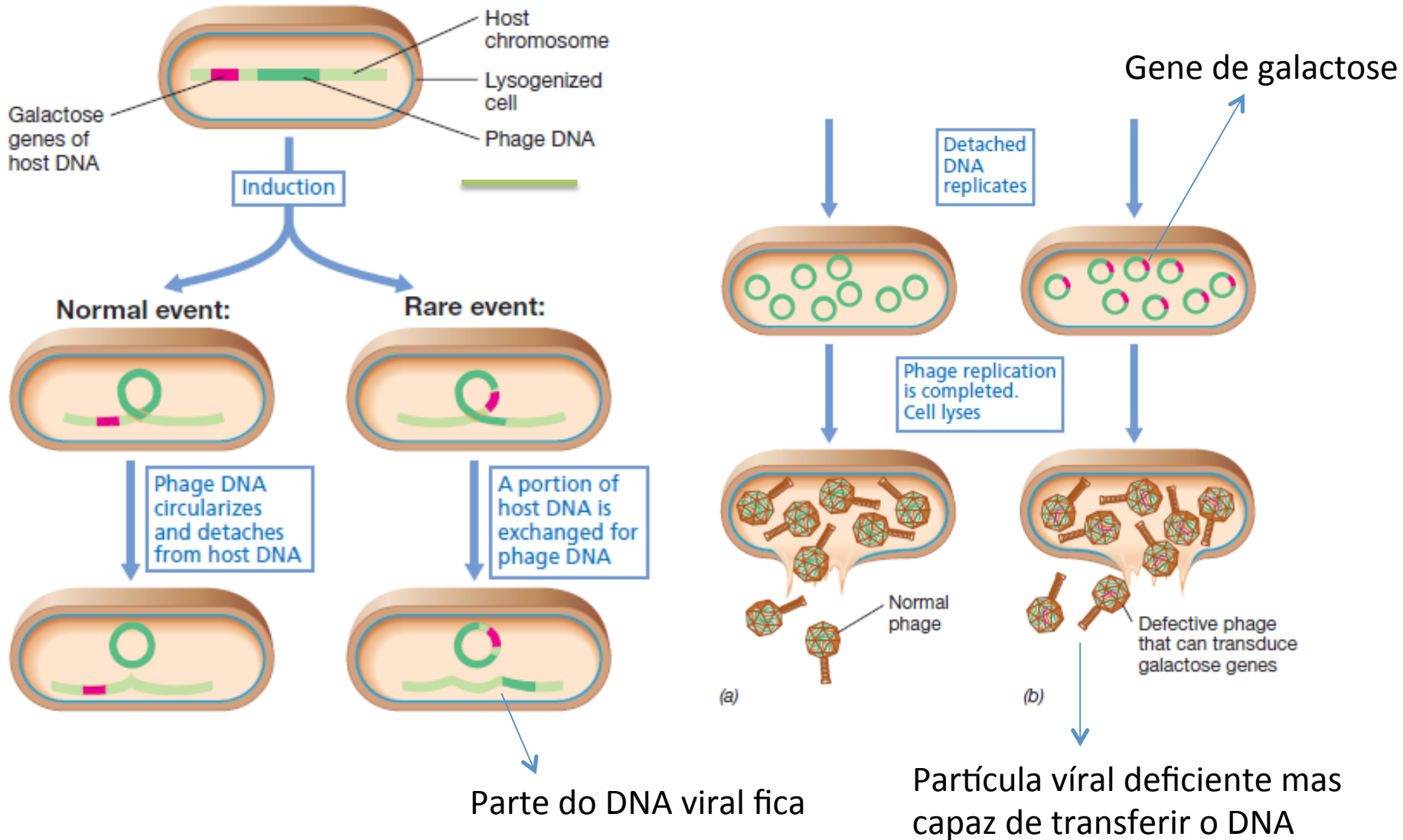
Ciclo lítico
e
Via lisogênica

Transdução Generalizada

Uma pequena parcela das partículas serão transdutoras, ou seja, carregarão um fragmento do DNA genômico ao invés de uma cópia do vírus!



Transdução Específica



Conjugação

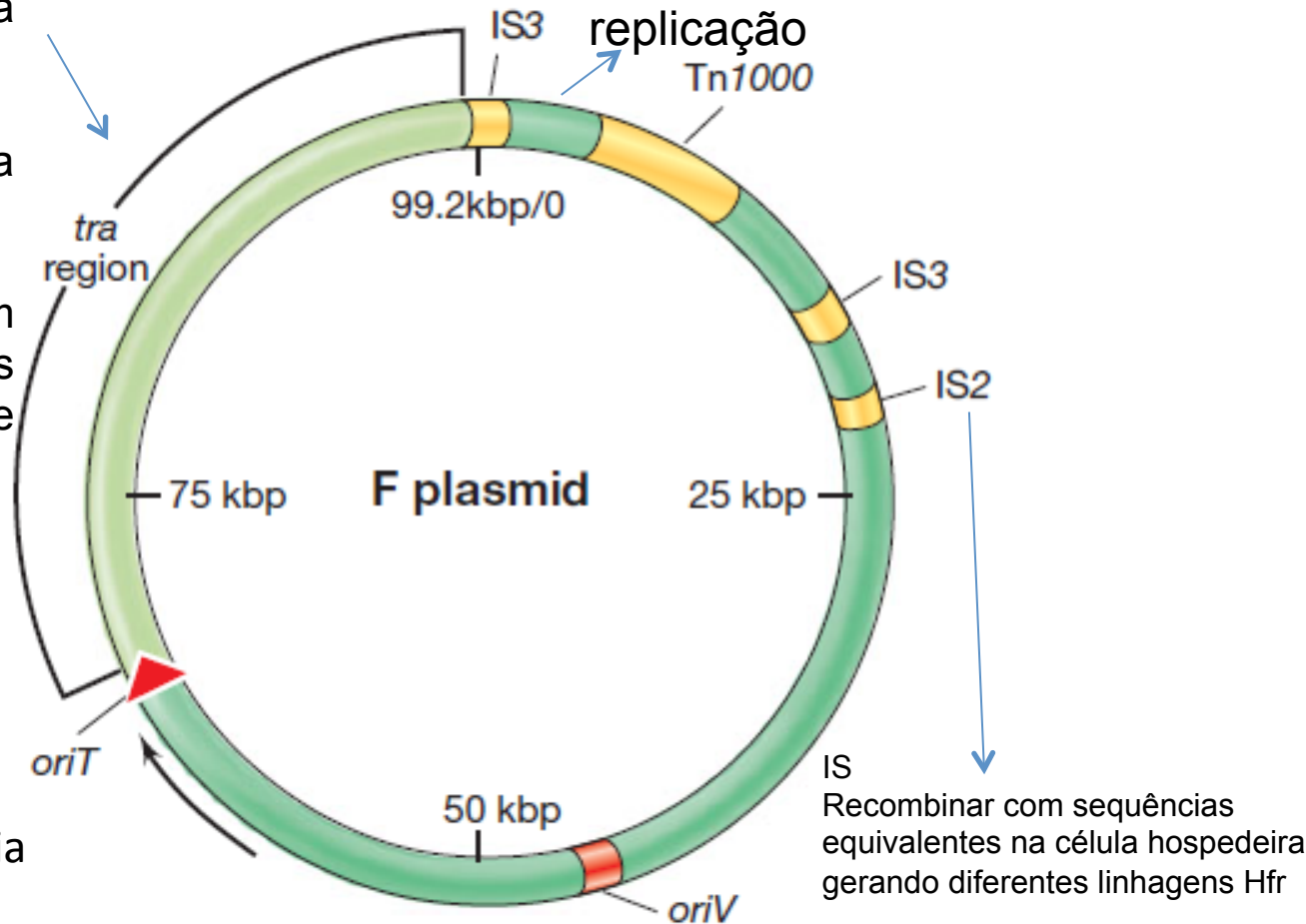
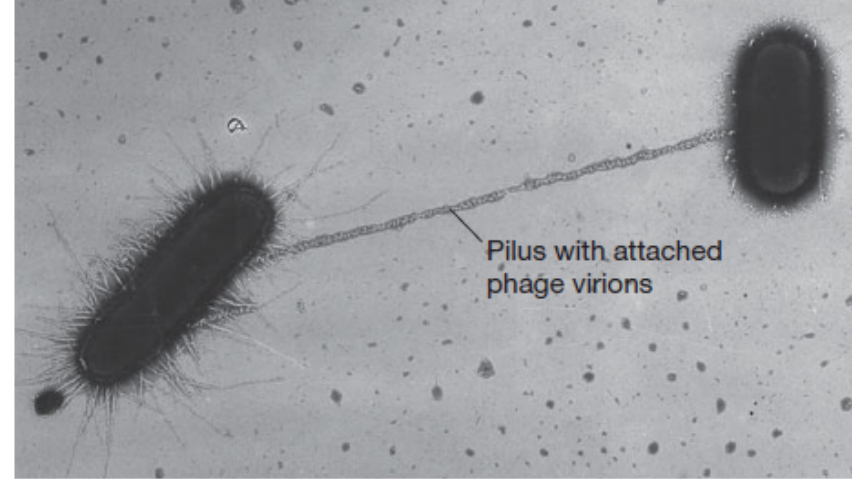
- Conjugação: Transferência genética entre duas células que envolve contato
- Envolve: célula doadora e receptora
- Mecanismo de transferência pode exibir diferenças dependendo do plasmídeo envolvido
- A maioria das bactérias Gram-negativas usam um mecanismo semelhante ao do plasmídeo F
- Normalmente, o plasmídeo é replicado por polimerases celulares e segregado por proteínas próprias
- Pode também ser integrado no cromossomo da célula hospedeira por intermédio de sequências de inserção (IS)

Plasmídeo F

Genes envolvidos na transferência do plasmídeo, como proteínas envolvidas na biossíntese do pili F

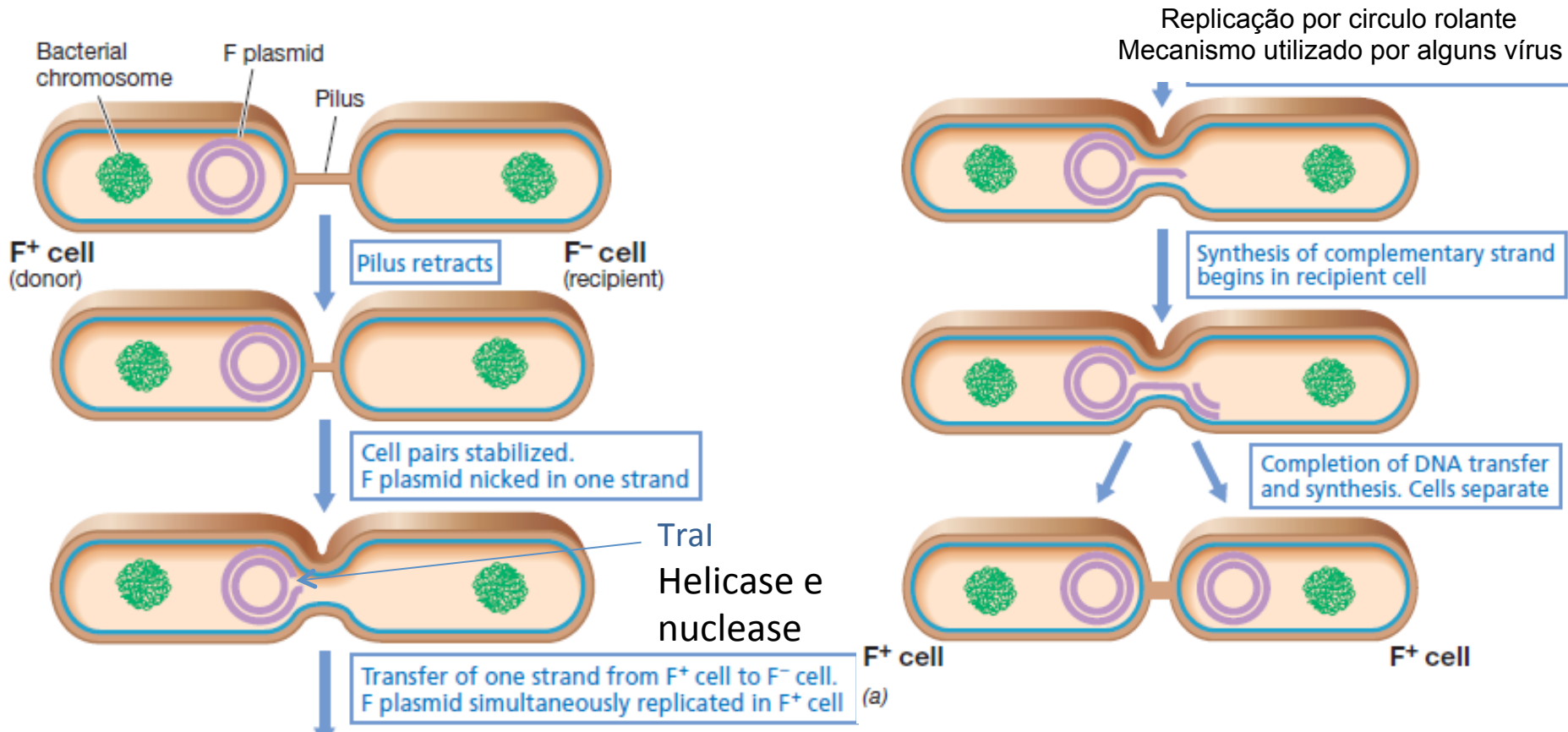
Genes envolvidos na formação do par conjugante

Diferentes plasmídeos podem codificar proteínas diferentes que vão ter o pili ligeiramente diferente



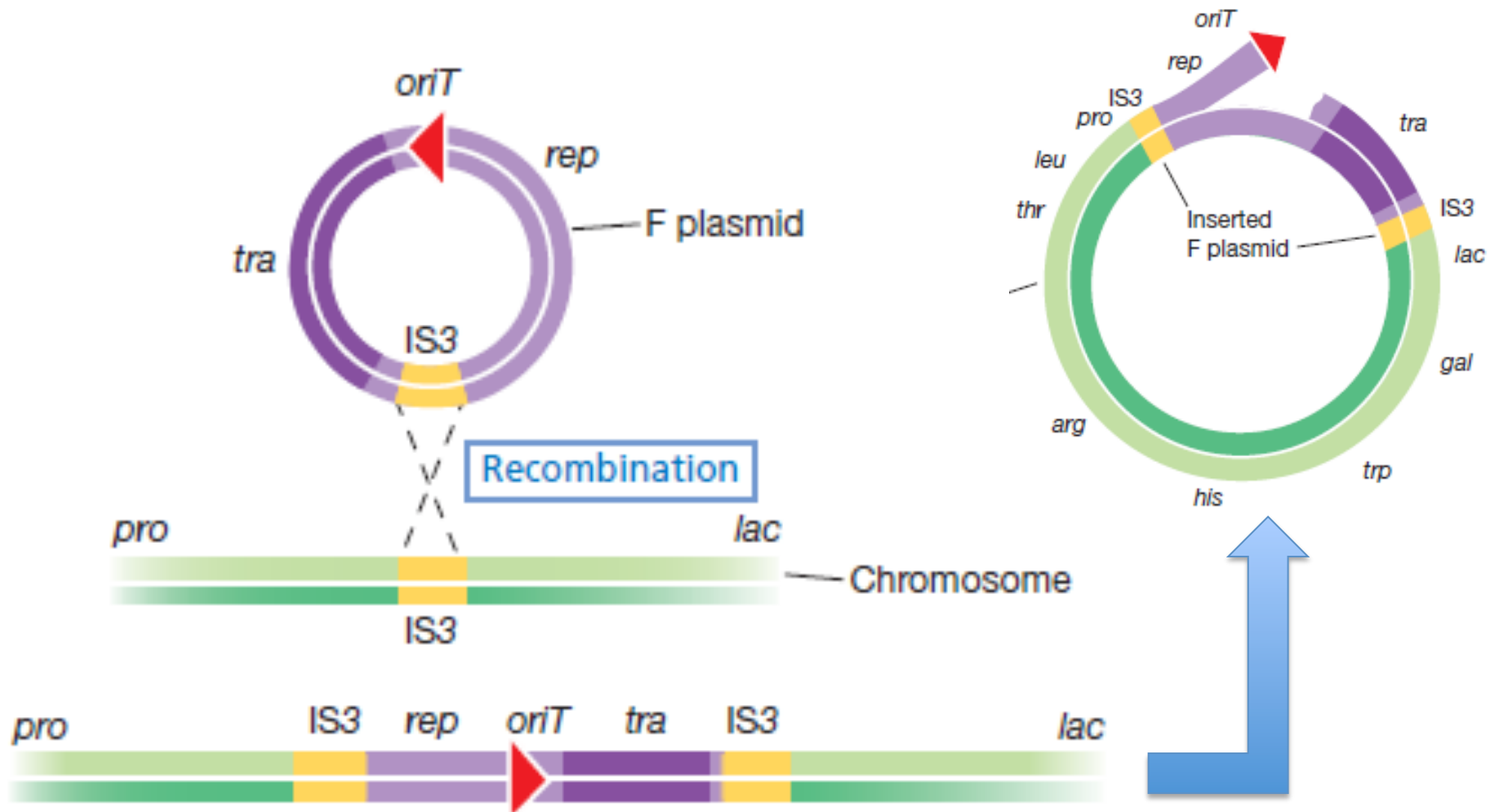
Transferência do DNA Plasmidial por Conjugação

- Processo que leva 5min (plasmídeo de 100 kbp)
- O Plasmídeo consegue se dissimular rapidamente na população e é, portanto, **um agente infeccioso**

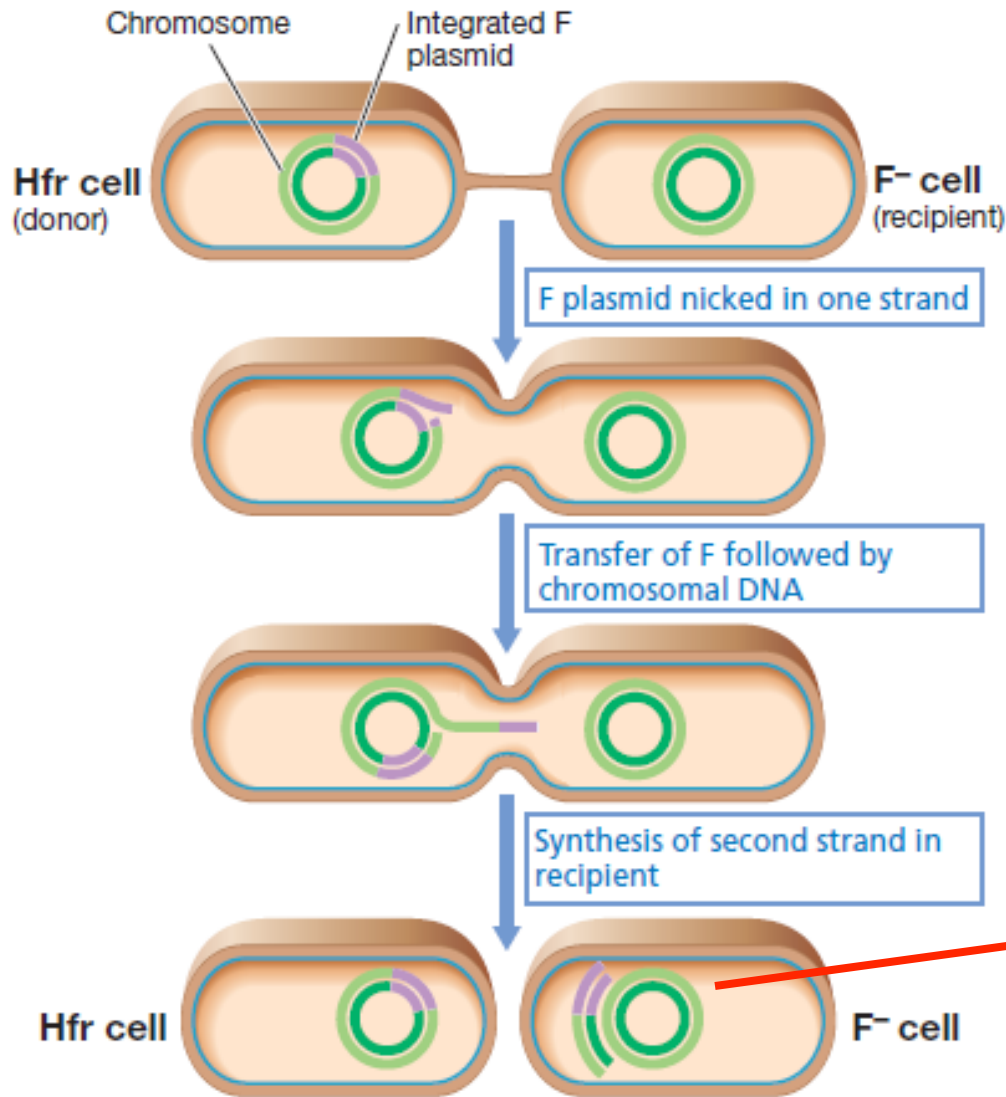


Nota: a célula receptora pode perder o plasmídeo

Processo de integração do plasmídeo F (Hfr) Recombinação Sítio específica



Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação



- Hfr: Alta frequência de recombinação
- Plasmídeo está integrado
- Transferir grandes quantidades de genes
- Receptora não será Hfr : apenas uma parte do plasmídeo é transferida

O fragmento transferido é integrado na célula aceptora por recombinação da parte homóloga (verde)

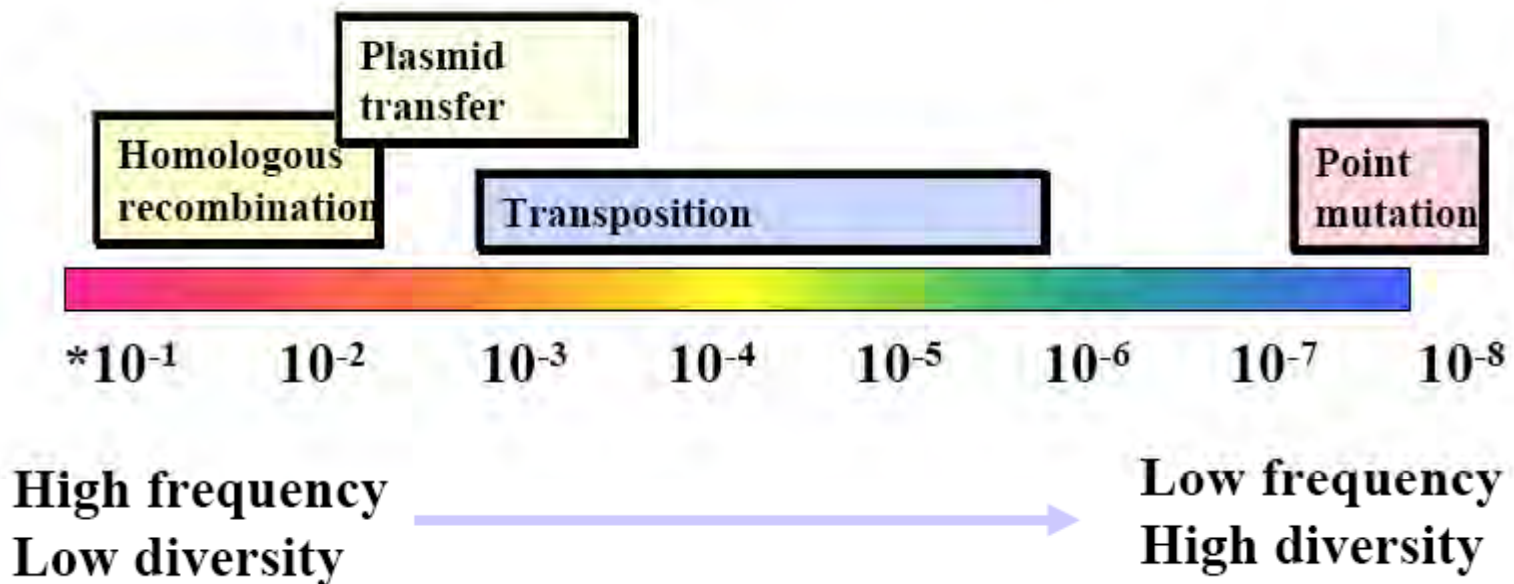
Origens da diversidade genética em bactérias

– Resistência cromossomal

- Mutações cromossômicas

– Resistência extra-cromossomal

- Transferência lateral



* As frequency per cell per generation

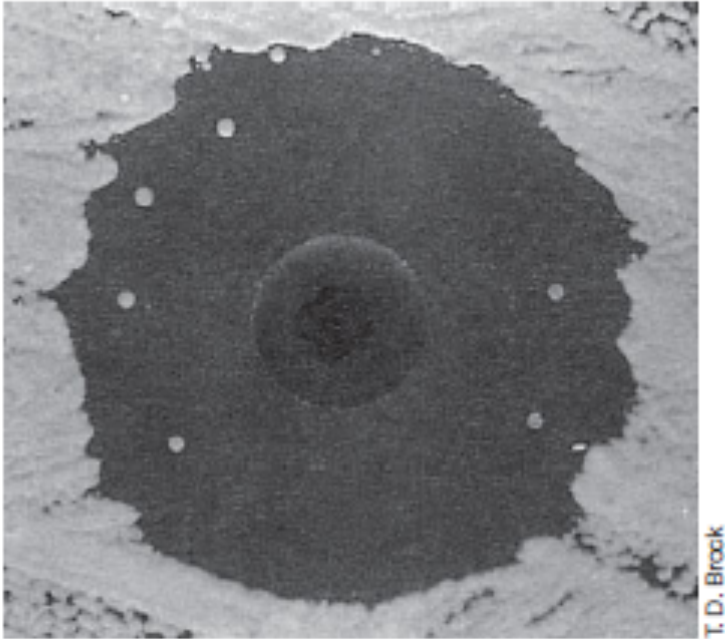
Vocabulário de genética bacteriana

Termo	Definição
Linhagem	Selvagem Linhagem de referência, isolada e mantida em laboratório
	Mutante Fenótipo diferente do selvagem parental
Marcadores	Um ou mais genes que carregam mutações que podem ser monitoradas por produzir fenótipos distintos do selvagem

Nomenclatura das mutações / mutantes			
Tipo de alteração	Exemplo	Categoria	Definição
Selvagem	wt	selvagem	referência
Fenotípicas	His ⁺	selvagem	Posso fazer minha própria histidina
	His ⁻	auxotrófico	Tenho que comer histidina pra viver
	Lac ⁺	selvagem	Posso comer lactose
	Lac ⁻		Não como lactose
Genotípicas	Δ hisC1	auxotrófico	His ⁻ porque o gene hisC1 não funciona
	Δ hisC2	auxotrófico	His ⁻ porque o gene hisC2 não funciona

Isolamento de Mutantes

Mutante Seleccionável



Disco central com antibiótico

Mutações selecionáveis

- Mutações com efeito direto na capacidade de sobrevivência do organismo nas condições testadas
- Exemplos: resistência a antibióticos, ganho/perda da capacidade de sintetizar metabólitos e nutrientes
- Organismos não-resistentes podem ser selecionado por meio com antibiótico

Mutante Não-Seleccionável



Aspergillus nidulans: pigmentação

Mutações não-selecionáveis

- Produzem efeito fenotípico de fácil observação mas sem valor para a sobrevivência do organismo
- Isolamento só pode ser feito pela observação visual

Referências

- Microbiologia (Tortora, 11a. Edição)
 - **Capítulo 8**: Genética microbiana
- Microbiologia de Brock (12a. Edição)
 - Capítulo 6: Biologia Molecular de Bactérias
 - Unidade 10: Genética de bactérias e arqueas

Perguntas

- O que são ORFs (fases abertas de leitura)?
- O que são operons?
- O que é genoma?
- A síntese de nucleotídeos ocorre sempre em um único sentido, seja síntese de DNA ou RNA. Que sentido é esse? Mostre as posições no anel da ribose.

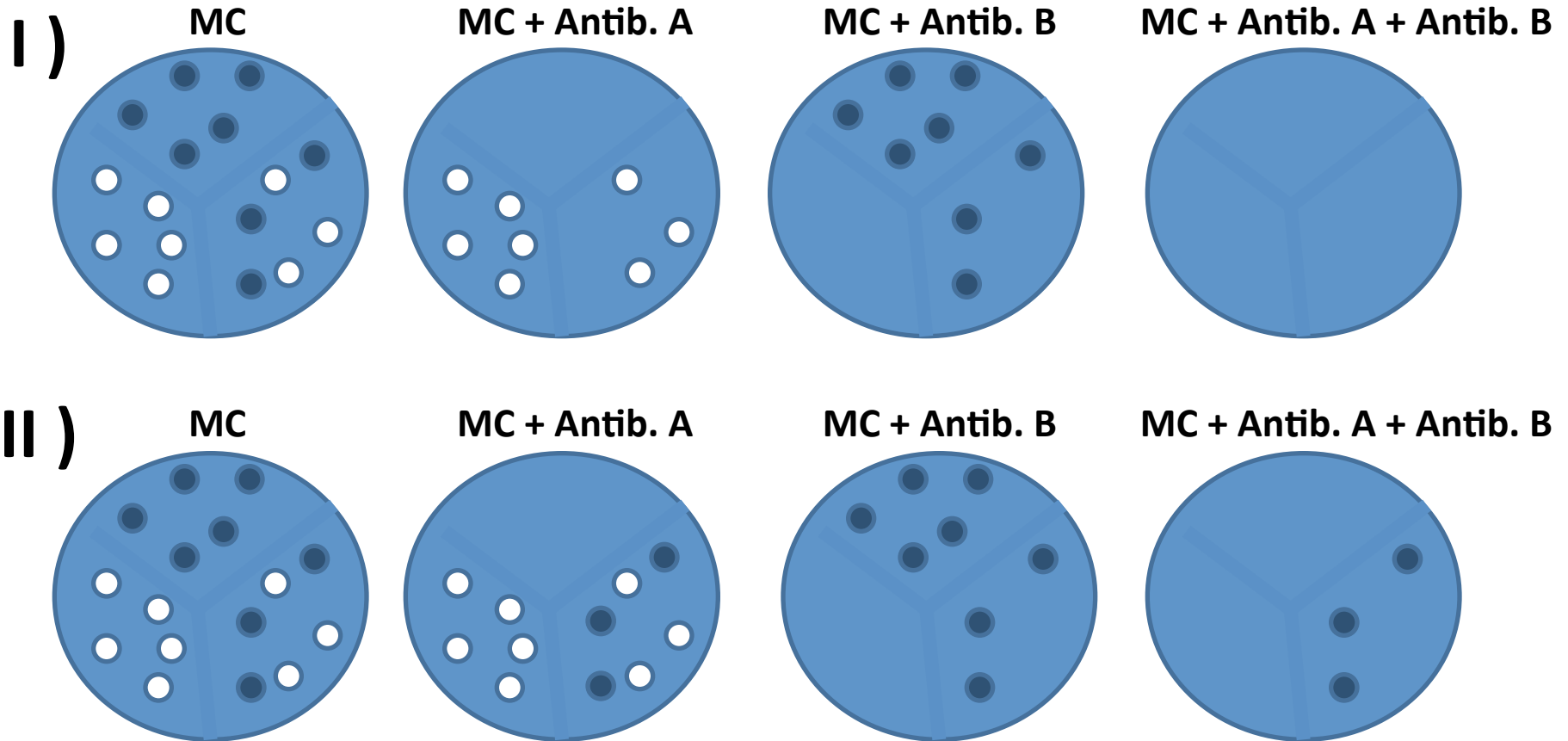
Perguntas

- Você tem Hfr, His⁺ e Lac⁺ e uma célula F⁻ resistente a canamicina. Qual fenótipo você espera observar para a célula conjugada? A célula F⁻ se transforma em F⁺ e Hfr?
- Mutação de sentido trocado pode causar que problemas para a célula?
- Uma célula F⁺ com resistência aos antibióticos Amp, Str e Gen, torna a célula receptora resistente a quais antibióticos? O processo de conjugação pode ser um problema para a saúde pública, em qual aspecto?

Perguntas

- Na transdução especializada, a célula receptora pode em alguns casos replicar o DNA da célula doadora? E no caso da transdução generalizada?
- O que é competência no processo de transformação?

Os resultados abaixo foram obtidos a partir de dois experimentos de transferência de resistência a antibióticos por conjugação:



a. Em qual dos experimentos a conjugação bacteriana ocorreu com sucesso? Identifique a célula doadora e a receptora. Justifique suas respostas.

b. Quais características a célula Receptora, doadora e conjugada possuem: A^r , B^r e Lac^+