

BMM-0271: Microbiologia básica

Genética de procariotos

Robson Francisco de Souza. Ph.D

robfsouza@gmail.com

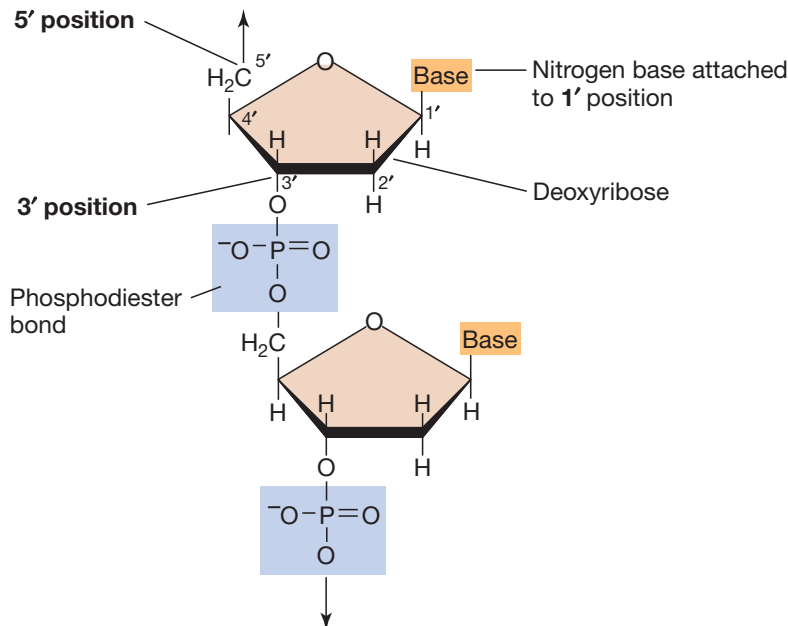
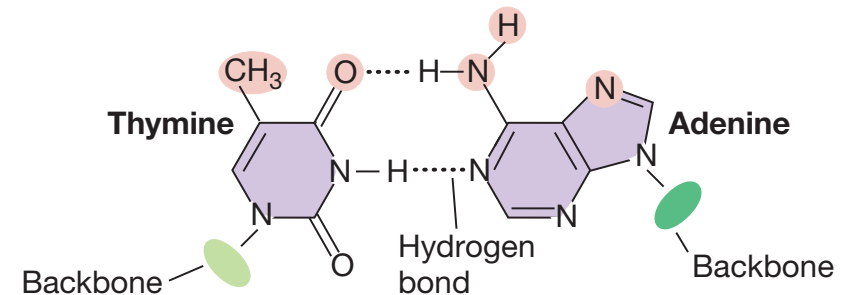
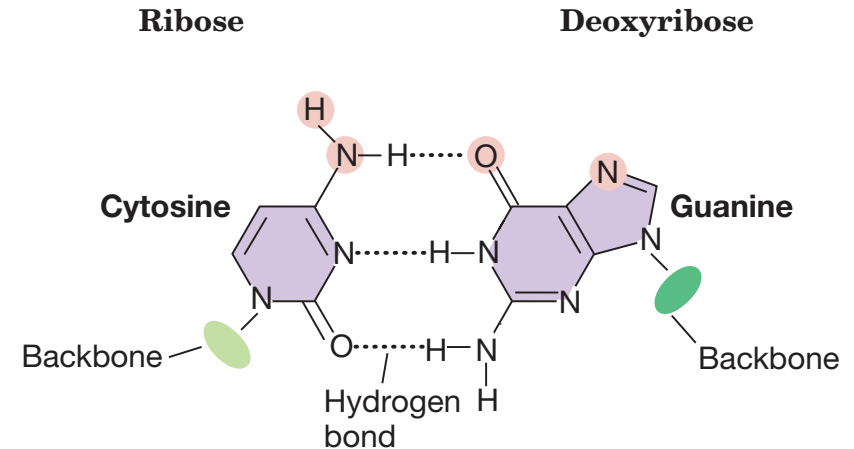
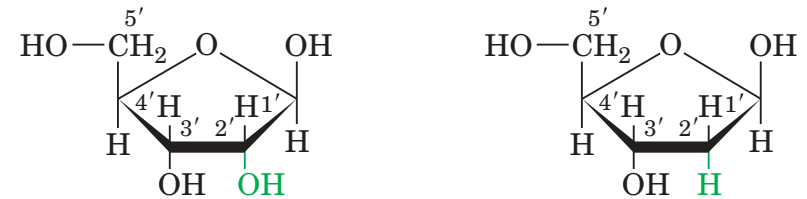
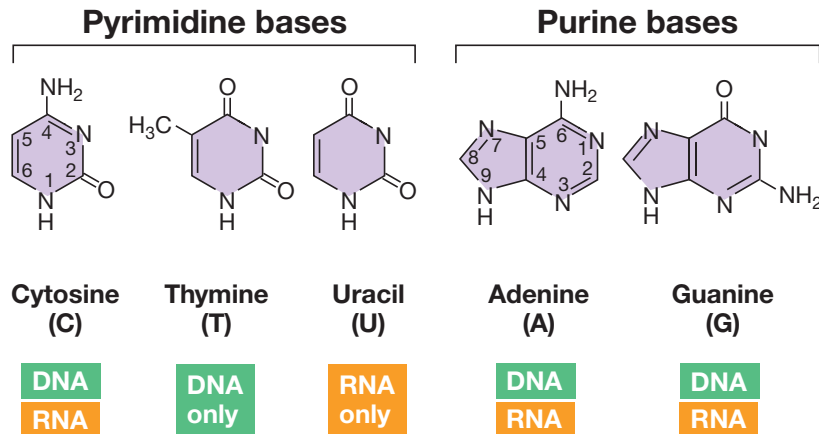
LEEP: Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas

ICB/USP – 2018

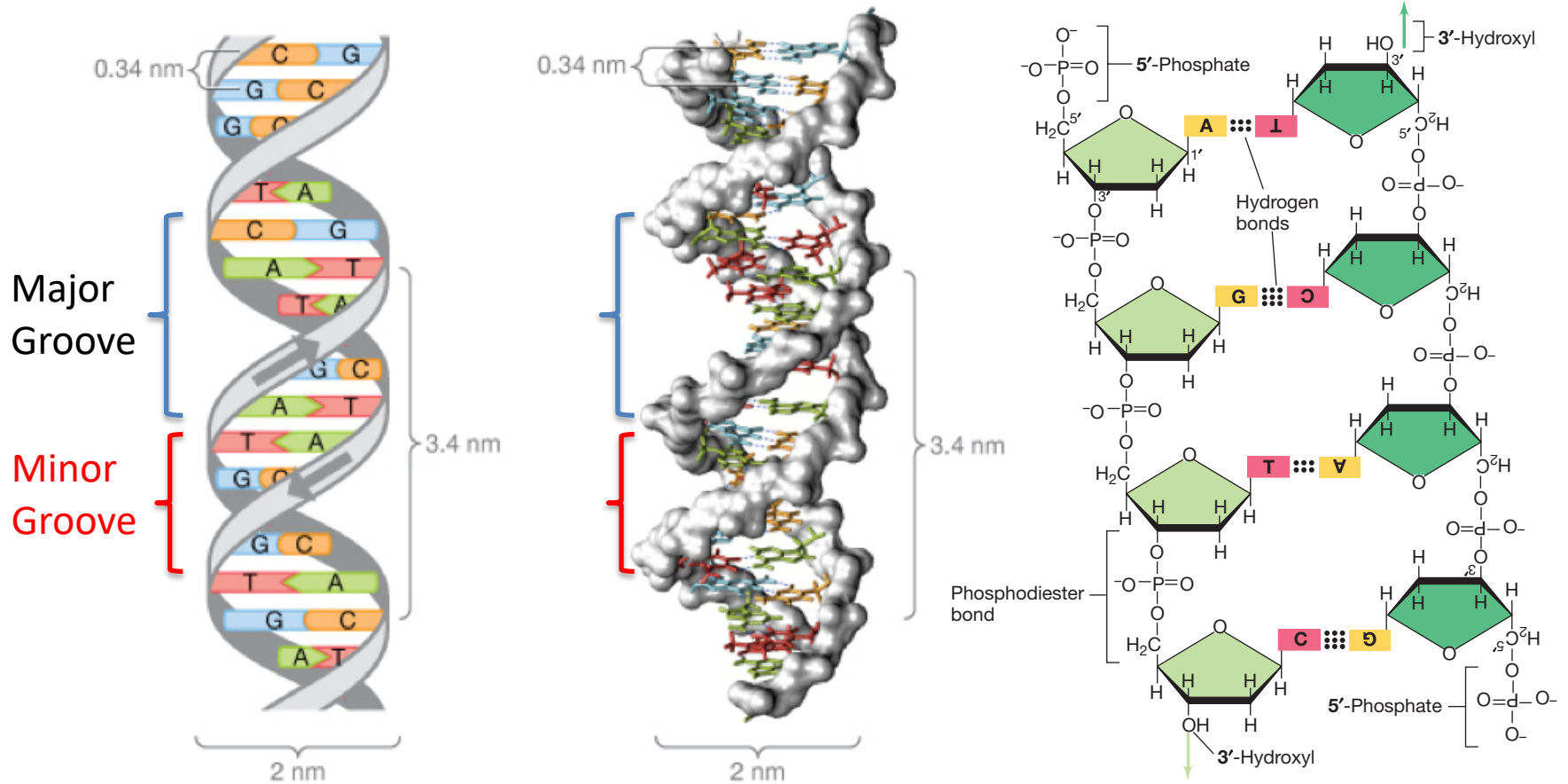
Tópicos

- **Genomas de procariotos**
 - Composição e estrutura química do DNA
 - Organização dos genomas e estrutura dos genes em procariotos
- **Origens da diversidade genética**
 - Mutação
 - Mecanismos
 - Isolamento
 - Recombinação e transposição
 - Transferência lateral de genes
 - Transformação
 - Transdução
 - Conjugação

Composição dos ácidos nucleicos

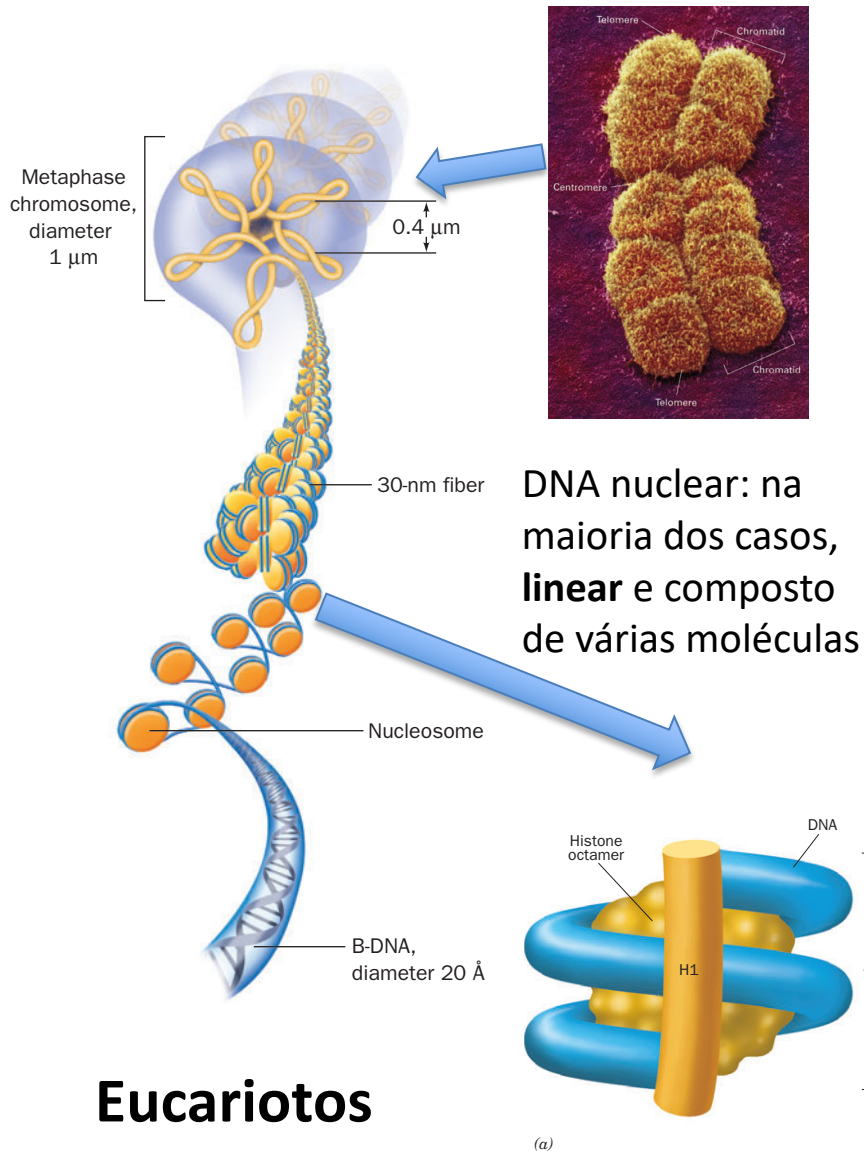


Estrutura do DNA



Organização dos genomas e estrutura dos genes em procariotos

DNA: organização



Eucariotos



DNA, na maioria dos casos, organizado em poucos cromossomos **circulares**, pode conter plasmídeos.

Procariotos

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

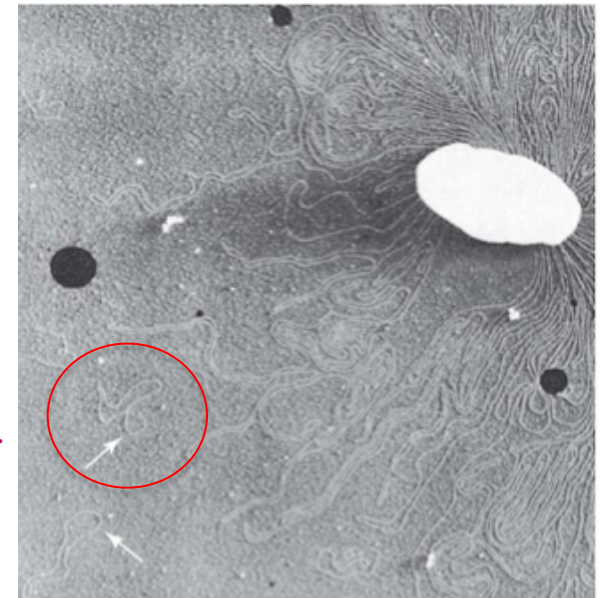
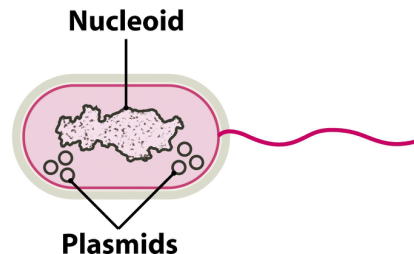
* Plasmídeos são muito raros em eucariotos

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



DNA: cromossomos

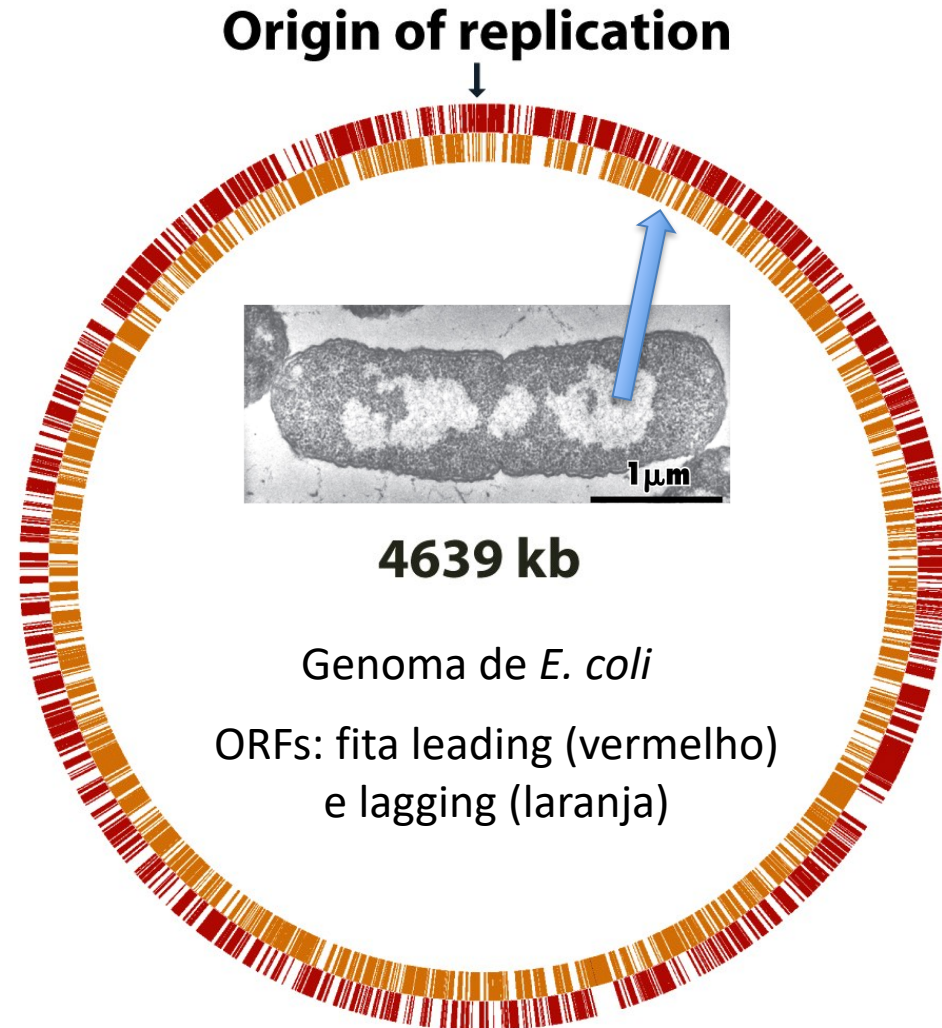
Procariotos

- Cromossomos lineares ou circulares (maioria)
- Organizados e compactados

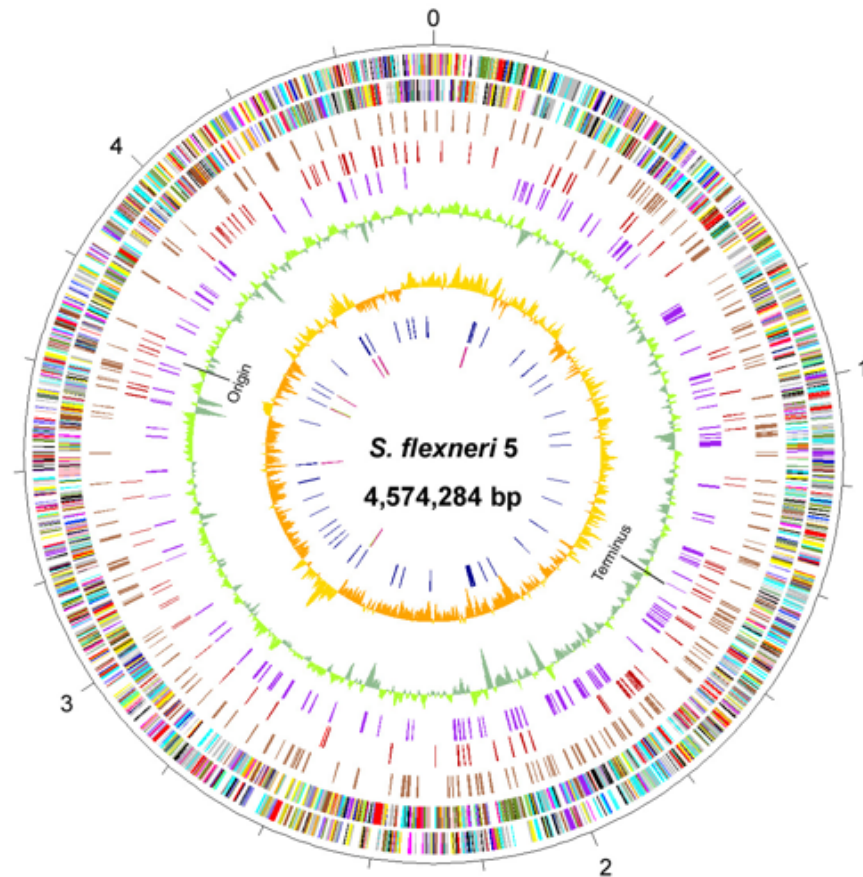
Cromossomos de procariotos

>gi|49175990|ref|NC_000913.2| Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655,
complete genome

AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCT
GATAGCAGCTTCTGAAGTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTC
ACTAAATACTTTAACCAATATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAGAGTACACA
ACATCCATGAAACGCATTAGCACCACCATTACCACCACCATCACCATTACCACAGGTAACG
GTGCGGGCTGACGCGTACAGGAAACACAGAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCAGGCTTTT
TTTTTCGACCAAAGGTAACGAGGTAACAACCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCA
GTGGCAATGCAGAACGTTTTCTGCGTGTGCGCATATTCTGGAAAGCAATGCCAGGCAGG
GGCAGGTGGCCACCGTCCTCTCTGCCCCGCCAAAATCACCACACCTGGTGGCGATGAT
TGAAAAAACCATTAGCGGCCAGGATGCTTTACCAATATCAGCGATGCCGAACGTATTTTT
GCCGAACTTTTGACGGGACTCGCCGCCGCCAGCCGGGTTCCCGCTGGCGCAATTGAAAA
CTTTTCGTCGATCAGGAATTTGCCCAAATAAACATGTCTGCATGGCATTAGTTTGTGGG
GCAGTGGCCGATAGCATCAACGCTGCGCTGATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTCGATCGCC
ATTATGGCCGCGTATTAGAAGCGCGCGGTACAACGTTACTGTTATCGATCCGGTCGAAA
AACTGCTGGCAGTGGGGCATTACCTCGAATCTACCGTCGATATTGCTGAGTCCACCCGCCG
TATTGCGGCAAGCCGATTCCGGCTGATCACATGGTGCTGATGGCAGGTTTACC GCCGGT
AATGAAAAAGGCGAAGTGGTGGTGCTTGGACGCAACGGTTCCGACTACTCTGCTGCGGTGC
TGGCTGCCTGTTTACGCGCCGATTGTTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTCTATAC
CTGCGACCCGCGTCAGGTGCCGATGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCCTACCAGGAAGCG
ATGGAGCTTTCCTACTTCGCGCTAAAGTCTTCAACCCCGCACCATTACCCCATCGCCC
AGTTCCAGATCCCTTGCCTGATTAAAAATACCGGAAATCCTCAAGCACCAGGTACGCTCAT
TGGTGCCAGCCGTGATGAAGACGAATTACCGGTCAAGGGCATTTCGAATCTGAATAACATG
GCAATGTTACAGCTTTCTGGTCCGGGGATGAAAGGGATGGTCCGCATGGCGGCGCGCTCT
TTGCAGCGATGTCACGCGCCCGTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATCATCTTCCGAATA
CAGCATCAGTTTCTGCGTTCACAAAGCGACTGTGTGCGAGCTGAACGGGCAATGCAGGAA
GAGTTCTACCTGGAAGTGAAGAAGGCTTACTGGAGCCGCTGGCAGTGACGGAACGGCTGG
CCATTATCTCGGTGGTAGGTGATGGTATGCGCACCTTGCCTGGGATCTCGGCGAAATCTT
TGCCGCACTGGCCCGCGCAATATCAACATTGTCGCCATTGCTCAGGGATCTTCTGAACGC
TCAATCTCTGTCGTGGTAAATAACGATGATGCGACCACTGGCGTGCGGTTACTCATCAGA
TGCTGTTCAATACCGATCAGGTTATCGAAGTGTGTTGATTGGCGTGGTGGCGTTGGCGG
TGCGCTGCTGGAGCAACTGAAGCGTCAGCAAAGCTGGCTGAAGAATAAACATATCGACTTA
CGTGTCTGCGGTGTTGCCAACTCGAAGGCTCTGCTCACCATTGTACATGGCCTTAATCTGG
AAAACCTGGCAGGAAGAACTGGCGCAAGCCAAAGAGCCGTTTAATCTCGGGCGCTTAATTCG
CCTCGTGA...



Genomas completos: ejemplos

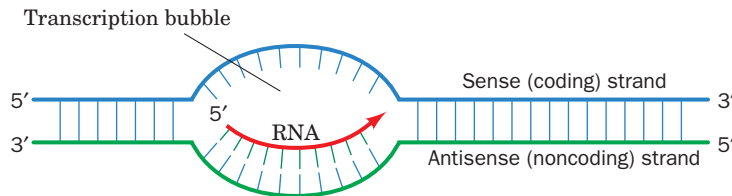


Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. **BMC Genomics** (2006) 7:173

Estrutura dos genes em procariotos

Síntese de RNA: transcrição

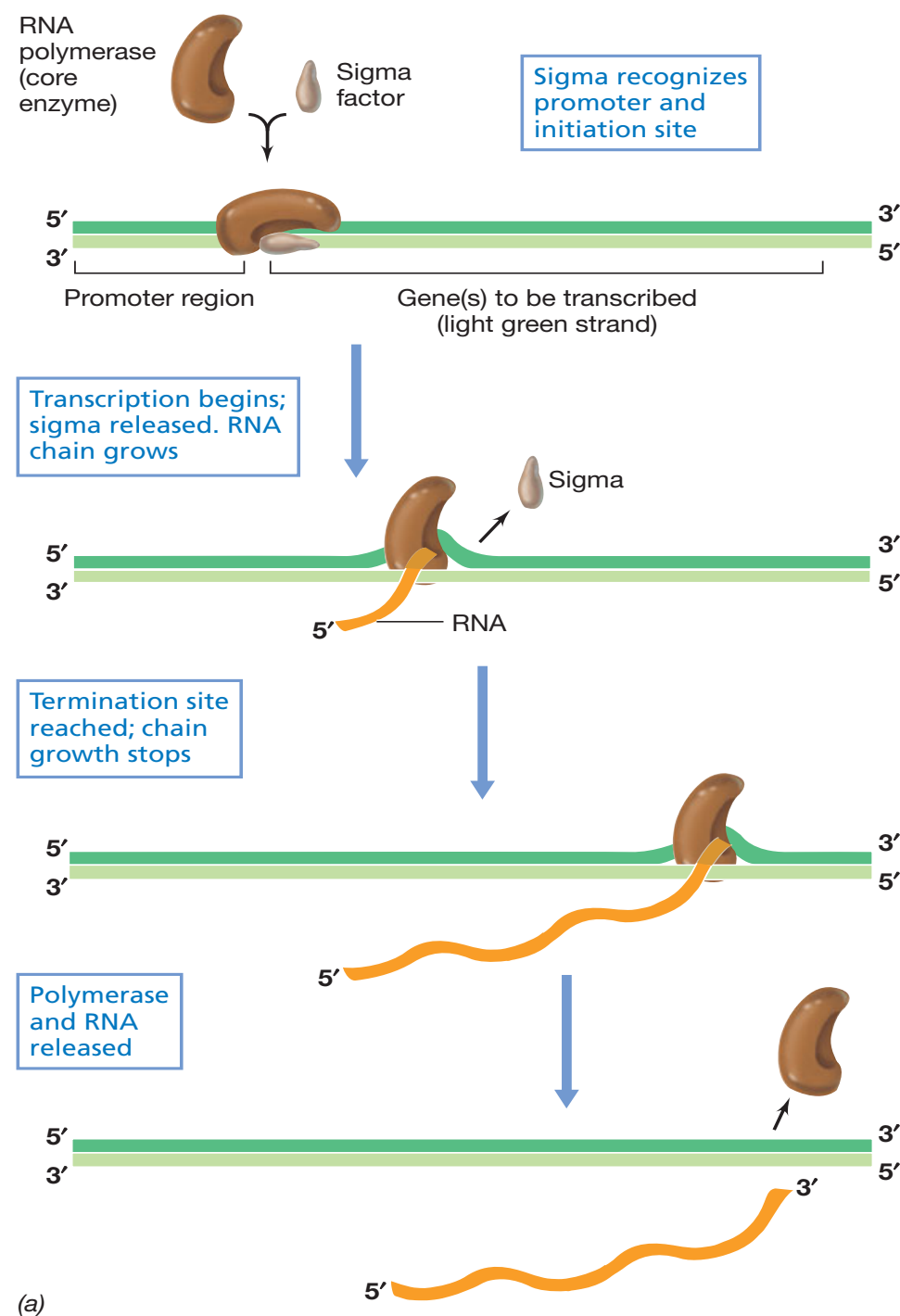
Como a replicação, também procede apenas no sentido 5' -> 3'



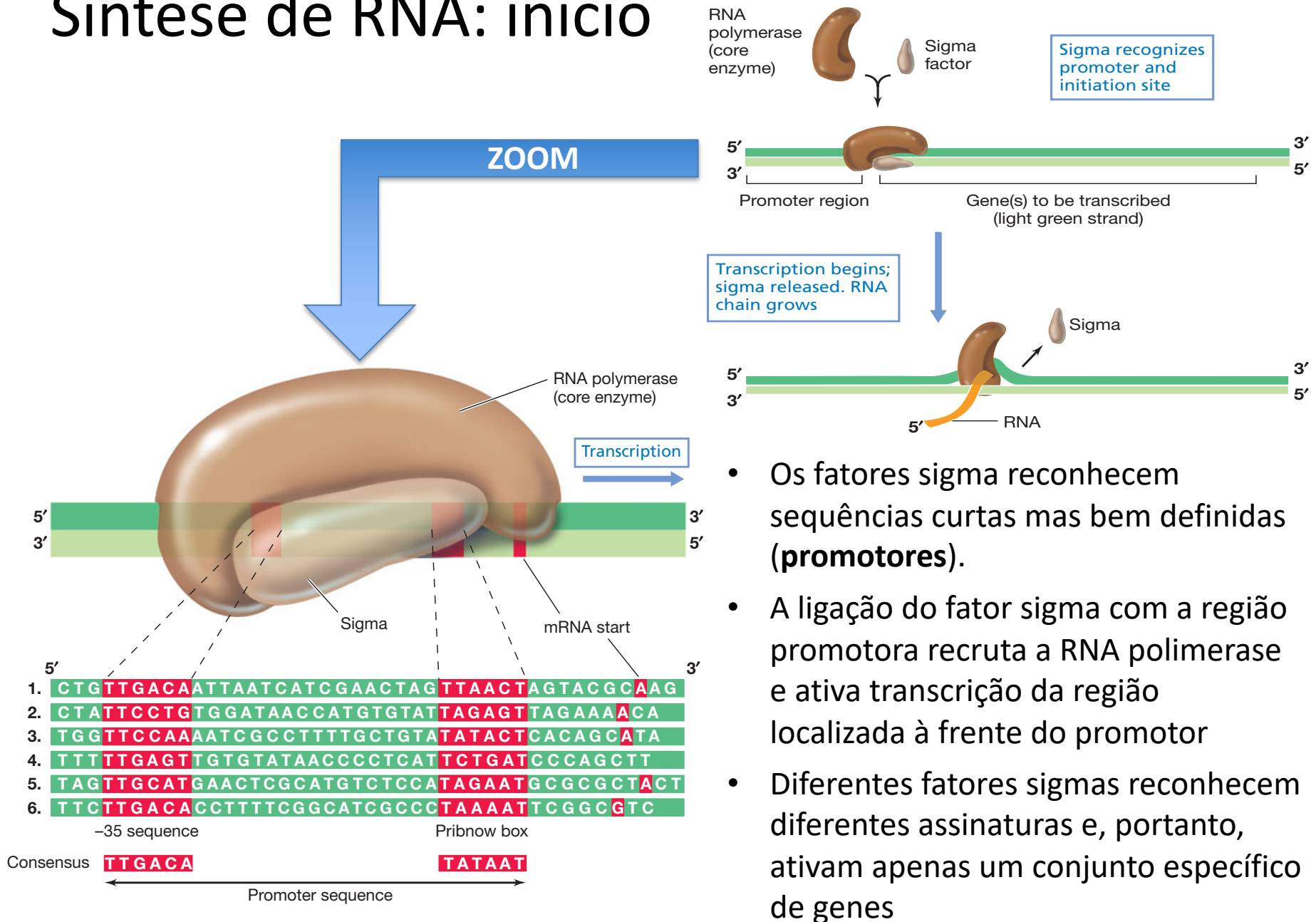
Unidade de transcrição

Segmento contínuo do genoma (*locus*) que inclui

- Regiões regulatórias
 - Início (região promotora)
 - Término (terminadores)
- Região transcrita
 - Procariotos: um mRNA
 - Eucariotos: um ou mais mRNAs

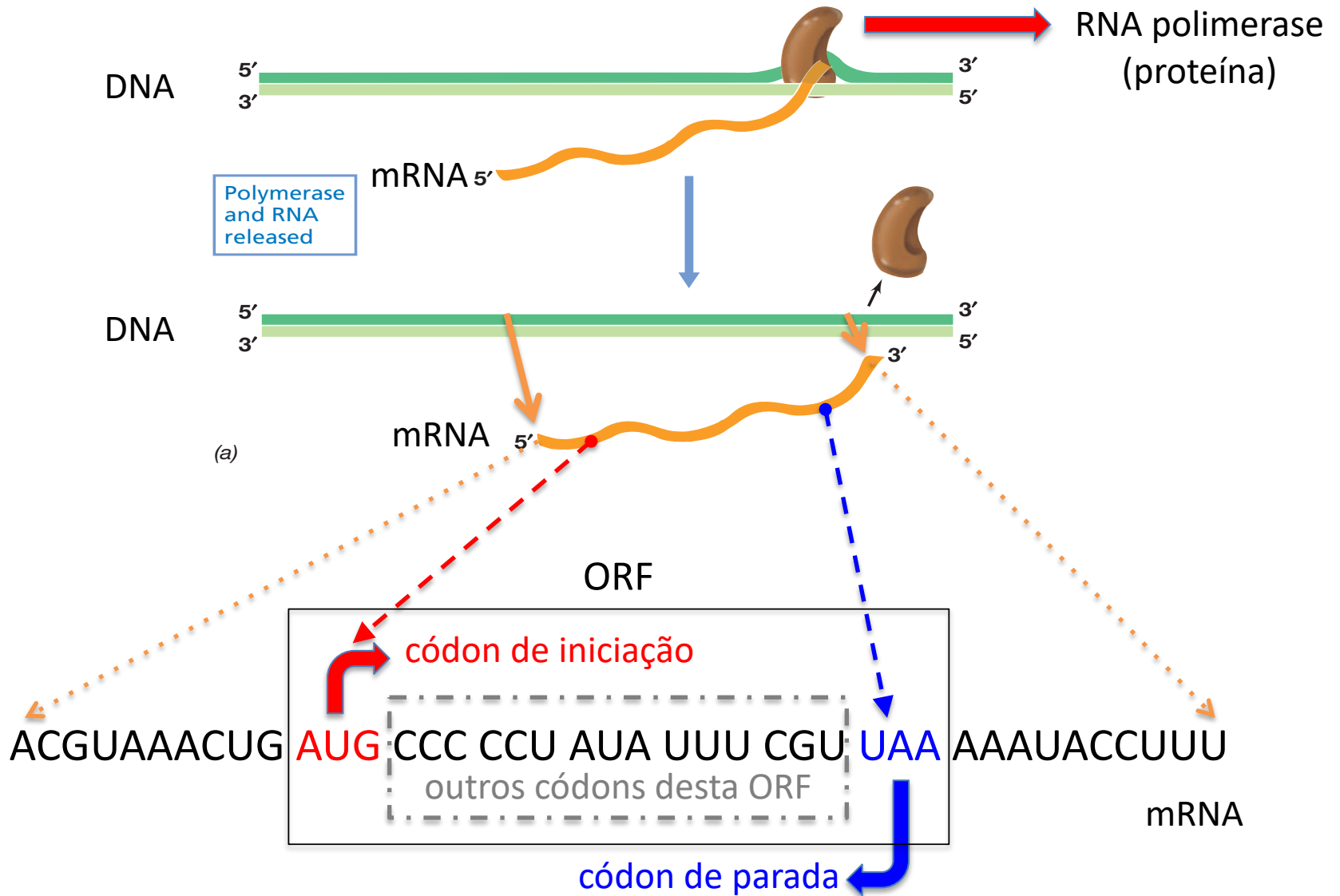


Síntese de RNA: início



- Os fatores sigma reconhecem sequências curtas mas bem definidas (**promotores**).
- A ligação do fator sigma com a região promotora recruta a RNA polimerase e ativa transcrição da região localizada à frente do promotor
- Diferentes fatores sigmas reconhecem diferentes assinaturas e, portanto, ativam apenas um conjunto específico de genes

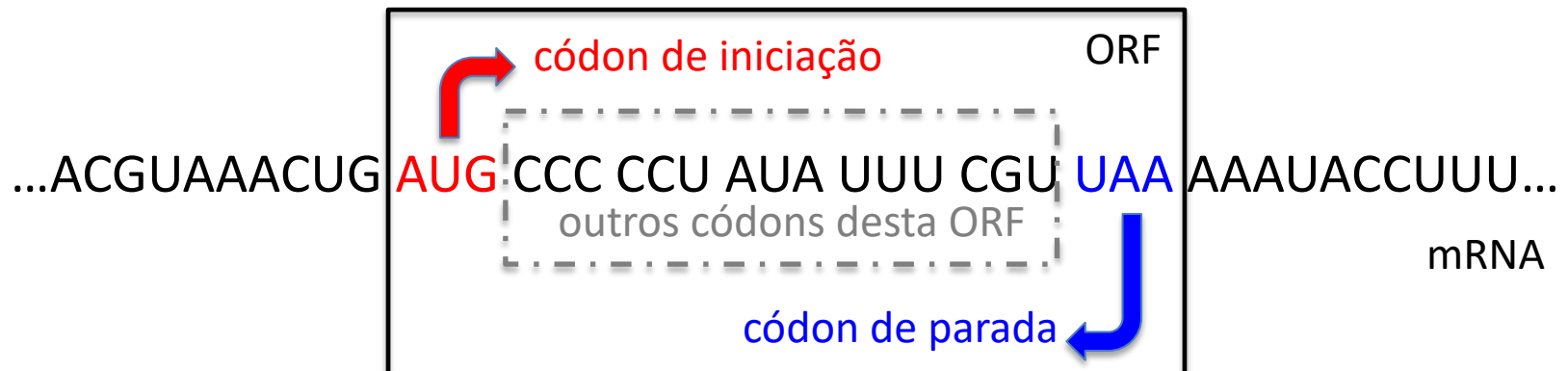
Fase aberta de leitura



Fase aberta de leitura

“Open reading frame” ou ORF

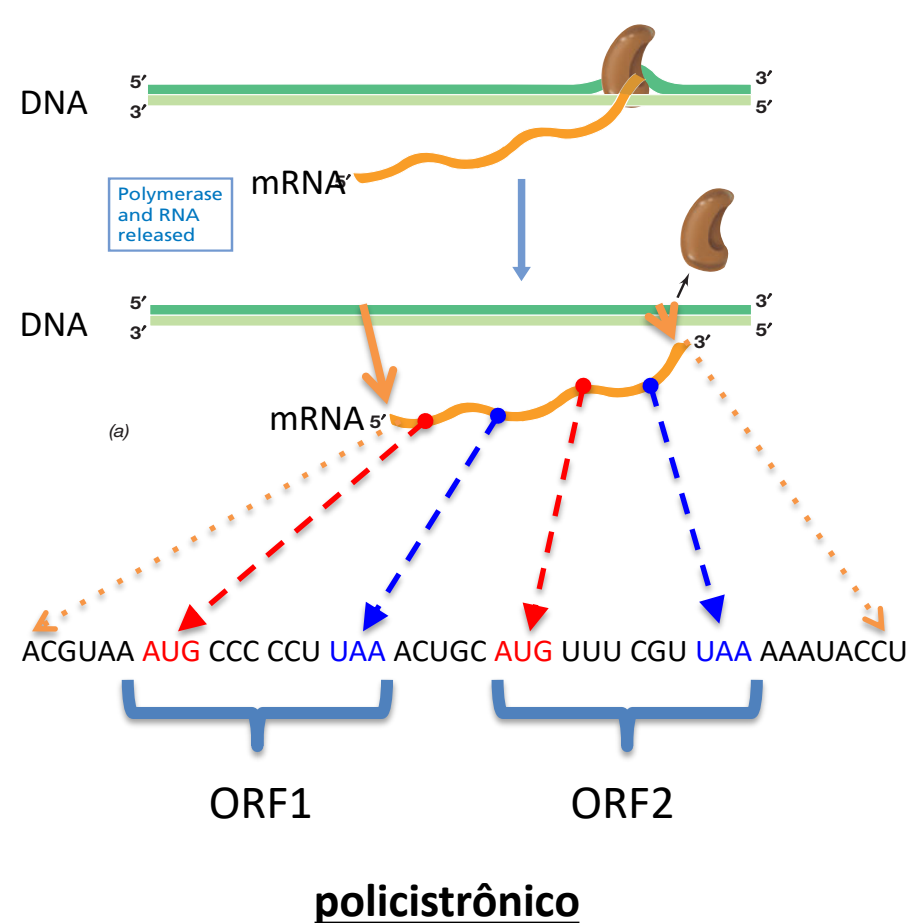
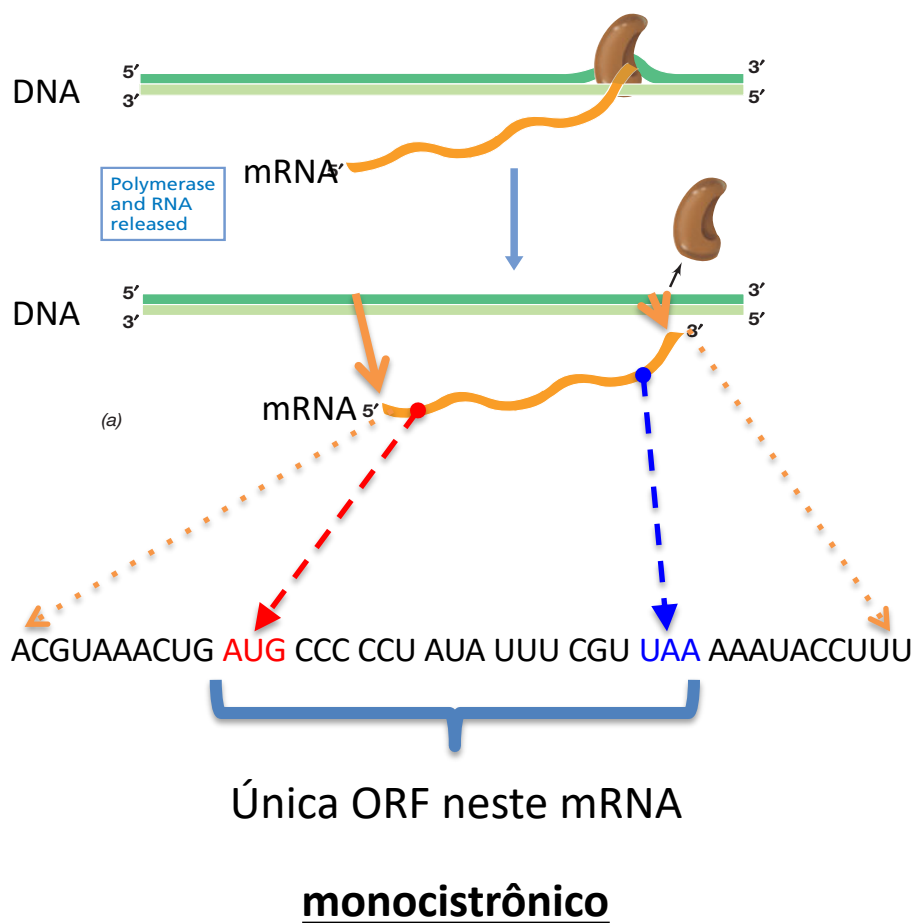
- **Definição:** uma fase aberta de leitura é a sequência de códons em uma molécula mRNA que determina os aminoácidos de uma única proteína.
- ORFs são compostas por um **códon de iniciação** e um **códon de parada**, e todos os códons intermediários (ver próximos slides).



- Com exceção do **códon de parada**, cada um dos códons de uma ORF corresponde, exatamente, a um aminoácido da proteína codificada

Genomas de procariotos: operons

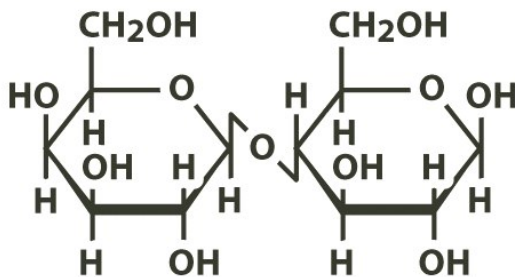
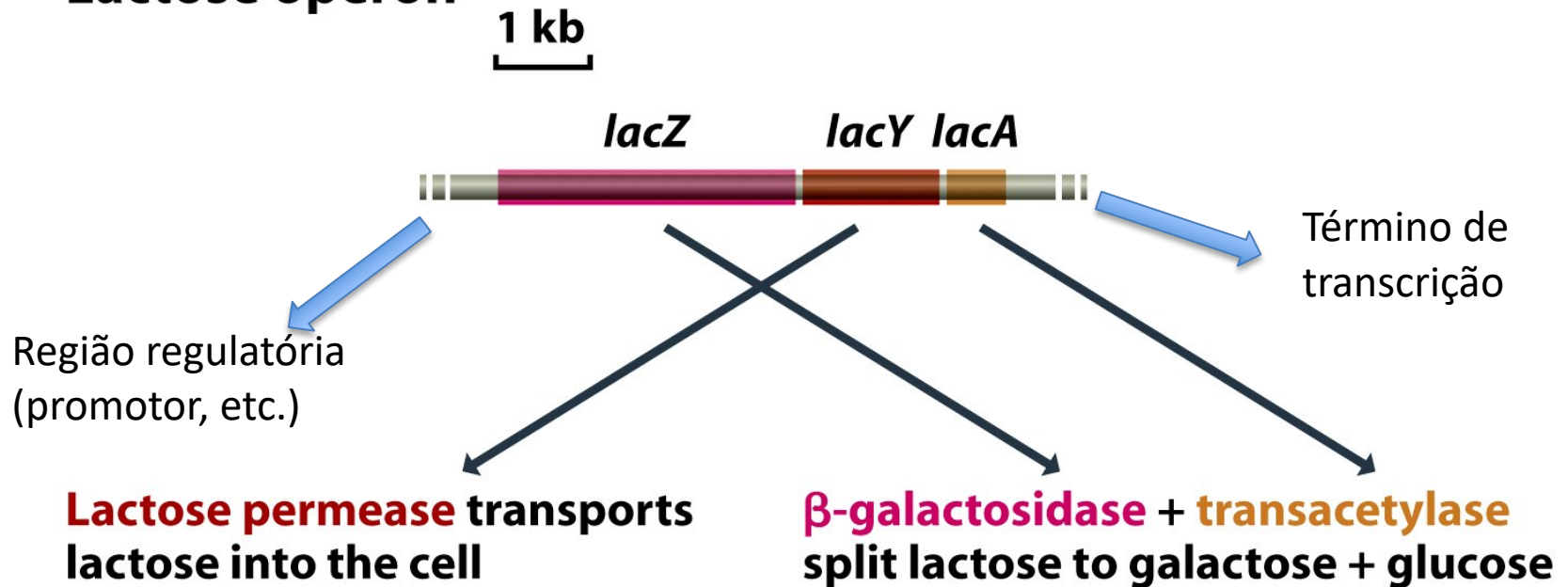
Em procariotos, uma única molécula de mRNA pode conter uma ou mais ORFs



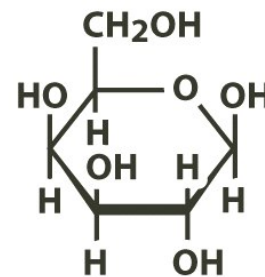
Definição: operon é um conjunto de genes vizinhos, codificantes ou não, transcritos em uma única molécula de mRNA policistônico.

Genomas de procariotos: operons

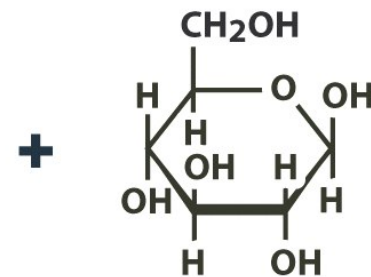
Lactose operon



Lactose



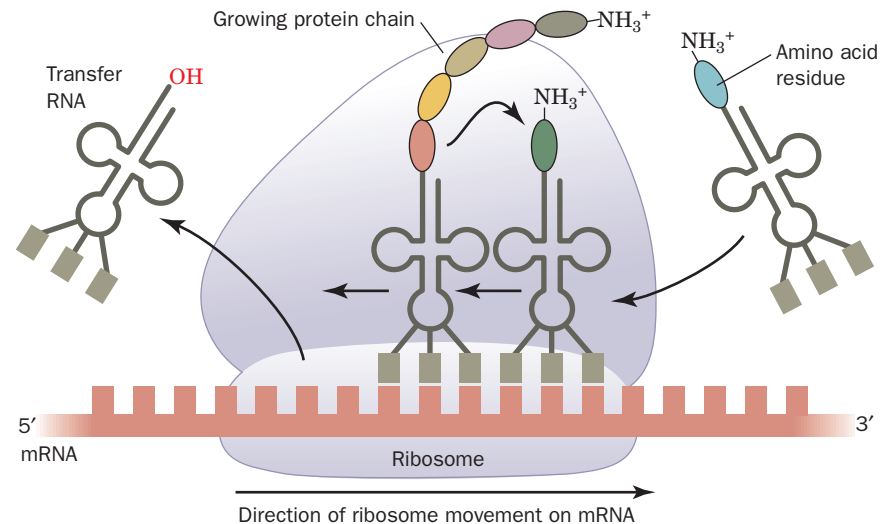
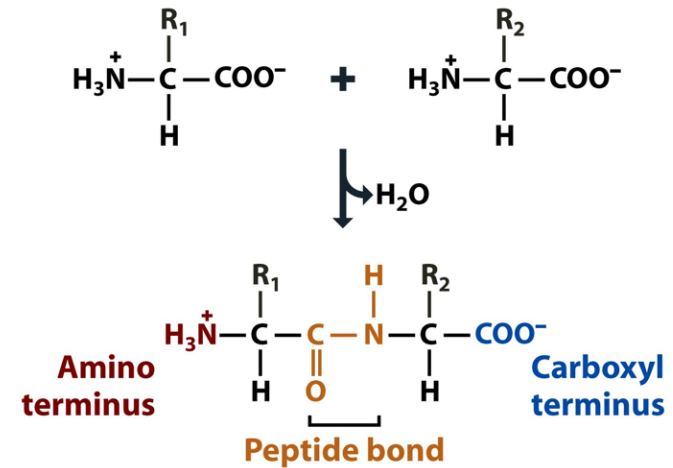
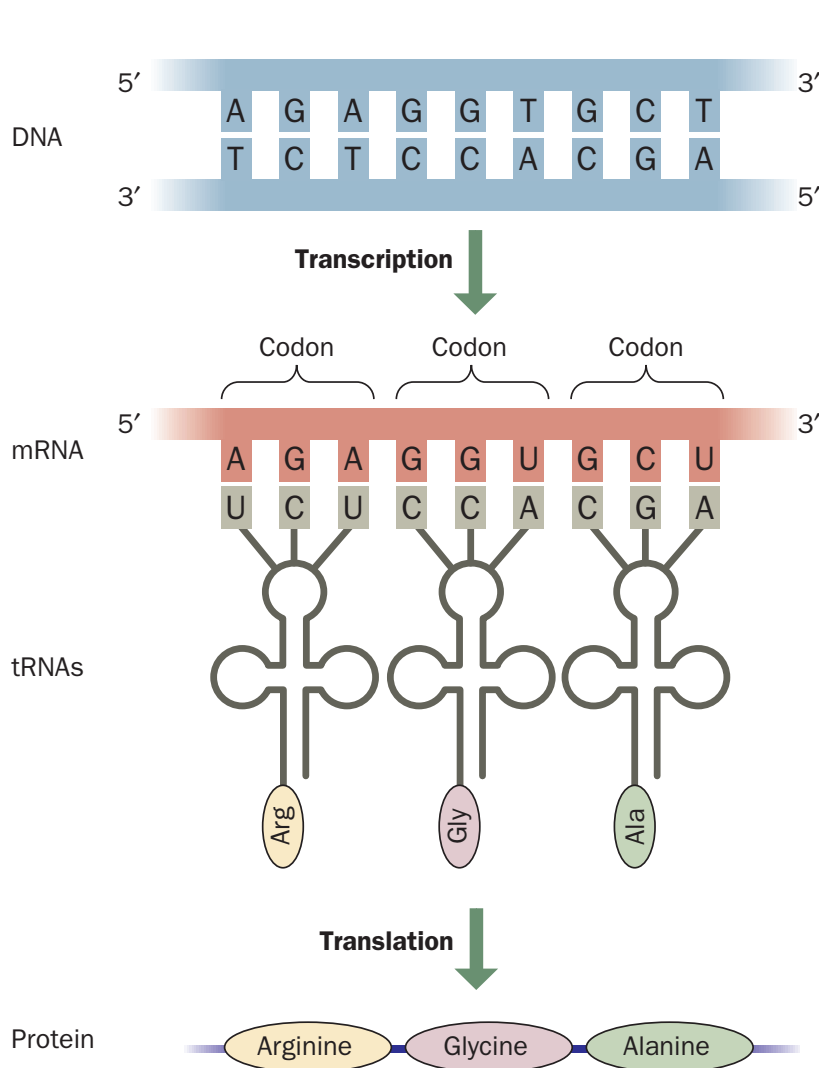
Galactose



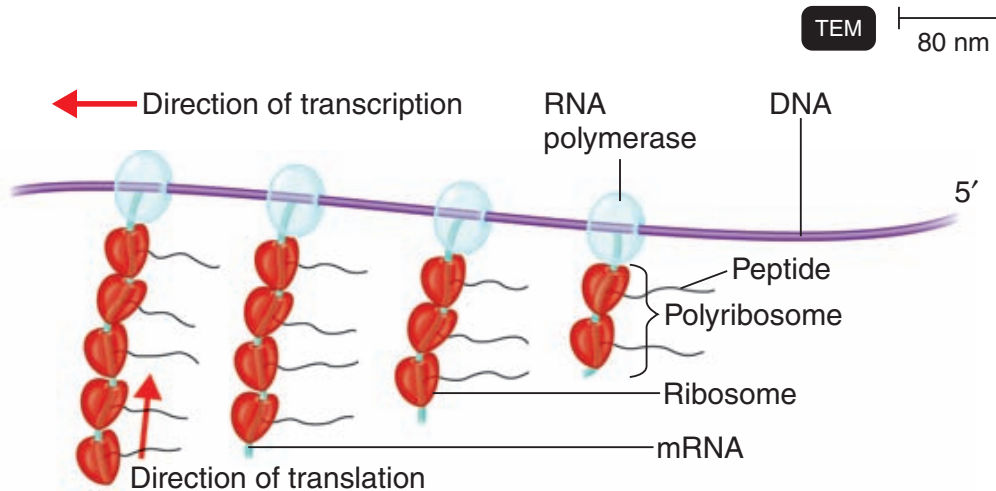
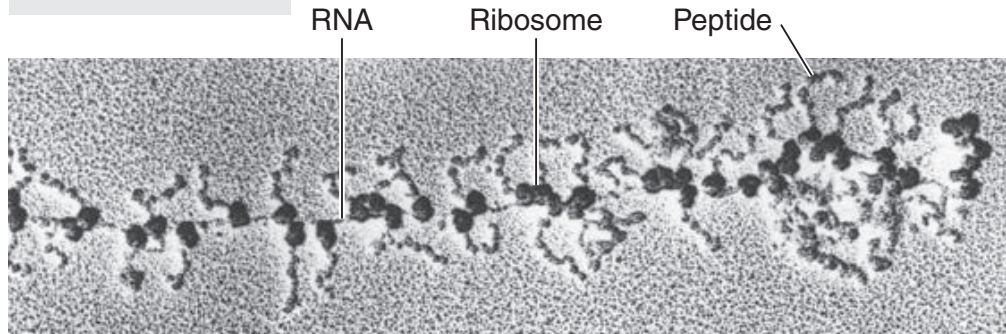
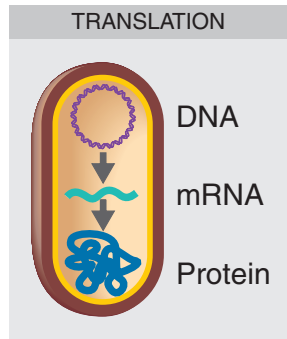
Glucose

Síntese de Proteínas: tradução

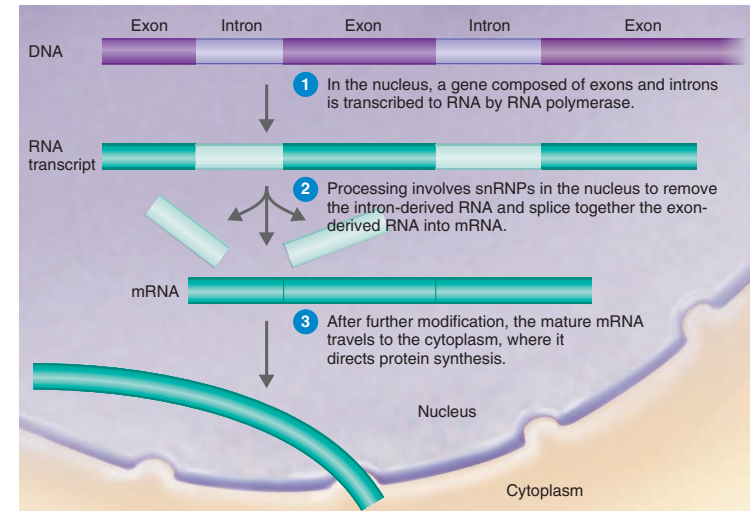
Tradução – síntese protéica



Tradução simultânea em procariotos



Eucariotos



Já em eucariotos, a transcrição ocorre no núcleo mas a tradução ocorre no citoplasma e etapas adicionais de processamento do mRNA (“splicing”) são executadas antes da tradução.

Algumas propriedades dos operons

- Genes de uma mesma via metabólica muitas vezes formam operons no genoma de bactérias
- Agregam genes com funções relacionadas em operons permite que um único promotor regule a expressão de vários genes, garantindo quantidades adequadas dos produtos gênicos (proteínas)
- Como não têm núcleo, as bactérias podem executar transcrição e tradução simultaneamente, no mesmo compartimento. Isso permite aos genes em operons acoplar os processos de transcrição, tradução e formação de complexos, resultando em maior eficiência

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.

Origens da diversidade genética

Mutação e evolução



Mutação



Evolução

Mutação

- Nomenclatura
- Técnicas de isolamento de mutantes
- Tipos de mutações

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

Vocabulário de genética bacteriana

Termo		Definição
Linhagem	Selvagem	Linhagem de referência, isolada e mantida em laboratório
	Mutante	Fenótipo diferente do selvagem parental

- **Mutante**

Linhagem geneticamente diferente da selvagem mas cuja origem pode ser traçada até uma linhagem de referência

- **Marcadores**

Um ou mais **genes** cujas mutações podem ser monitoradas por gerarem **fenótipos identificáveis**

Vocabulário de genética bacteriana

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

- **Mutações selecionáveis**

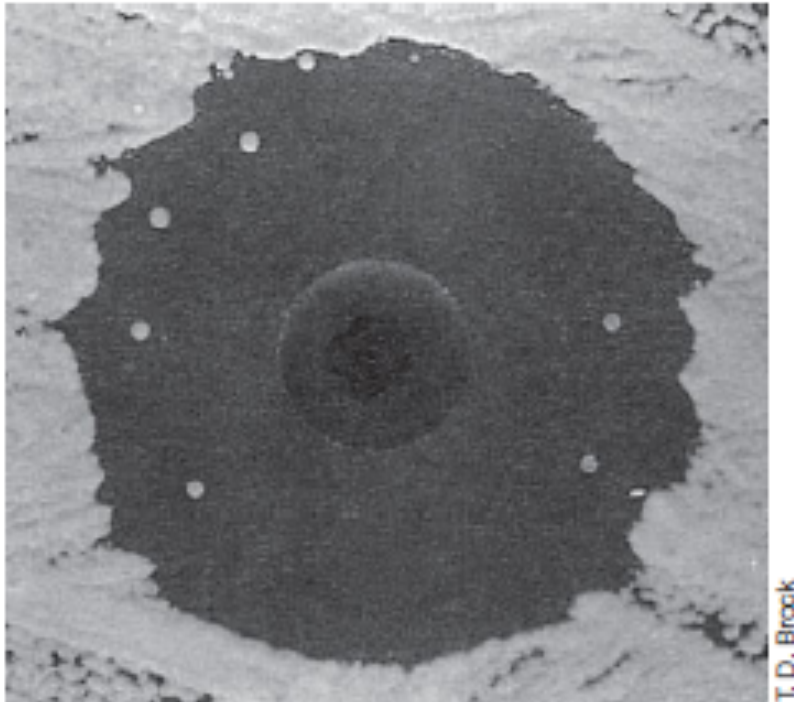
- Mutações com efeito direto na capacidade de sobrevivência do organismo nas condições testadas
- Exemplos: resistência a antibióticos, ganho/perda da capacidade de sintetizar metabólitos e nutrientes
- Organismos não-resistentes podem ser selecionado por meio com antibiótico

- **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

Isolamento de Mutantes

Mutante Seleccionável



Disco central com antibiótico

Mutante Não-Seleccionável

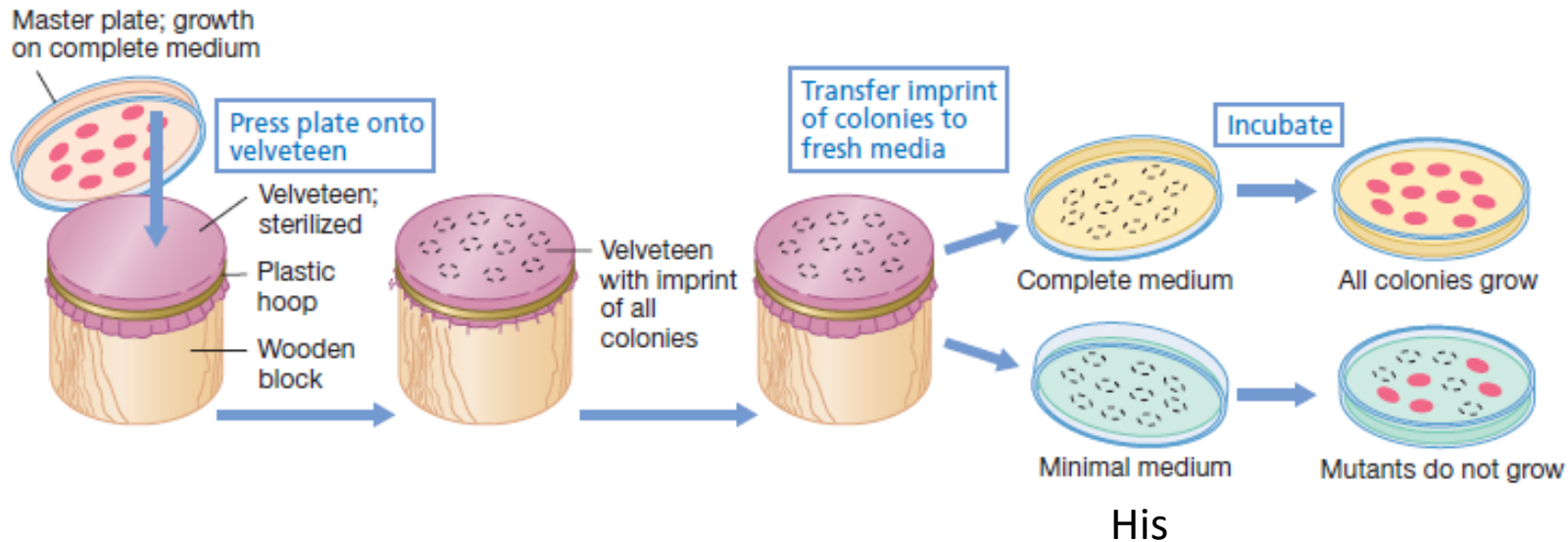


Fungos *Aspergillus nidulans*
Variação na pigmentação

Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Problema: selecionar uma **deficiência**

Técnica de Plaqueamento de Réplica



Problema: selecionar uma **deficiência**

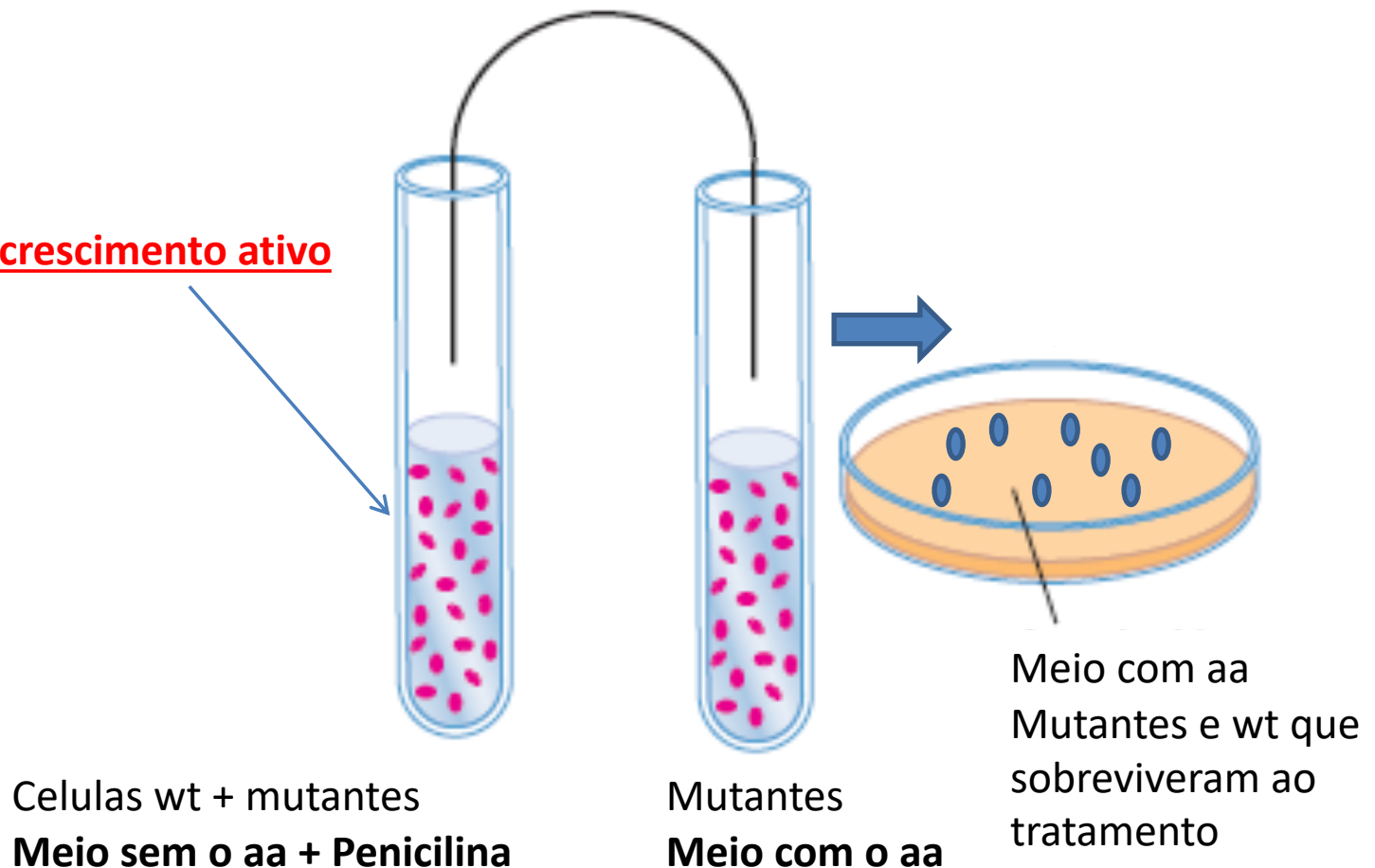
Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Problema: selecionar uma **deficiência**

Células Parentais (**wt**) são mortas porque podem crescer sem o aminoácido

Penicilina:

Mata células em crescimento ativo



Mutagênese

- **Espontâneas**

- Causadas por erros do sistema de replicação
- Muito raras nos genomas baseados em DNA
- Ocorrem com frequência 1000x maior em genomas de RNA

- **Induzidas**

- Provocadas por agentes químicos ou físicos externos à célula

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

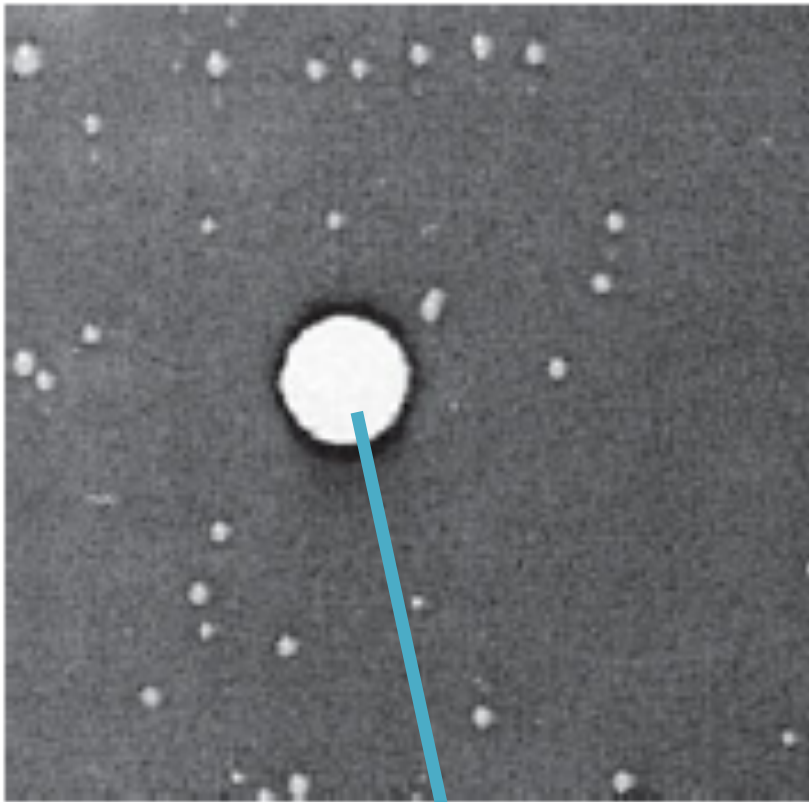
Ultravioleta	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção
Radiação ionizante (raios-X)	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção

Teste de Ames (Bruce Ames)

Avaliação da capacidade mutagênica de um composto com base no número de colônias que reverterem ao estado selvagem

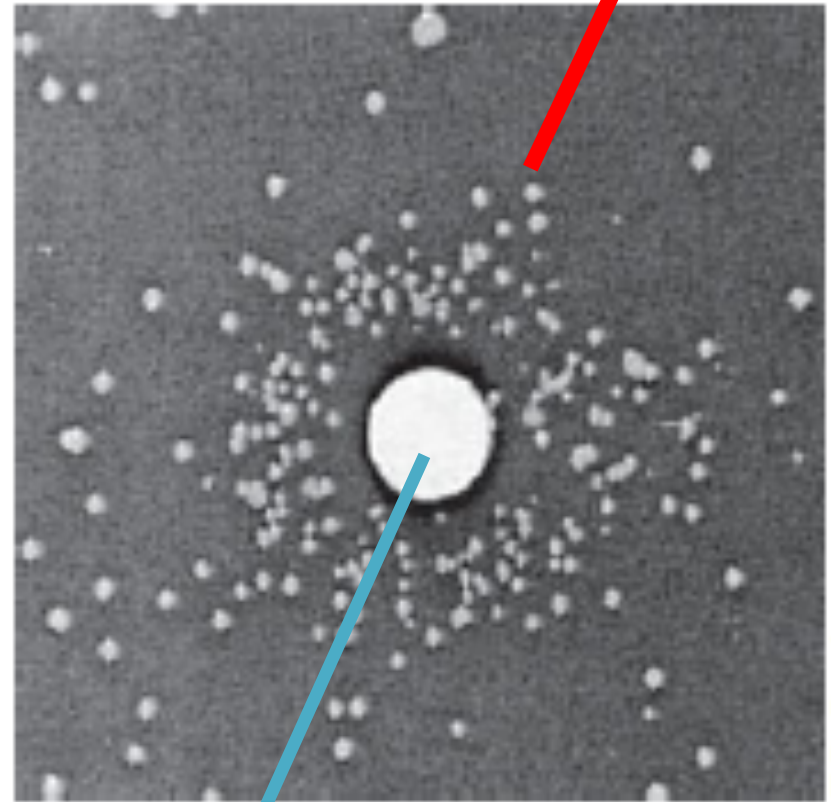
Mutantes

Meio His⁻



Controle negativo

Meio His⁻



Agente mutagênico

Tipos de mutações

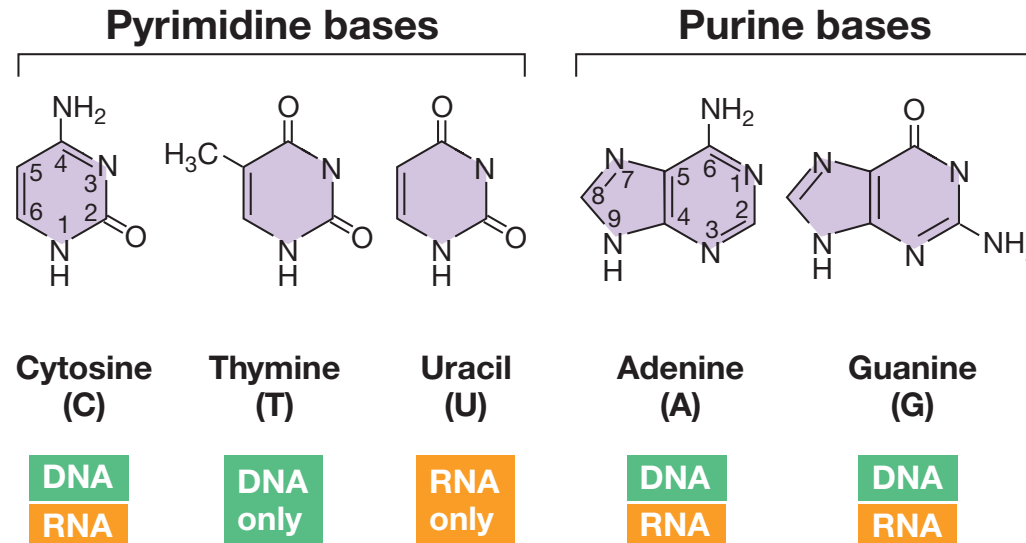
O efeito das mutações sobre regiões codificantes será determinado pela fase de leitura e pela estrutura do código genético

		Second Position				
		U	C	A	G	
First Position	U	UUU Phe / F	UCU Ser / S	UAU Tyr / Y	UGU Cys / C	U
		UUC		UAC	UGC	C
		UUA Leu / L		UAA STOP	UGA STOP	A
		UUG		UAG STOP	UGG Trp / W	G
	C	CUU Leu / L	CCU Pro / P	CAU His / H	CGU Arg / R	U
		CUC		CAC	CGC	C
		CUA		CAA Gln / Q	CGA	A
		CUG		CAG	CGG	G
	A	AUU Ile / I	ACU Thr / T	AAU Asn / N	AGU Ser / S	U
		AUC		AAC	AGC	C
		AUA		AAA Lys / K	AGA Arg / R	A
		AUG Met / M		AAG	AGG	G
	G	GUU Val / V	GCU Ala / A	GAU Asp / D	GGU Gly / G	U
		GUC		GAC	GGC	C
		GUA		GAA Glu / E	GGA	A
		GUG		GAG	GGG	G

Tipos de mutação: mutações pontuais

Mutações pontuais correspondem à **troca de uma única base no genoma**

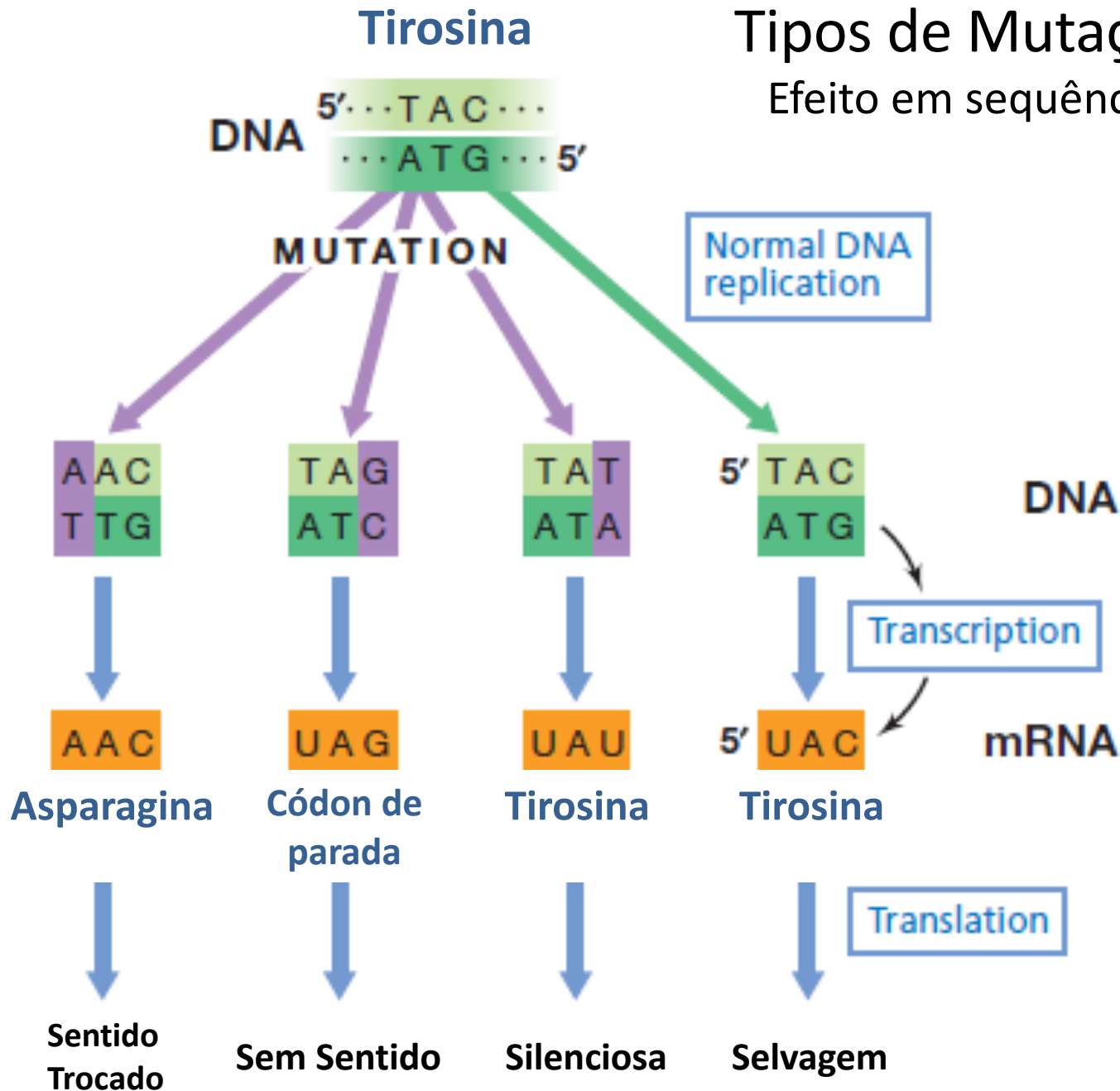
São também conhecidas como polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)



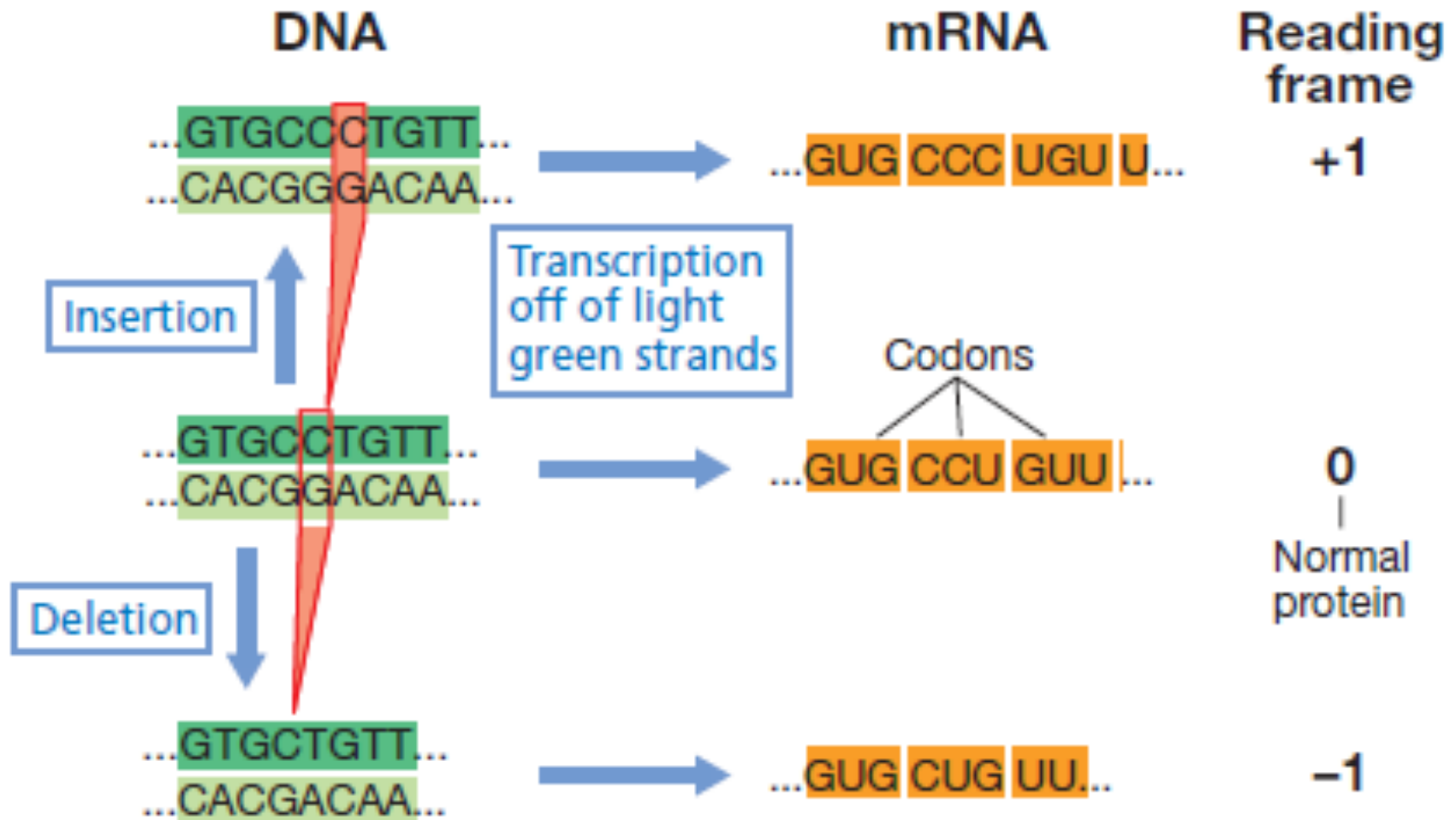
Transição		Transversão	
Purina – Purina	Pyrimidina – Pyrimidina	Purina – Pyrimidina	Pyrimidina – Purina
A → G	C → T	A → T	T → A
G → A	T → C	A → C	T → G
		G → T	C → A
		G → C	C → G

Tipos de Mutações Pontuais

Efeito em sequências codificantes

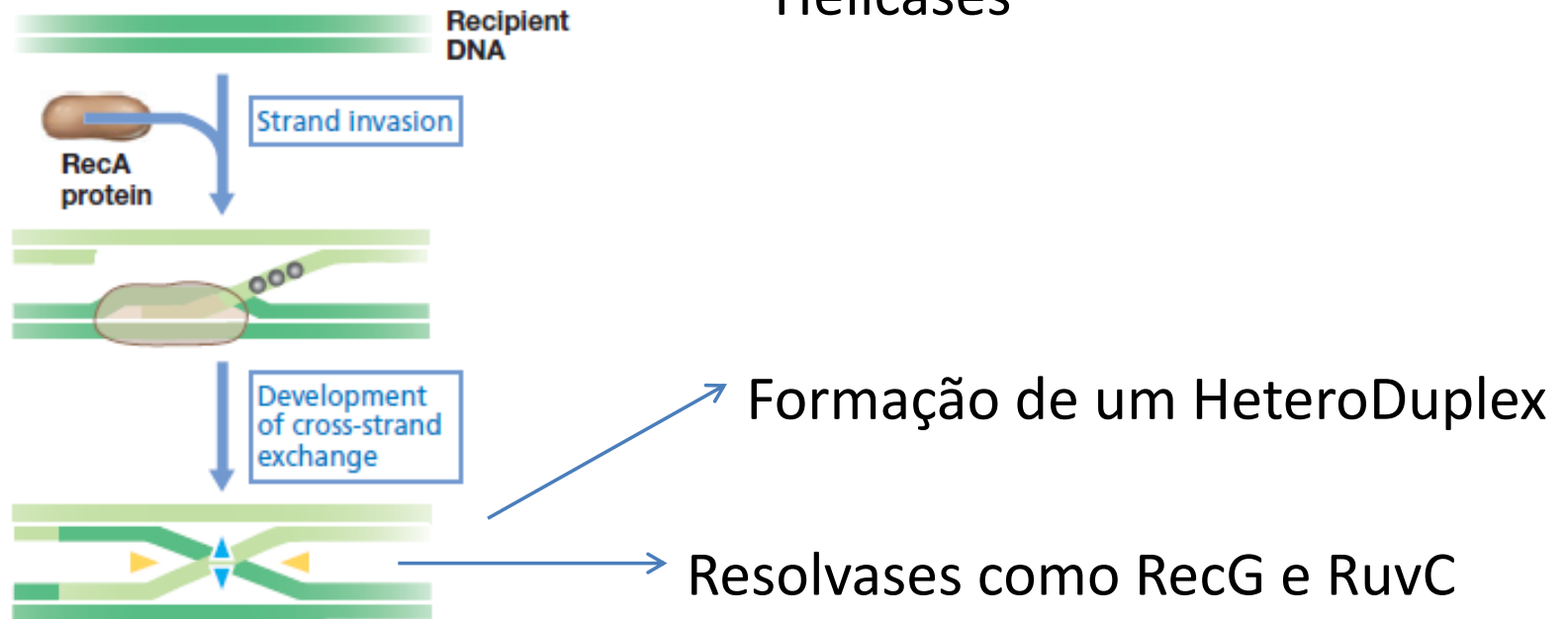
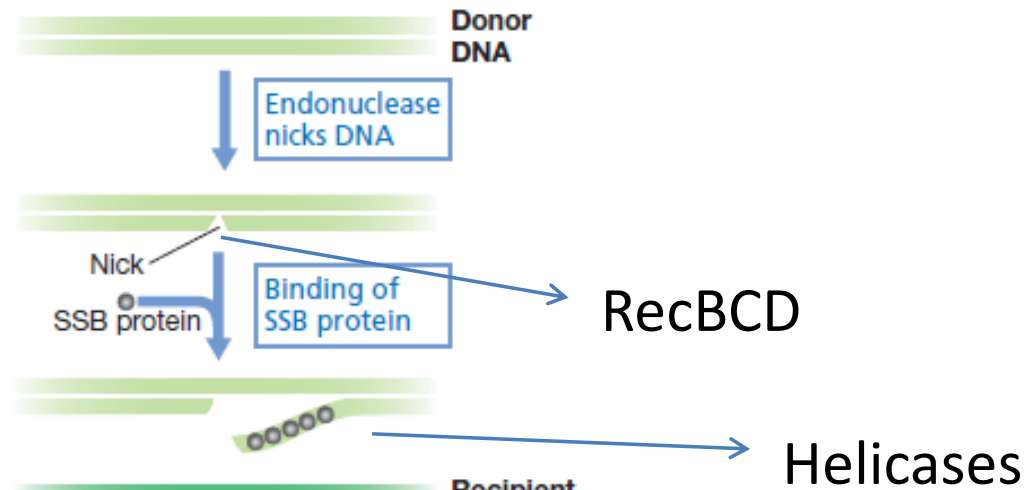


Inserção ou Deleção de Uma base



Recombinação e Transposição

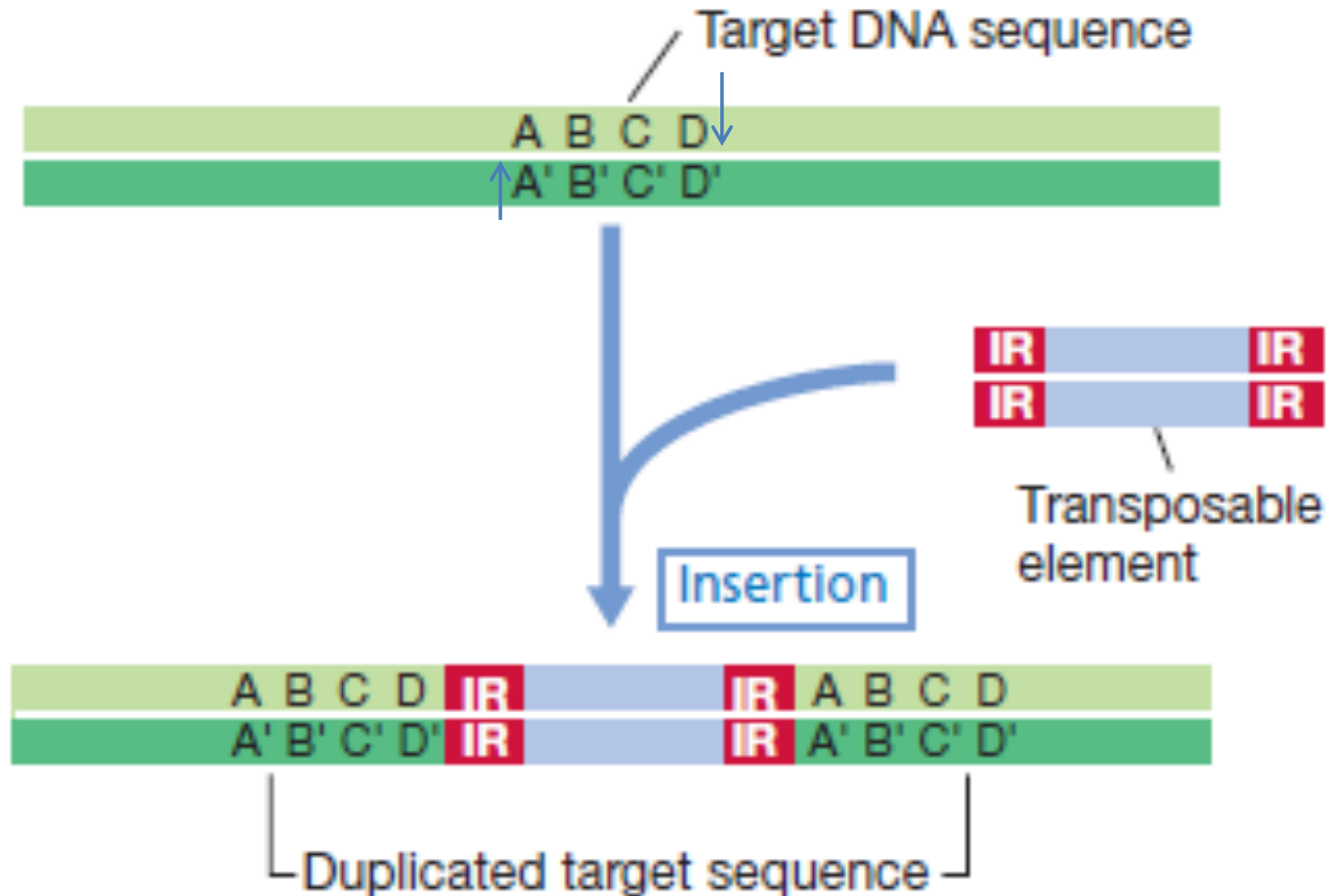
Recombinação homóloga



Transposição

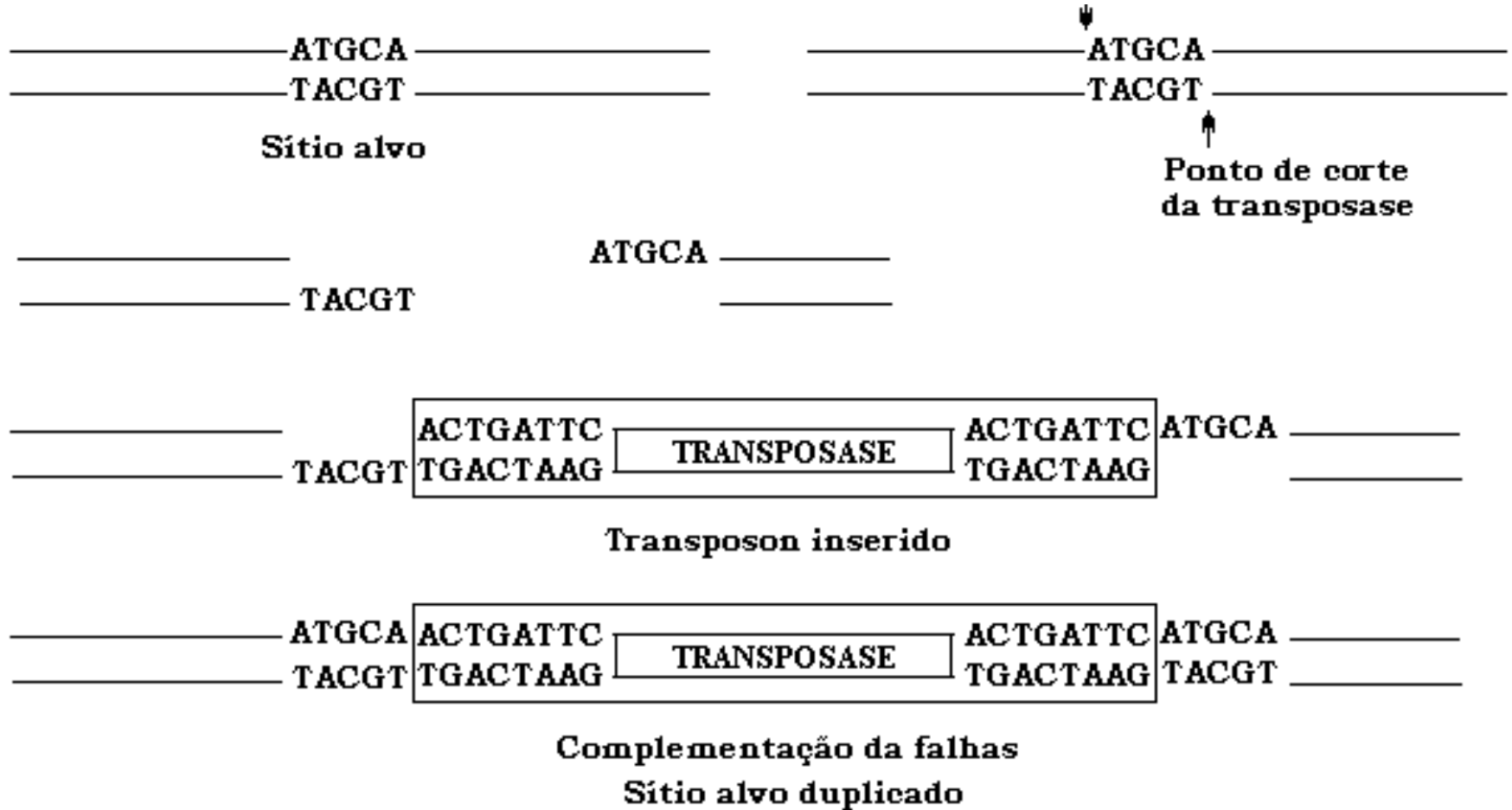
- Mobilização ou duplicação de porções do genoma mediadas por enzimas especializadas (transposases)
- Associadas a elementos genômicos mais ou menos autônomos, chamados elementos móveis

Transposição

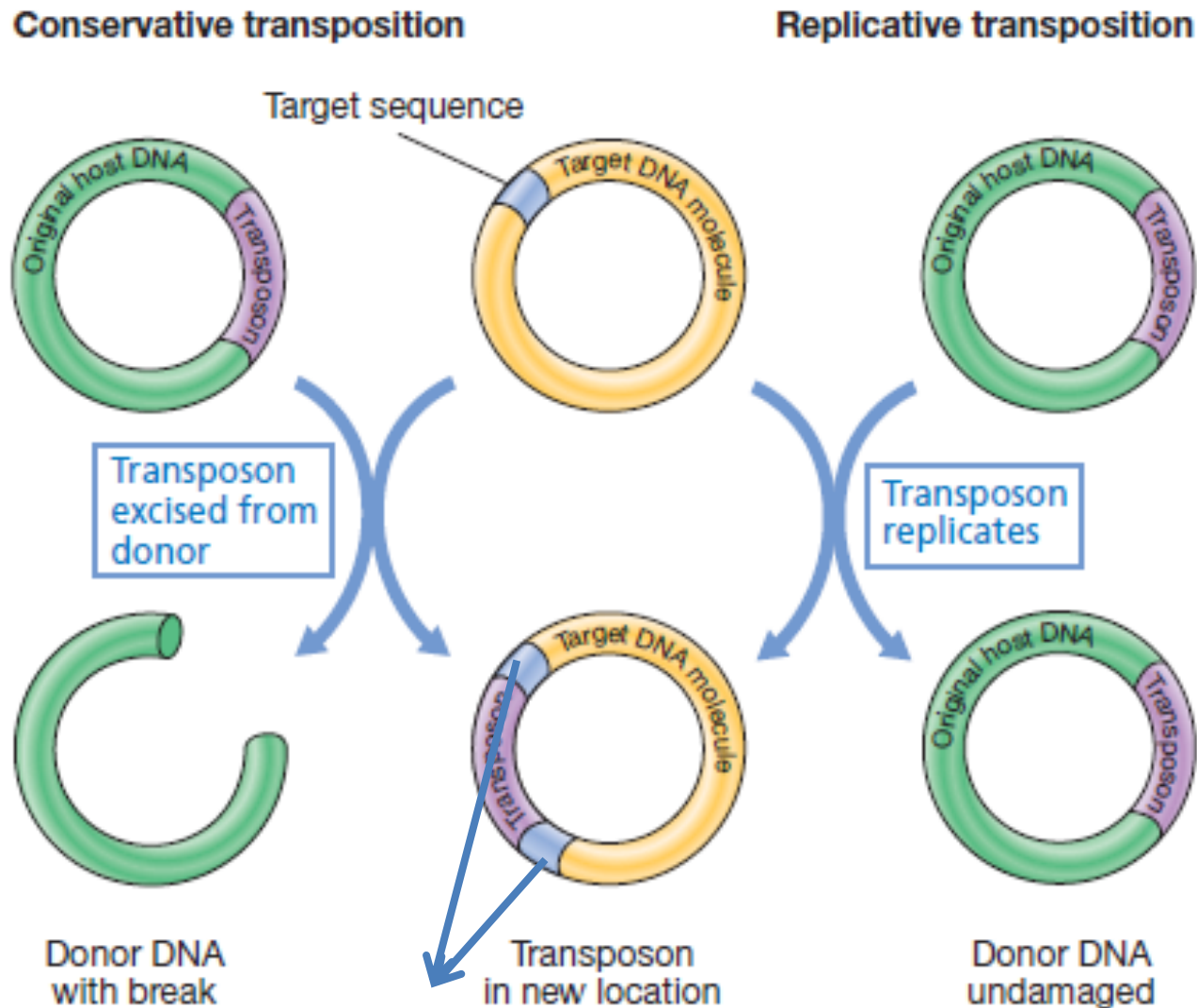


Inserção de um transposon

É um exemplo de recombinação sítio específica



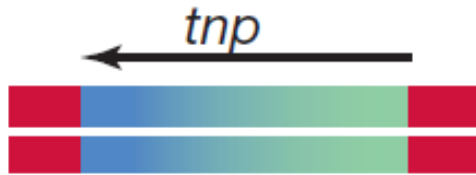
Mecanismo de Transposição



Elementos Transponíveis

IS: Sequência de Inserção

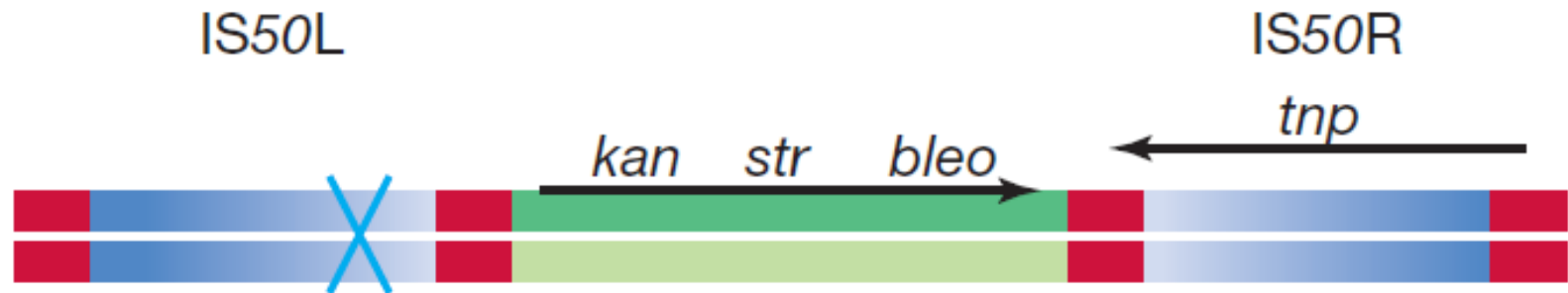
IS2



- Elemento transponível mais simples
- Repetições invertidas (IR) de 10-50pb
- Possui apenas um gene (transposase)

Transposon

Tn5



Mutação sem sentido na primeira transposase impede transposição independente

Permuta Genética em Procaríotos

Três Mecanismos de Troca Genética

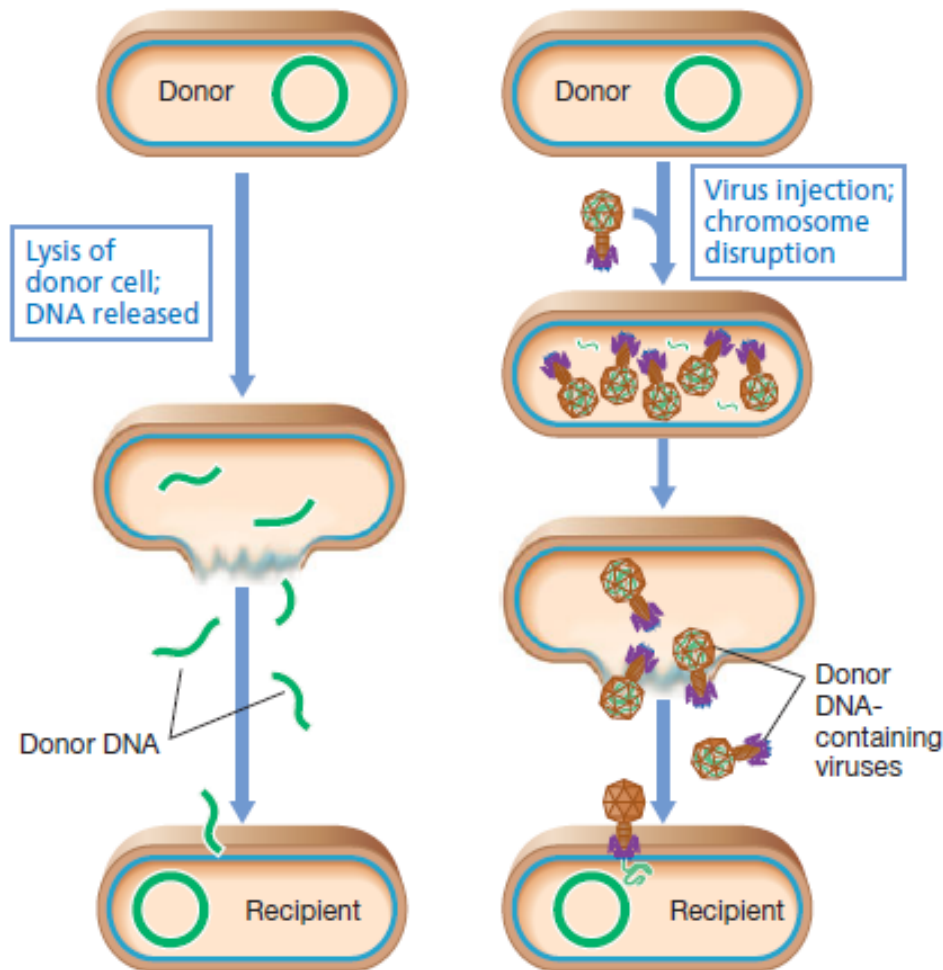
- Transformação
 - Competência
- Transdução
 - Generalizada
 - Específica
- Conjugação
 - Plasmídeos
 - Cepas Hfr

Transferência Horizontal de DNA

Transformação

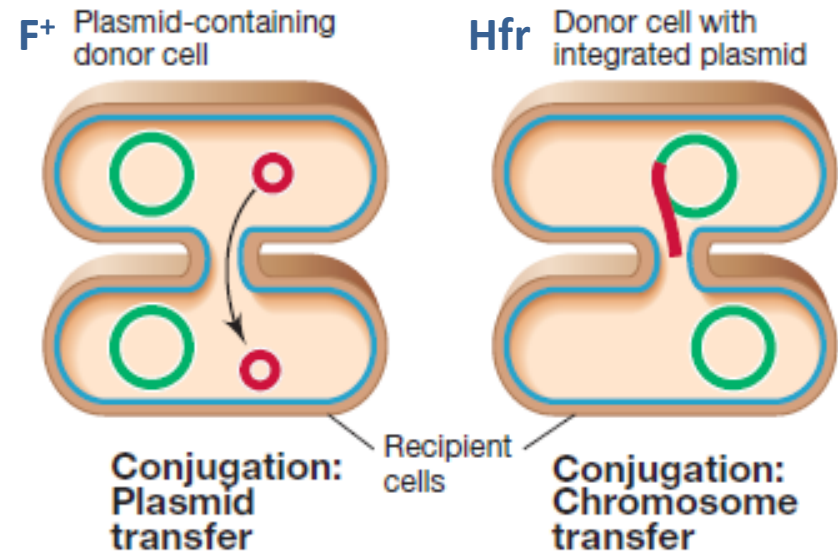
Transdução*

Conjugação



DNA livre

Mediado por vírus

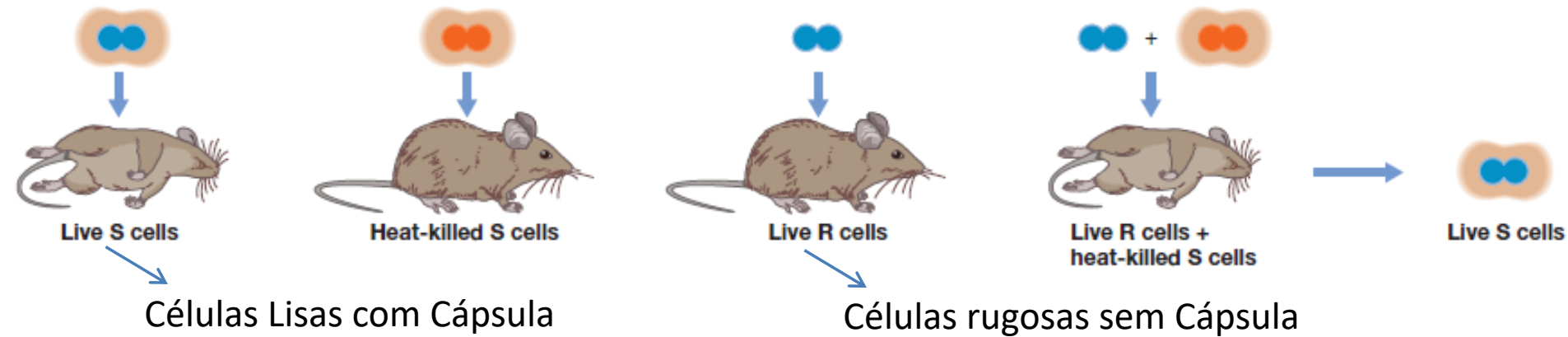


- mediado por plasmídeos
- Exige contato célula-célula
- Depende de pilus

* transdução = transfecção

Experimento de Griffith com *Streptococcus pneumoniae*

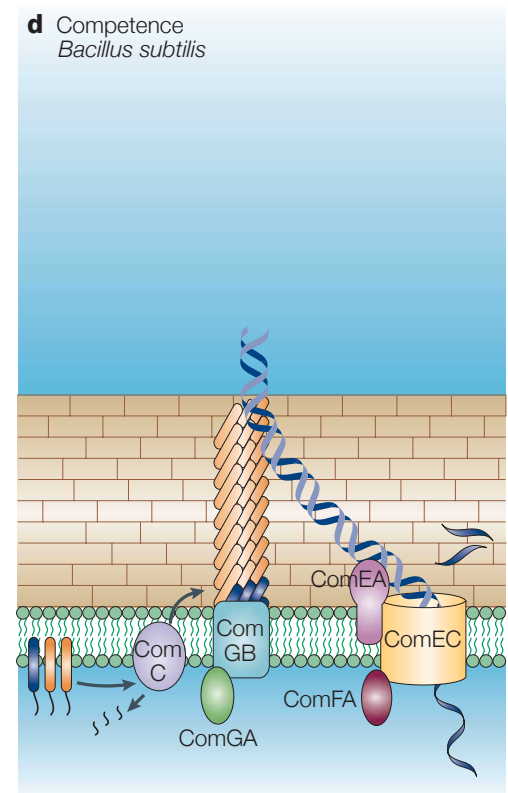
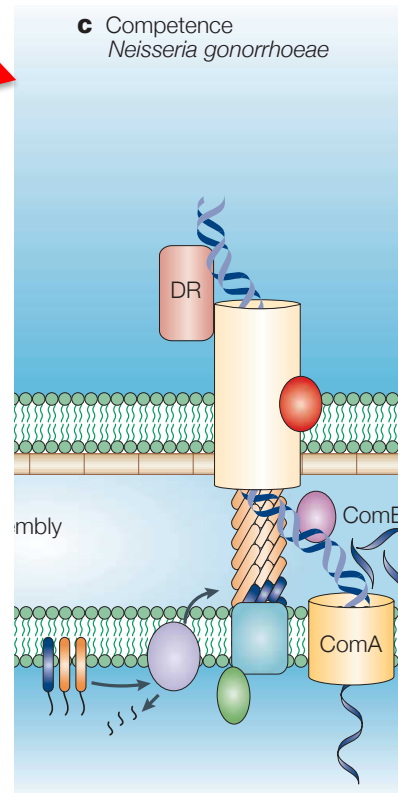
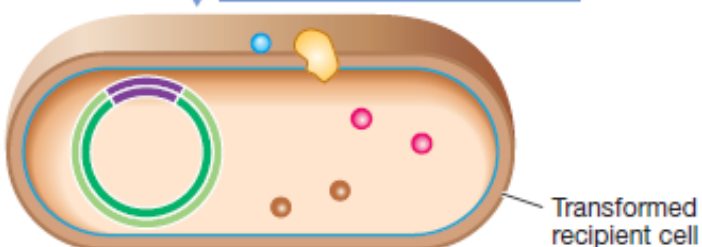
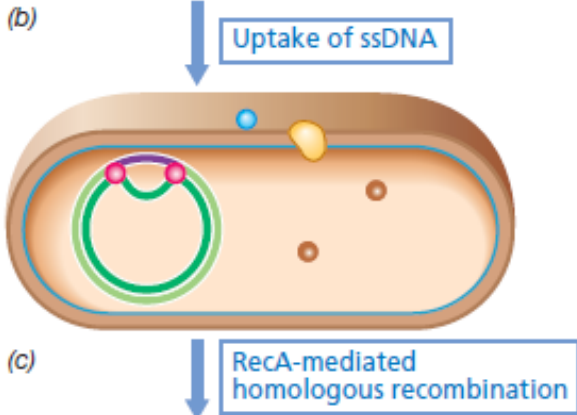
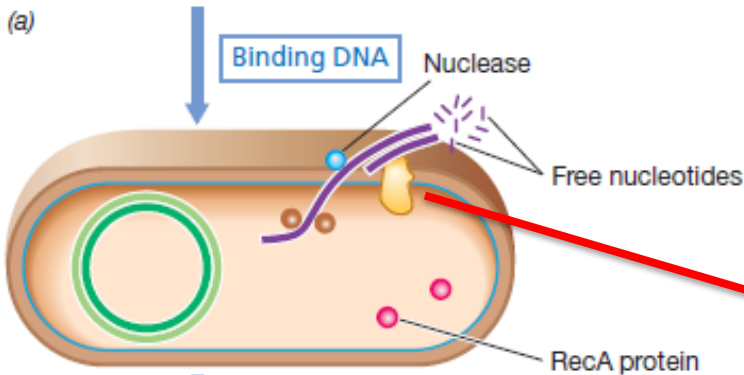
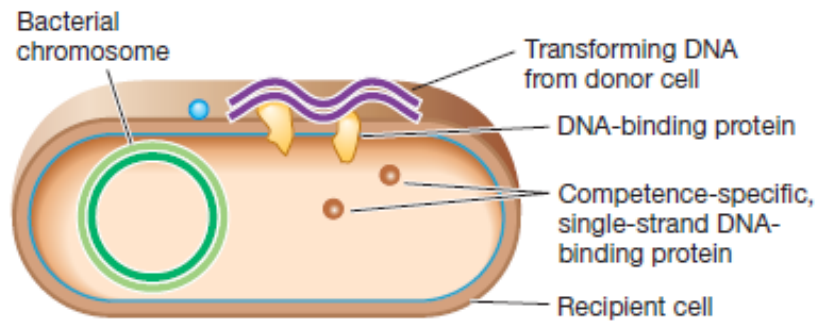
Pneumonia Fatal



- 1920 : Primeira evidência de transformação Frederick Griffith
- Preparou o palco para a descoberta do DNA
- 1940: Oswald T. Avery mostrou que o agente transformante era o DNA
- 1953: James Watson e Francis Crick e a estrutura do DNA

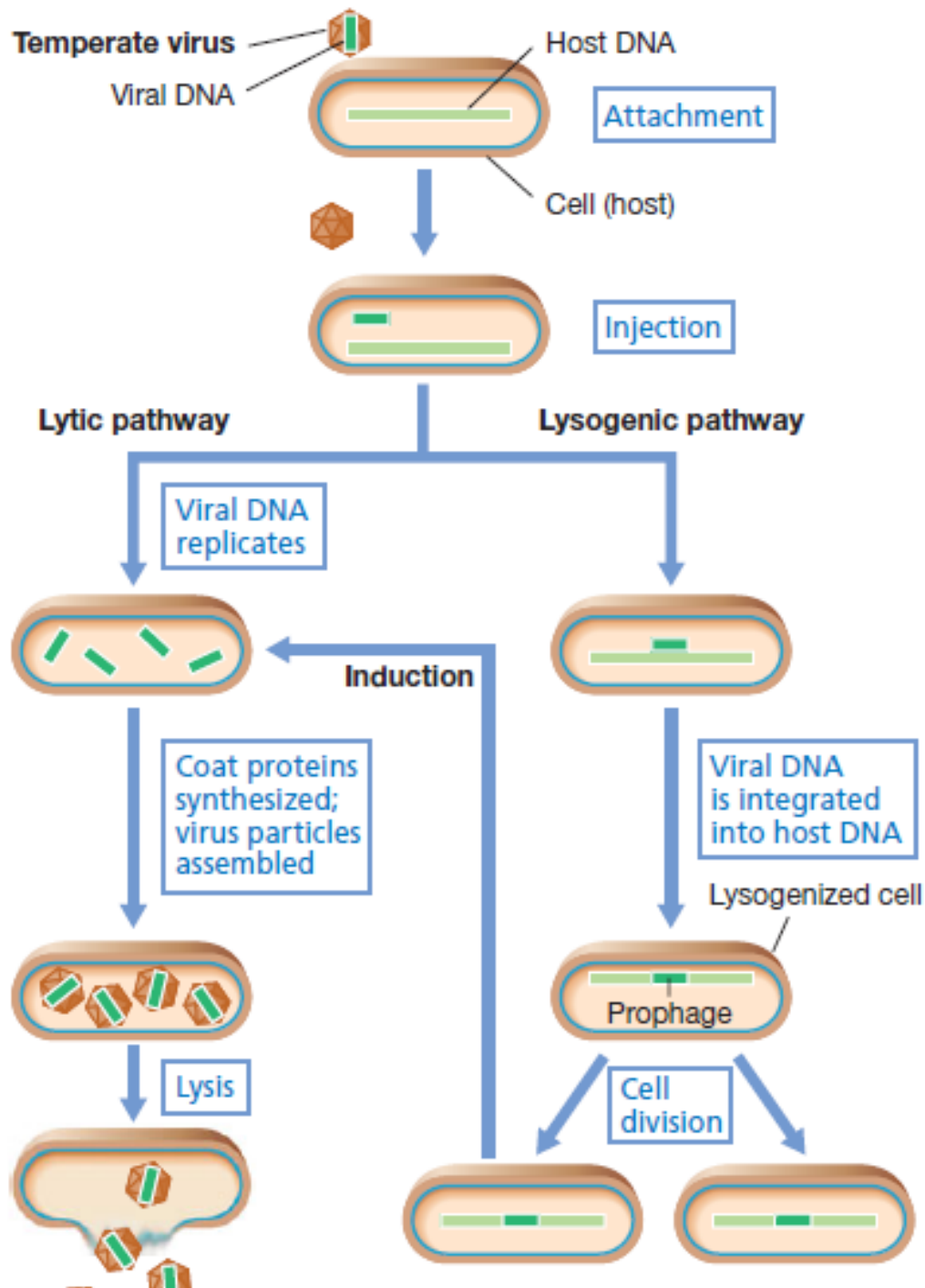
Transformação

- 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

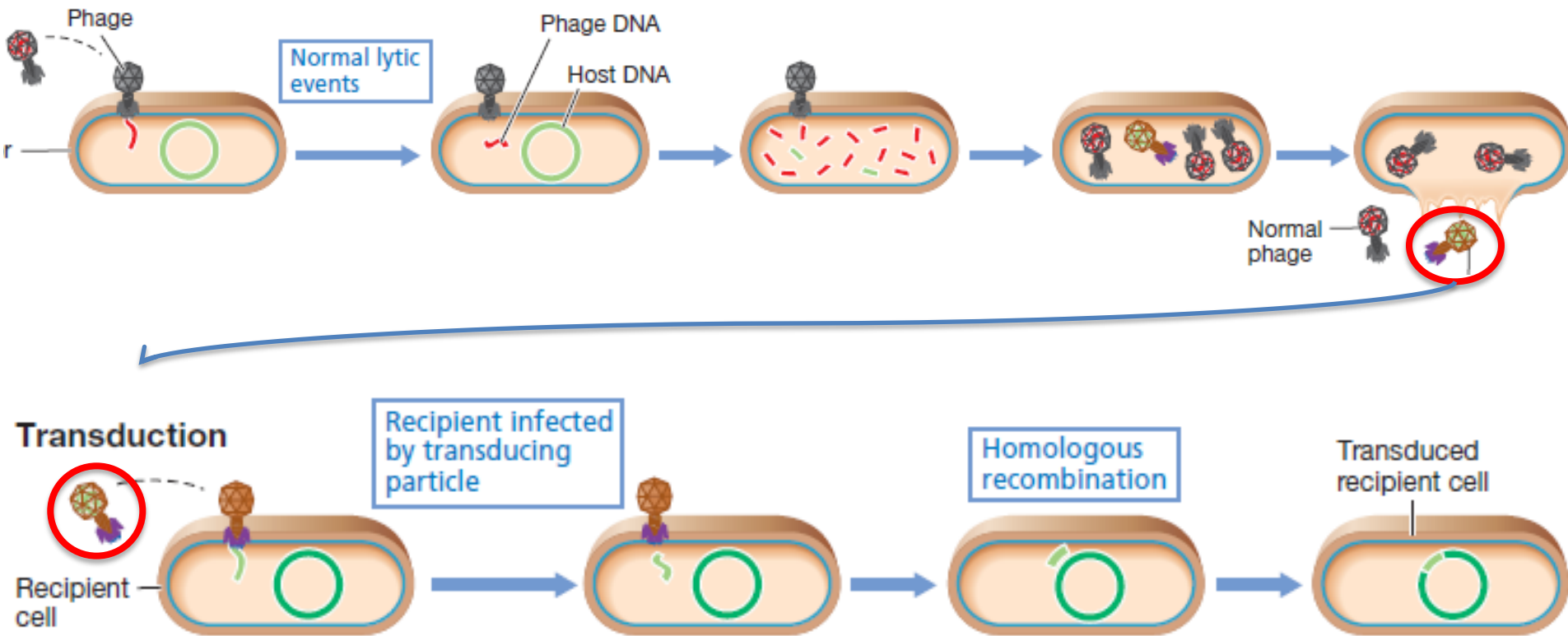


Transdução

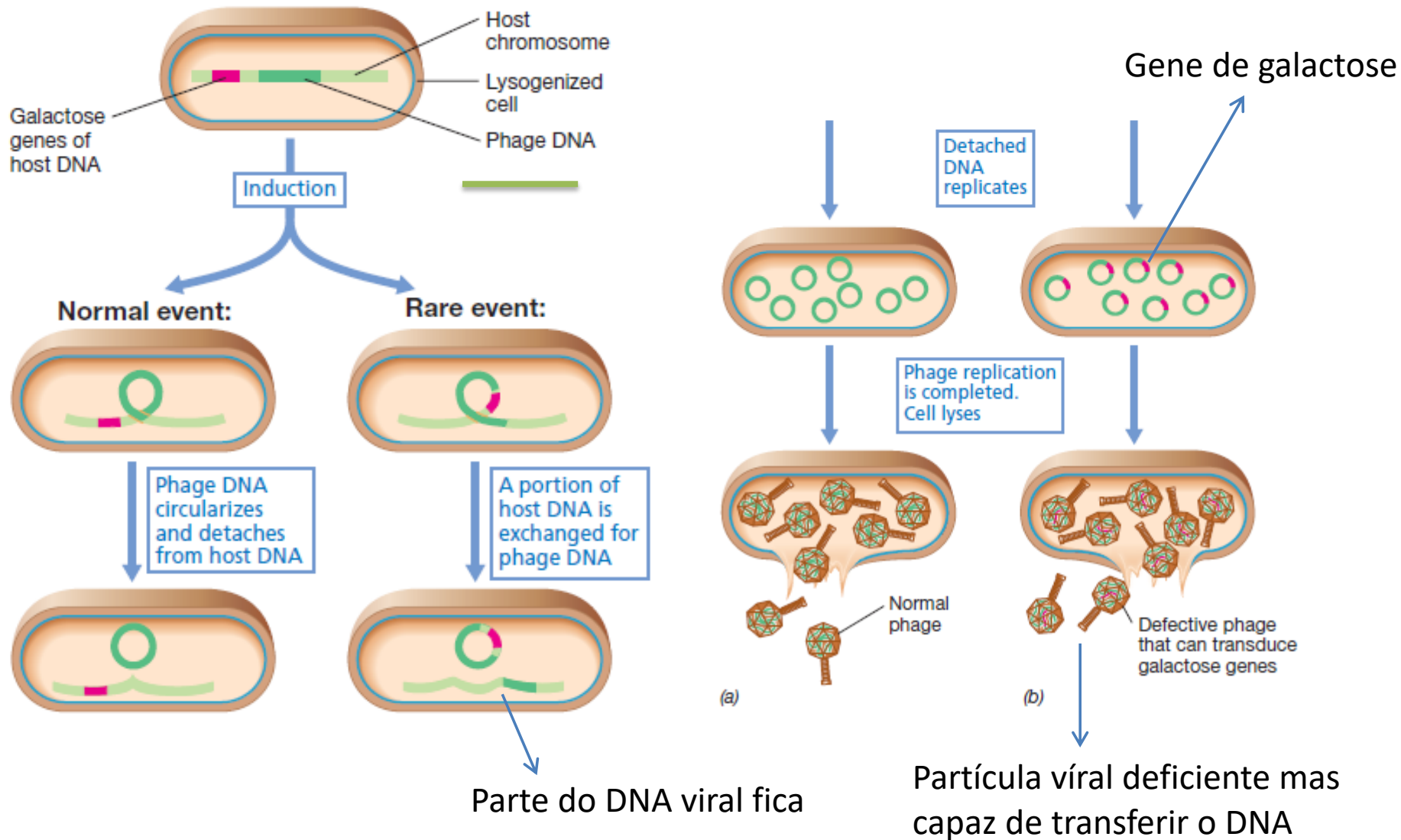
Ciclo Lítico
e
Via lisogênica

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

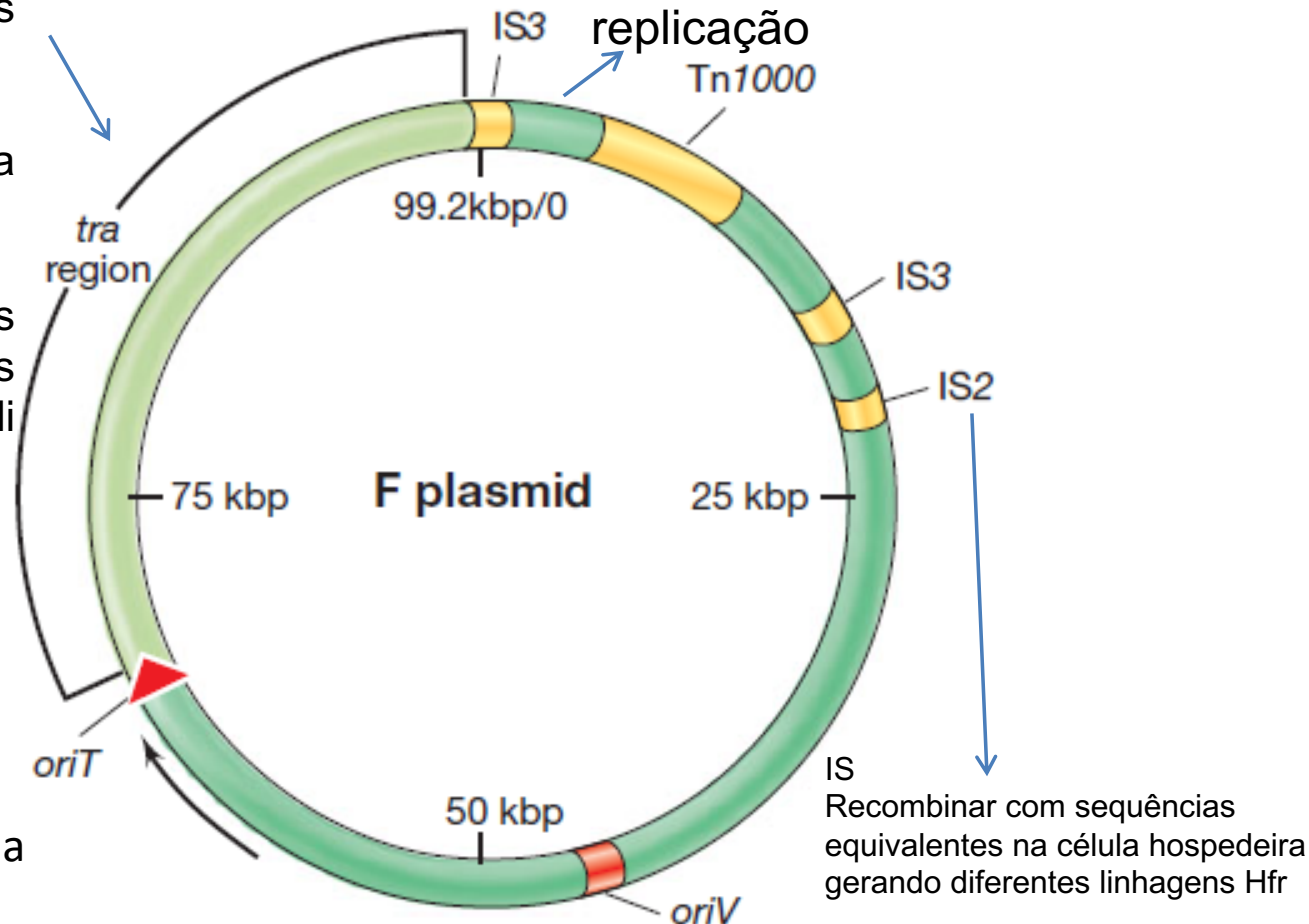
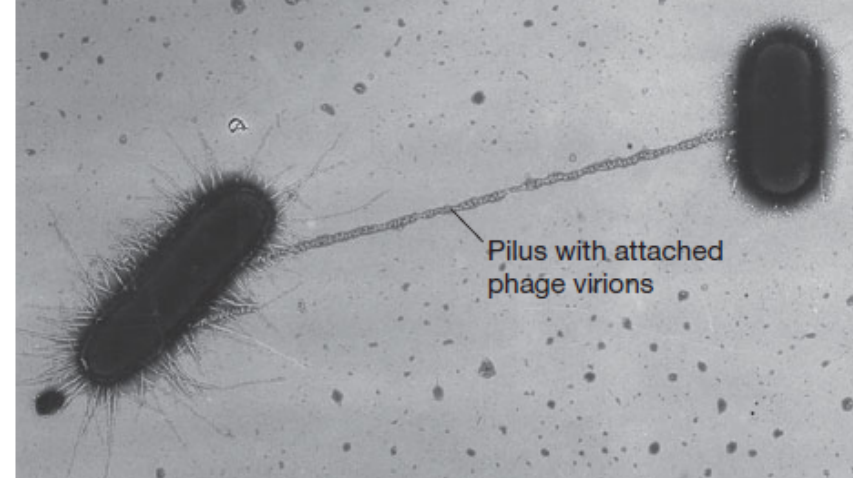
- Conjugação: Transferência genética entre duas células que envolve contato
- Envolve: célula doadora e receptora
- Mecanismo de transferência pode exibir diferenças dependendo do plasmídeo envolvido
- A maioria das bactérias Gram-negativas usam um mecanismo semelhante ao do plasmídeo F
- Normalmente, 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

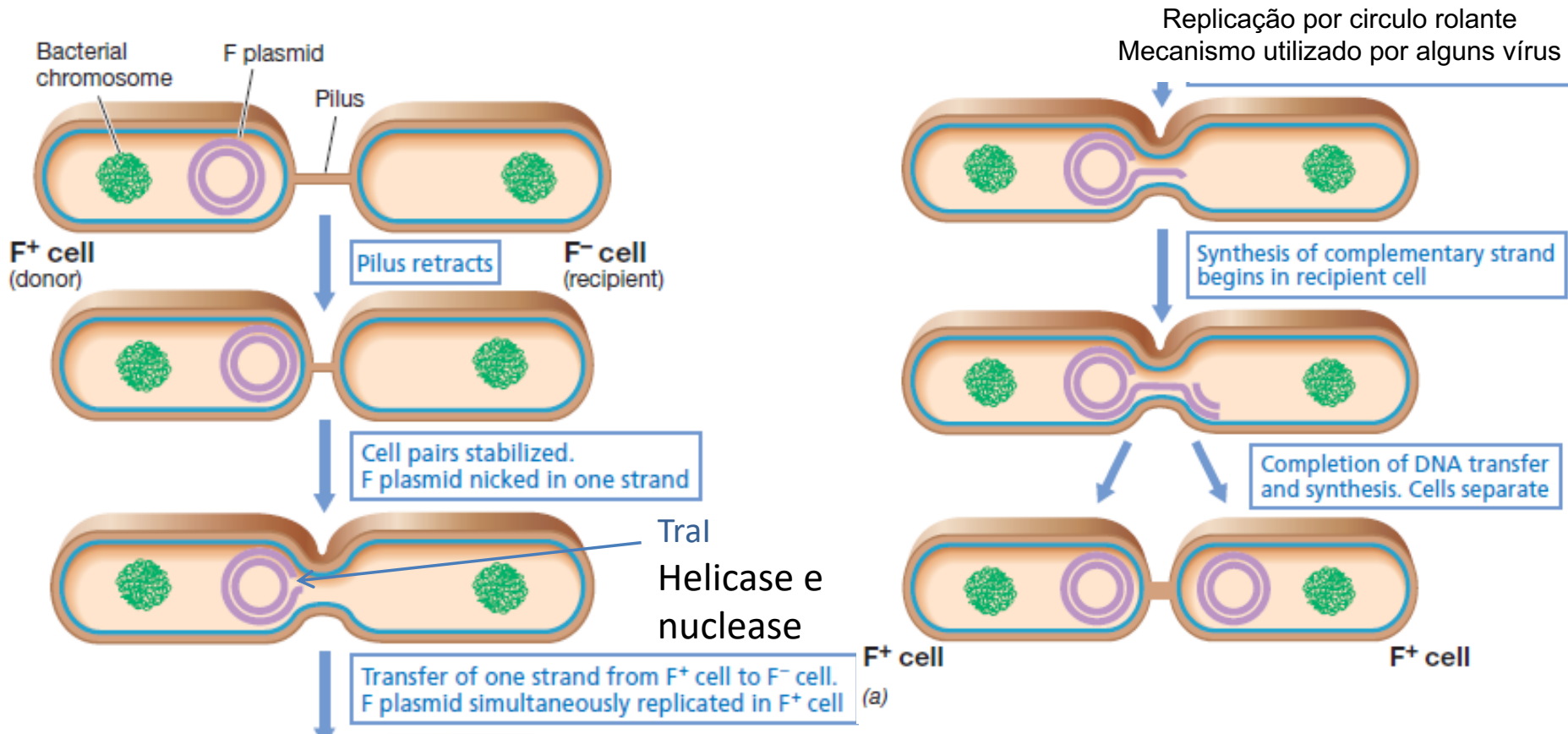
Genes envolvidos na formação do par conjugante

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



Transferência do DNA Plasmidial por Conjugação

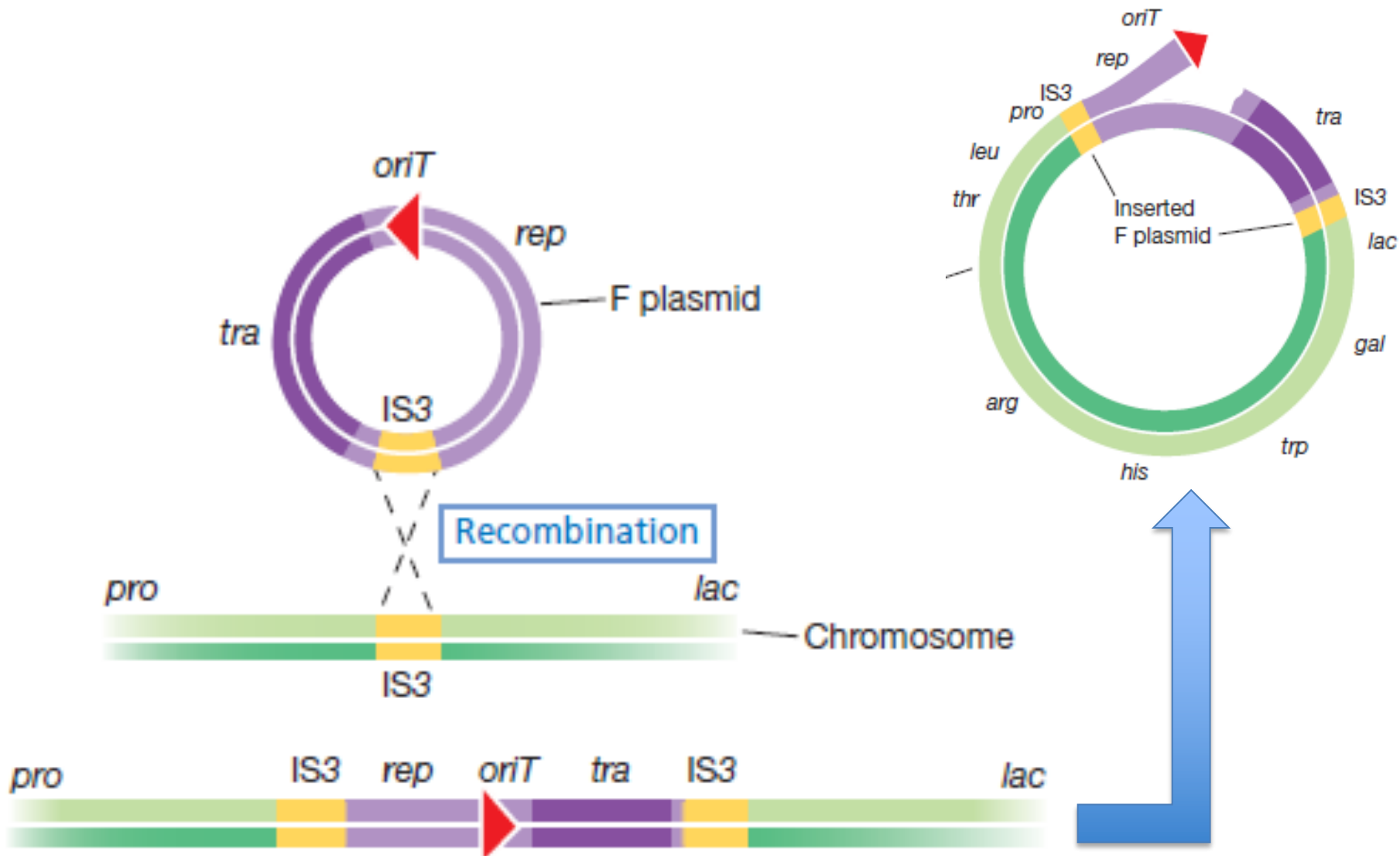
- Processo que leva 5min (plasmídeo de 100 kbp)
- O Plasmídeo consegue se dissimular rapidamente na população e é, portanto, **um agente infeccioso**



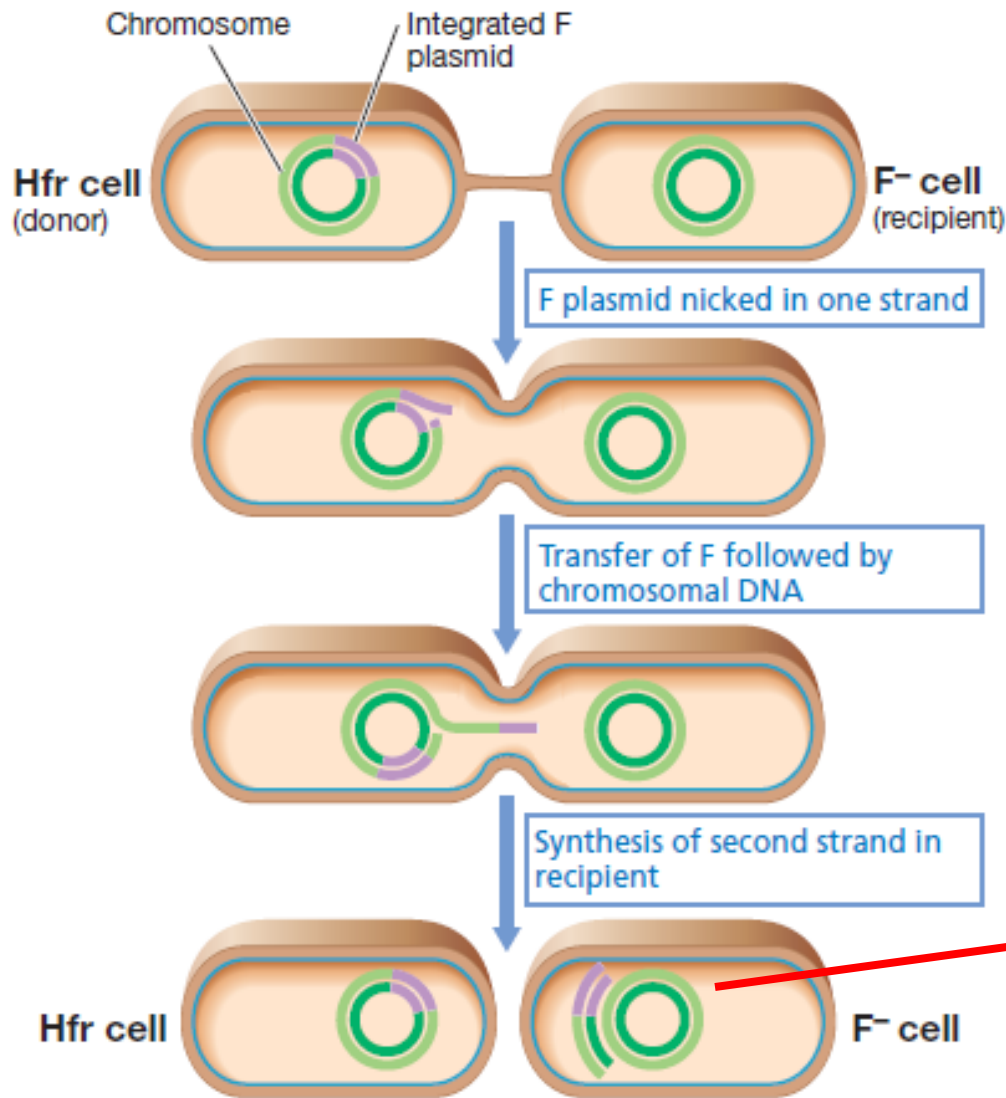
Nota: a célula receptora pode perder o plasmídeo

Processo de integração do plasmídeo F (Hfr)

Recombinação Sítio específica



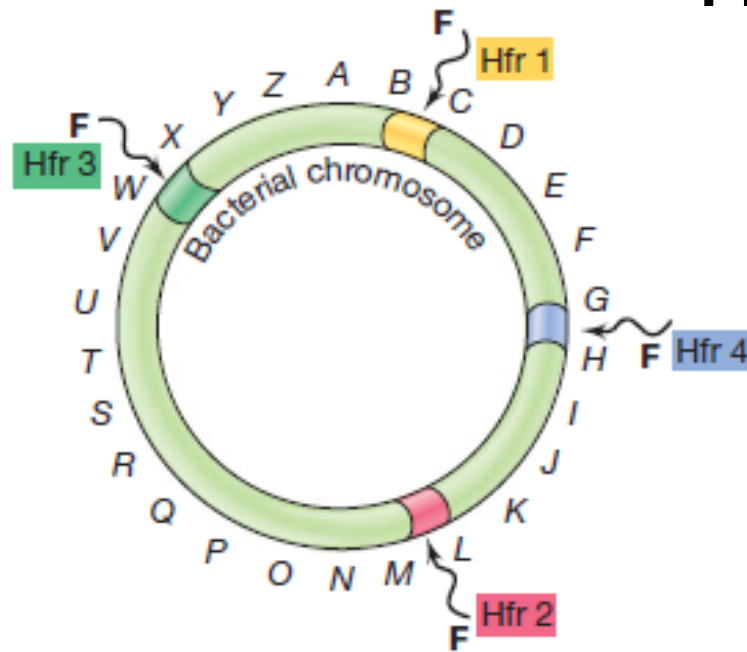
Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação



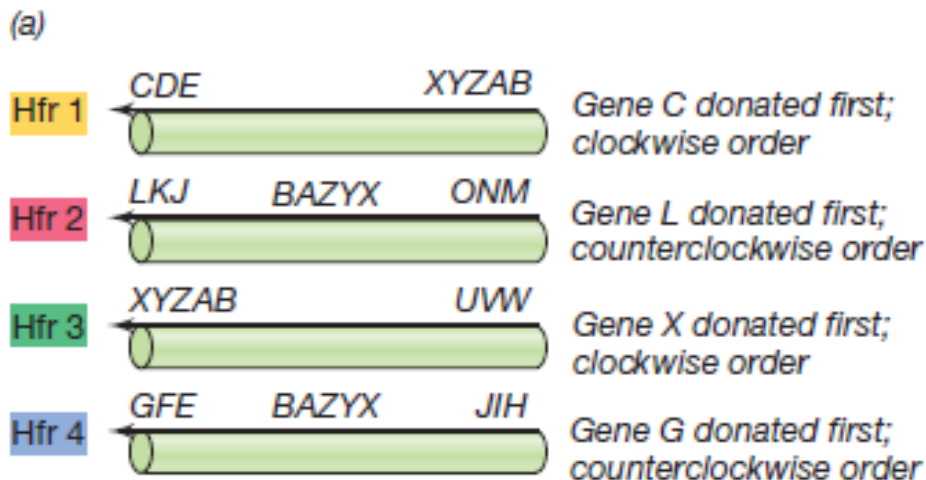
- Hfr: Alta frequência de recombinação
- Plasmídeo está integrado
- Transferir grandes quantidades de genes
- Receptora não será Hfr : apenas uma parte do plasmídeo é transferida

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

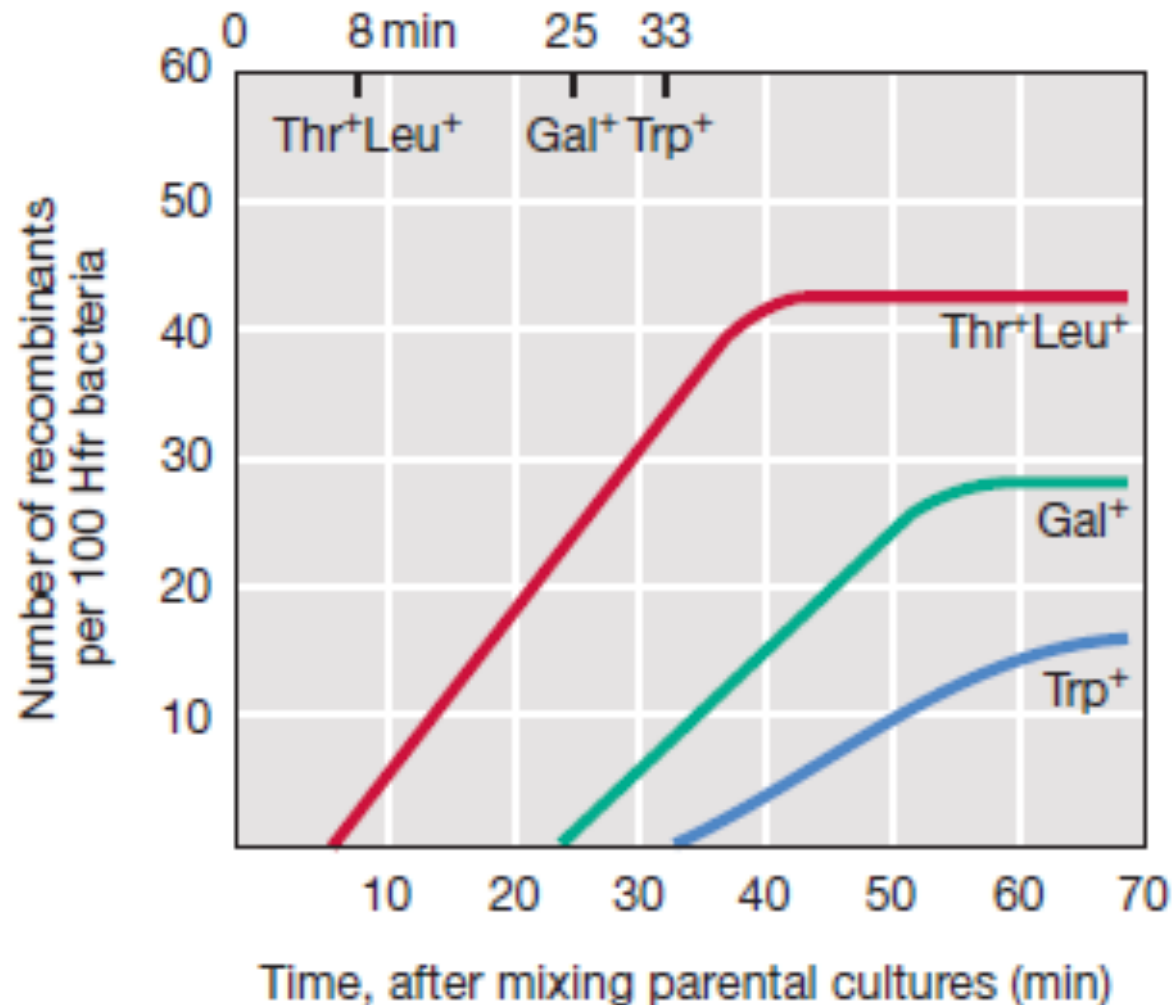
Formação de Diferentes Linhagens Hfr



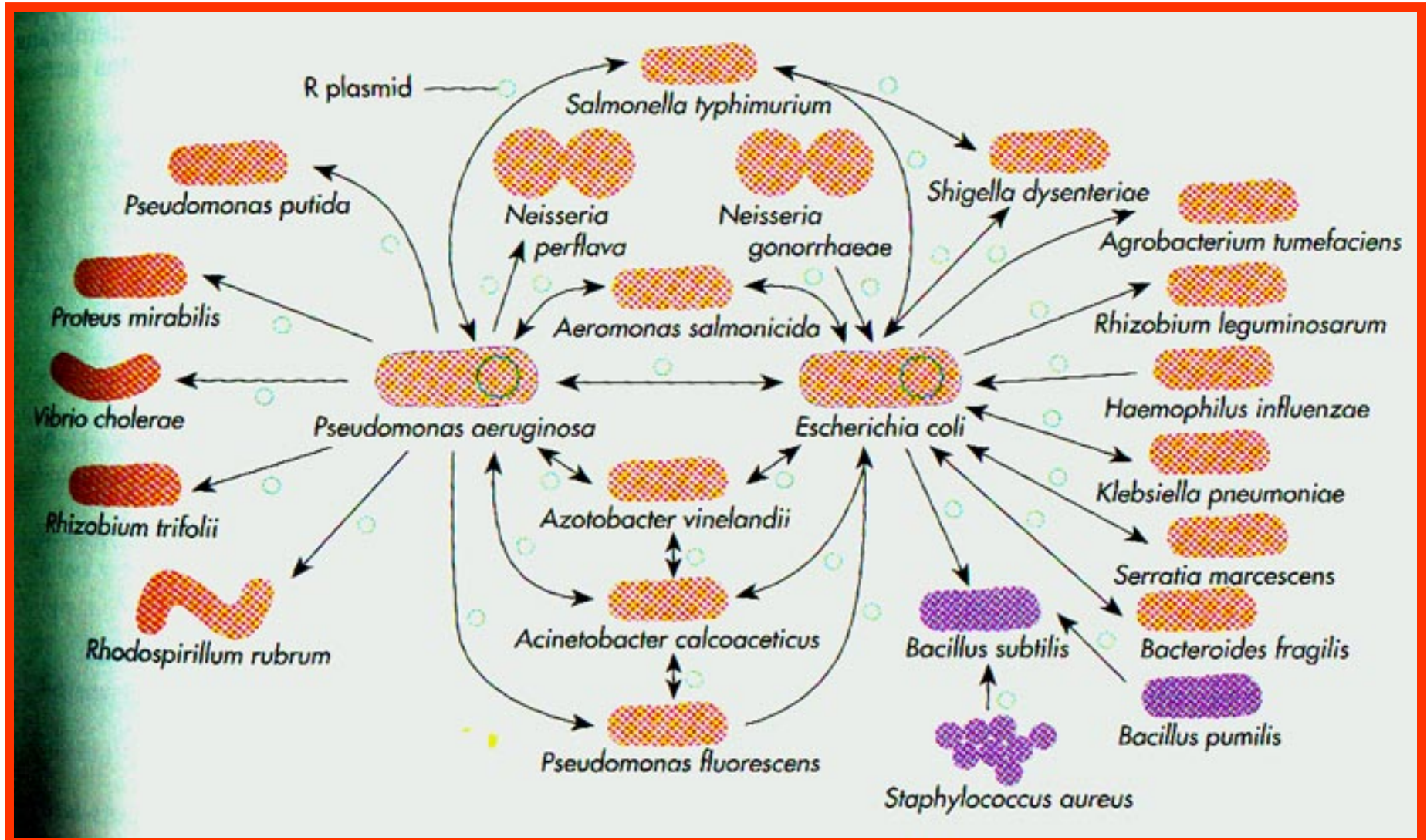
- Diferentes linhagens Hfr: Ilustrado 4 linhagens diferentes
- Diferentes sítios de inserção
- Direção de inserção pode ser diferente – transferência de genes é diferente



Tempo de transferência de genes em uma cultura de acasaleamento



Malha de transferência lateral de genes em bactérias



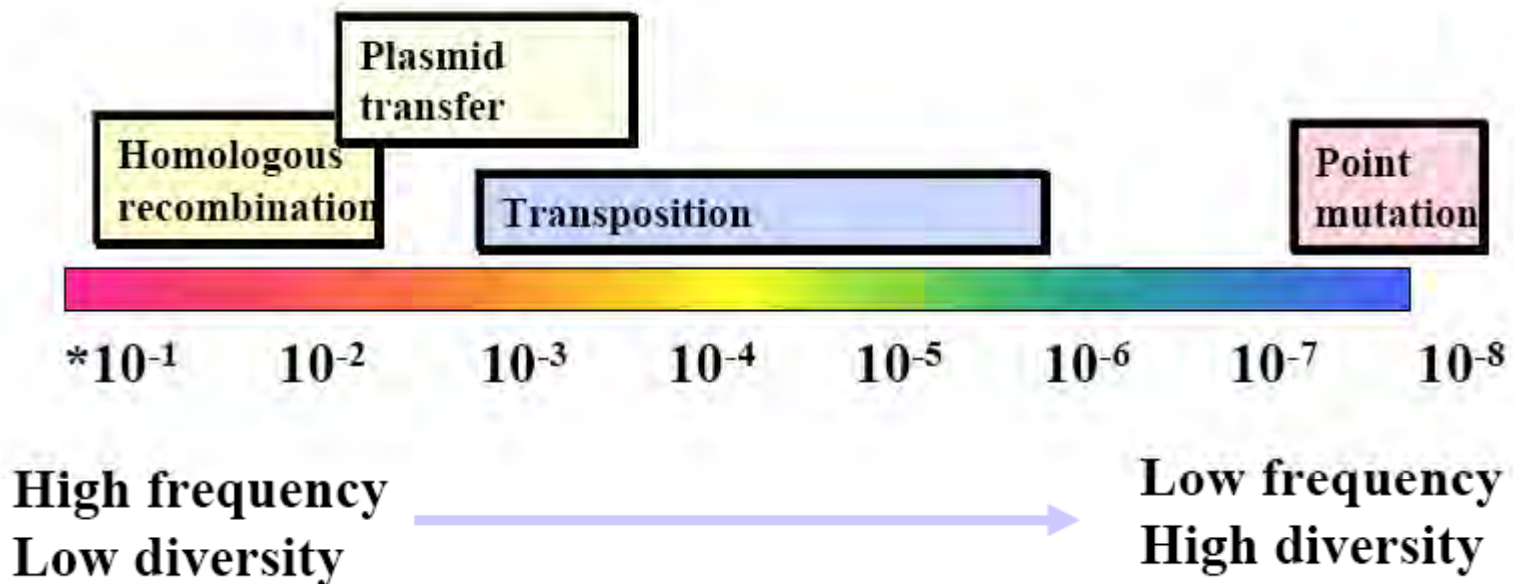
Origens da diversidade genética em bactérias

— Resistência cromossomal

- Mutações cromossômicas

— Resistência extra-cromossomal

- Transferência lateral



* As frequency per cell per generation

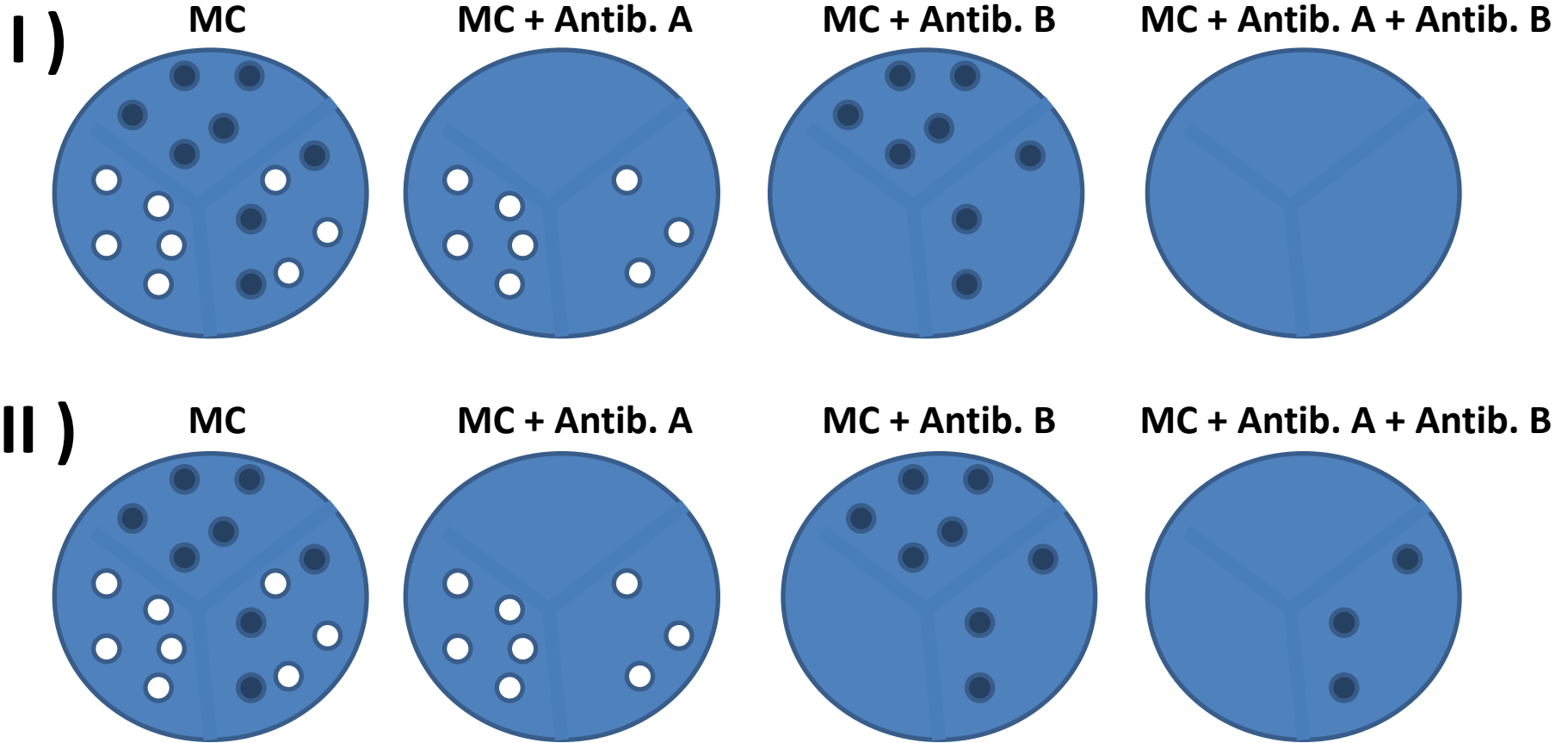
Perguntas

- 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.

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

Referências

- Microbiologia de Brock (12a. Edição)
 - Capítulo 6: Biologia Molecular de Bactérias
 - Unidade 10: Genética de bactérias e arqueas