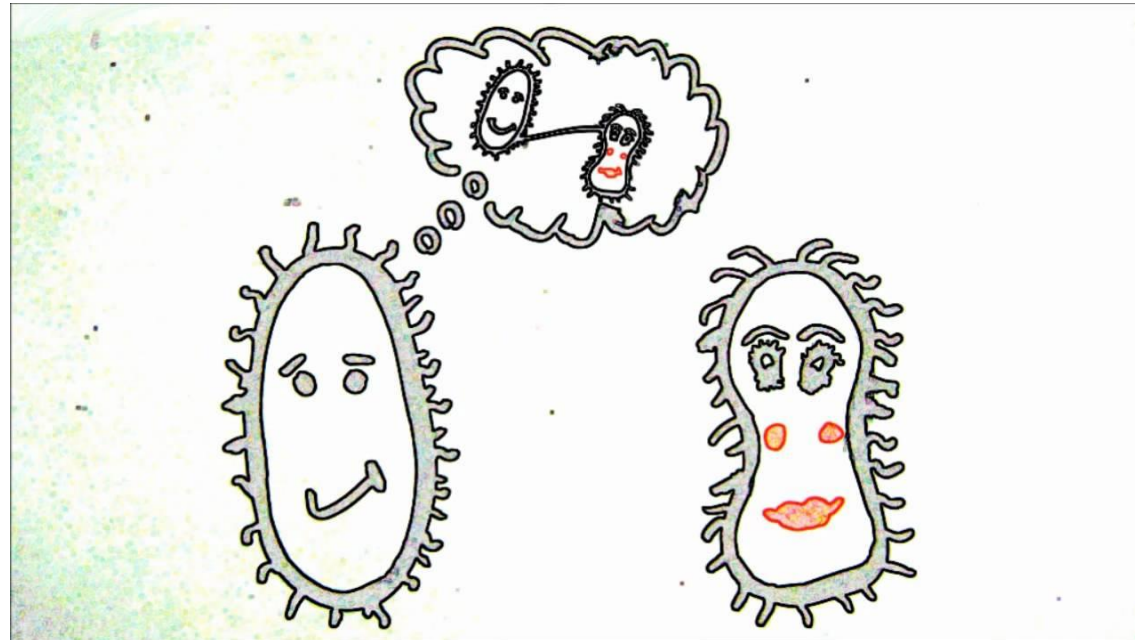


Genética Bacteriana

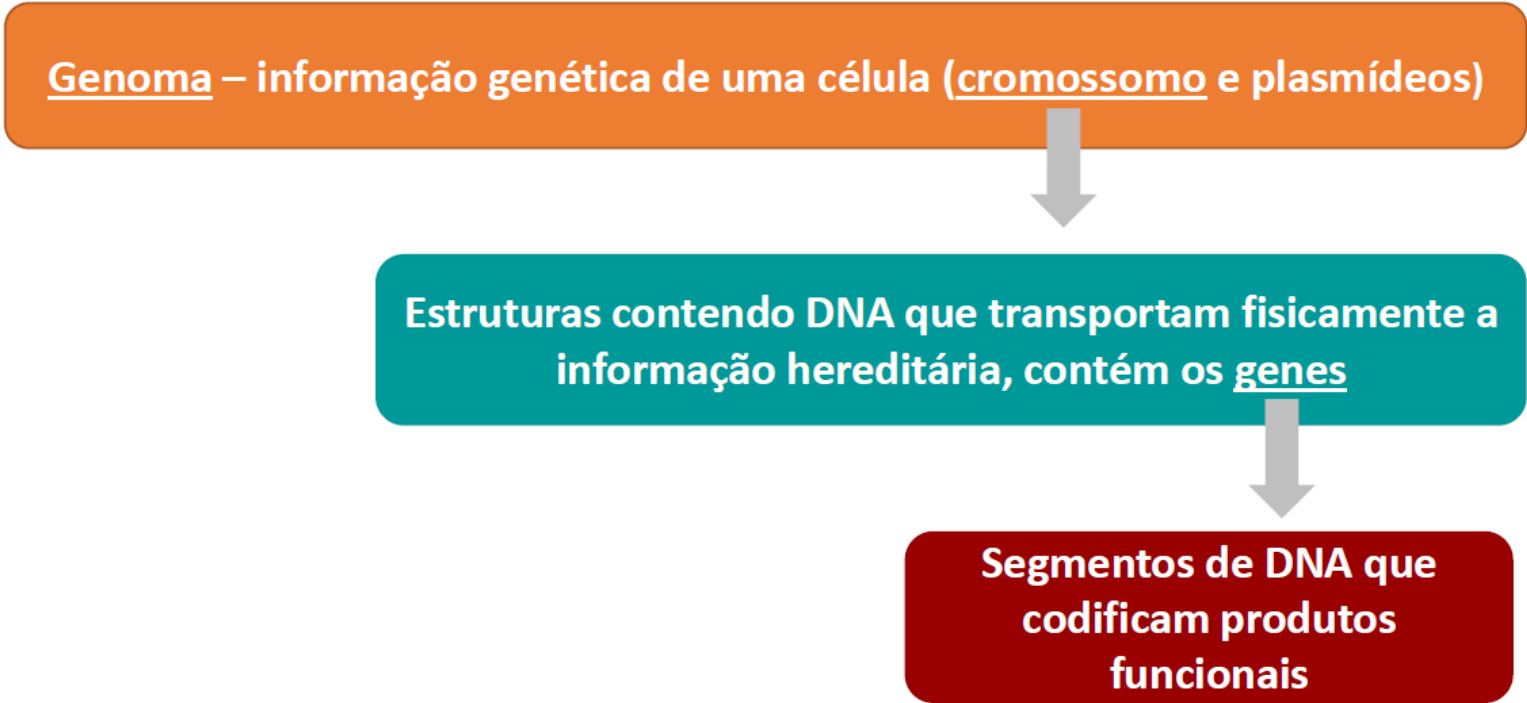
Prof. Dr Marcio V B Dias, sala 166

E-mail: mvbdias@usp.br



Relembrando conceitos...

Genoma – informação genética de uma célula (cromossomo e plasmídeos)



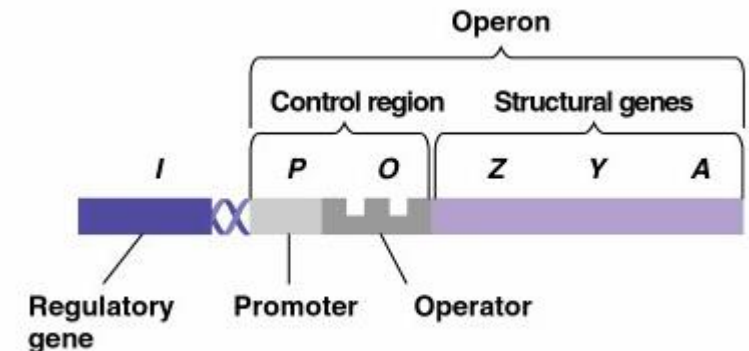
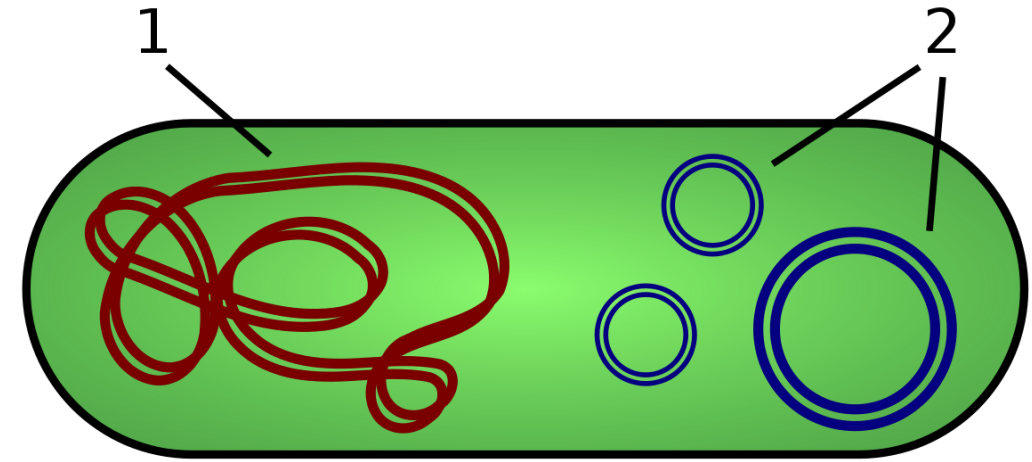
```
graph TD; A[Genoma – informação genética de uma célula (cromossomo e plasmídeos)] --> B[Estruturas contendo DNA que transportam fisicamente a informação hereditária, contém os genes]; B --> C[Segmentos de DNA que codificam produtos funcionais];
```

Estruturas contendo DNA que transportam fisicamente a informação hereditária, contém os genes

Segmentos de DNA que
codificam produtos
funcionais

Cromossomo bacteriano

- Molécula de DNA dupla fita circular (maioria);
- Disperso no citoplasma (nucleoide);
- 1 cromossomo (maioria);
- Haploides – um único conjunto de genes;
- Todas as informações essenciais para a sobrevivência da célula;
- 88% regiões codificadoras; 1% genes codificadores de rRNA e tRNA; ~10% regiões regulatórias (promotor, operador, origem em termino da replicação);
- Genes organizados na forma de operon.



E. coli



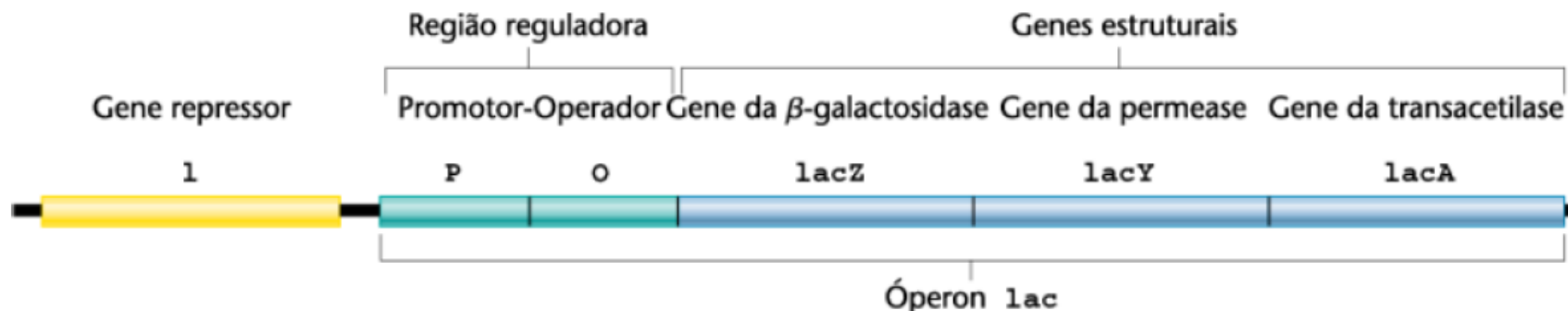
O DNA da *E. coli*, tem cerca de 4,6 milhões de pares de bases e possui cerca de 1 mm de comprimento – mil vezes maior que toda a célula.

O cromossomo ocupa apenas cerca de 10% do volume celular.

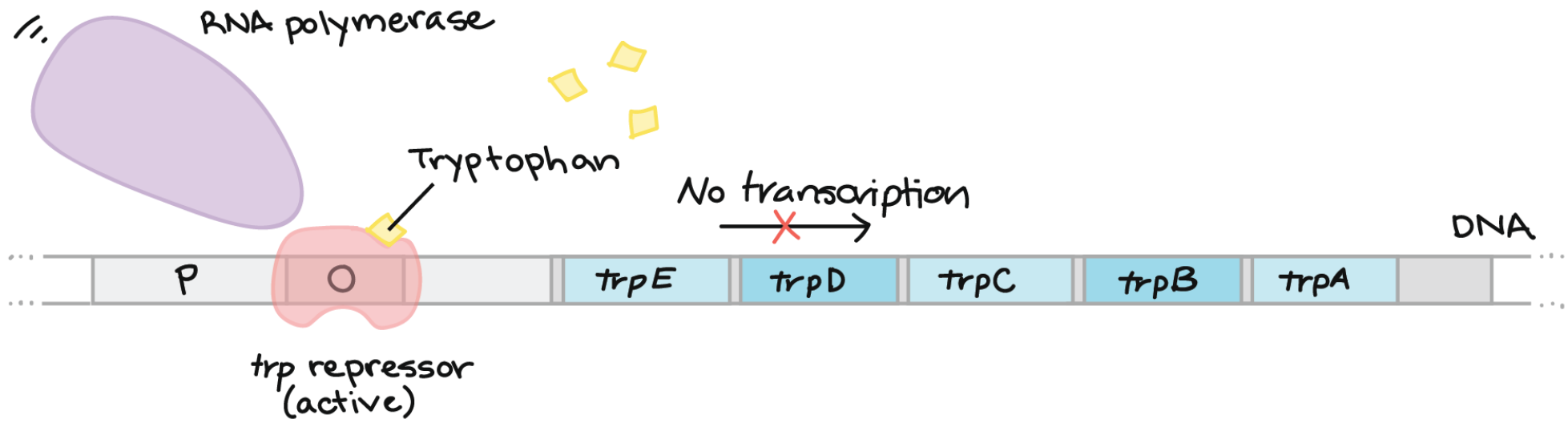
DNA é *superenovelado*!

Cromossomo bacteriano

- Operons:
 - Agrupamento de genes estruturais localizados em sequência no cromossomo bacteriano que são regulados em conjunto.
 - A região reguladora é composta por um promotor e operador.
 - Promotores são sequências de nucleotídeos que controlam a expressão (taxa de transcrição) de um gene.
 - Operadores são sequências de nucleotídeos que sinalizam para parar ou prosseguir a transcrição.

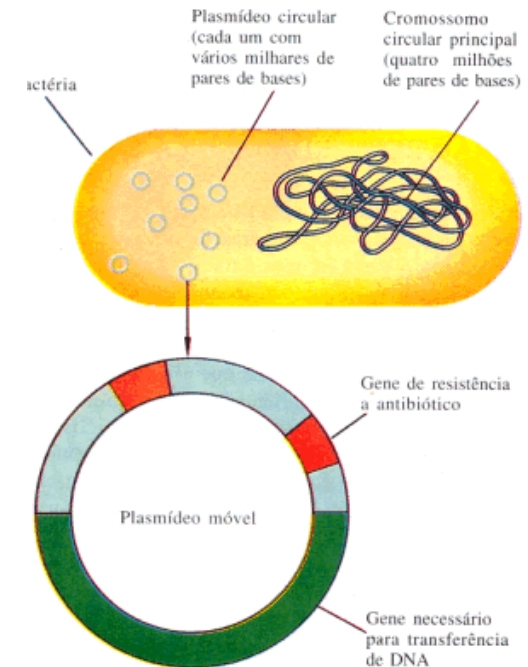
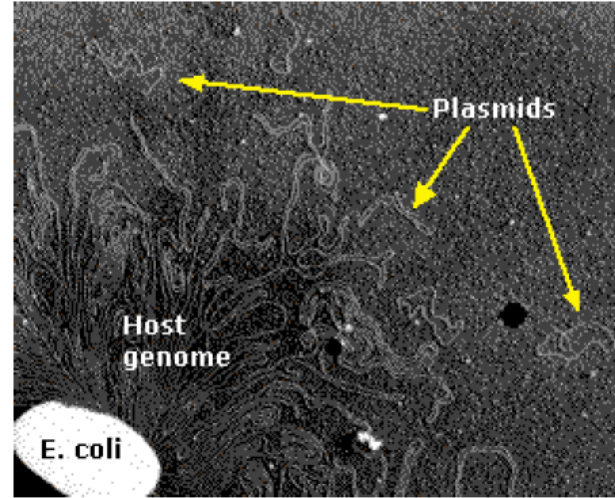


HIGH TRYPTOPHAN:



Plasmídeos bacterianos

- Elemento genético além do cromossomo;
 - Moléculas de DNA dupla fita;
- Circulares;
- Menores que os cromossomos;
- Replicam independentemente do cromossomo;
- Podem estar presentes em muitas cópias em uma única célula;
- Bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Carregam informação genética não essencial a célula, mas podem conferir uma vantagem adaptativa.



Plasmídeos bacterianos

- Carreiam genes que exercem influência no fenótipo da célula.
- Plasmídeo de resistência – ameaça a terapia antimicrobiana

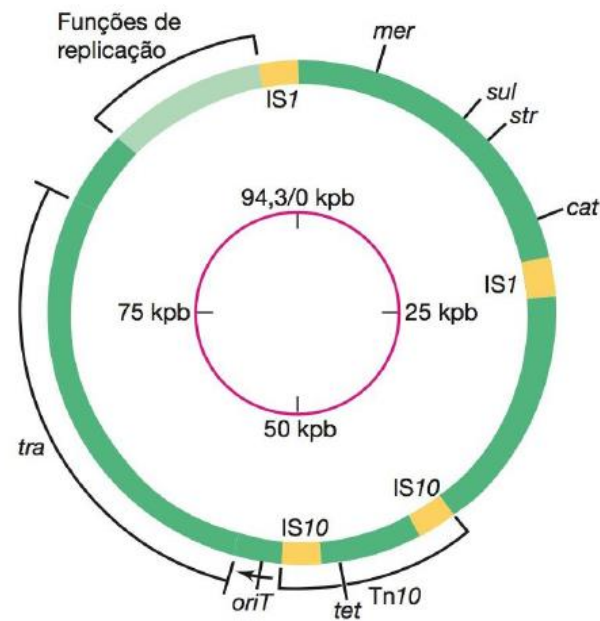
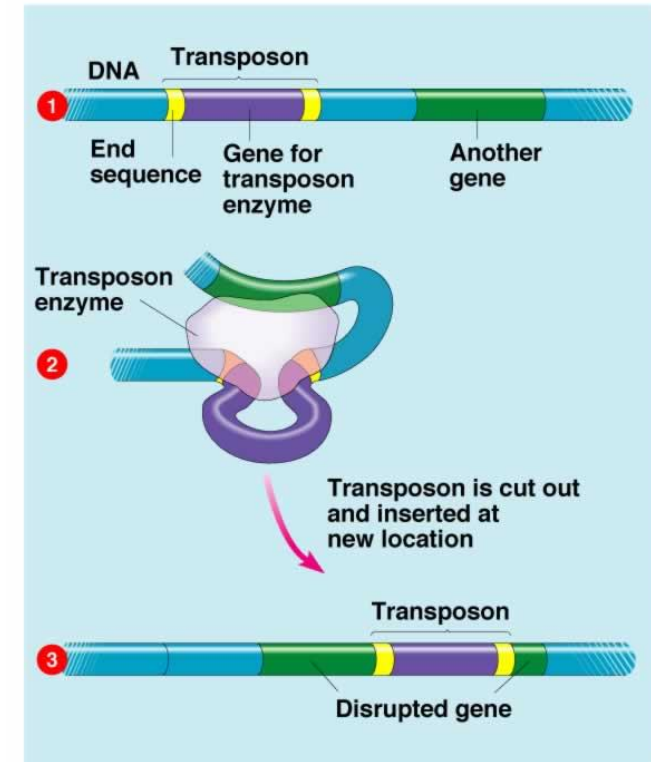


Tabela 11.1 Exemplos de fenótipos conferidos por plasmídeos em procariotos

<i>Classe fenotípica</i>	<i>Organismos^a</i>
Produção de antibióticos	<i>Streptomyces</i>
Conjugação	Ampla gama de bactérias
Funções metabólicas	
Degradação de octano, cânfora, naftaleno	<i>Pseudomonas</i>
Degradação de herbicidas	<i>Alcaligenes</i>
Formação de acetona e butanol	<i>Clostridium</i>
Utilização de lactose, sacarose, citrato ou ureia	Bactérias entéricas
Produção de pigmentos	<i>Erwinia</i> , <i>Staphylococcus</i>
Produção de vesícula de gás	<i>Halobacterium</i>
Resistência	
Resistência a antibióticos	Ampla gama de bactérias
Resistência a metais tóxicos	Ampla gama de bactérias
Virulência	
Produção de tumores em plantas	<i>Agrobacterium</i>
Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio	<i>Rhizobium</i>
Produção e resistência à bacteriocina	Ampla gama de bactérias
Invasão de célula animal	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i>
Coagulase, hemolisina, enterotoxina	<i>Staphylococcus</i>
Toxinas e cápsula	<i>Bacillus anthracis</i>
Enterotoxina, antígeno K	<i>Escherichia</i>

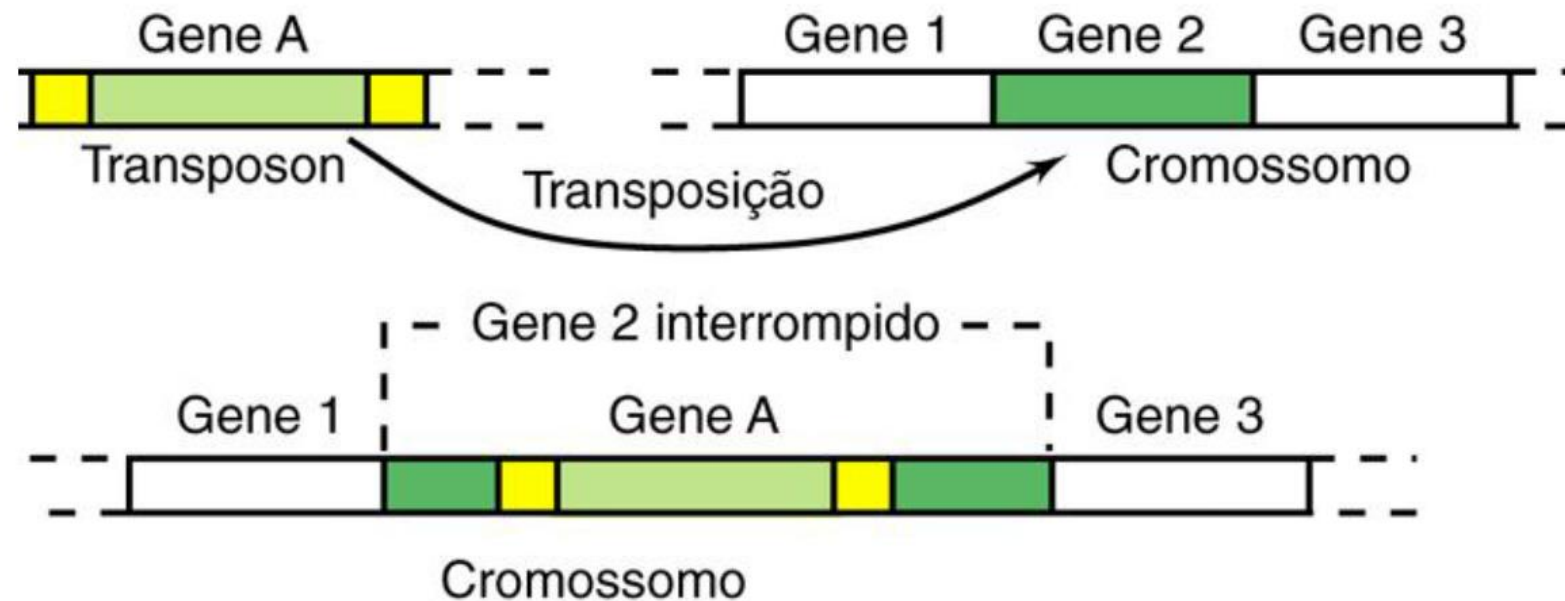
DNA móvel: elementos transponíveis

- Segmentos distintos de DNA que movem-se como unidade; no interior de outra molécula de DNA.
- Sempre inseridos em cromossomos, plasmídeos ou genoma viral.
- São replicados quando a molécula de DNA do hospedeiro é replicada.
- Podem afetar a expressão de outros genes.
- Sequências de inserção (IS) e transposons.



DNA móvel: elementos transponíveis

- Transposição:

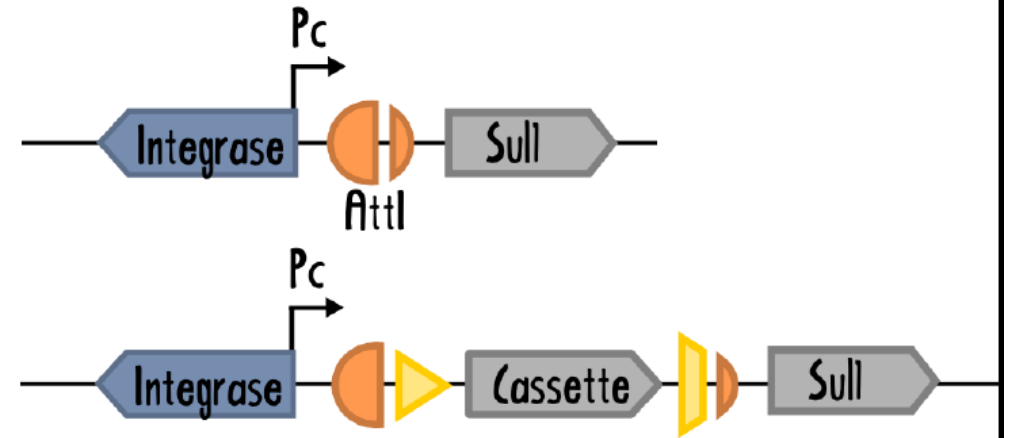


- Pode afetar a expressão de genes.

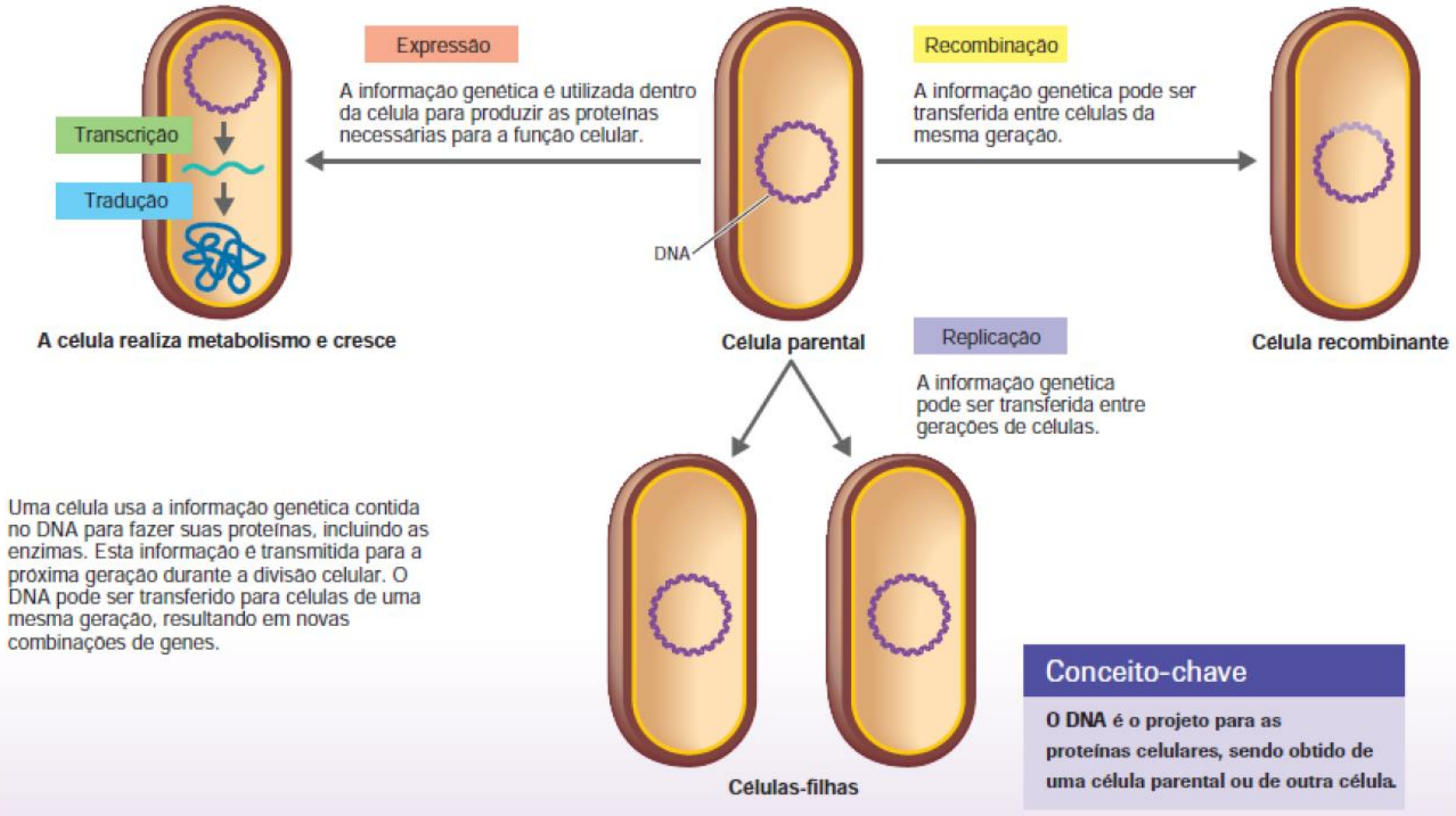
Integrans

- São sistemas que conseguem capturar e utilizar elementos genéticos móveis (cassetes gênicos).
- Os cassetes geralmente estão associados com resistência a antimicrobianos.
 - Fator de disseminação de resistência.
- Estrutura:
 - Gene codificador de integrase (*intI*). Proteína da família das recombinases.
 - Sítio de recombinação (*attI*).
 - Promotor constitutivo (*Pc*).
 - Para o cassette gênico ser integrado tem que possuir *attC*.

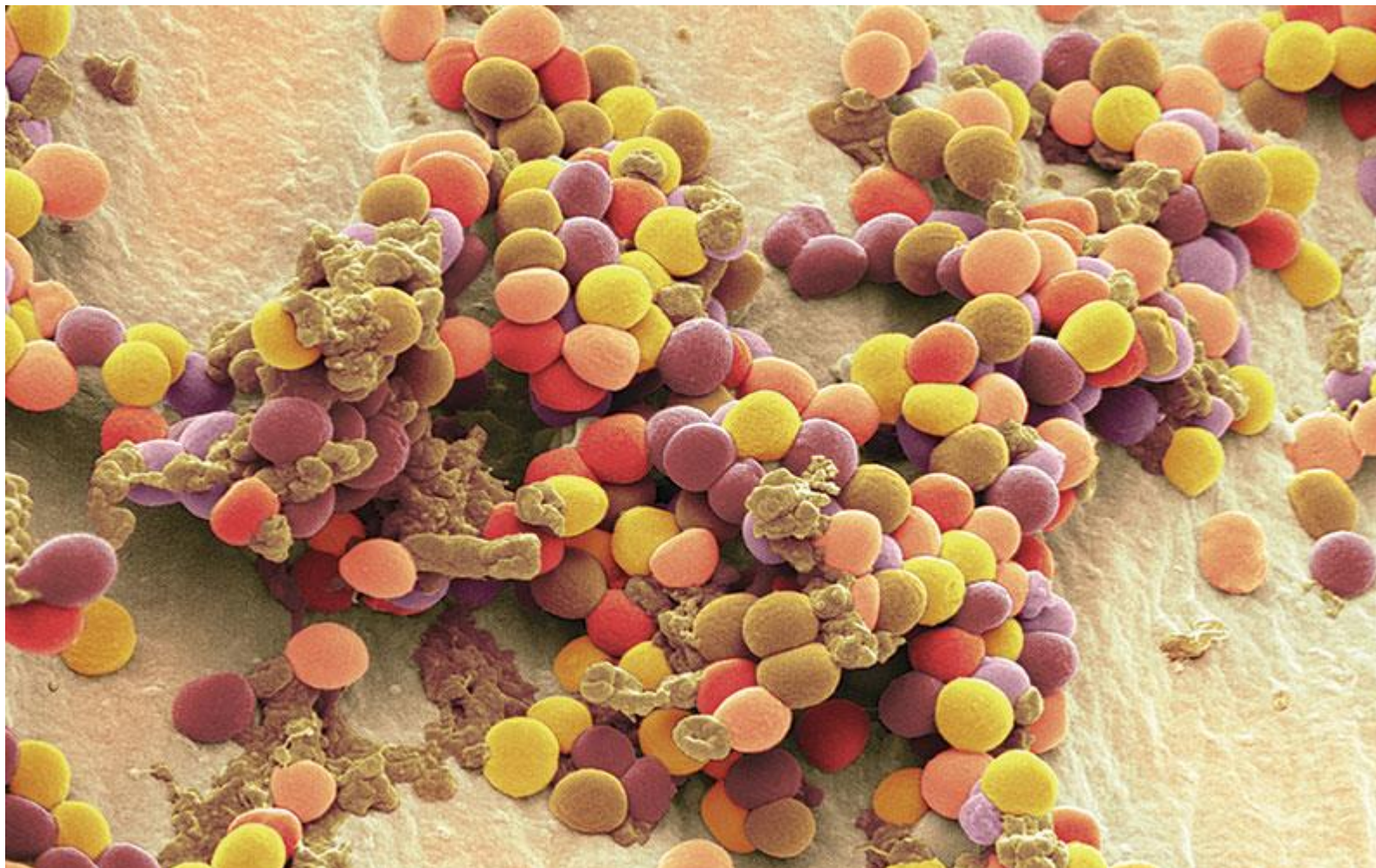
Class 1 Integrans



Fluxo da informação genética



Variabilidade genética e sua origem em bactérias



Variabilidade Genética

Mutação: alteração na sequência de bases do DNA sem aquisição de genes de outro microrganismo.

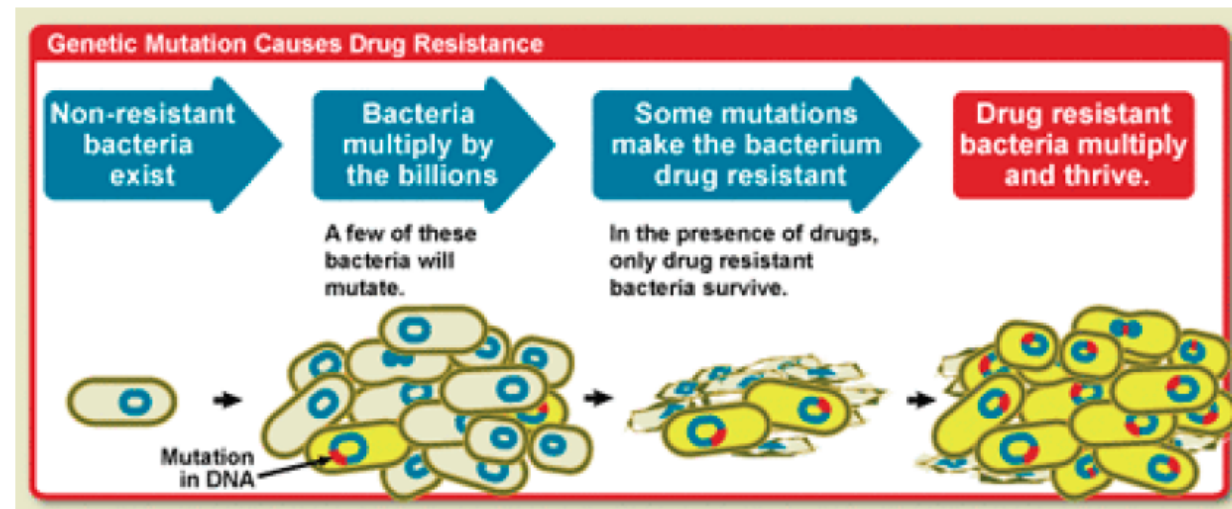
Processo vertical
Ocorre durante
replicação
cromossomo

Recombinação genética: alteração no genótipo que ocorre pela aquisição de material genético de outro microrganismo.

Processo
horizontal
Ocorre durante
transformação,
transdução e
conjugação

Mutações

- DNA é estável e a replicação é precisa. Mesmo assim mudanças e erros acontecem.
- Mutações: Alteração **herdada** da informação genética.
- Fonte de variação genética, matéria-prima para evolução.
 - Baixos níveis de “erros” são toleráveis.



Termos

- **Linhagem Selvagem**

É a linhagem de **referência** para um conjunto de experimentos. Corresponde sempre a uma linhagem conhecida e **mantida em laboratório**

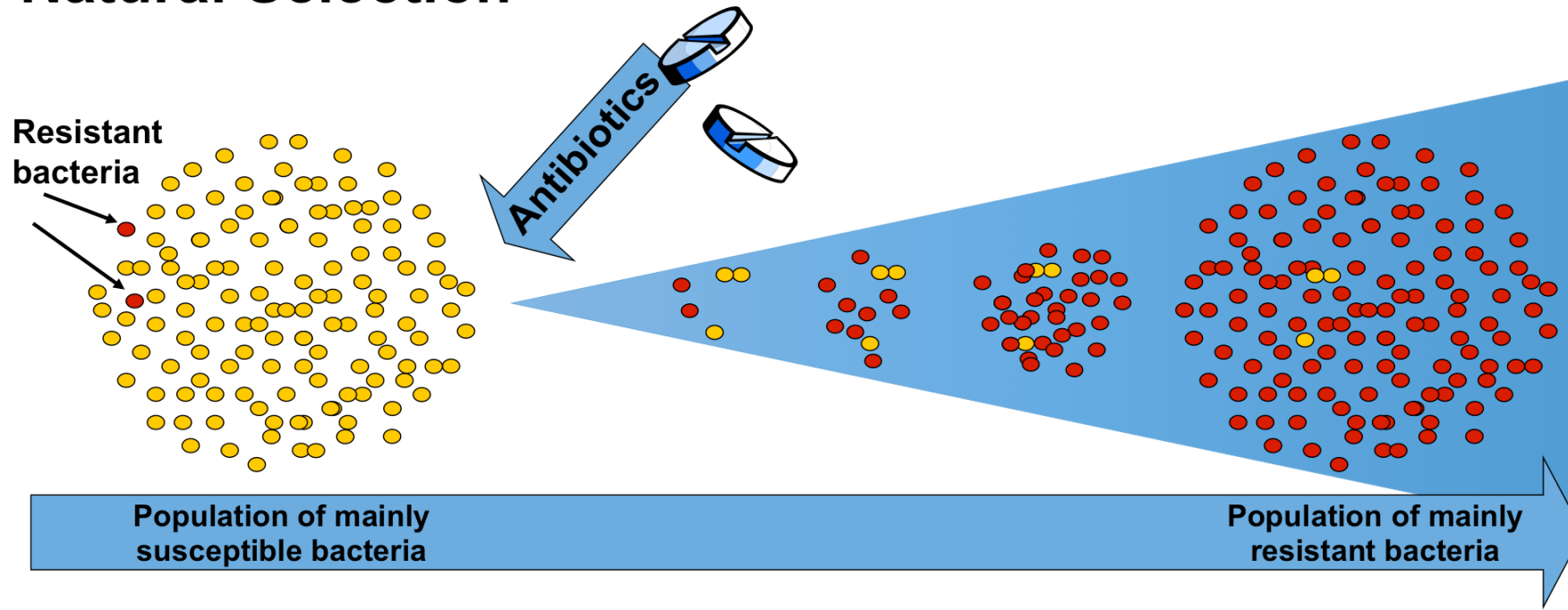
- **Mutante**

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**

Natural Selection



Genótipo X fenótipo

Vocabulário de genética bacteriana

Nomenclatura das mutações / mutantes			
Tipo de informação	Exemplo	Categoria	Definição
Selvagem	wt	selvagem	referência
Fenotípicas	His ⁺	selvagem	Posso sintetizar minha própria histidina
	His ⁻	auxotrófico	Tenho que comer histidina pra viver
	Lac ⁺	selvagem	Posso comer lactose
	Lac ⁻		Não posso usar lactose como fonte de carbono
	Stp ^R		
	Stp ^S		
Genotípicas	$\Delta hisC1$	auxotrófico	His ⁻ porque o gene <i>hisC1</i> não funciona
	$\Delta hisC2$	auxotrófico	His ⁻ porque o gene <i>hisC2</i> não funciona

Isolamento de Mutantes

Mutante Seleccionável



Colônias resistentes a um antibiótico

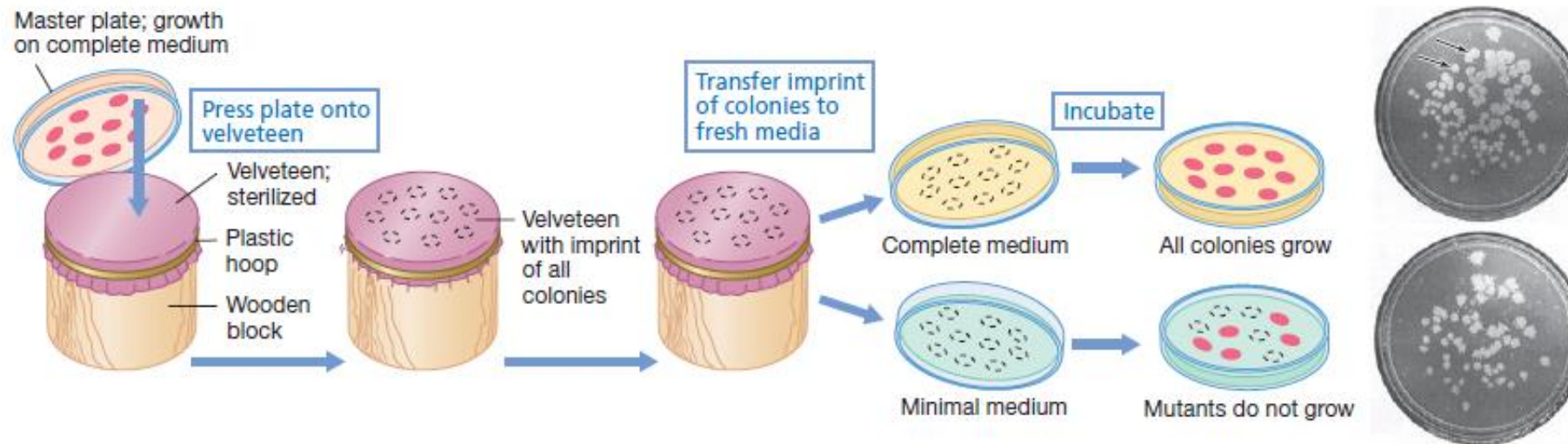
Mutante Não -Seleccionável



Fungos: pigmentação verde, amarela ou branca

Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Plaqueamento em Réplica



Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

A seleção por antibióticos permite a identificação de **auxotróficos**

Células selvagens são mortas

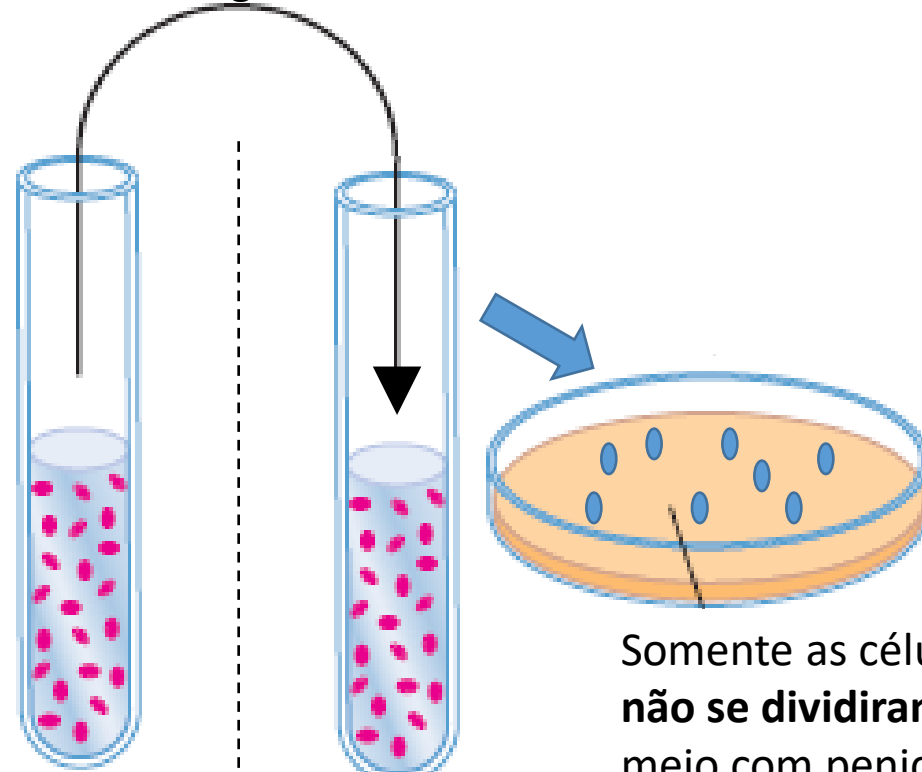
A penicilina mata
somente as células em
crescimento ativo
(divisão celular)

As **mutantes**, por
precisarem da adição de
um certo nutriente no
meio, o qual são
incapazes de sintetizar,
não irão se dividir

Células selvagens + mutantes
Meio sem o aa + penicilina

Mutantes
Meio com o aa

Somente as células que
não se dividiram no
meio com penicilina
sobreviveram ao
tratamento



Classes Comuns de Mutantes

Table 10.1 *Kinds of mutants*

<i>Phenotype</i>	<i>Nature of change</i>	<i>Detection of mutant</i>
Auxotroph	Loss of enzyme in biosynthetic pathway	Inability to grow on medium lacking the nutrient
Temperature-sensitive	Alteration of an essential protein so it is more heat-sensitive	Inability to grow at a high temperature (for example, 40°C) that normally supports growth
Cold-sensitive	Alteration of an essential protein so it is inactivated at low temperature	Inability to grow at a low temperature (for example, 20°C) that normally supports growth
Drug-resistant	Detoxification of drug or alteration of drug target or permeability to drug	Growth on medium containing a normally inhibitory concentration of the drug
Rough colony	Loss or change in lipopolysaccharide layer	Granular, irregular colonies instead of smooth, glistening colonies
Nonencapsulated	Loss or modification of surface capsule	Small, rough colonies instead of larger, smooth colonies
Nonmotile	Loss of flagella or nonfunctional flagella	Compact instead of flat, spreading colonies
Pigmentless	Loss of enzyme in biosynthetic pathway leading to loss of one or more pigments	Presence of different color or lack of color
Sugar fermentation	Loss of enzyme in degradative pathway	Lack of color change on agar containing sugar and a pH indicator
Virus-resistant	Loss of virus receptor	Growth in presence of large amounts of virus

Tipos de mutações

Mutações espontâneas



Mutações induzidas

agentes mutagênicos



Tipos de mutações

Mutações de uma única base

Troca de bases dentro de um códon, ou seja, **preservando a fase de leitura**

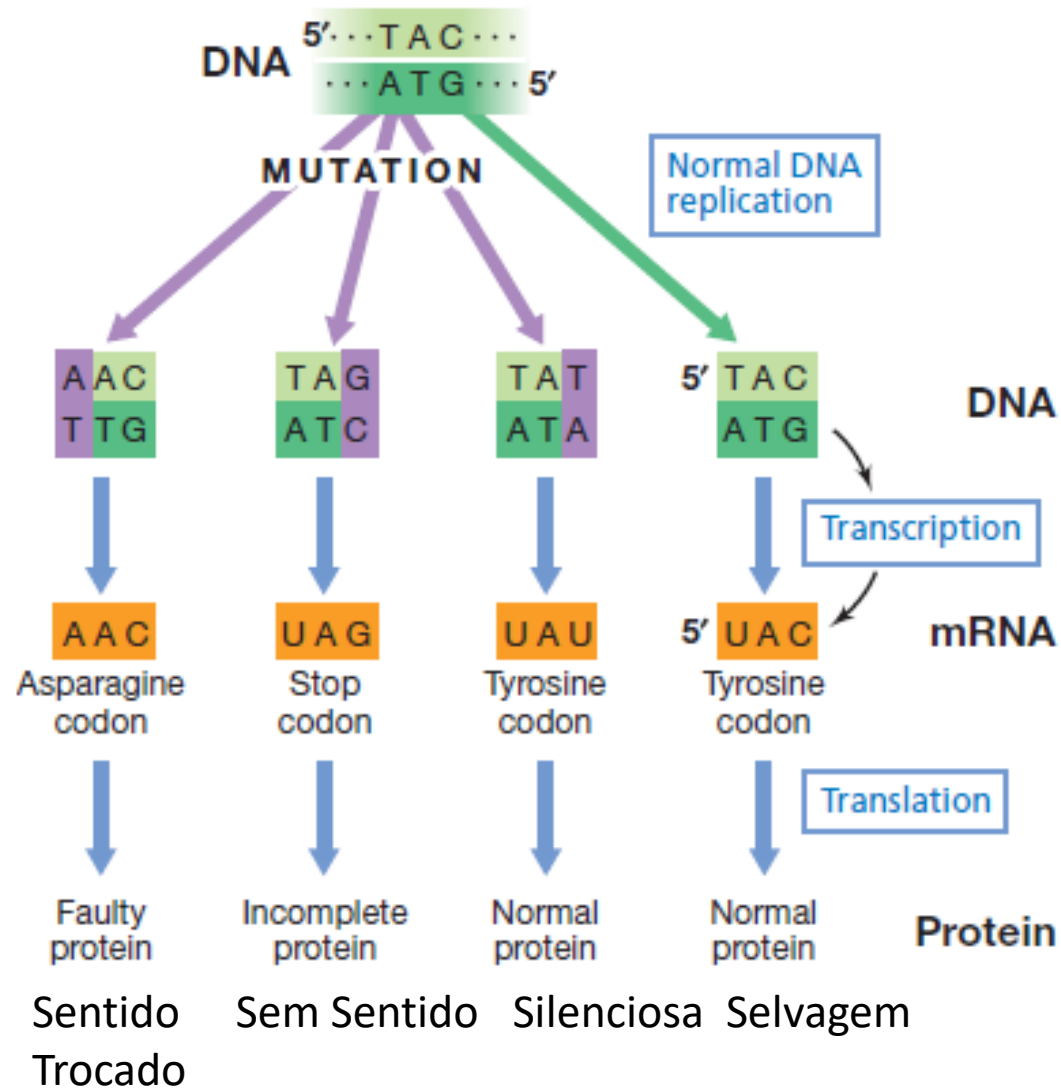
Tipo de Substituição

1. Transição

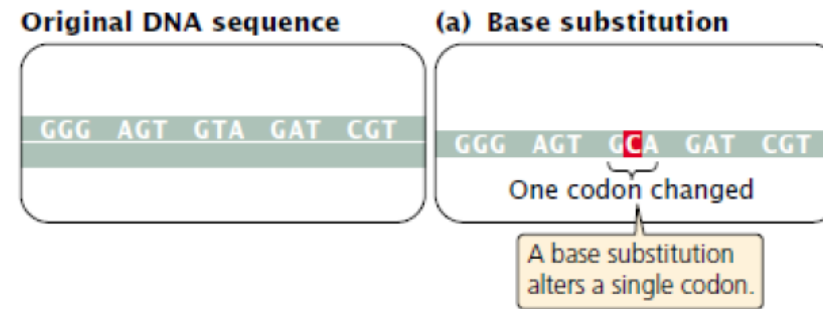
- Purina – Purina (A ou G)
- Pirimidina – Pirimidina (C ou T)

2. Transversão

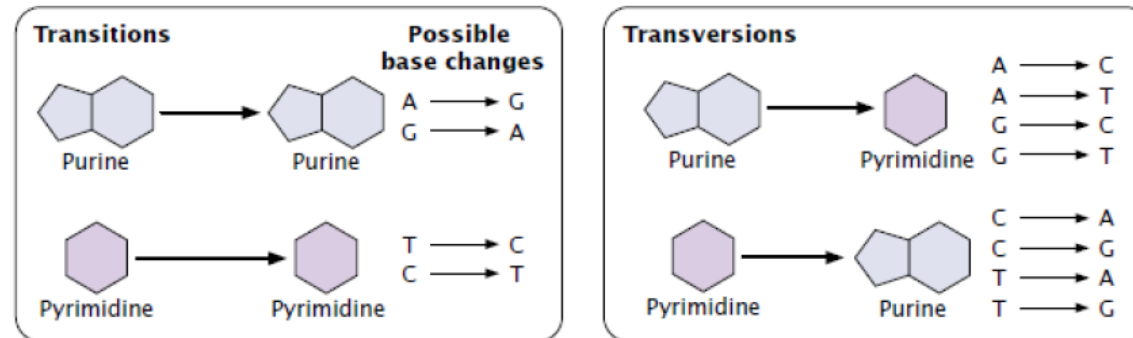
- Purina – Pirimidina
- Pirimidina - Purina



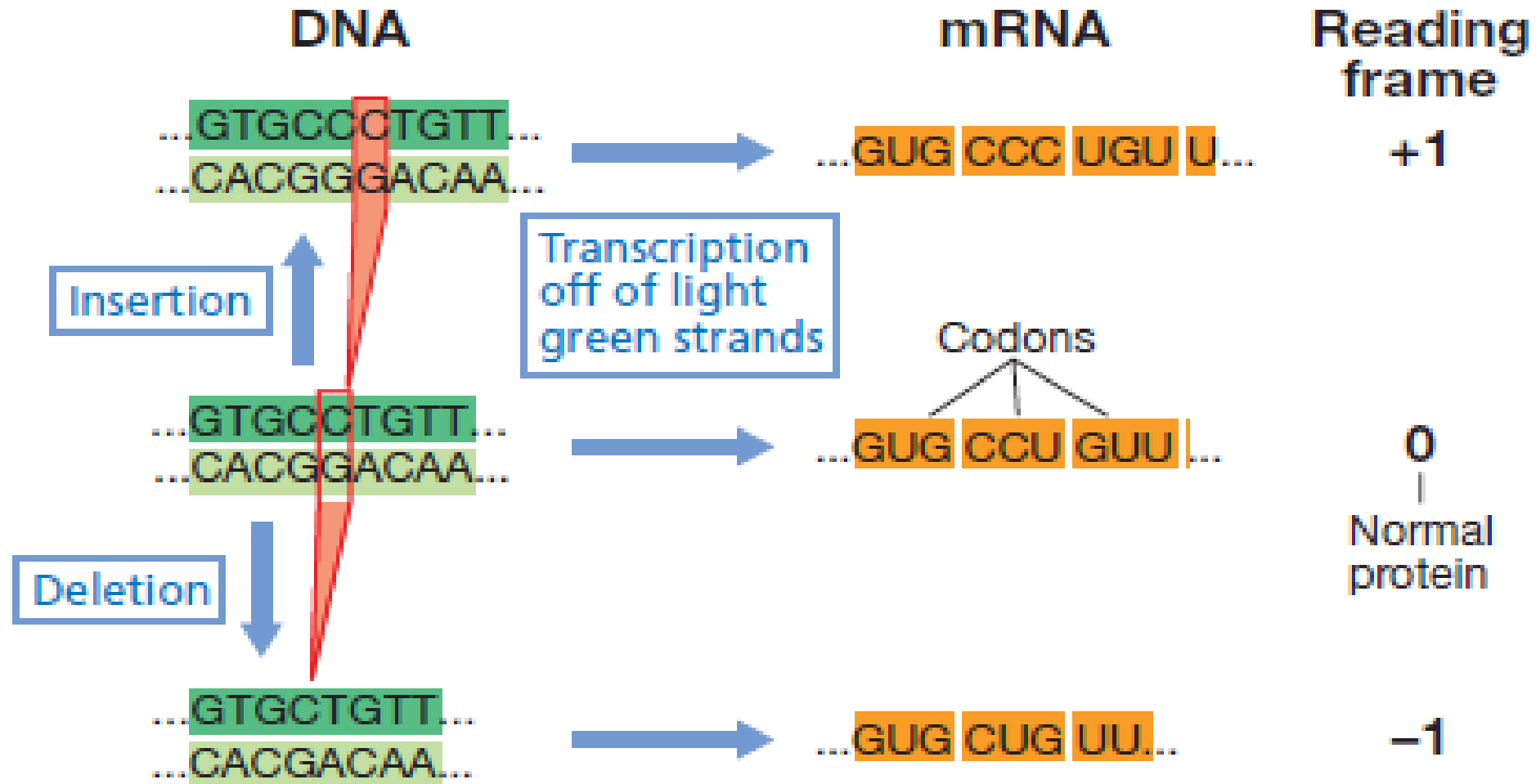
- Substituição:



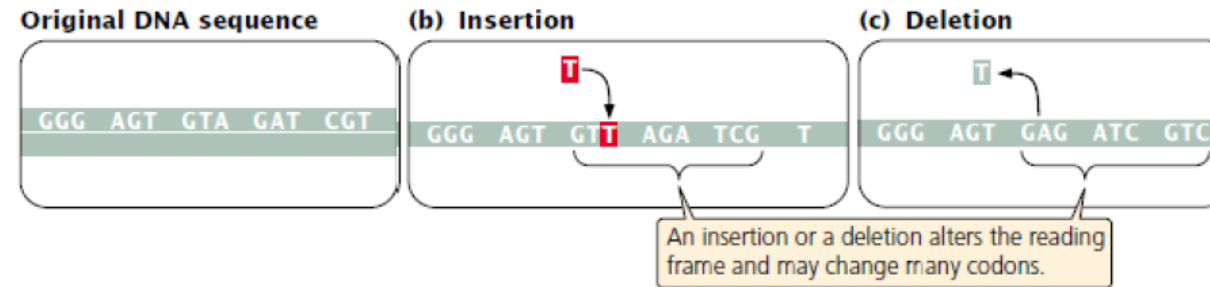
- Tipos:



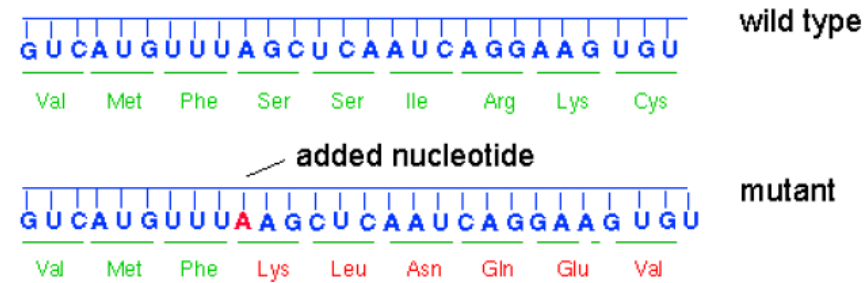
Insertão ou Deleção de Uma ou mais bases



- Inserções e deleções :



- Alteração na matriz de leitura
 - Inserção e deleção múltiplos de 3 não afetam a matriz.



Mutagênese

Agentes mutagênicos

Table 9.3 : Different types of chemical mutagens

<i>Class of Chemical</i>	<i>Chemical Mutagens</i>
Acridines	Ethyleneimine (EI)
Mustard	Nitrogen mustard
	Sulphur mustard
Nitrosamines	Diethylnitrosamine (DMN)
	Diethylsulphonate (DES)
	Nitrosomethylurea (NMU)
Epoxide	Ethyleneoxide (EO)
	Diepoxybutane (DEB)
Alkyl sulphonates	Diethylsulphonate (DES)
	Methylmethanesulphonate (MMS)
	Ethylmethanesulphonate (EMS)
Others	Nitrous acid
	Maleic hydrazide
	Hydroxylamine

Radiation

UV Radiation

Both natural sunlight and tanning beds



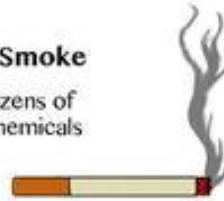
X-Rays

Medical, dental, airport security screening

Chemicals

Cigarette Smoke

Contains dozens of mutagenic chemicals



Nitrate & Nitrate Preservatives

In hot dogs and other processed meats

Barbecuing

Creates mutagenic chemicals in foods



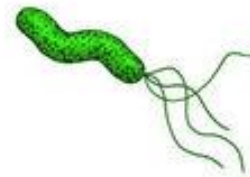
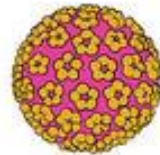
Benzoyl Peroxide

Common ingredient in acne products

Infectious Agents

Human Papillomavirus (HPV)

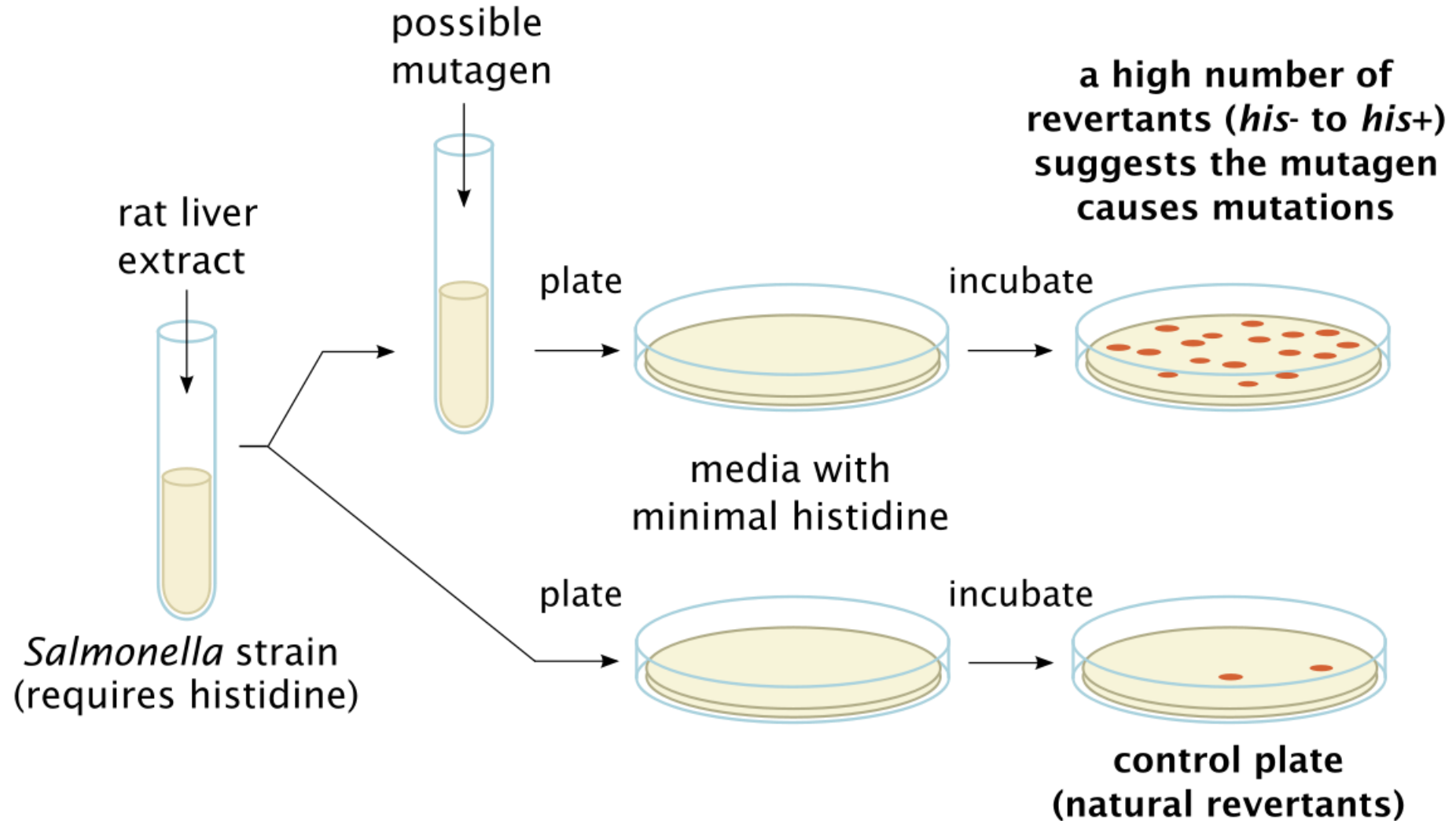
Sexually transmitted virus



Helicobacter pylori

Bacteria spread through contaminated food

Teste de Ames

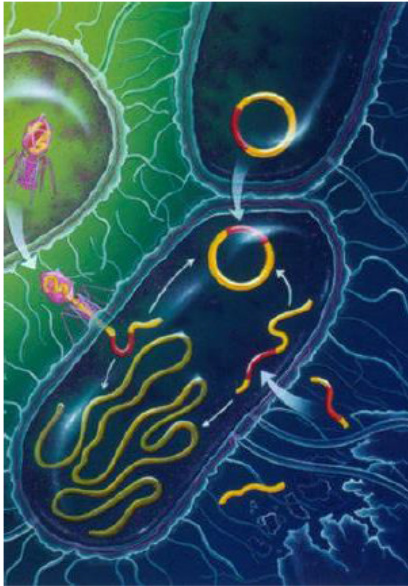


Qual outro mecanismo de surgimento de variabilidade genética???

Recombinação Genética

- Troca de genes entre moléculas de DNA para formar uma nova combinação de genes no cromossomo (plasmídeos).
- Assim como as mutações, contribui para o aumento da diversidade genética. Fonte de variações para evolução.
- Recombinação pode ser mais benéfica do que mutações.
 - Menor probabilidade de alterações negativa nos genes.
 - Combinação de genes que permite ao organismo uma característica adaptativa.

Recombinação Genética



Transformação

Incorporação de DNA livre, geralmente decorrente de lise celular

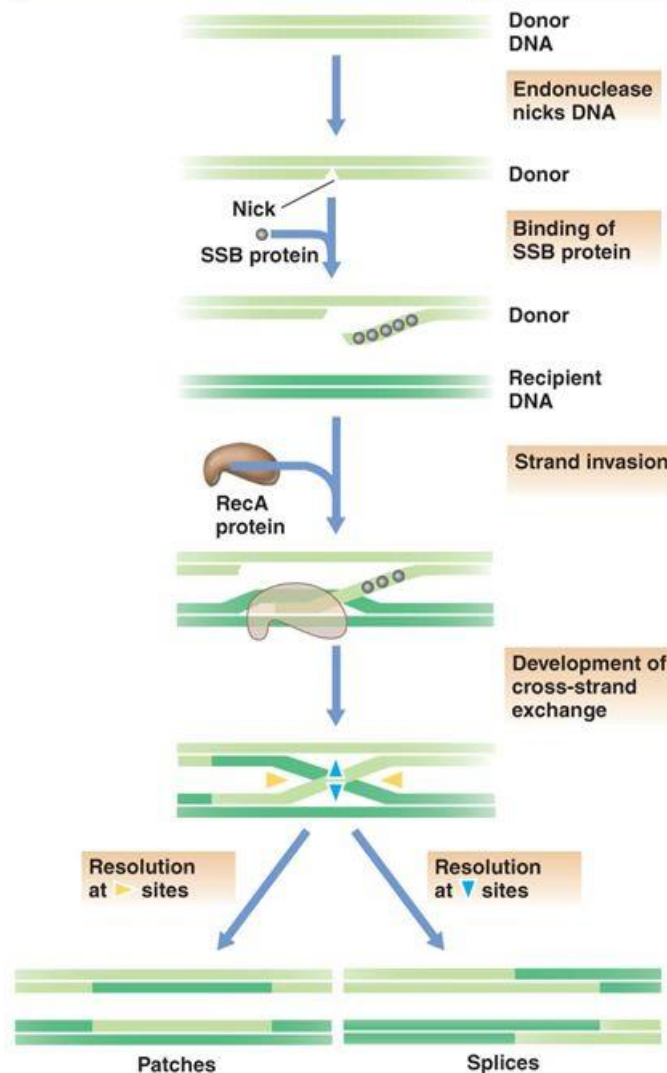
Conjugação

Transferência de DNA de uma bactéria para outra que envolve o contato entre as duas células

Transdução

Transferência de material genético mediada por bacteriófago

A Simplified Version of Homologous Recombination



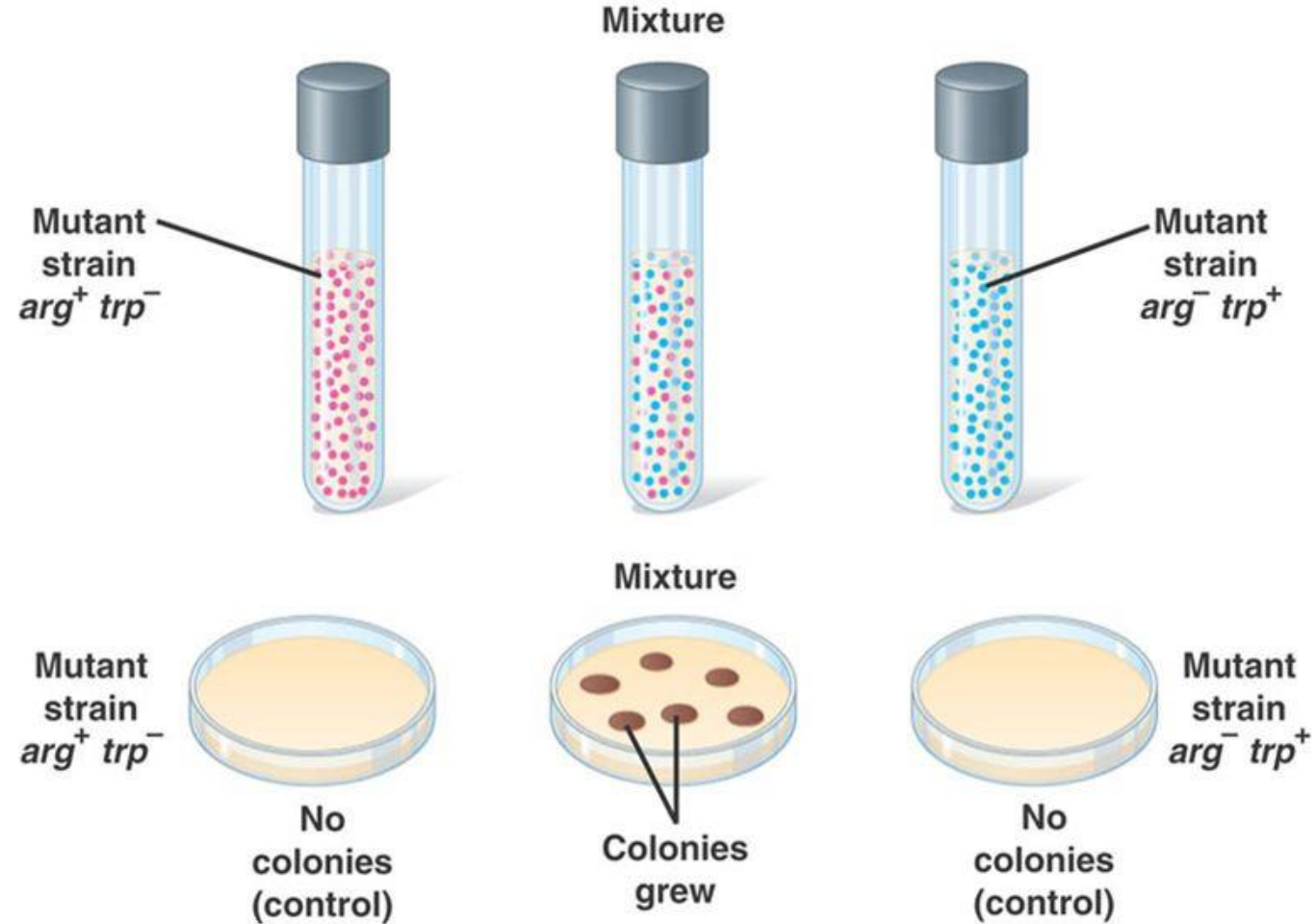
Endonuclease nicks one strand of donor DNA, is displaced (eg helicase), & ss binding protein binds. RecBCD has both endonuclease & helicase activities

Strand invasion: RecA (error-prone repair) binds to ss DNA to form a complex & subsequently displaces the complimentary sequence of the other strand to form a heteroduplex (Holliday junction)

Holliday junctions are energised by several proteins & can migrate along the DNA until “resolved” by resolvase – cut & rejoin the 2nd & previously unbroken strand

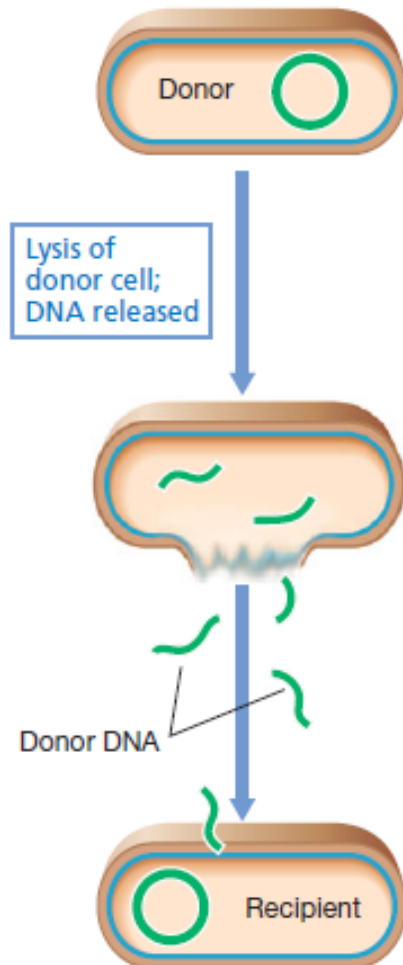
Two types of products of resolvase which differ in conformation can exist in E. coli – patch or splice

Detecting Genetic Recombination in Bacteria

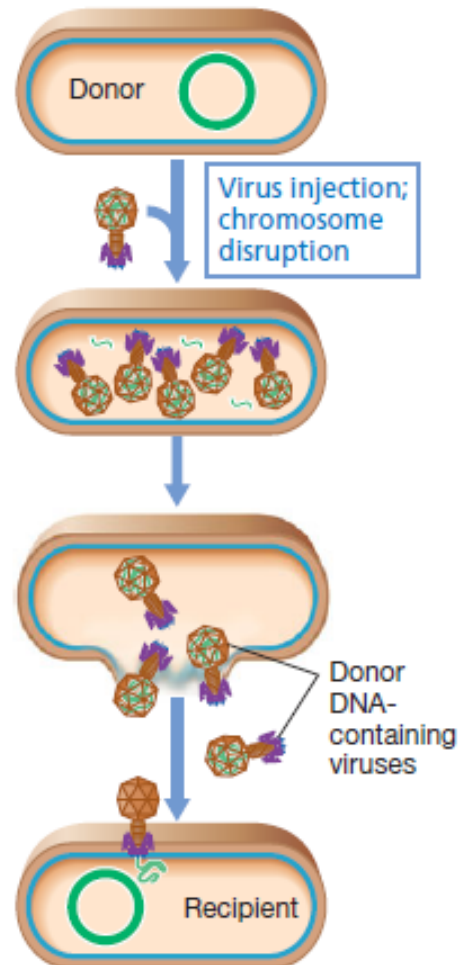


Transferência Horizontal em Procariotos

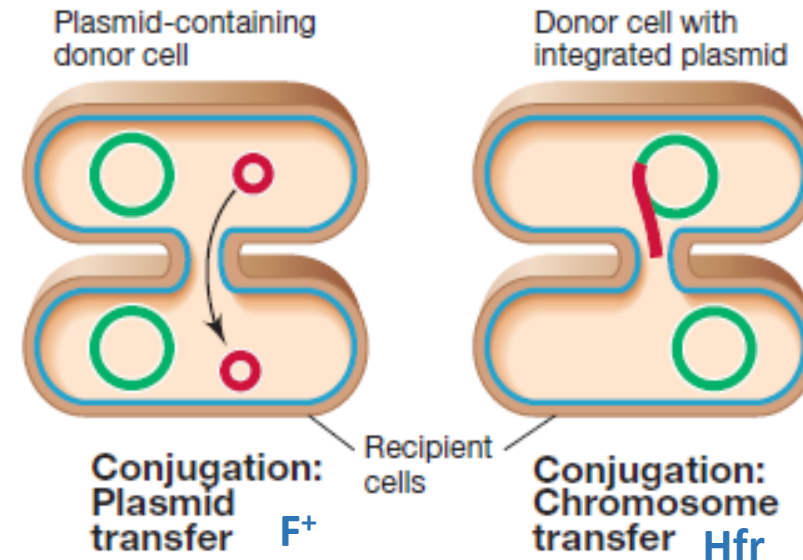
1. Transformação



2. Transdução

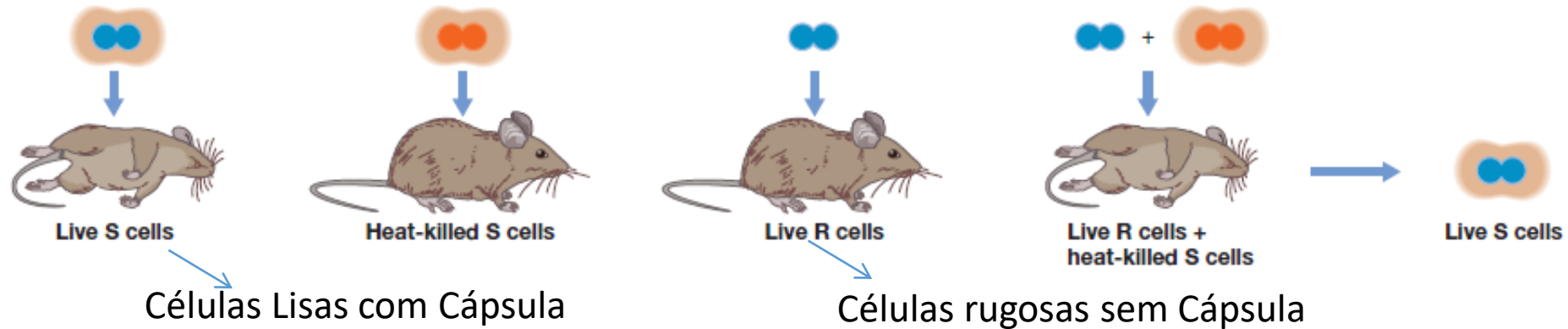


3. Conjugação



Transformação

Experimento de Griffith com *Streptococcus pneumoniae*



- 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 – Estrutura do DNA

Competência de transformação

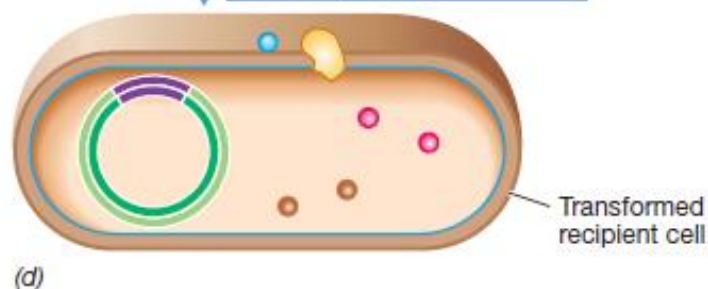
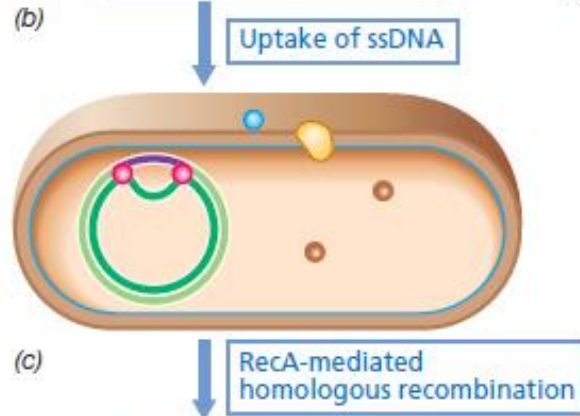
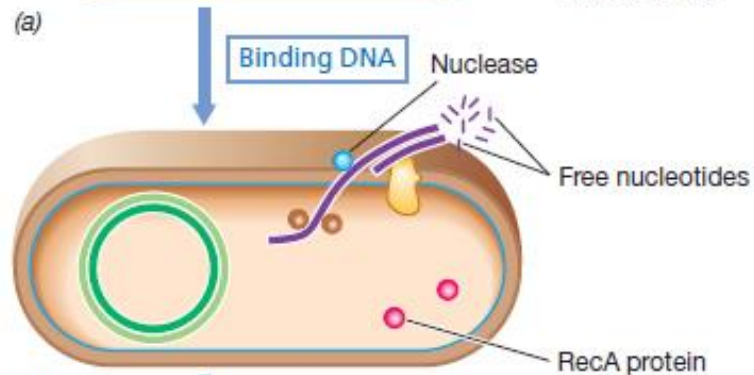
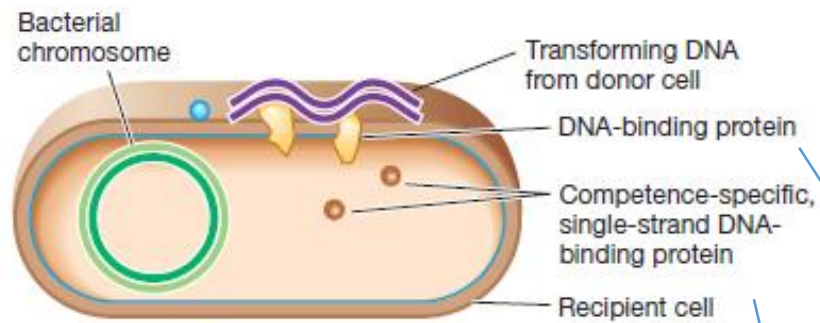
Table 1. Numbers of transformants and transformation frequencies obtained from glass bead transformation of Gram-positive bacteria with pGK12

Gram-positive bacteria	Number of transformants (x 10 ³) ^a	Transformation frequency (per µg of pGK12)
<i>E. faecalis</i>	3.8, 5.0, 4.4, 4.6, 5.2	4.60 x 10 ³
<i>L. casei</i>	4.3, 4.0, 4.8, 5.0, 4.6	4.54 x 10 ³
<i>L. lactis</i>	6.9, 6.3, 7.1, 6.7, 6.1	6.62 x 10 ³
<i>L. dextranicum</i>	5.8, 6.1, 4.8, 5.7, 5.0	5.48 x 10 ³
<i>L. innocua</i>	5.1, 4.7, 4.5, 5.3, 4.0	4.72 x 10 ³
<i>S. aureus</i>	3.3, 3.8, 4.2, 3.0, 3.5	3.56 x 10 ³
<i>S. pneumoniae</i>	3.6, 4.8, 4.3, 3.2, 4.5	4.08 x 10 ³

^a obtained from 5 separate experiments

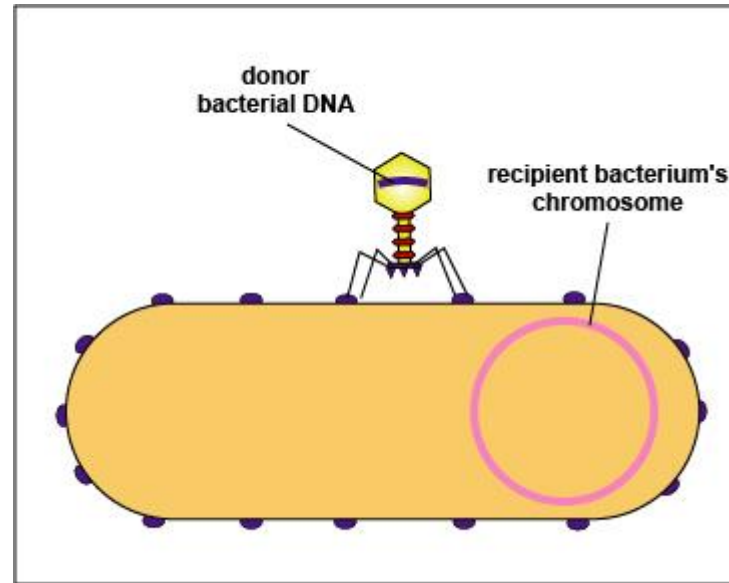
As bactérias podem ter sua eficiência de transformação aumentada por estresse

Transformação



- Em geral são pequenos Fragmentos de DNA
- Internalizar dsDNA ou ssDNA
- Protege o DNA de ser degradado

Transdução

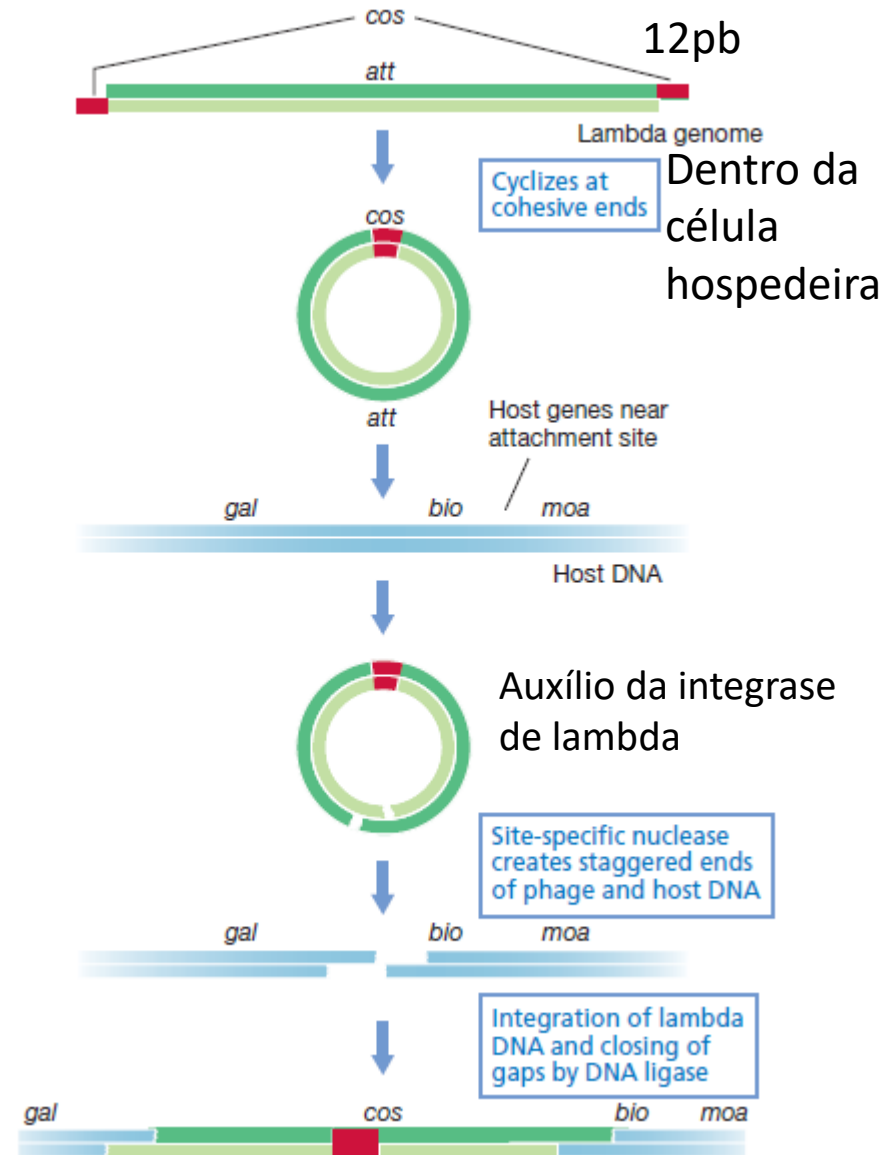
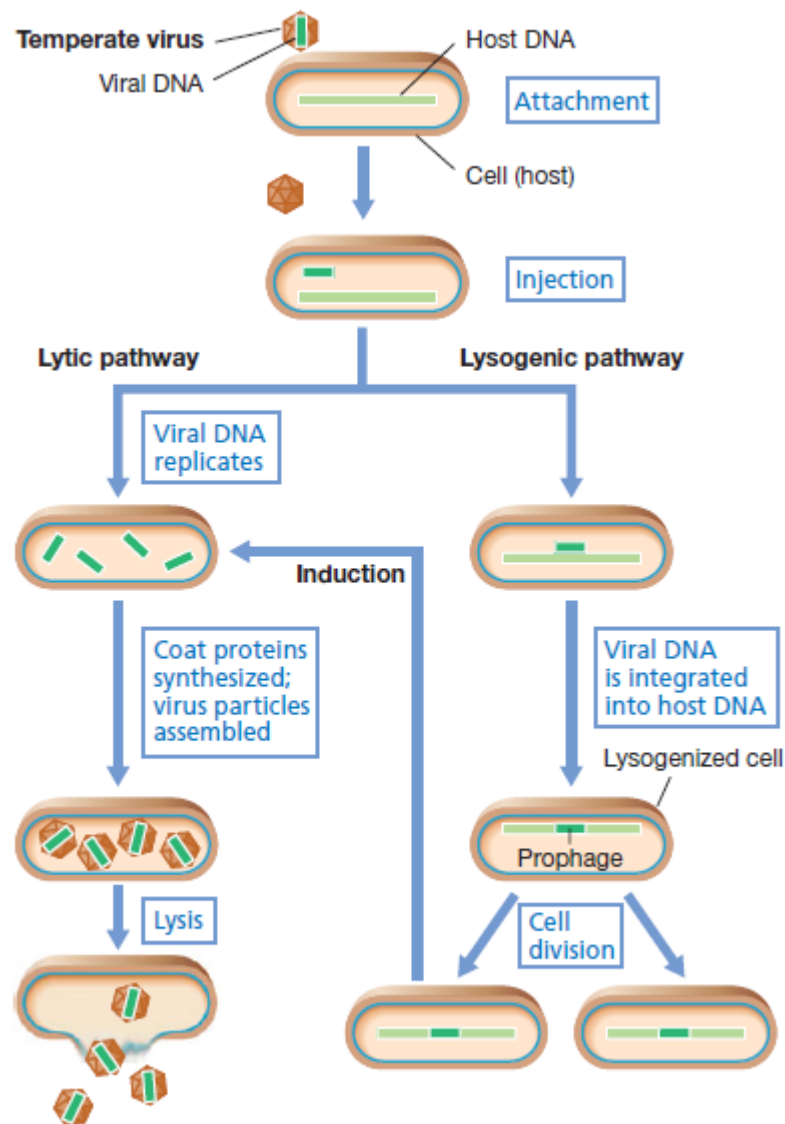


Transdução

1. Transdução Generalizada

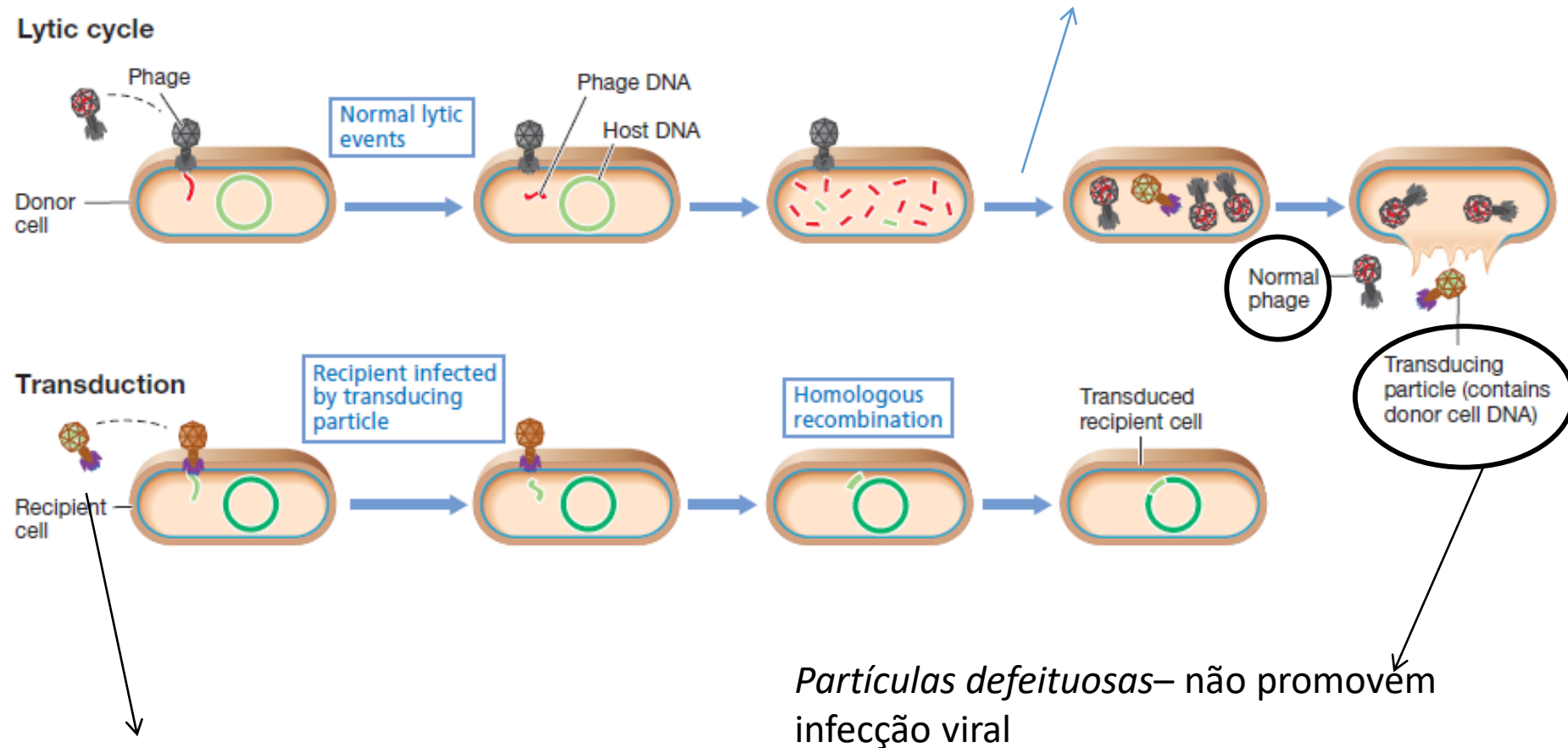
1. Transdução Específica

Ciclo Lítico e Via Lisogênico



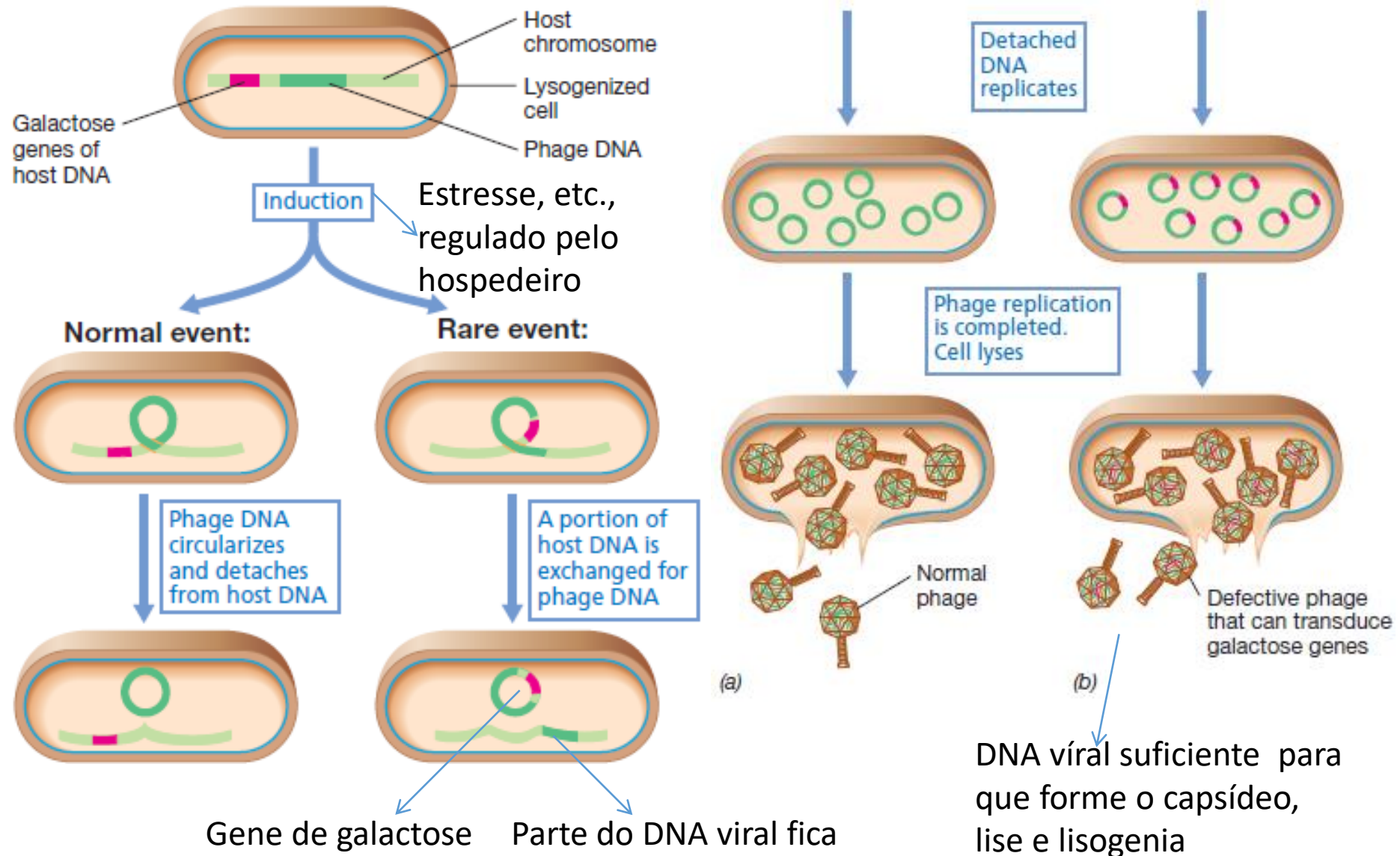
Transdução Generalizada

As enzimas envolvidas no empacotamento do DNA viral empacotam erroneamente o DNA hospedeiro

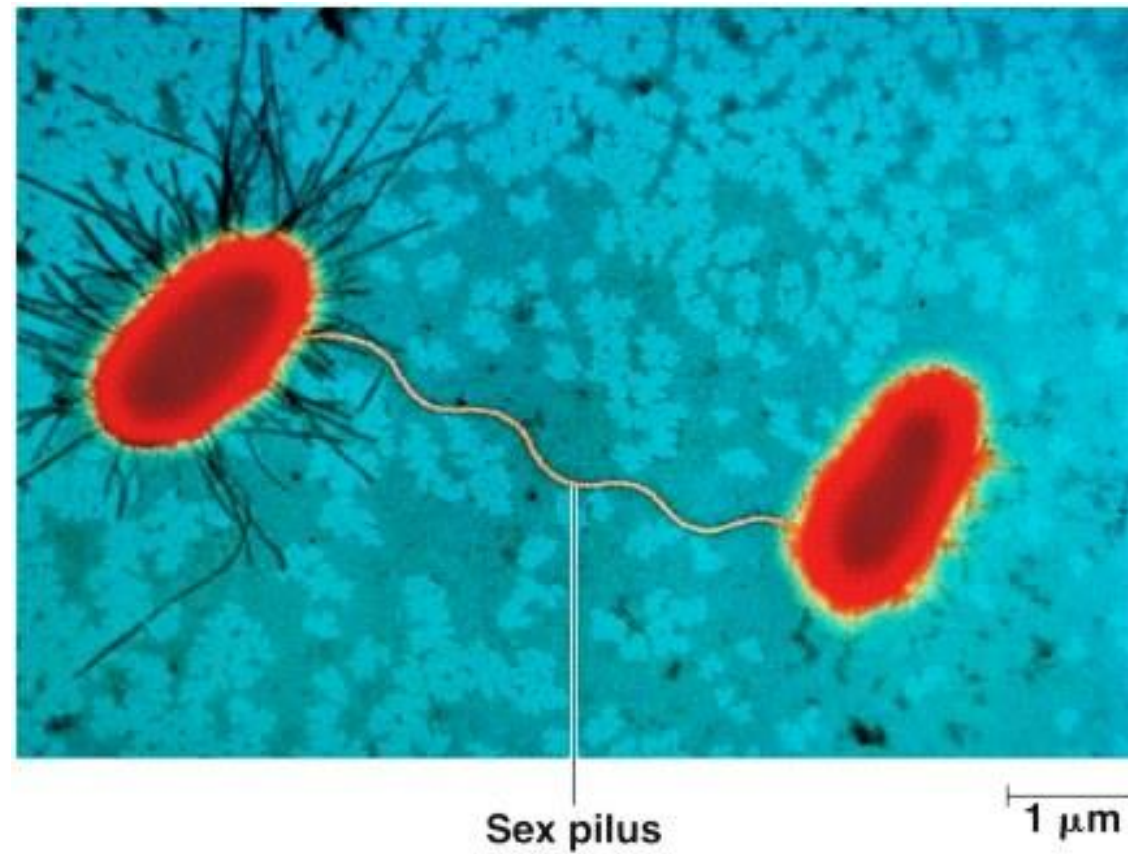


A parcela dos vírus que são partículas transfectoras carregam um fragmento do DNA genômico

Transdução Específica



Conjugação



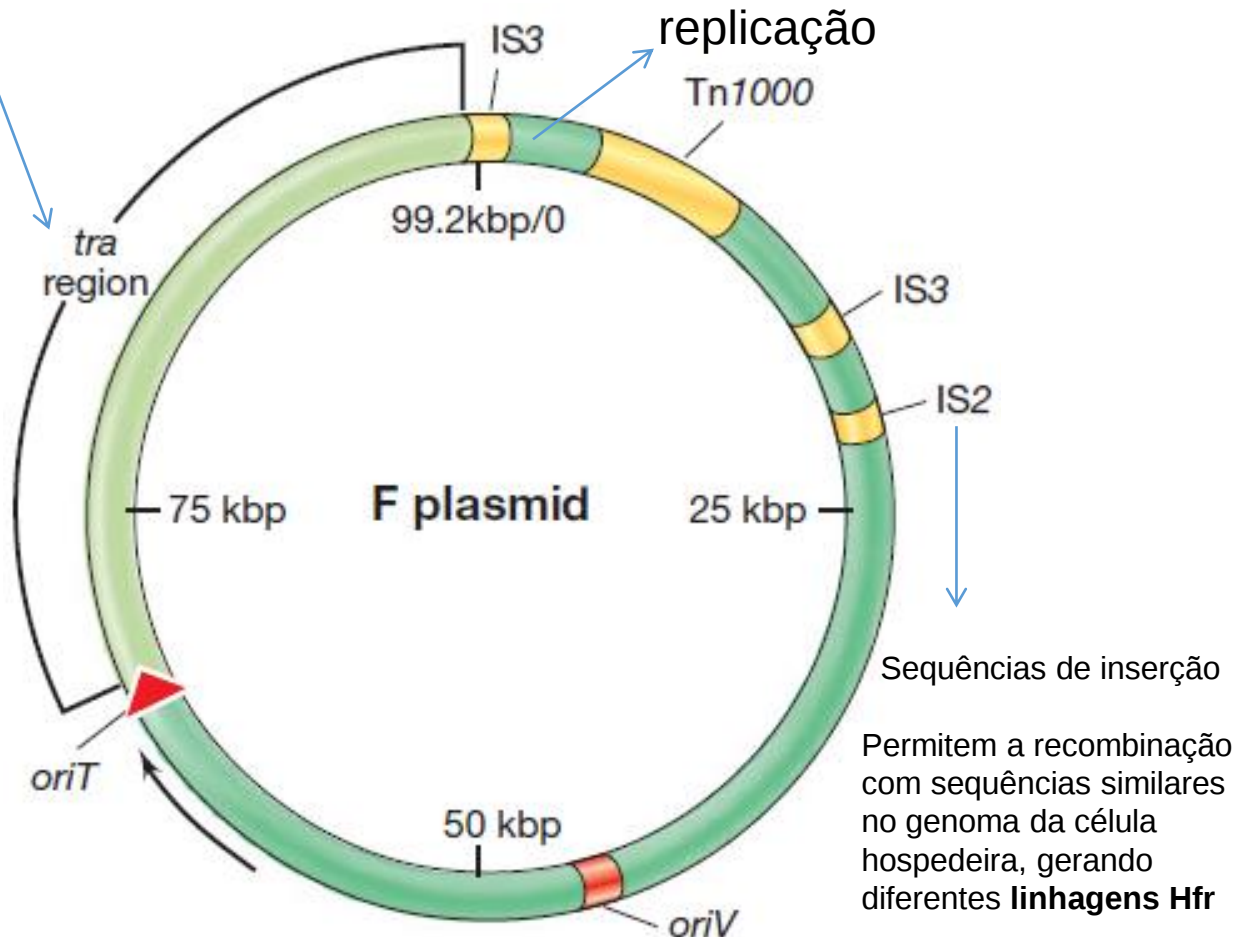
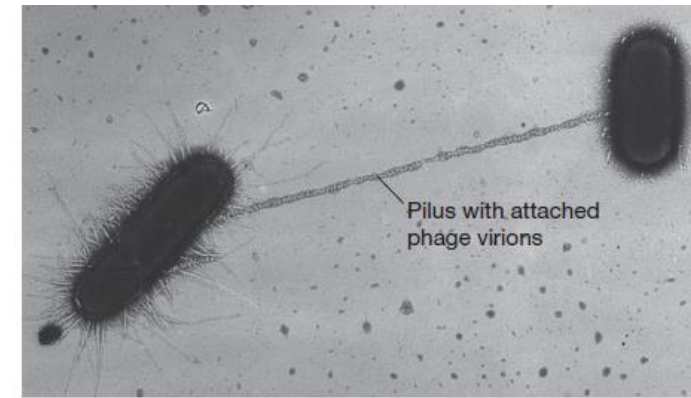
Plasmídeo F

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

Genes envolvidos na formação do par conjugante

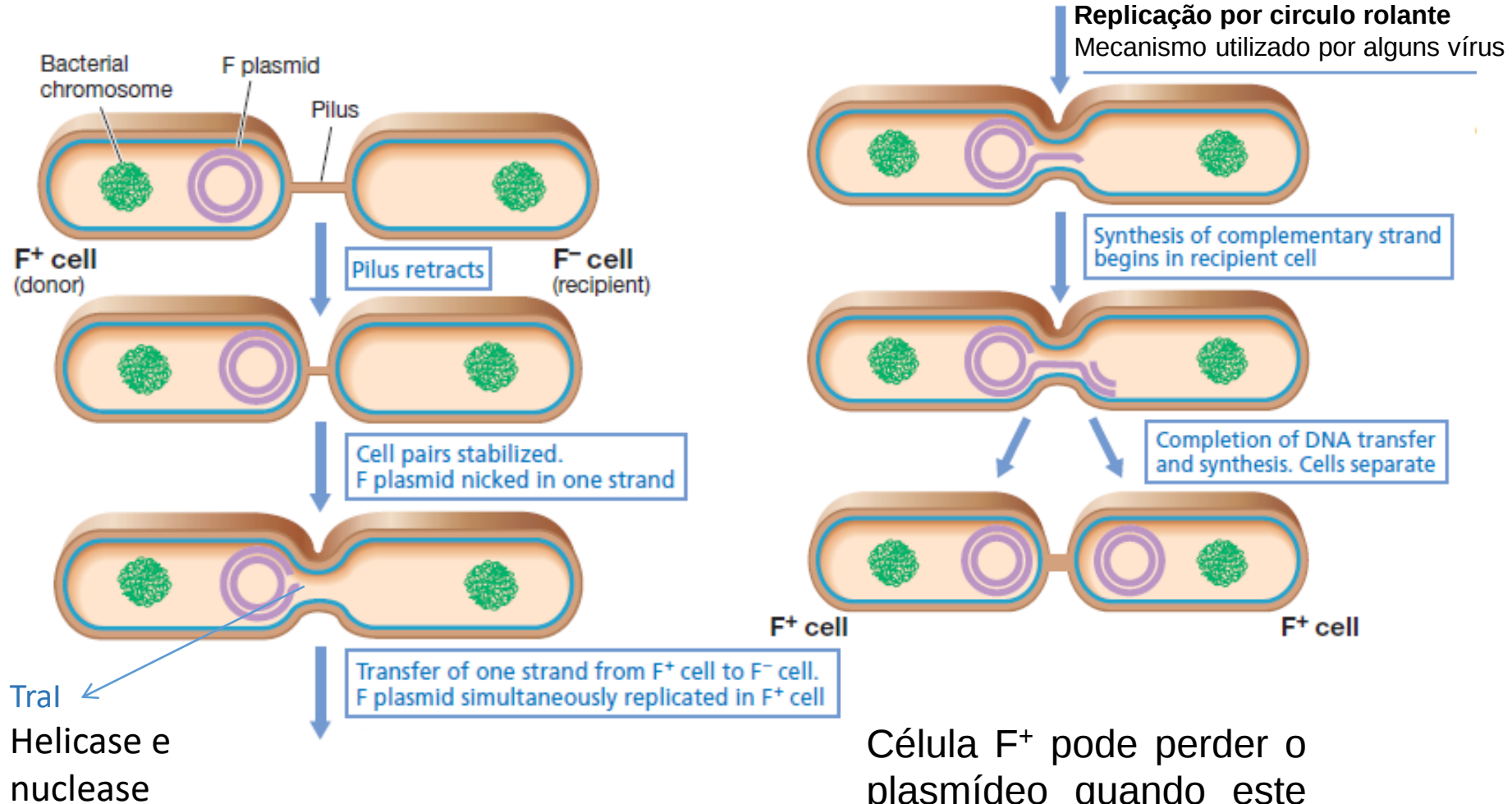
Os plasmídeos podem carregar genes para versões ligeiramente diferentes do pili

Origem de transferência



Transferência do DNA Plasmidial por Conjugação

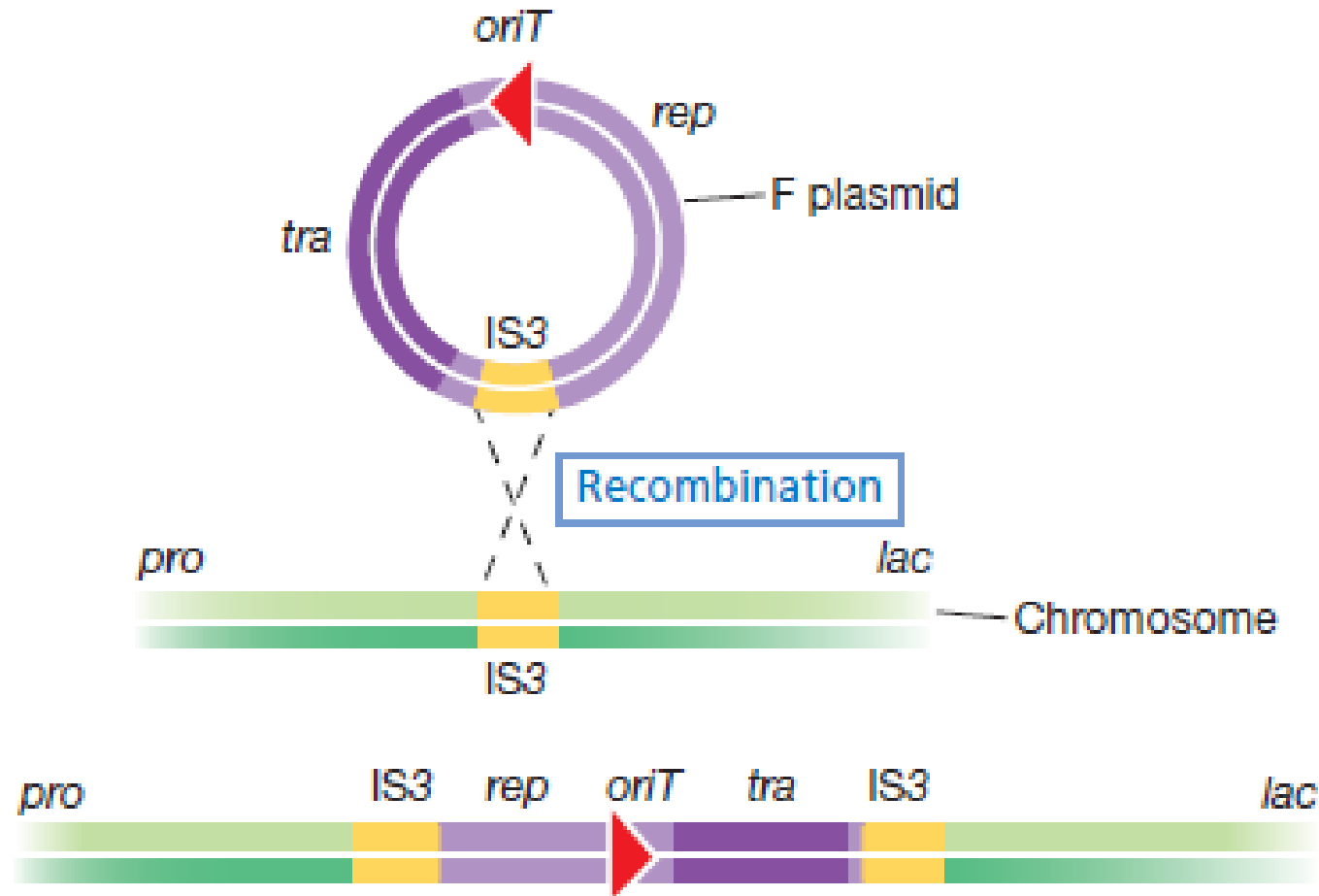
- Processo que leva 5min (plasmídeo de 100 kp)
- Consegue se disseminar rapidamente: **agente infeccioso**



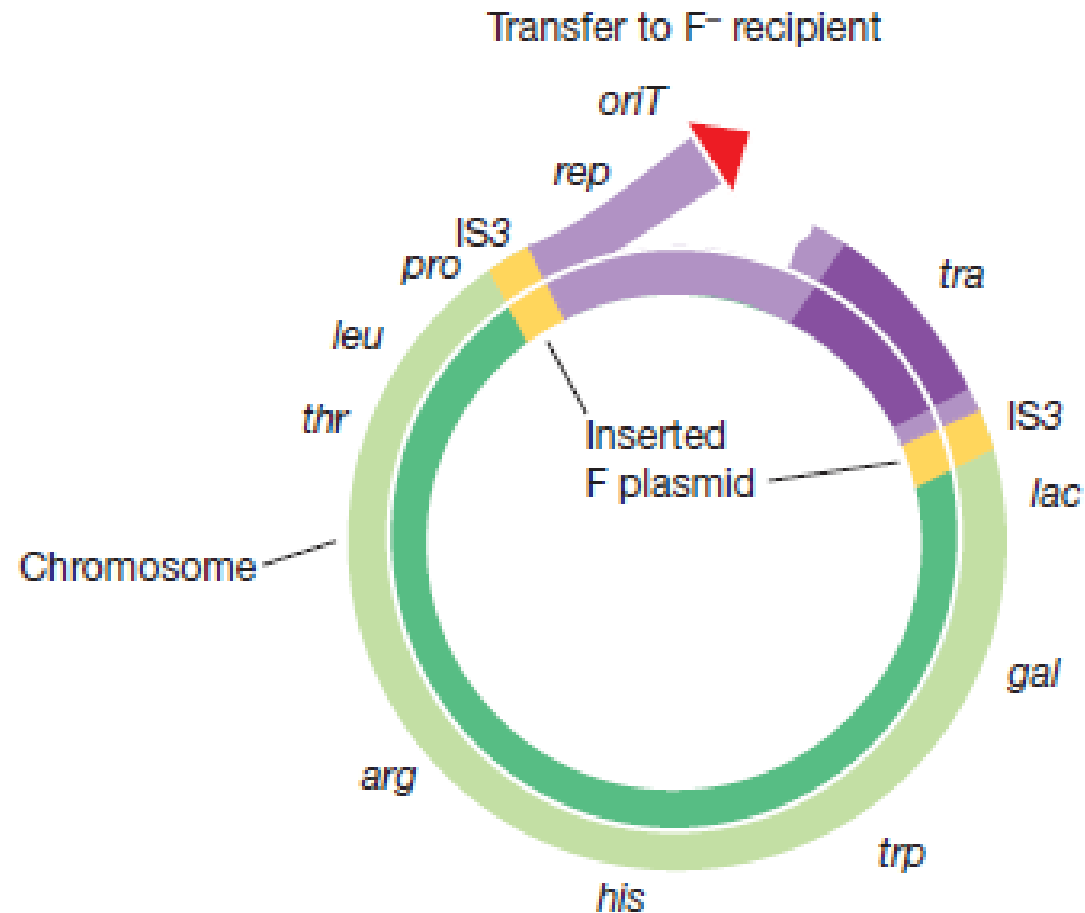
Célula F^+ pode perder o plasmídeo quando este não é mais necessário

Processo de integração do plasmídeo F (Hfr)

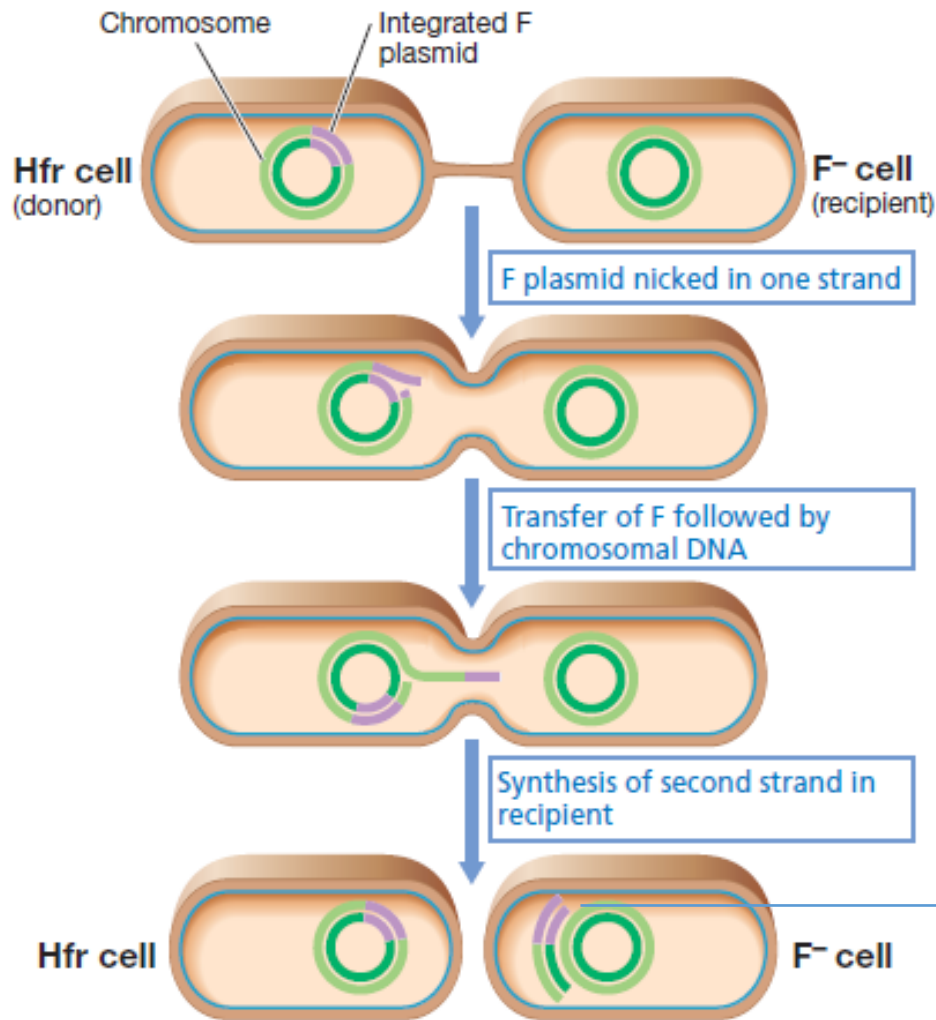
Mobilização Cromossomal: Recombinação Sítio específica



Transferência de genes cromossomais por uma linhagem Hfr



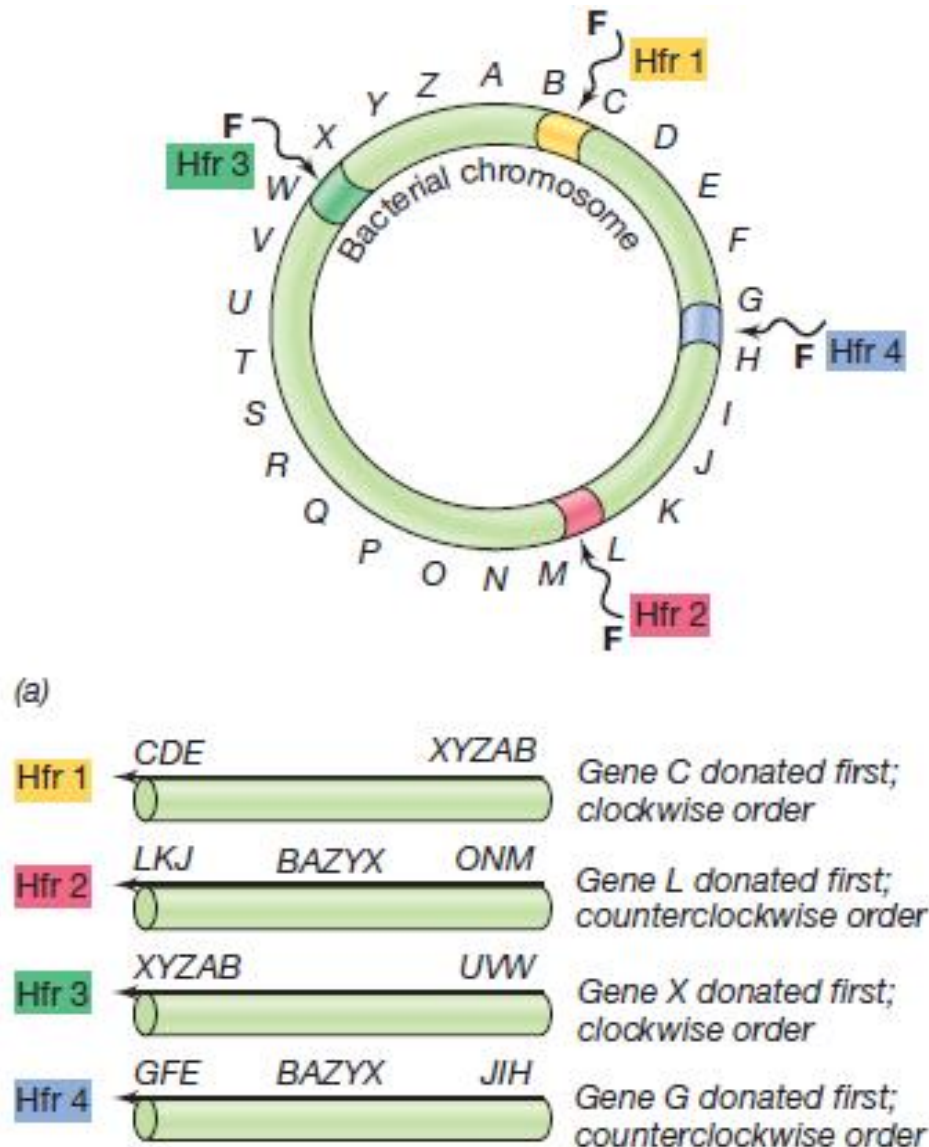
Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação



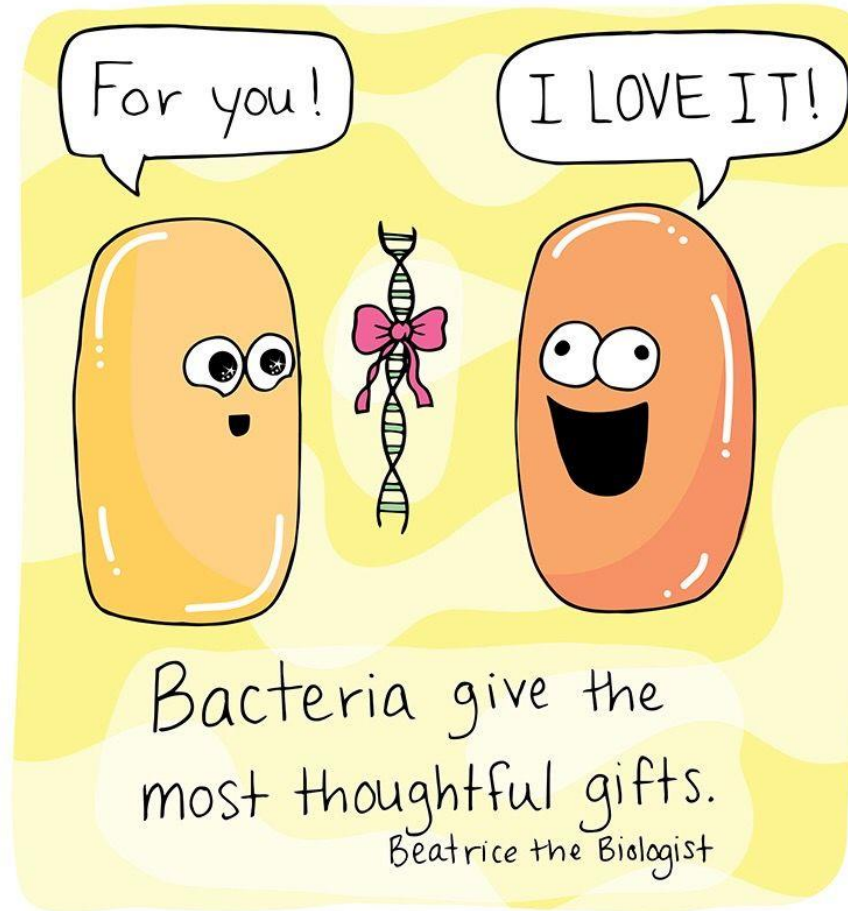
- Hfr: Alta frequência de recombinação
- Plasmídeo F está integrado
- Transferir grandes quantidades de genes
- Receptora não é Hfr: apenas uma parte do plasmídeo F é transferida

→ Tem que ser integrado no cromossomo da célula

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



Bacterial Conjugation

The horrible truth



Pilus censored for decency

