GENOMAS PROCARIOTOS E *LOCUS* RIBOSSOMAL

Aparecida Maria Fontes

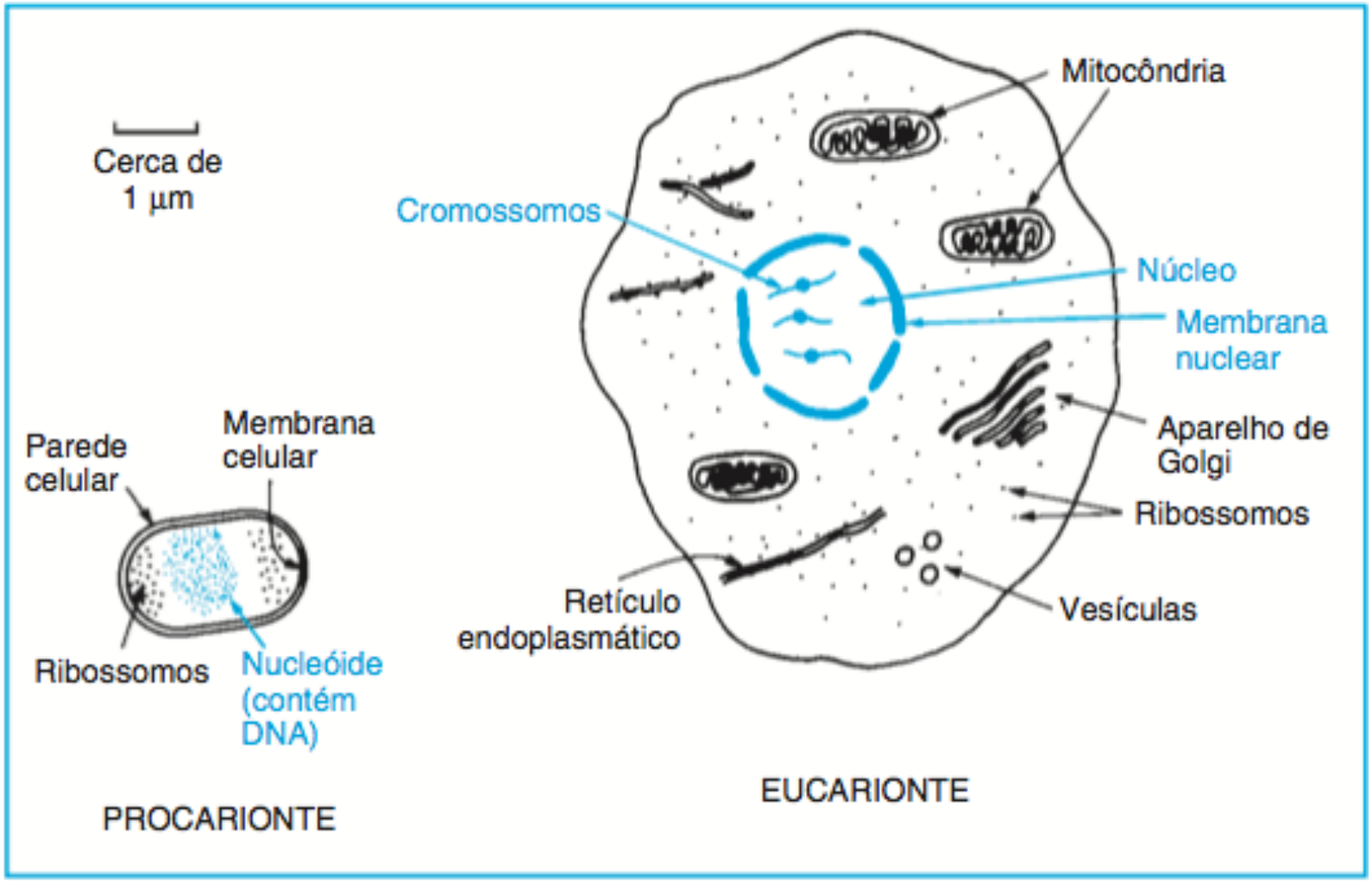
Ribeirão Preto – Fevereiro/ 2019

Conteúdos Principais:

- Organização celular dos procariotos
- Origem da Vida
- Genômica evolutiva
- Grupos de Procariotos e Genomas comparativos
- Transcrição em *E. coli*
- Mecanismo de síntese proteica em *E. coli*
- RNA ribossomal
- Exercícios

Organização celular dos procariontes:

- Uma célula procariótica típica e eucariótica típica



A origem da vida

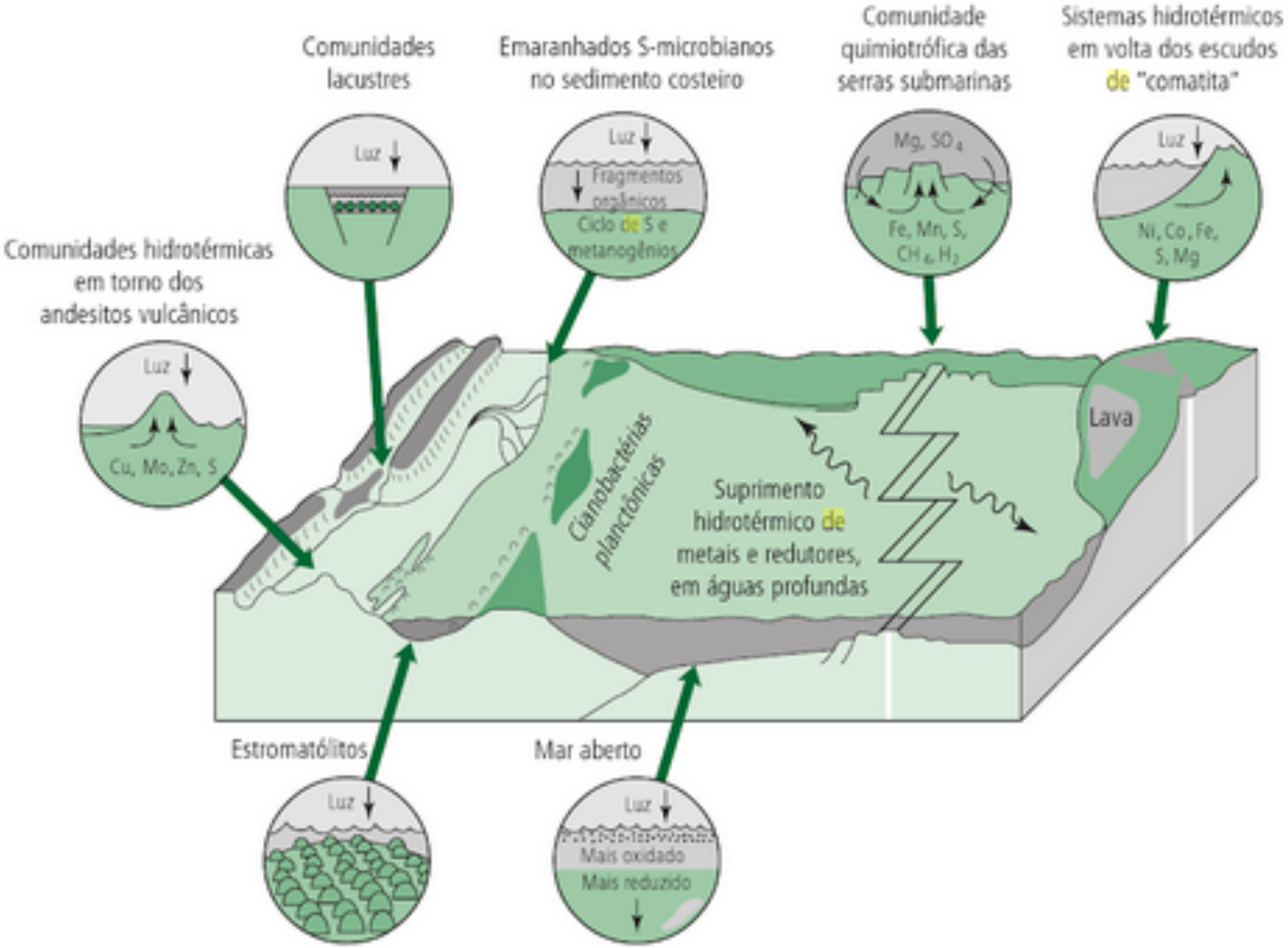
Quando ocorreu a origem da vida na Terra?

- Há 4,5 bilhões de anos.

As evidências fósseis sugerem sobre quando surgiram os primeiros procariotos?

- Fósseis da vida procariótica foram encontrados em vários locais há 3,5 bilhões de anos.

Vida microbiana procariótica em vários ambientes há 2 a 3 bilhões de anos



A origem da vida

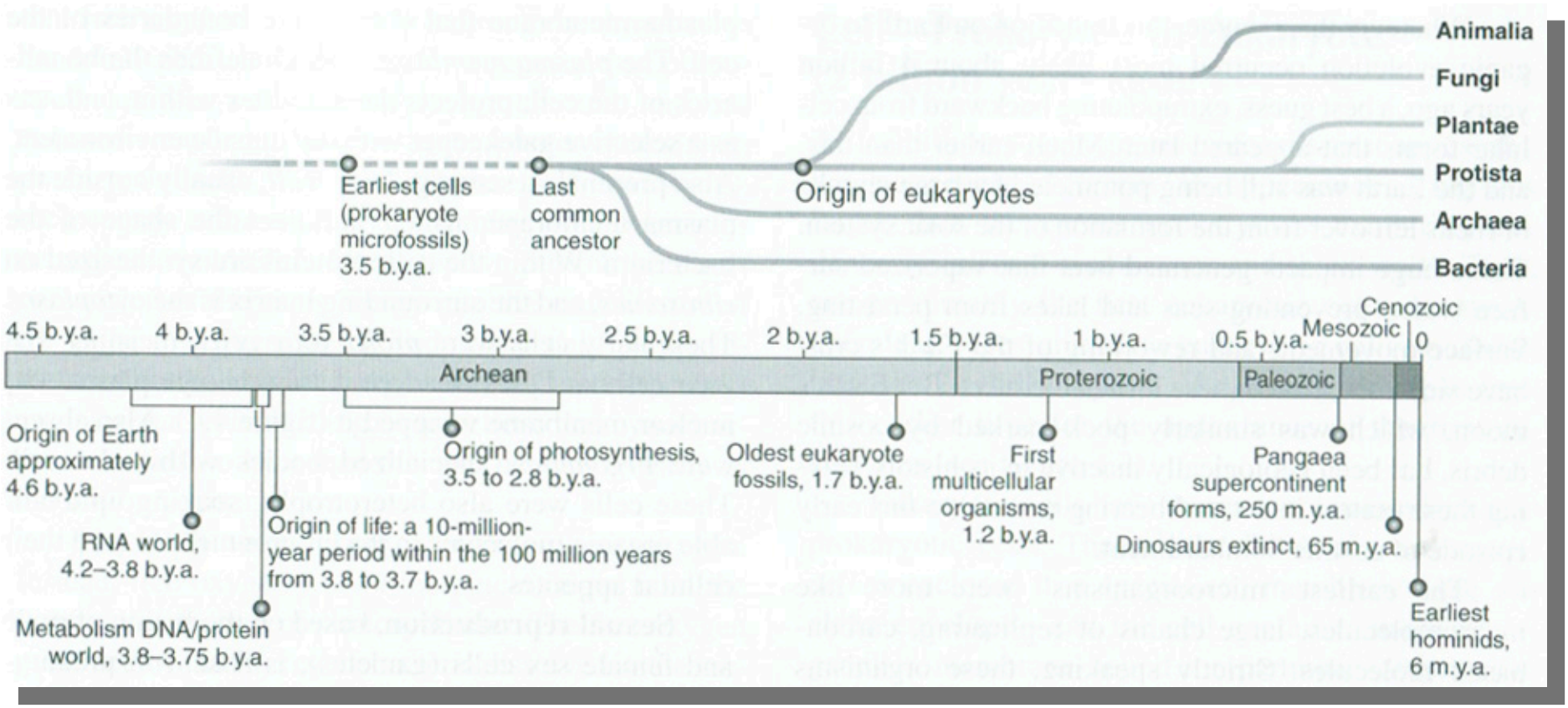
Evidências fósseis sugerem sobre quando ocorreram a origem dos eucariotos?

- Há 2 bilhões de anos.

E a vida pluricelular?

- Há 1,2 bilhão de anos.

A origem da vida



Genômica evolutiva

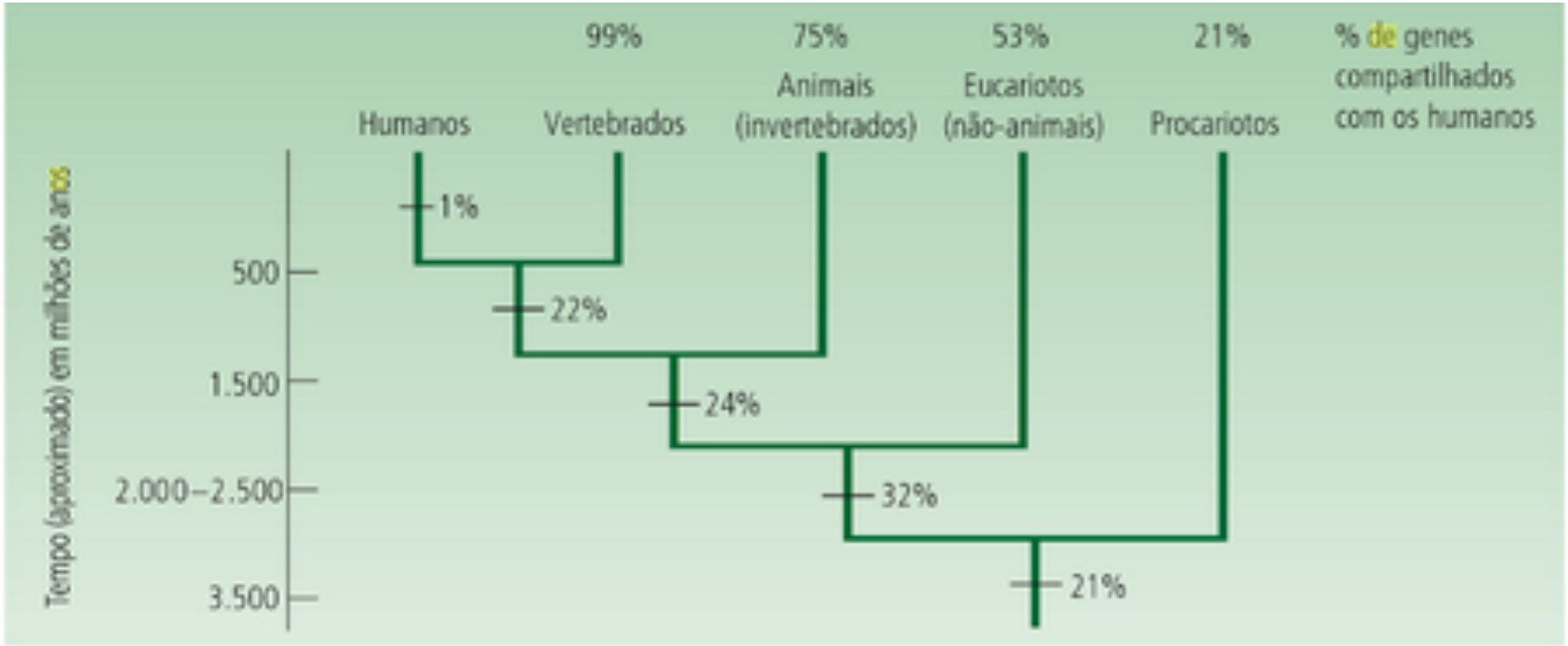
Qual a percentagem de genes humanos são compartilhados com procariotos ?

- 21%.

Qual a percentagem de nossos genes são homólogos aos genes de todos eucariotos, mas não aos de bactéria?

- 32%.

Genômica evolutiva



Genomas procarióticos

Quais os dois principais grupos de procariotos?

- Grupo Bacteria

  > 50 filos

  - Eubactérias (bactérias verdadeiras) tais como *E. coli*
  - Cianobactérias (ou algas azuis esverdeadas)
  - Micoplasma
  - *Rickettsias*

- Grupo *Archea*

  - Metanógenas (ganham energia convertendo hidrogênio e CO2 em metano)
  - Termófilas (vivem em temperaturas elevadas > 50ºC)
  - Halófilas (crescem em concentrações salinas 3.5-4.5 M)

Marcador molecular para estudo filogenia

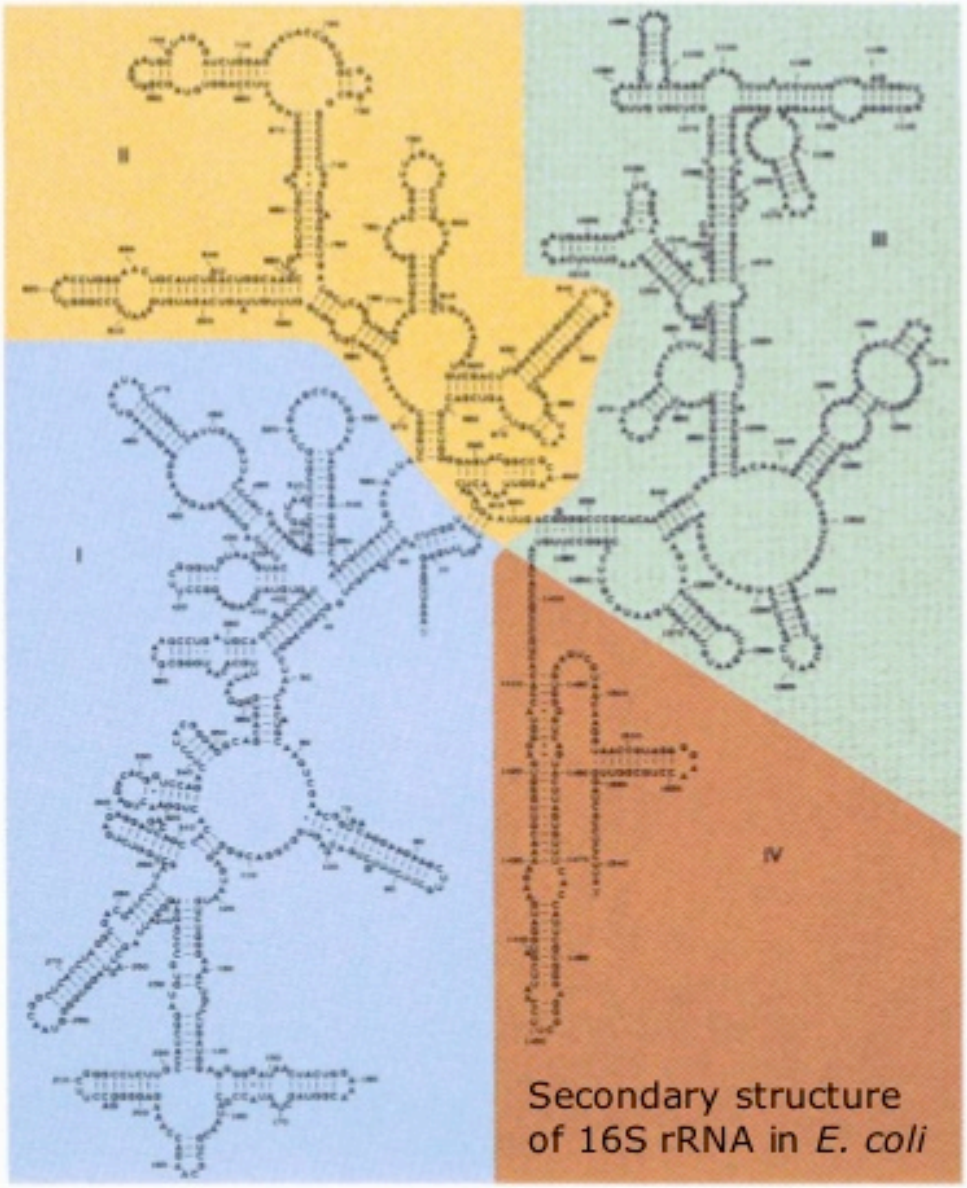
Molecular Phylogenetics

Step 1. Select a DNA region that is *homologous*, or similar across species due to common ancestry.

Ribosomal RNA (rRNA)

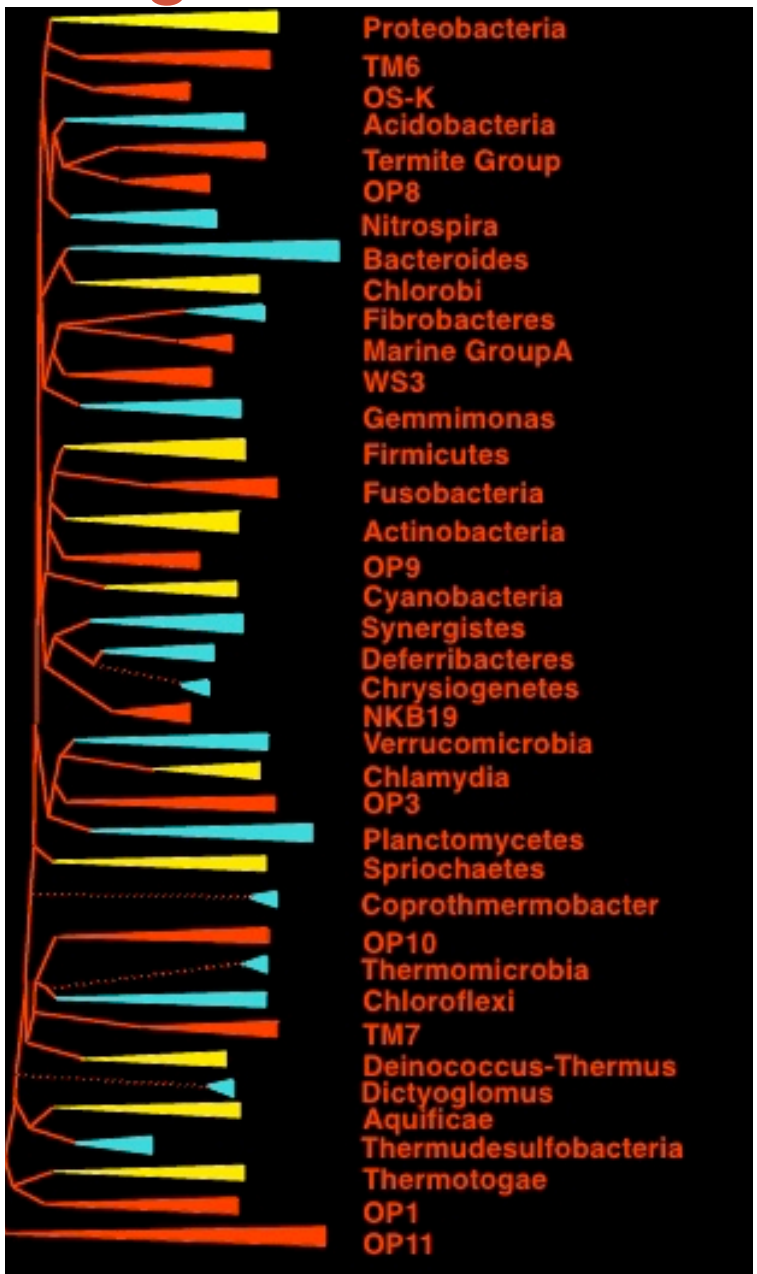
Ideal gene for phylogenetic studies because it :

- is an essential gene that is present in all organisms.
- is a common target for sequencing studies; large database for comparisons.
- contains sites that are relatively conserved (stems) and sites that are more free to vary (loops).



Secondary structure of 16S rRNA in *E. coli*

Filogenia – bacteria



Genoma de *E. coli* K12

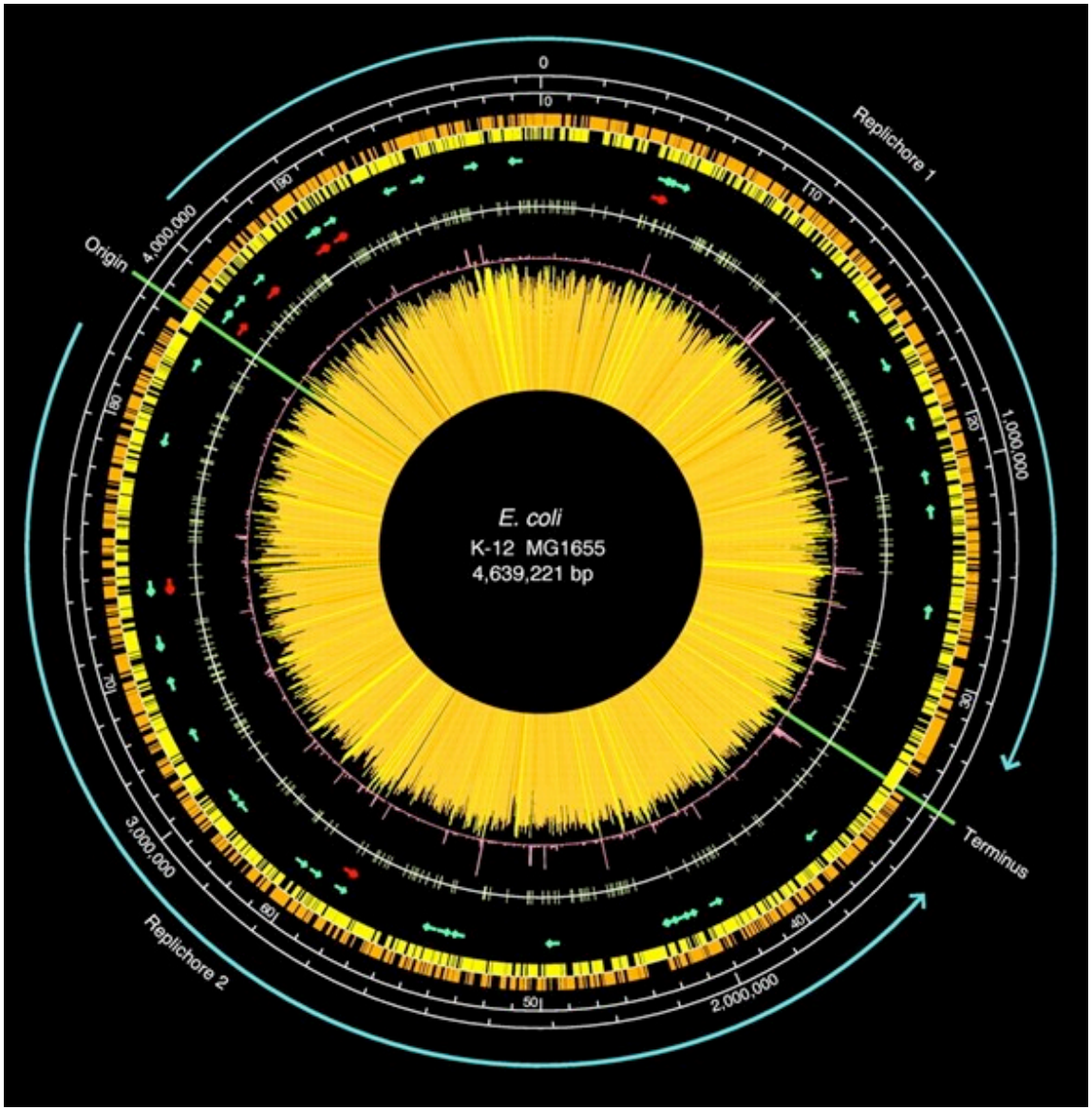
Orange squares
-forward genes

Yellow squares
-complement genes

Red arrows
-rRNA

Green arrows
-tRNA

White ring
-REP sequences



Blattner et al 1995. Science 277:1453

Genoma de Procariotos Comparativos

Espécie	*Comprimento do genoma (kb)*	*Nº de genes para*			
		Proteínas conhecidas	*Proteínas não-identificadas*	*rRNAs*	*tRNAs*
Escherichia coli	4.639	1.897	379	21	84
Haemophilus influenzae	1.830	1.007	736	18	54
Mycoplasma genitalium	580	374	96	3	33
Methanococcus jannaschii [1]	1.739	660	1.078	7	37

Genomas Comparativos de Procariotos

Os genomas de *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*

Os genes codificantes de proteínas identificados nos genomas destas duas bactérias são classificados do seguinte modo:

Função biológica	*Nº de genes em* H. influenzae	M. genitalium
Biossíntese de aminoácidos	68	1
Biossíntese de co-fatores	54	5
Multiplicação celular	16	4
Proteínas do envoltório celular	84	17
Morte celular	5	2
Destoxificação	3	1
Metabolismo energético	112	31
Metabolismo intermediário	30	6
Metabolismo de lipídios	25	6
Biossíntese de nucleotídeos	53	19
Replicação do DNA	87	32
Dobramento de proteína	6	7
Secreção de proteína	15	6
Proteínas regulatórias	64	7
Transcrição	27	12
Transformação	8	1
Tradução	141	101
Captação de moléculas do ambiente	123	34
Outras	93	27

De C.M. Fraser e col. (1995) *Science*, **270**, 397-403.

Grupo Bacteria: mais comuns

Firmicutes e Actinobacteria → **Produtoras de antibióticos**

Proteobacteria →

- **Alphaproteobacteria**
- **Betaproteobacteria**
- **Gammaproteobacteria**
- **Deltaproteobacteria**
- **Epsilonproteobacteria**

Bacterias mais comuns

Firmicutes → ***Bacillus* e *Clostridia***

- ***Clostridia*: tetanus e botulismo**
- ***Lactobacillus*: alimentos fermentados (yogurt)**

Actinobacteria →

- ***Mycobacterium*: tuberculosis**
- ***Propionibacterium*: swiss cheese e acne**
- ***Bifidobacterium*: trato gastrointestinal (suplementos probióticos)**

Proteobacterias

Betaproteobacteria → ***Neisseria*: gonorrhea**

Gammaproteobacteria → ***Enterobacteriacea*: *E. coli***

Epsilonproteobacteria → ***Helicobacter*: ulcera**

TRANSCRIÇÃO GÊNICA

Em procariotos

Transcrição gênica

Como se chama a reação química subjacente à transcrição?

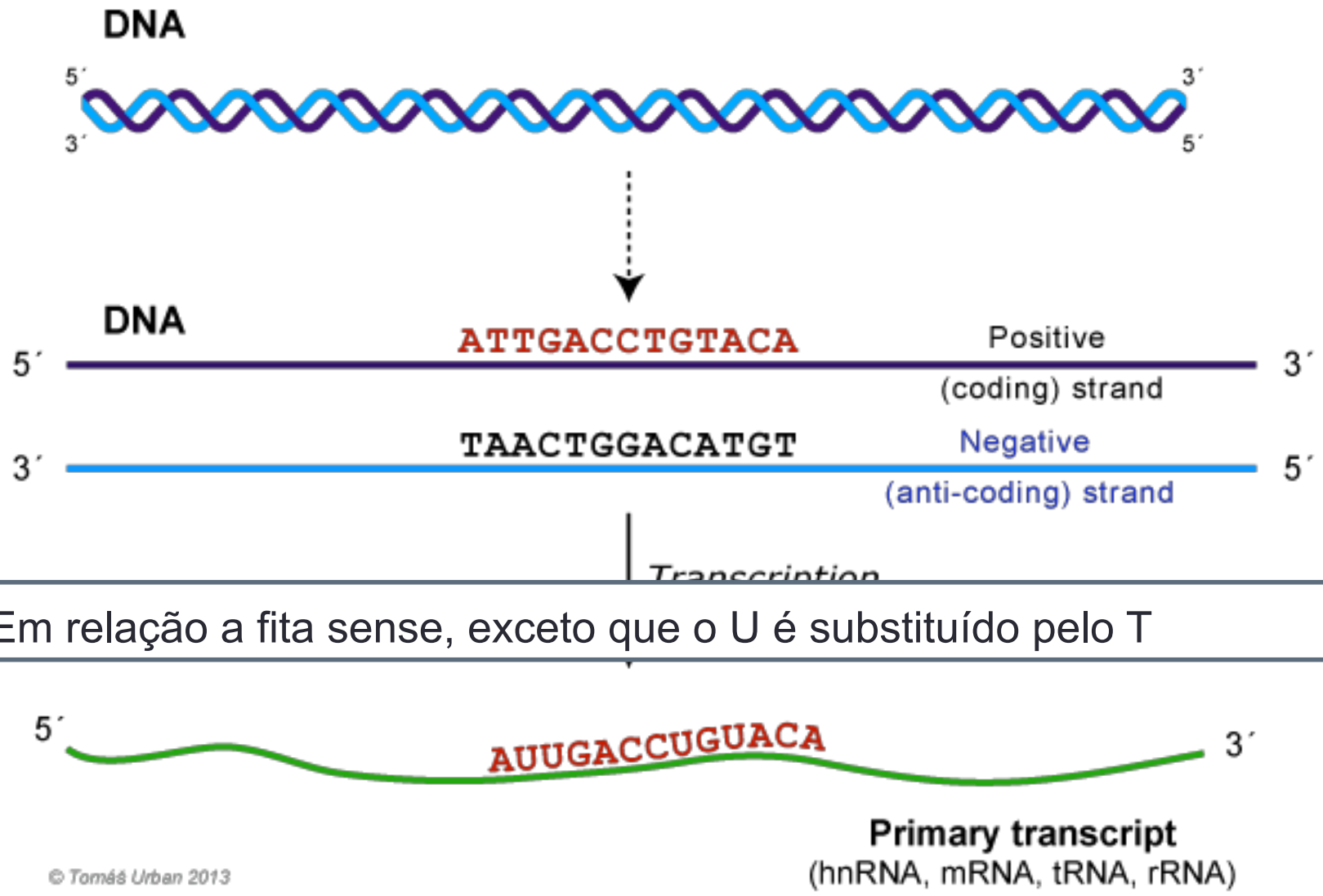
- ❑ Síntese de RNA.

Como é o nome da molécula que catalisa essa reação?

- ❑ RNA polimerase.

- **Transcrito primário é idêntico em termos de sequência de base, com exceção que o U está no lugar do T, em relação a qual fita de DNA?**

Transcrição gênica

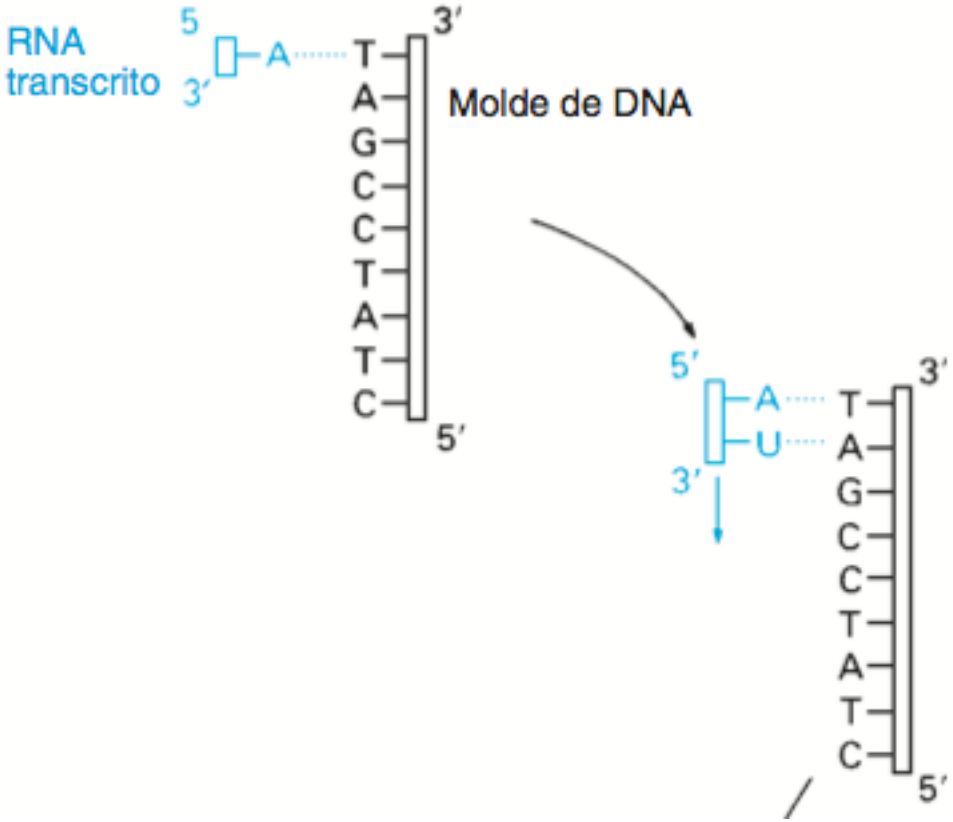


- Em relação a fita sense, exceto que o U é substituído pelo T

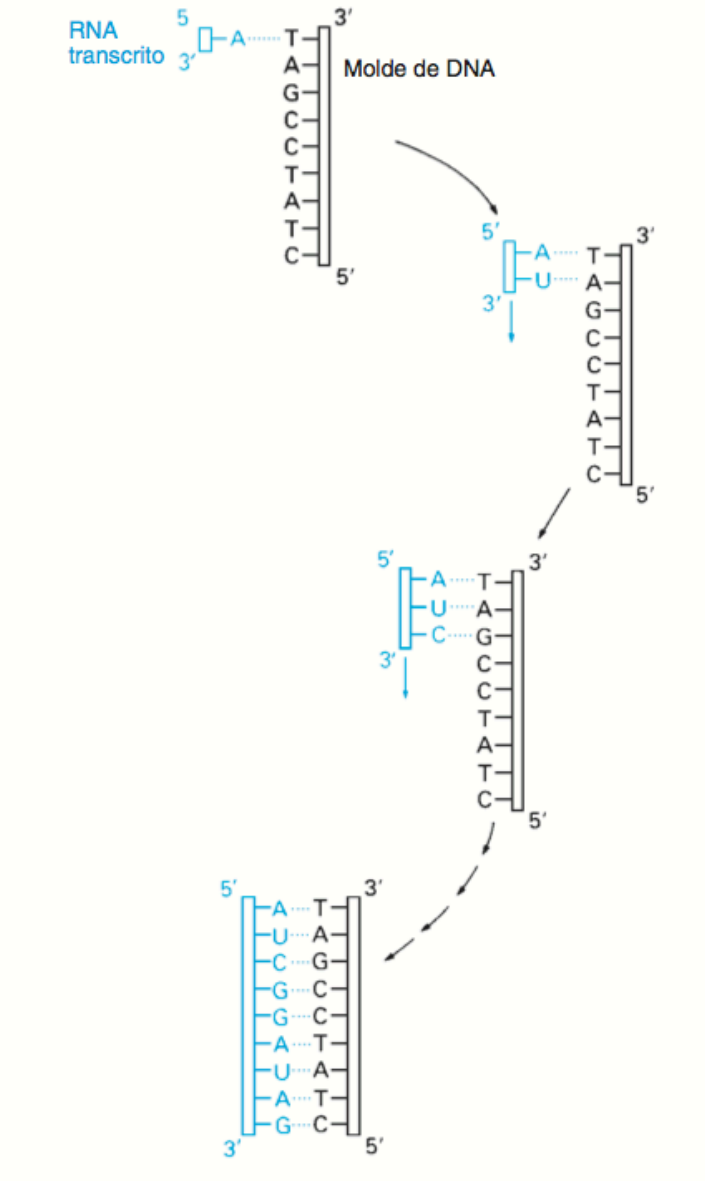
Transcrição gênica

Durante a transcrição, a síntese de RNA é feita a partir da fita sense ou antisense ?

- A fita antisense é lida no sentido 3'- 5' e a síntese de RNA ocorre no sentido 5'- 3'.



Transcrição gênica



Região Promotora

Em procariotos, qual a principal característica da região promotora?

- Contém duas sequências conservadas: uma distante -35 bp e outra (denominada Pribnow boxe) distante a -10bp do sítio de início de transcrição.

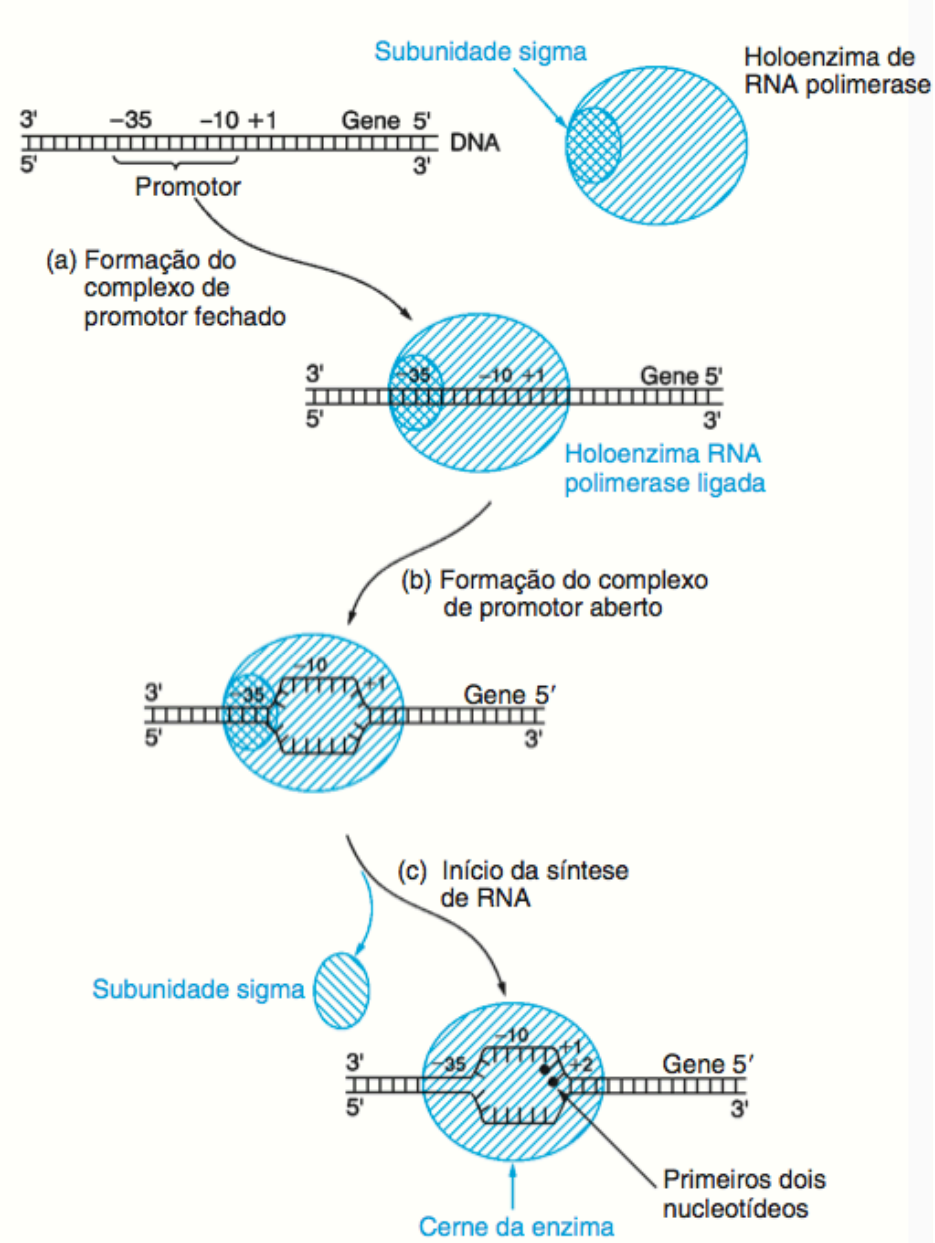
–35	5′-TTGACA-3′
–10	5′-TATAAT-3′

REGIÃO PROMOTORA

Sequências de alguns dos promotores reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli*

Gene	*Seqüência −35*	*Seqüência −10*
Consenso de *E. coli*	TTGACA	TATAAT
Óperon *lac*	TTTACA	TATGTT
Óperon *trp*	TTGACA	TTAACT
Genes de tRNA	TTTACA	TATGAT

Transcrição em procariotos



TRADUÇÃO: A SÍNTESE PROTEICA

Em procariotos

Tipos de moléculas de RNA

Quais os tipos de moléculas de RNA produzidas por transcrição?

- RNA codificador:
  - RNA mensageiro
- RNA não codificador:
  - RNA ribossômico
  - RNA transportador
  - RNAs reguladores

Do que são constituidos os ribossomos?

- RNAr e proteinas

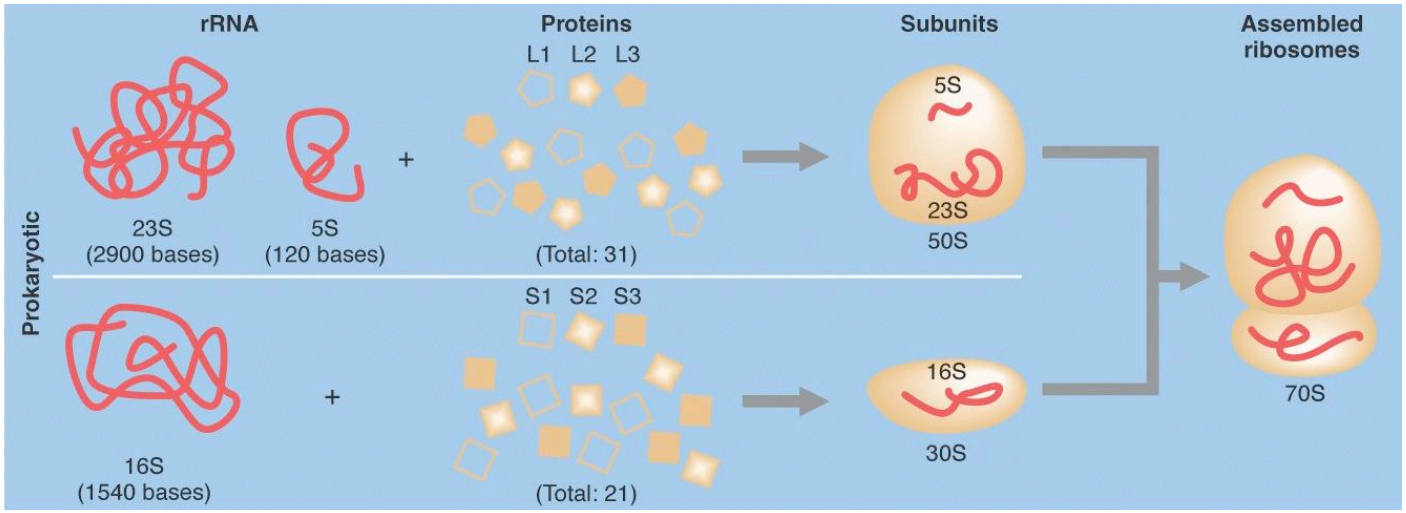
Ribossomos em procariotos

Onde as células realizam a síntese proteica?

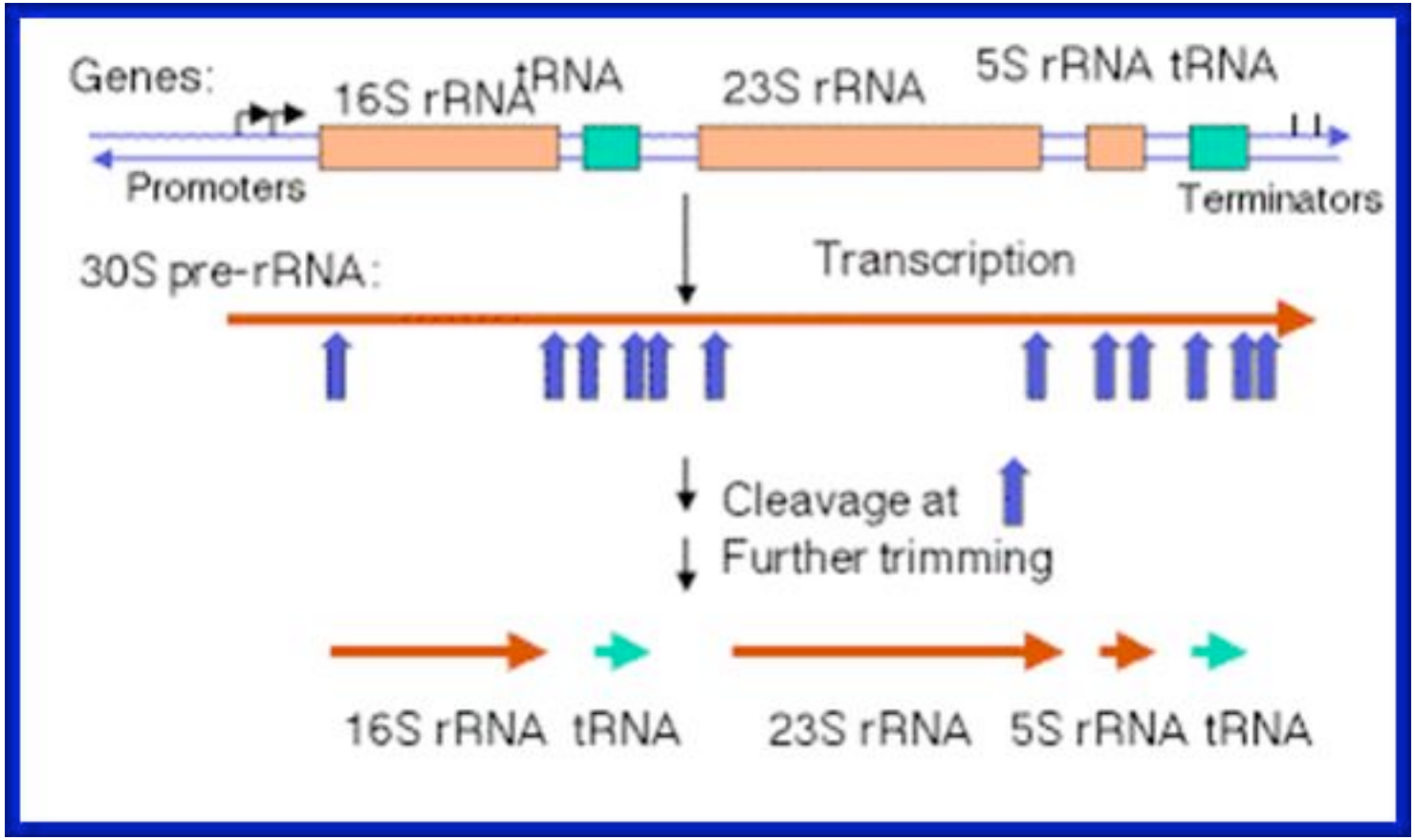
- Nos ribossomos.

Como são constituídos os ribossomos?

- RNAs ribossômicos.
- Proteínas ribossomais.



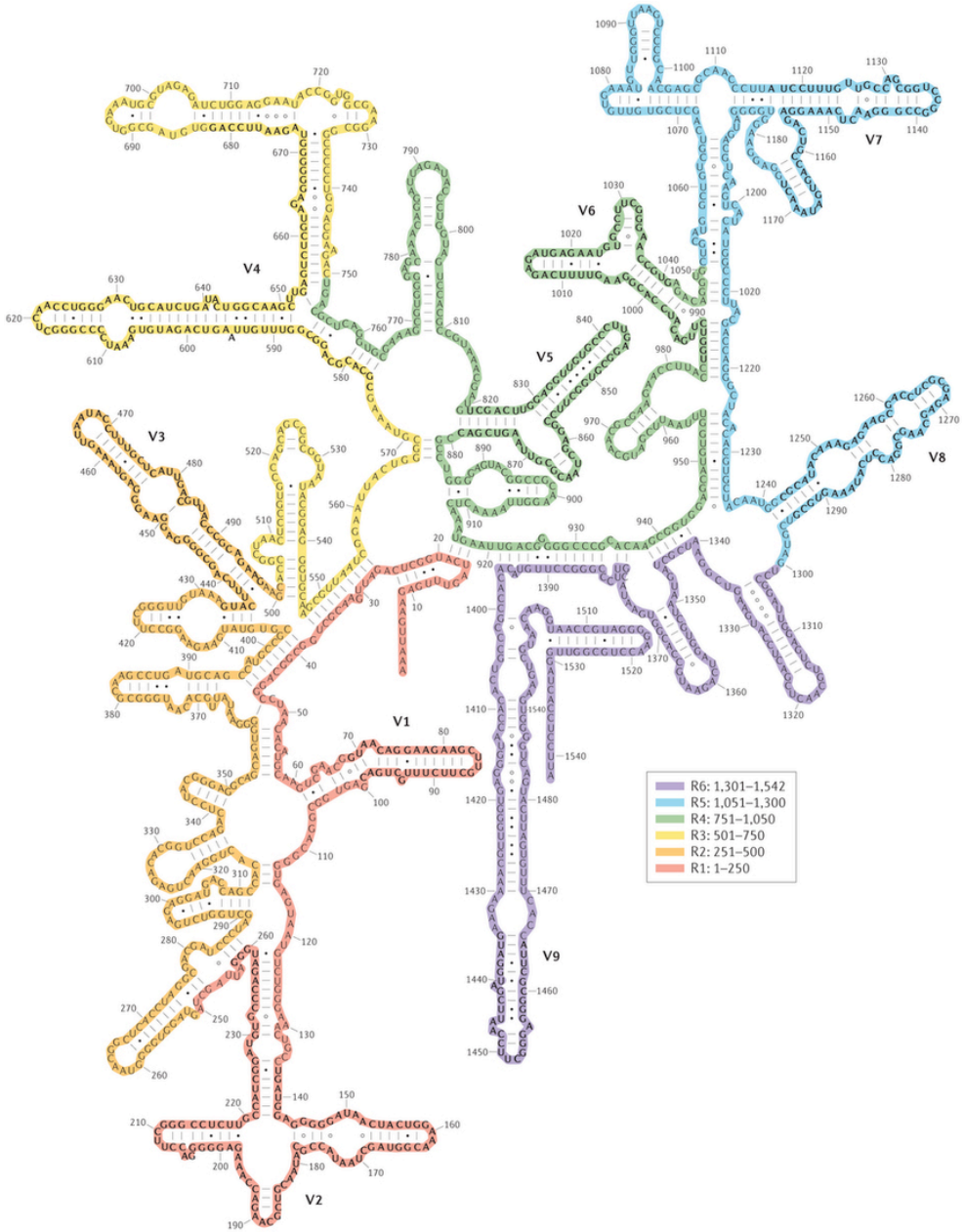
Gene de rRNA em procarioto



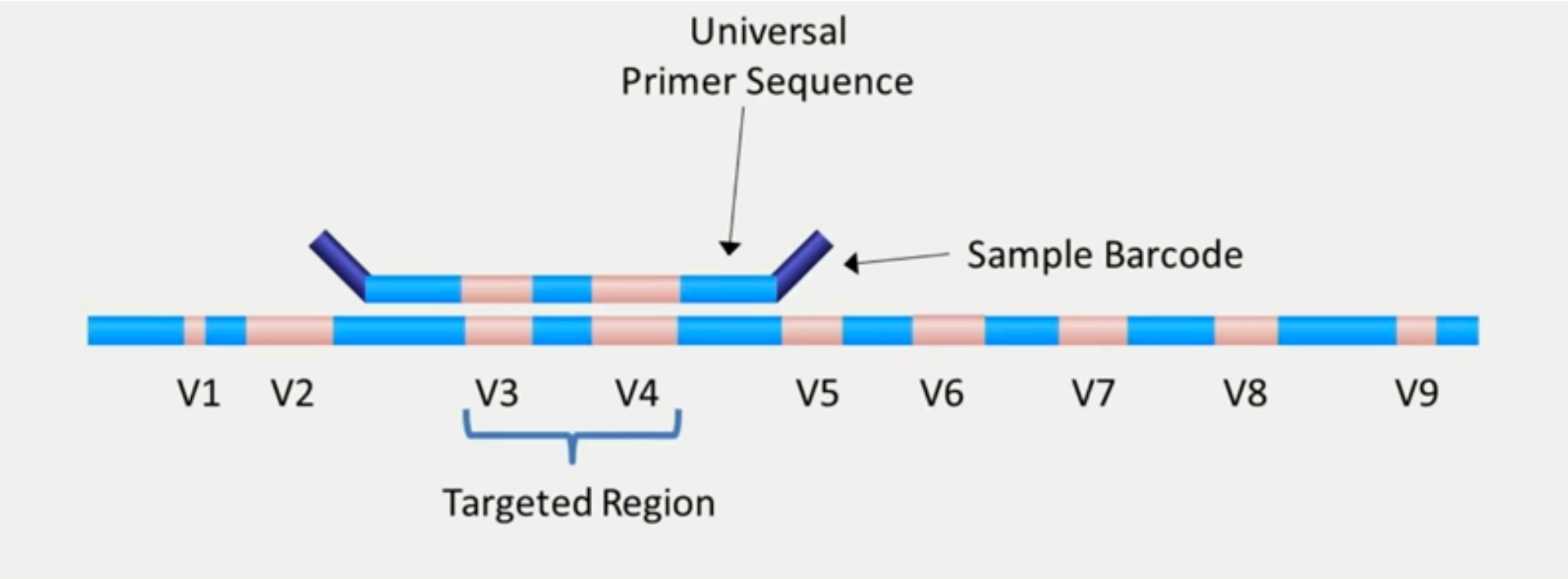
Genomas Comparativos

Microorganism	Chromosome (kbp)	Plasmid (kbp)	Genome (kbp)	rRNA
Escherichia coli K12 MG1655*	4640	-	4640	7
Haemophilus influenzae Rd*	1830	-	1830	6
Burkholderia cepacia ATCC 25416	3650 +3170 + 1070	200	8090	4+1+1
Agrobacterium tumefaciens	3000 + 2100 (L)	200, 450	5750	1+1
Rhizobium meliloti	3400	1340, 1700	6440	3
Rhodobacter sphaeroides	3045 + 915	31, 42, 63, 97, 105, 110	4408	1+2
Thiobacillus cuprinus	3800	50 (L)	3850	1
Myxococcus xanthus	9455	-	9455	4
Bacillus subtilis *	4215	-	4215	10
Mycoplasma genitalium *	580	-	580	1
Bacillus cereus Fo837/76	2400	40, 230, 260, 360, 760, 960	5010	3
Streptomyces coelicolor	8000 (L)	350 (L)	8350	6
Synechocystis sp. strain PCC 6803*	3820	2.2, 5.2, 50, 100	3977	2
Borrelia burgdorferi B31*	910 (L)	9-53 (L and C)	>1250	2
*Methanococcus jannaschii**	1660	16, 58	1734	2
Haloferax volcanii	2920	6.4, 86, 442, 690	4144	2

RNA ribossomal 16S em *E. coli*



Sequência gênica: RNA ribossomal 16S



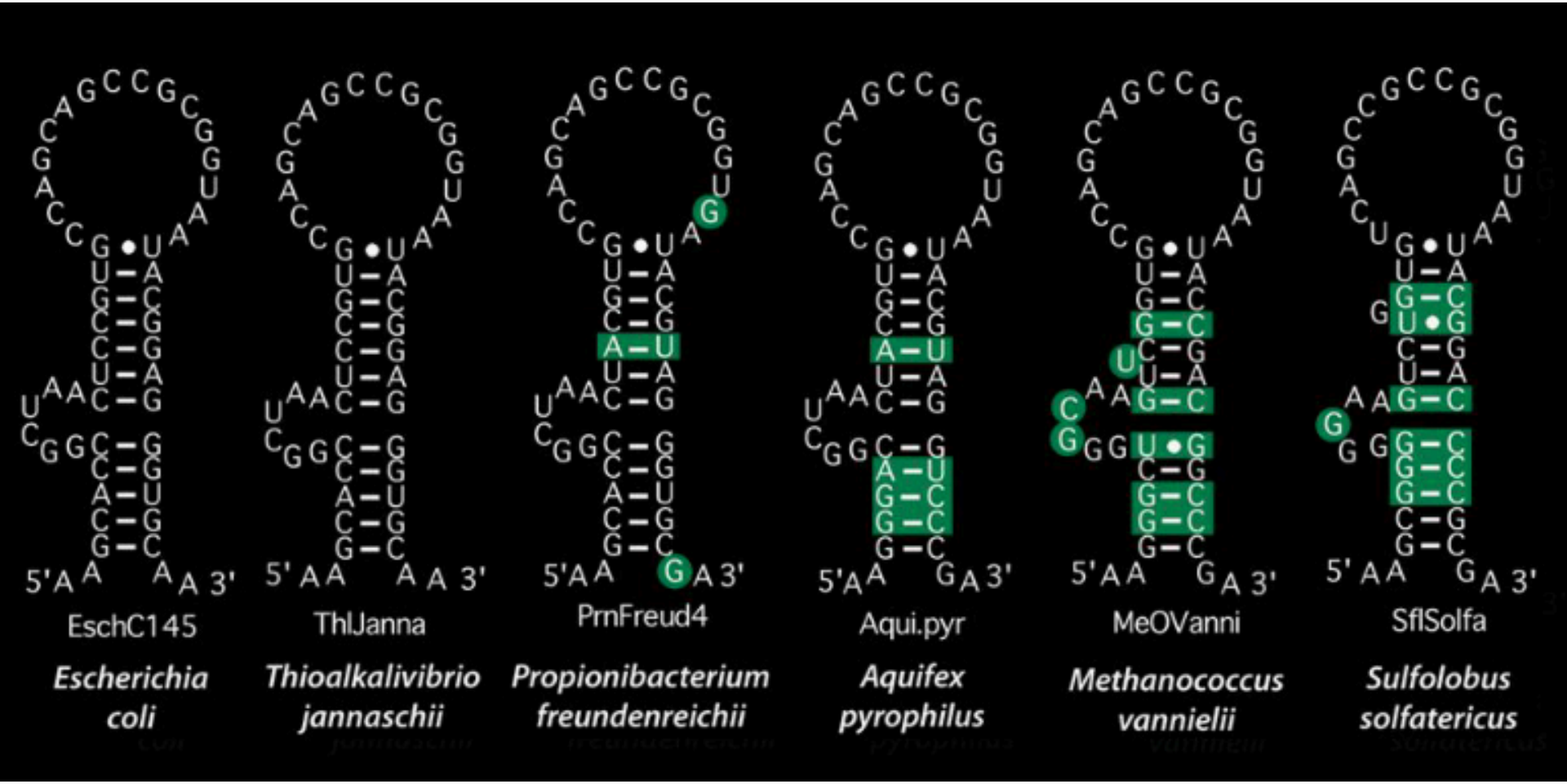
Sequência gênica: RNA ribossomal 16S

KEY: **totally conserved** **conserved** variable highly variable > 75% variable

variable regions priming sites

```
                10        20        30        40        50        60
AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGT
                80  E8F  E9F  100       110       120       130
AACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT
                150  V1   160       170       180       190       200
GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTC
                220       230       240  V2   250       260       270
GGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC
                290       300       310       320       330       340
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAC
                360       370       380       390       400       410  E334/41F
```

Genoma Comparativos: região variável 16S em 6 espécies



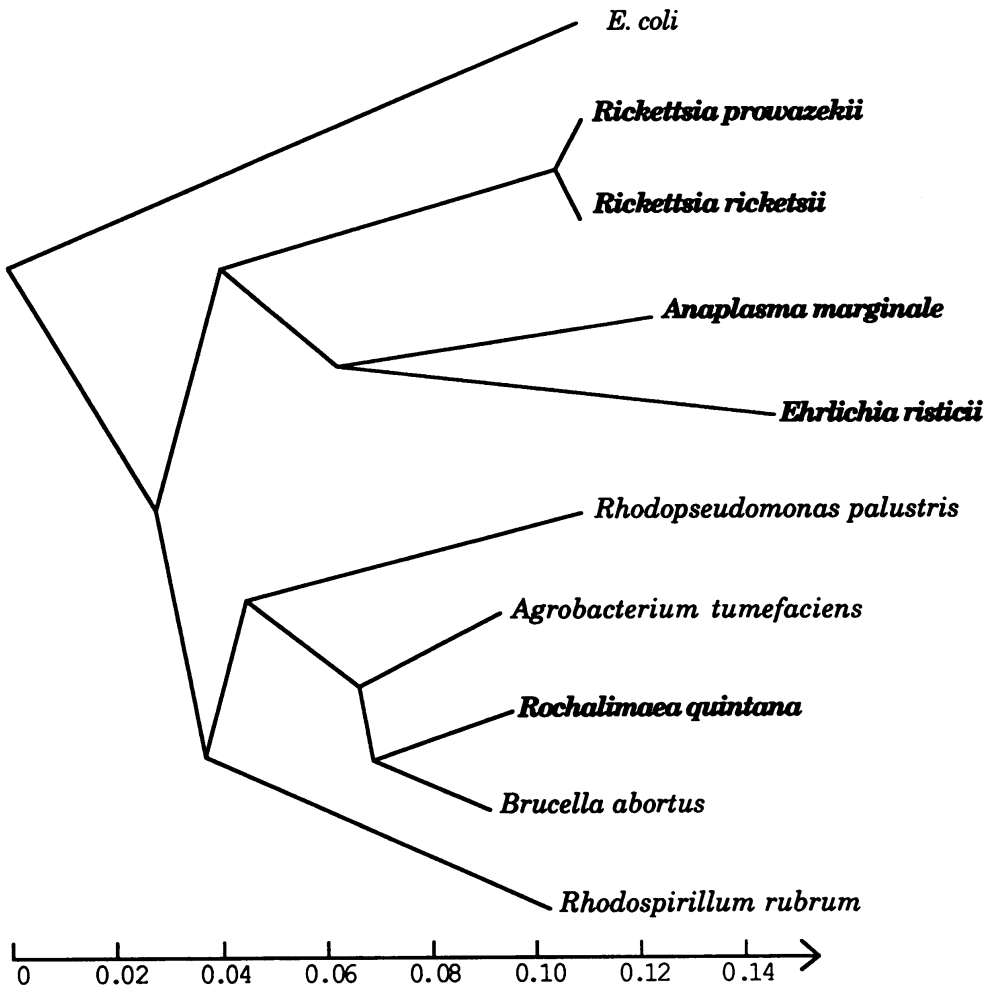
Primer “universal” e archeia-específico 16S rRNA gene

“Universal” and Archaea-specific 16S rRNA gene sequence/PCR primers

Code	Pub spec.	Sequence 5′–3′	N	Tm	Matches	EK1	EK2	EK3
A1F	A+	ATTCCGGTTGATCCTGC	17	49	89	+	–	++
A2Fa	A+	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	20	60	215	+	+	+++
A2Fb	A+	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	20	61	189	+	+	++
A3Fa		TCCGGTTGATCCYGCCGG	18	56	265	+	+	+++
A3Fb		TCYGKTTGATCCYGSCRGAG	20	61	263	+	++	+++
N3F	N+	TCCCGTTGATCCTGCG	16	52	1	–	–	–
EK4F		CTGGTTGATCCTGCCAG	17	49	1483	–	–	++
A109F		ACKGCTCAGTAACACGT	17	46	512	+	+++	+++
Kb228F	K/A	GAGGCCCCAGGRTGGGACCG	20	66	8	+	–	–
Eb246F	A+B+	AGCTAGTTGGTGGGGT	16	45	3021	–	–	–
A333F	A+	TCCAGGCCCTACGGG	15	51	495	+	+++	+++
A340F	A+	CCCTACGGGGYGCASCAG	18	60	766	++	+++	+++
U341F		CCTACGGGRSGCAGCAG	17	54	16776	++	+++	+++
A344F	A+	ACGGGGTGCAGCAGGCGCGA	20	68	709	++	+++	+++
Kb366F	K/A	CTCCGCAATRCGCGMAAG	18	53	24	+	+	–
U515F	A+B+	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	19	60	18695	++	+++	+++

Qual o objetivo do uso do primer “universal” do locus 16S rRNA?

Distância filogenética entre as espécies



Weisburg et al 1991, *J.Bacter.* 173:697

Exercícios

1. Desenhar um conjunto de *primers* para amplificar a região constante do 16S rRNA de cinco espécies de bactérias:

2. Determinar se o *primer* "universal" tem 100% homologia com 5 procariotos:
Forward primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e
Reverse primer (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') *in* **Weisburg et al 1991**

3. Obter as informações para a tabela abaixo:

	sequência	Tamanho amplicon	Tm	Homologia com primer universal
Primer Forward				
Primer Reverse				

Sites ou softwares

(A) Primer 3

(B) Snap gene

(C) Genious

(D) Primer show

(E) NEB Tm calculator

(F) EMBL gene

(G) NCBI gene

Passos

(1) Selecionar uma espécie de bactéria;

(2) Obter a sequência do RNA ribossomal específico: NCBI gene ou EMBL gene;

(3) Salvar no formato FASTA;

(4) Verificar se os *primers* universais (*forward* e *reverse*) apresentam homologia com o locus 16S rRNA da espécie selecionada: sites: "*primer show*" e "*NCBI align two sequences*";

(5) Caso afirmativo obter o tamanho do *amplicon;*

(6) Obter a sequência dos *primers*: snap gene ou primer 3 e comparar com a região de amplificação utilizando os *primers* universais;

(7) Verificar o tamanho do *amplicon* utilizando os *primers* "não universais"

(8) Determinar as temperaturas de *melting* e de *annealing* para amplificação da sequência 16S: Comparar as temperaturas com o cálculo manual e os valores disponíveis no *site* NEB Tm calculator

Questões

Qual o tamanho do gene que codifica o 16S ribossomal do procarioto selecionado?

Os *primers* universais apresentam homologia?

Qual o tamanho do *amplicon* utilizando os primers universais?

Qual o tamanho do *amplicon* utilizando os primers não universais?

Quais as diferenças dos tamanhos dos *amplicons* entre as 5 espécies?

EXEMPLO: *Clostridium botulinum*

Results for 1502 residue sequence "mRNA /gene="16S ribosomal" (Clostridium botulinum)" "AGAGTTTGAT".

```
   1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' PF_U
   1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGC
  61 GATGAAACTTCCTTCGGGGAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
 121 TGCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATATAAGAGAA
 181 TCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
 241 GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 301 CCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
 361 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTA
 421 AAGCCCTGTTTTCTAGGACGATAATGACGGTACTAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACG
 481 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAG
 541 GGTGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCA
 601 TTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAA
 661 ATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACG
 721 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 781 ACGATGGATACTAGGTGTAGGGGGTATCAACTCCCCCTGTGCCGCAGTTAACACAATAAG
 841 TATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 901 ACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGACTTGA
 961 CATCCCTTGCATAGCCTAGAGATAGGTGAAGCCCTTCGGGGCAAGGAGACAGGTGGTGCA
1021 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCT
1081 TGTTATTAGTTGCTACCATTAAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGCCTGGGTAACCAGGAG
1141 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTAC
1201 AATGGTAGGTACAATAAGACGCAAGACCGTGAGGTGGAGCAAAACTTATAAAACCTATCT
1261 CAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAA
1321 TCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAG
1381 AGCTGGTAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCGGCCGAAGGTGGGAT
1441                TTCAGCATTGTTCCATCGGCA 5' PR_U
1441 TAGTGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCT
1501 CC
```

EXEMPLO: *Clostridium botulinum*

```
Template masking not selected
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%  any th  3' th hairpin seq
LEFT PRIMER        340   20   58.96   55.00    0.00   0.00    0.00 GGCAGCAGTGGGGAATATTG
RIGHT PRIMER       567   20   59.01   50.00    0.00   0.00    0.00 TCCCACTTAAACATCCGCCT
SEQUENCE SIZE: 1502
INCLUDED REGION SIZE: 1502

PRODUCT SIZE: 228, PAIR ANY_TH COMPL: 6.87, PAIR 3'_TH COMPL: 17.54

    1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGC

   61 GATGAAACTTCCTTCGGGGAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC

  121 TGCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATATAAGAGAA

  181 TCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA

  241 GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG

  301 CCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
                                                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

  361 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTA

  421 AAGCCCTGTTTTCTAGGACGATAATGACGGTACTAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACG

  481 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAG

  541 GGTGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCA
            <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

EXEMPLO: *Clostridium botulinum*

Amplificação 16S Ribossomal												
											Temp Melting	Temp Annealing
					Tamanho Primer (bp)	G+C	A+T	(G+C) *4	(A+T) *2	oC = H + I	Tm - 4oC
Clostridium botulinum	PF_*primer 3*	5'-	GGCAGCAGTGGGGAATATTG	-3'	20	11	9	44	18	62	58
	PR_*primer 3*	5'-	TCCCACTTAAACATCCGCCT	-3'	20	10	10	40	20	60	56
	PF_universal	5'-	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	-3'	20	10	10	40	20	60	56
	PR_universal	5'-	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	-3'	21	10	11	40	22	62	58

	sequência	Tamanho amplicon	Tm (ºC)	Ta (ºC)
Primer Forward	acima	227 bp	61	57
Primer Reverse	acima			

Primers Universais				
Primer Forward	acima	1475 bp	61	57
Primer Reverse	acima			

EXEMPLO: *Clostridium botulinum*

NEW ENGLAND BioLabs Inc.

Tm Calculator v 1.9.13

Product Group

Taq DNA Polymerase

Polymerase/Kit

Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer

Primer Concentration (nM)

200

Reset concentration

Primer 1

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

Primer 2

ACGGCTACCTTGTTACGACTT

Switch to batch mode

Clear

Use example input

Anneal at

51 °C

Primer 1
20 nt
50% GC
Tm: 56 °C

Primer 2
21 nt
48% GC
Tm: 58 °C

Bibliografia

Ridley, M., 2008: Evolução– Capítulo 8

Brown, T.A., 2008: Genética: um enfoque molecular – Capítulos 6 e 14

Baker, G.C. et al., 2003: Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J. Microb. Methods 55:541-555

Frank, J.A. et al., 2008: Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. Applied and Enviroment Microb. 74:2461-2470

Yarza, P. et al., 2014: Uniting the classification of culture and uncultured bacteria and archea using 16S rRNS sequences. Nature Rev. Microb. 12:635-645