

GENÉTICA BACTERIANA

- 1. Introdução: A natureza do material genético**
- 2. Material Genético de procariotos e de eucariotos**
- 3. Replicação do material genético bacteriano**
- 4. Mecanismos de variação genética**
 - 4.1. Mutação e mecanismos de Reparo de DNA**
 - Agentes mutagênicos
 - Eventos possíveis após lesões causadas por agentes genotóxicos
 - Mecanismos de Reparo de DNA
 - Aplicações
 - 4.2. Recombinação**
 - Transformação
 - Conjugação
 - Transdução
 - Transposons
- 5. Sistema CRISPR/Cas9, ou simplesmente, CRISPR – Você sabe o que é isto?**
- 6. Questões para Estudo**

Olá, olá!



Profa. Elisabete Vicente
Dep. Microbiologia
ICB/USP
bevicent@usp.br



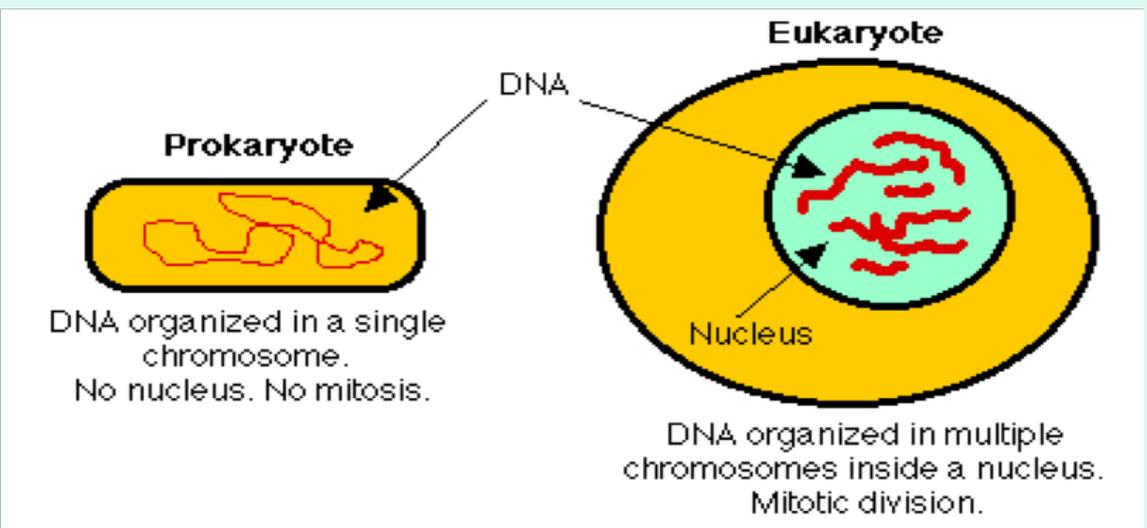
Instituto de Ciências
Biomédicas USP

1. Introdução

Do que é constituído o material genético?

Como o material genético está organizado nas bactérias (procariotos) e nos organismos eucariotos?

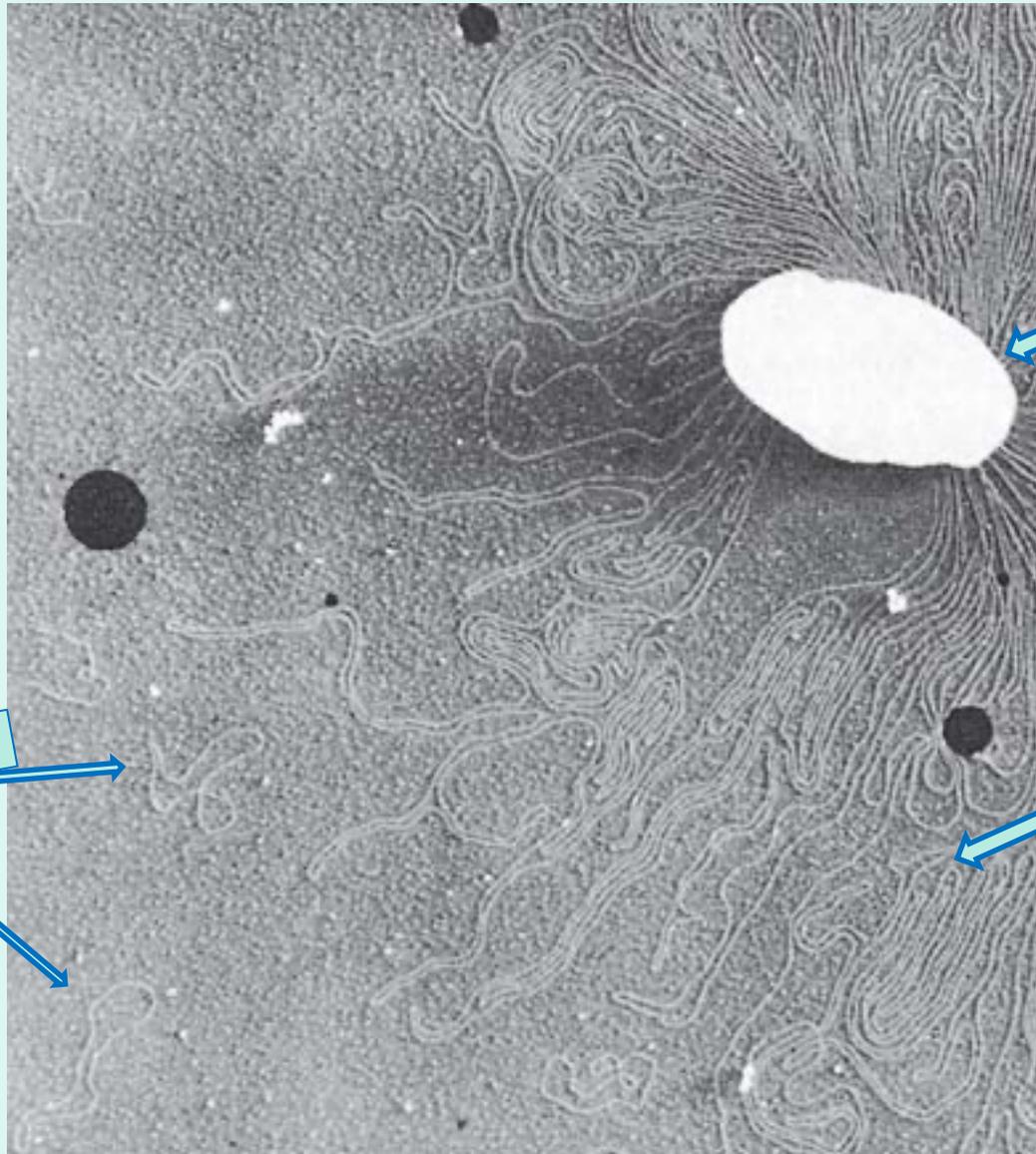
2. Material Genético: Procariotos X Eucariotos



DNA cromossomal	<ul style="list-style-type: none"> - No citoplasma - Fita dupla - Mais frequentemente circular 	<ul style="list-style-type: none"> - No NÚCLEO - Fita dupla - Linear -- Cromossomos
-----------------	---	--

DNA Extra-cromossômicos	<ul style="list-style-type: none"> - DNA plasmidial - Codifica funções extras: - Resistência a drogas - Resistencia a metais pesados - Adesão, - Invasão - Fermentação de açúcares 	<ul style="list-style-type: none"> - DNA mitocondrial - Cloroplasto (plantas) - DNA plasmidial
-------------------------	---	---

2. Material Genético: Bacteriano



Célula bacteriana

DNA cromossomal

Plasmídeos

Figura:

O cromossomo bacteriano e os plasmídeos bacterianos, vistos ao microscópio eletrônico. Os plasmídeos (setas) são as estruturas circulares e são muito menores do que o DNA cromossômico principal. A célula (estrutura grande, branca) foi cuidadosamente degradada para que o DNA permanecesse intacto.

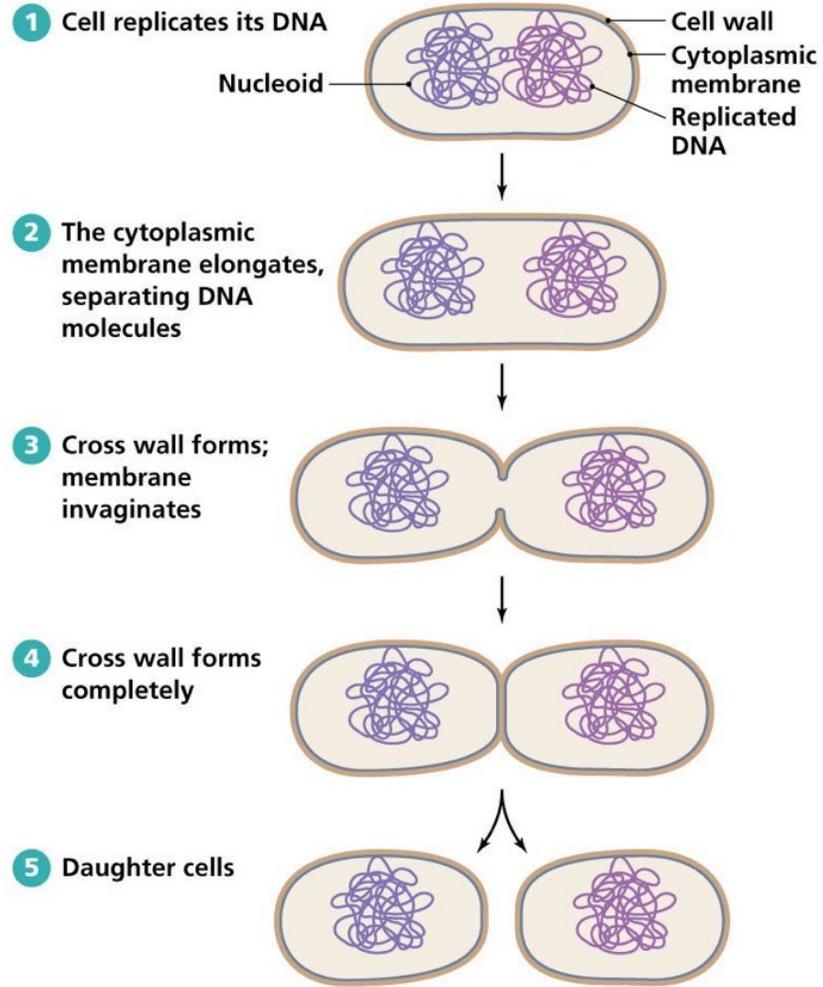
Fonte: Microbiologia de Brock, 14^o ed., 2016.

2. Material Genético de Procariotos (continuação)

Quadro 1: Arranjo do DNA cromossomal de alguns organismos

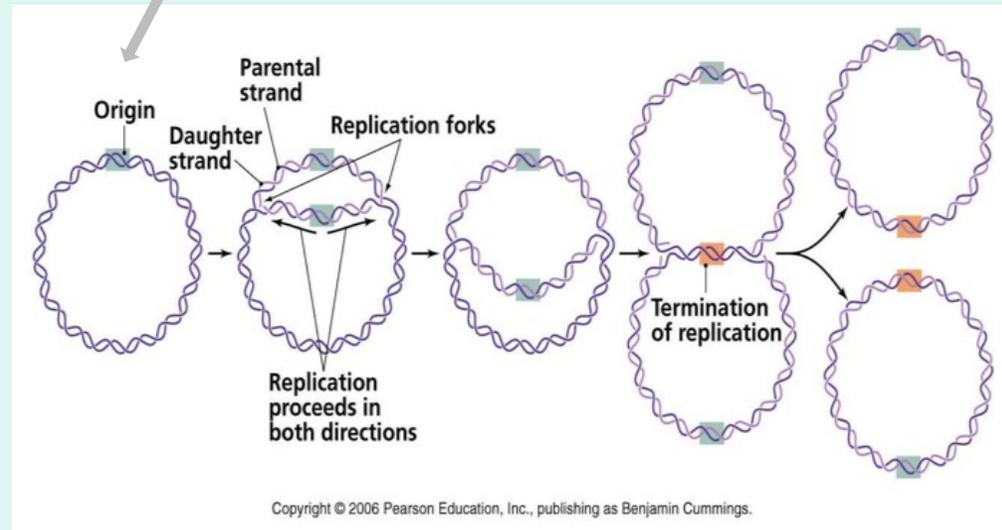
Espécie	tamanho (pb)	Nº genes	DNA cromossomal	DNA plasmidial
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58.10 ⁶	480	fita dupla, circular	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1,3. 10 ⁶		fita dupla, linear	Vários lineares
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83. 10 ⁶	1.743	fita dupla, circular	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,79. 10 ⁶		fita dupla, circular	Vários circulares
<i>Clostridium perfringens</i>	3,60.10 ⁶		fita dupla, circular	
<i>Escherichia coli</i>	4,67. 10 ⁶	4.288	fita dupla, circular	Vários circulares
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,41 10 ⁶			
<i>Bacillus cereus</i>	5,70 10 ⁶		fita dupla, circular	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4,3. 10 ⁶		duas fitas duplas lineares	
<i>Streptomyces</i>	8,0. 10 ⁶		fita dupla, linear	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de cerveja)	1,2. 10 ⁷	5.885	16 cromossomos lineares	Alguns circulares
<i>Homo sapiens</i> (homem)	3,2. 10 ⁹	60.000 - 100.000	46 cromossomos lineares (célula diplóide)	

3. Replicação do Material Genético Bacteriano



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

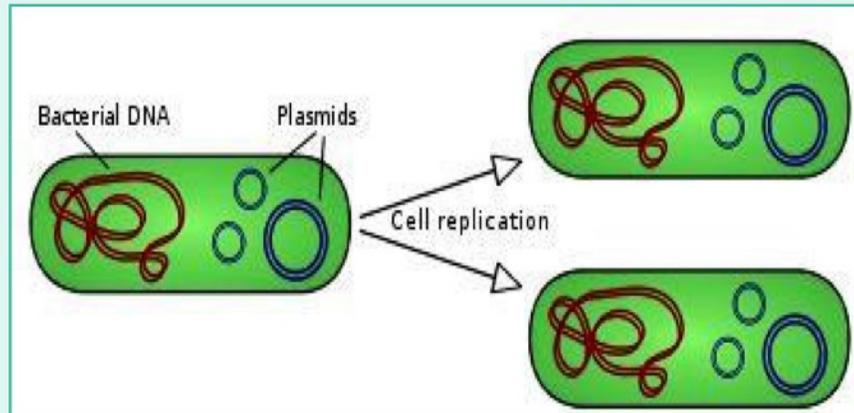
A partir da **origem de replicação** (ligada ao **mesossomo septal** região na membrana citoplasmática), Inicia-se a duplicação em sentido bidirecional



Detalhe do processo de replicação do DNA cromossômico bacteriano.

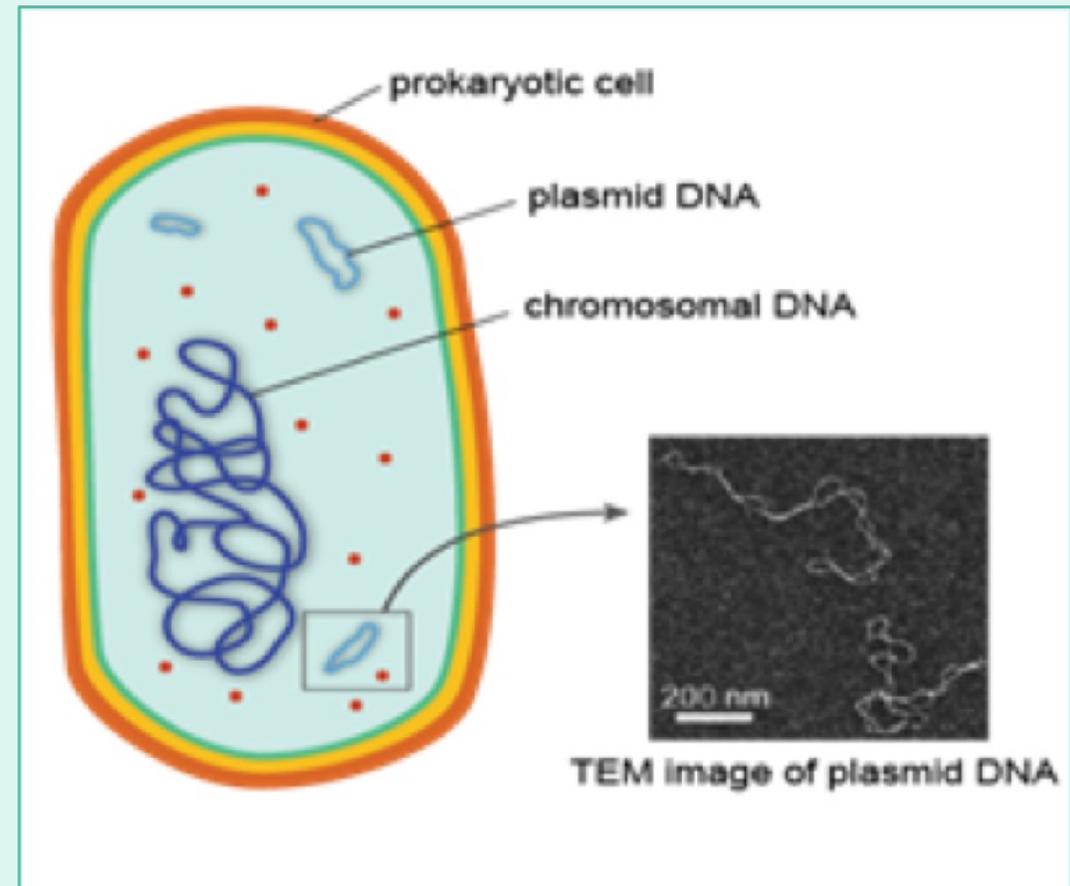
Duplicação bacteriana

3. Replicação do Material Genético Bacteriano (continuação)



Esquema da replicação de bactéria que tem plasmídeo de replicação autônoma.

Duplicação bacteriana

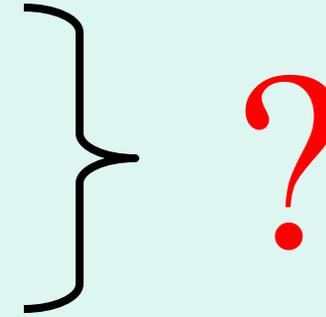


Esquema e **Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)** mostrando o material genético bacteriano:

- DNA cromossômico, e
- DNA plasmidial de replicação autônoma.

✓ **Autoperpetuação**

✓ **Multiplicidade das espécies**



4. Mecanismos de Variação Genética

Mutação

Recombinação

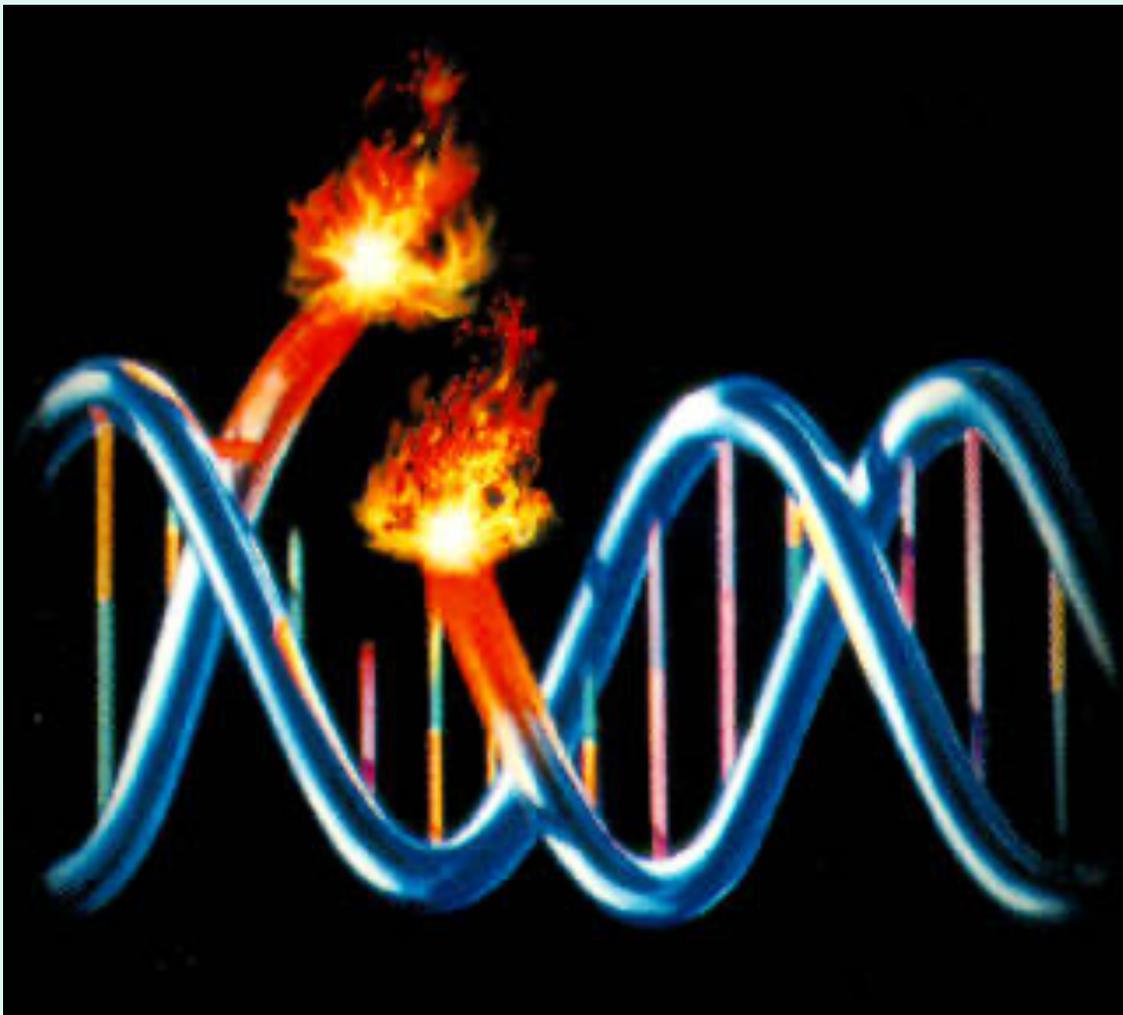
Transformação

Conjugação Bacteriana

Transdução

Elementos Transponíveis -
Transposons

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA



Prof^a Elisabete J. Vicente
bevicent@usp.br

- **Mutação:**

qualquer modificação súbita ou hereditária no conjunto gênico de um organismo que não é explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente.

- **Mutações espontâneas:** resultado de funções celulares normais ou interações aleatórias com o ambiente.

- **Mutações induzidas:** ocorre devido o tratamento com determinados compostos chamados de mutagênicos ou genotóxicos.

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Agentes Mutagênicos

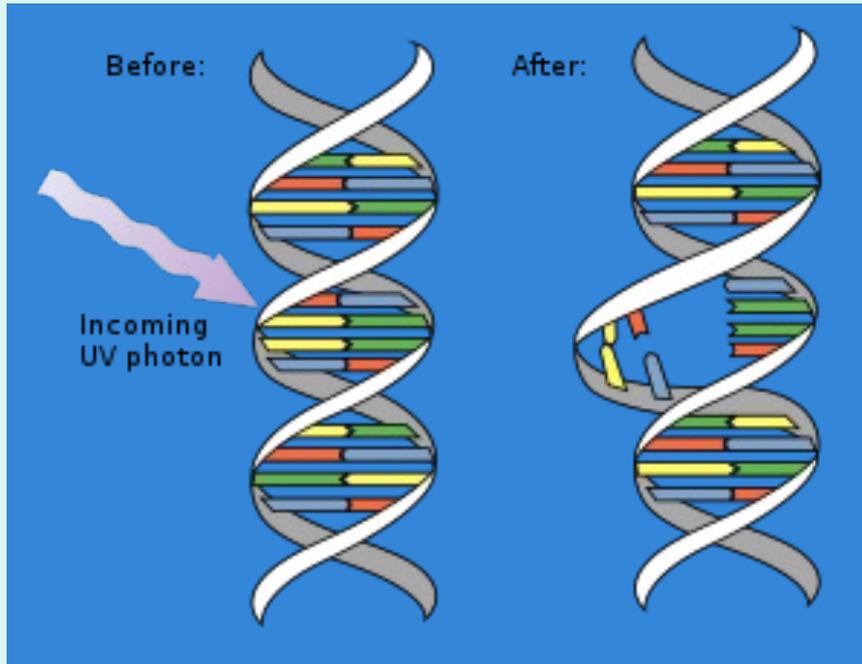
- Mutagênicos físicos:

- UV (dímeros de pirimidina),
- Radiações ionizantes (ionização do DNA → quebras das cadeias do DNA simples e duplas)
- Calor

- Mutagênicos químicos:

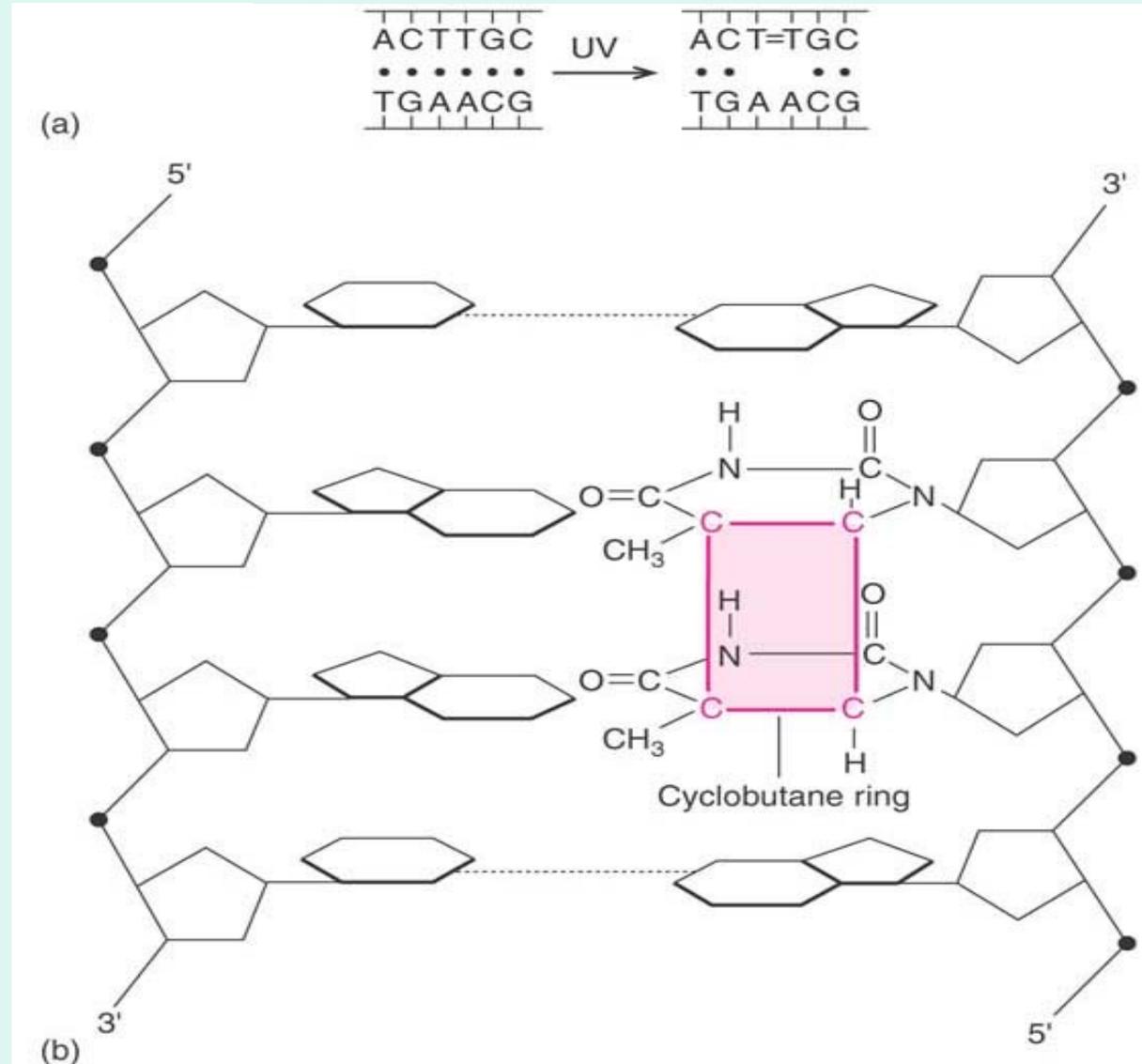
- moléculas planares: - Brometo de etídio (EB),
- Dodecilsulfato de sódio (SDS)
- Agentes alquilantes: metil metano sulfonato (EMS)
- Água oxigenada (H_2O_2)

RUV (radiação ultravioleta)



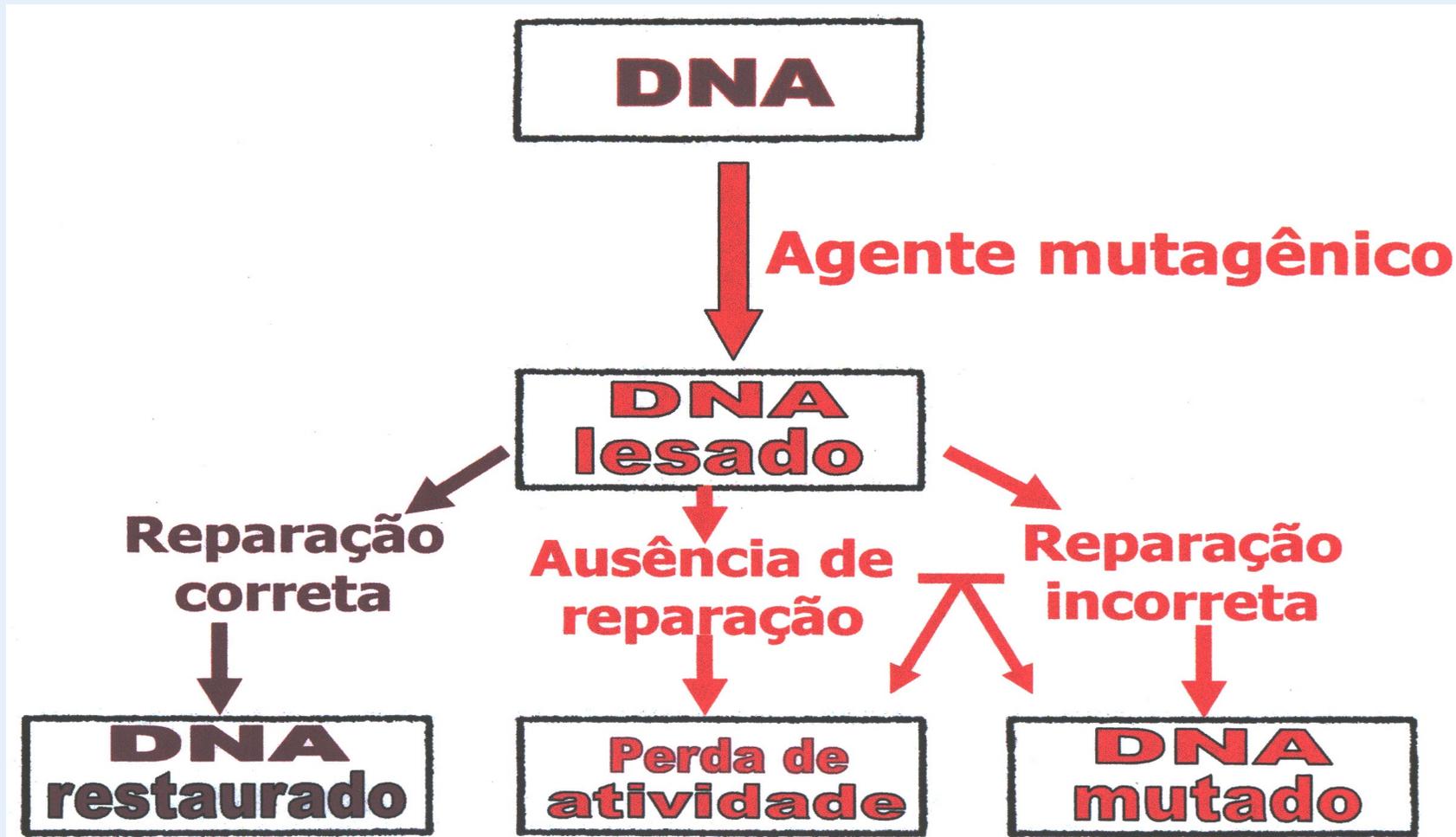
RUV: Quando incide nas fitas do DNA provoca o surgimento de dímeros de PIRIMIDINA:

- dímeros T-T
- dímeros T-C
- dímeros C-C



4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Eventos possíveis após lesões causadas por agentes genotóxicos



4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Mecanismos de Reparo de DNA

Todos os seres possuem mecanismos multi-enzimáticos para a eliminação (reparo) das lesões presentes no DNA

Em presença de Luz:

Foto reativação



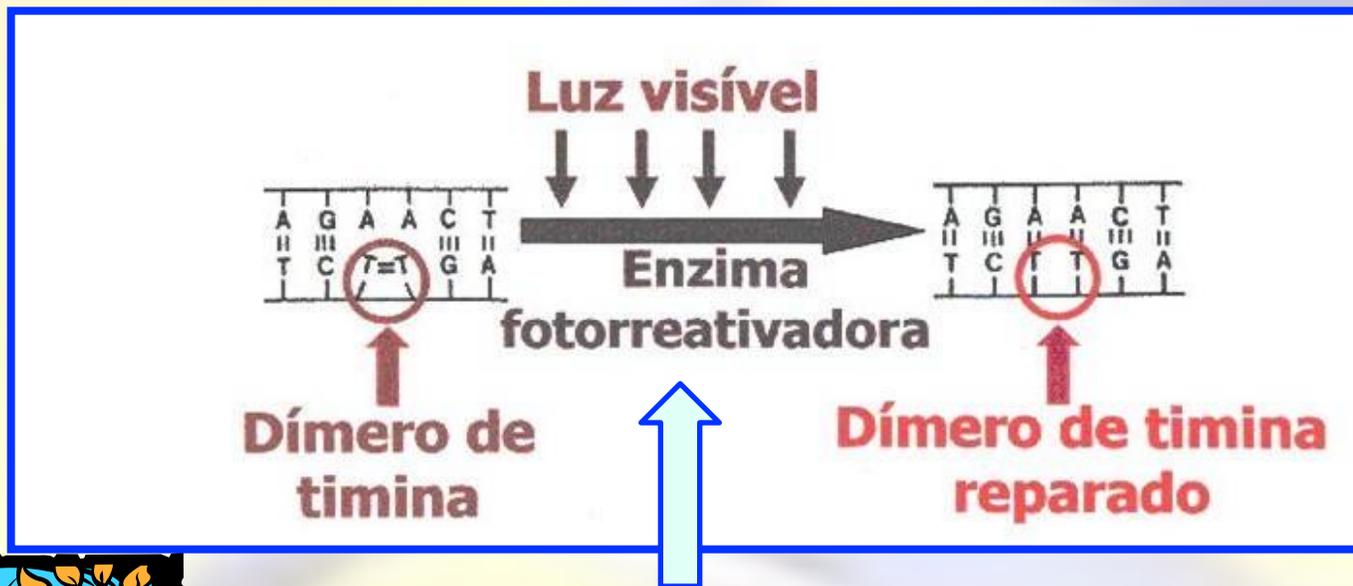
Na Ausência de Luz:



4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Mecanismos de Reparo de DNA

➤ **Reparação por Foto reativação Enzimática:**



A enzima DNA fotoliase é ativada pela luz visível

Comprimentos de onda de radiação UV:

UVA (400–320 nm, luz negra)

UVB (320–280 nm), e

UVC (280–100 nm, UV curta ou germicida).

Principalmente UVB e UVC causam:

- Eritema (queimadura de pele),
- Fotoconjuntivite,
- Fotoceratite (ceratite ultravioleta),
- Câncer de pele.



Fotoceratite uma dolorosa condição ocular causada pela exposição dos olhos aos raios UV de fontes naturais (luz solar intensa) ou artificiais (ex. arco elétrico de solda).



Recomenda-se ir a praia horários em que a % luz visível supera % RUV.

Mecanismo de Reparo de DNA que opera na PRESENÇA de luz e que não resulta em mutações. Ele está presente em todos os seres vivos: Bactérias, fungos, plantas, animais, seres humanos, etc

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Mecanismos de Reparo de DNA

➤ **Reparação Na Ausência de Luz:**



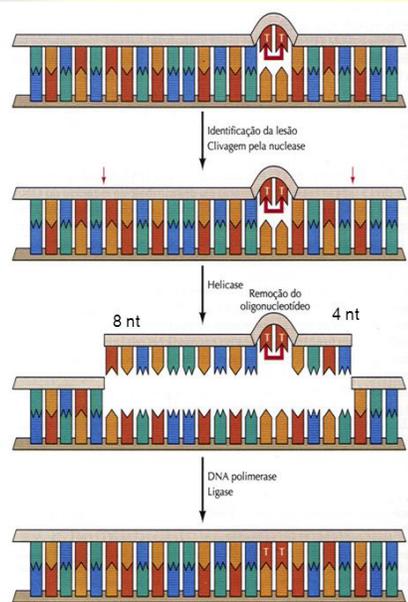
A) Excisão de bases (BER)

Reparo por excisão de nucleotídeos

→ Proteínas UvrA, UvrB, UvrC e UvrD: identificam, separam e clivam a fita de DNA

→ DNA polimerase I

→ DNA ligase



B) Recombinacional

DSB Formation

End Processing

Rad50, Mre11
XRS2,

Joint molecule formation (D-loop)

Rad51, Rad52,
Rad55/Rad57,
Rad54, (Srs2)

Repair DNA synthesis (Srs2)
Resolution of Intermediates (Srs2)
Ligation

Mecanismos multi-enzimáticos de Reparo de DNA que operam na ausência de luz e que não resultam em mutações. Eles estão presentes em todos os seres vivos:

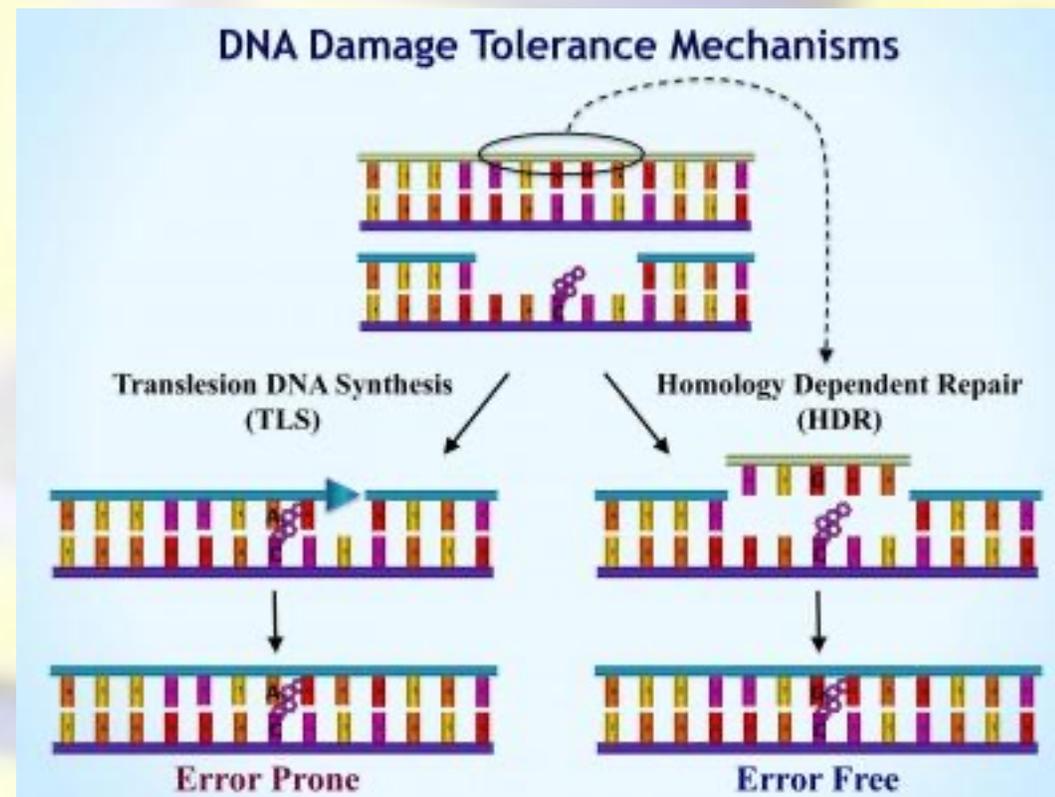
A) Excisão de bases (BER), ou excisão-resíntese;

B) Recombinacional

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Mecanismos de Reparo de DNA

➤ Tolerância a lesões



Mecanismo de Reparo de DNA que operam na ausência de luz e que **RESULTA em mutações.** Ele está presente em todos os seres vivos. Ocorre quando a quantidade de lesões no DNA é tão grande que os mecanismos de reparo atuantes na célula são insuficientes para restaurar o DNA e a célula (bacteriana) entra em divisão.

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Aplicações

1. Obtenção de Mutantes

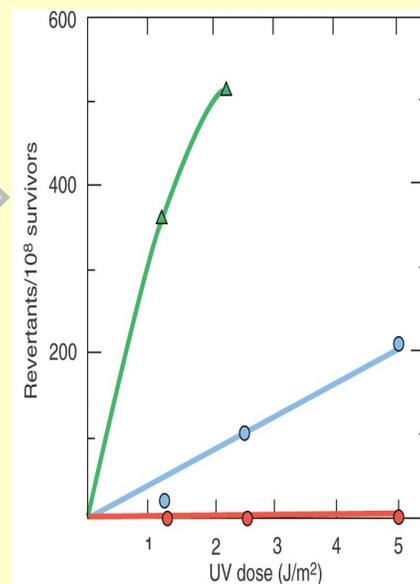
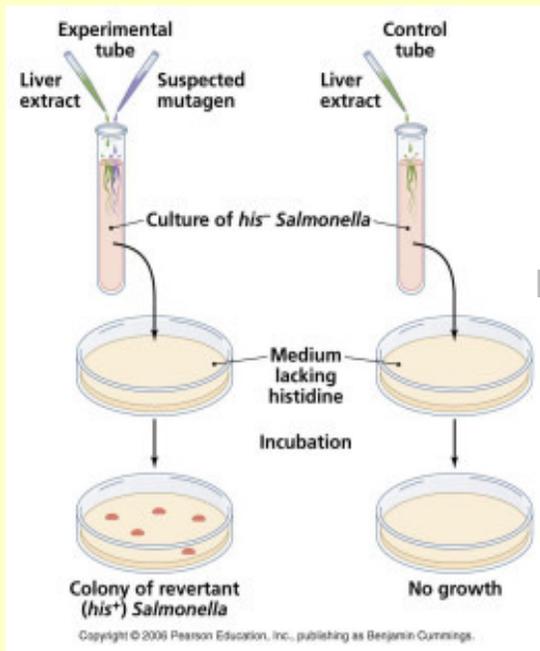
2. Testes de Detecção de substâncias mutagênicas

4.1. Mutação e mecanismos de reparo de DNA

- Aplicações

Teste de Ames

(*Salmonella typhimurium* – gene *umuCD*)

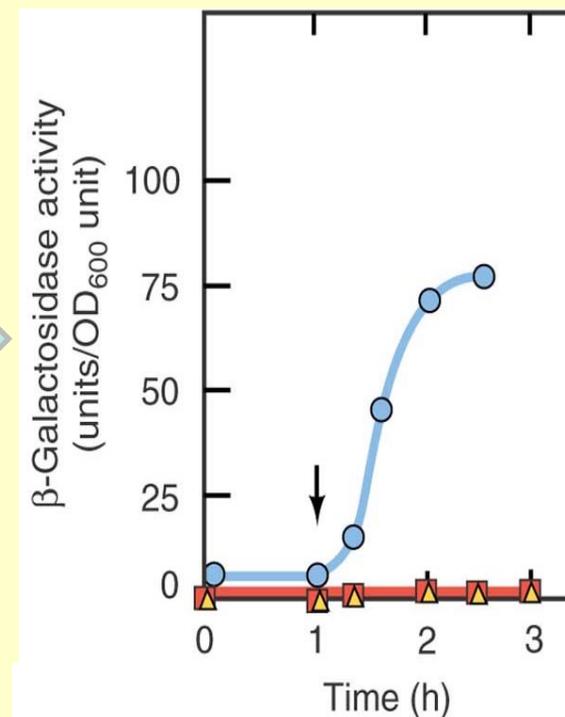
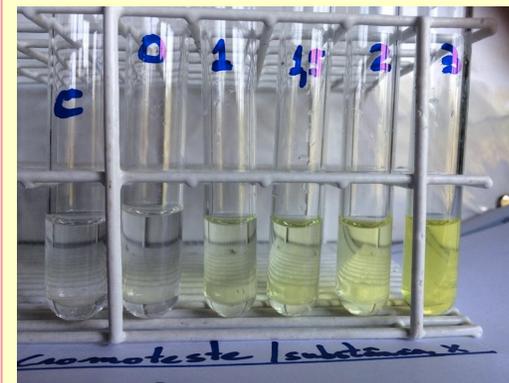


Detecção: Quantificação de colônias bacterianas Mutantes Revertentes *his⁺* que crescem em meio mineral (sem fontes de aminoácidos).

Fonte: [BRUCE AMES, TESTING FOR CARCINOGENS](#)

Cromoteste

(*Escherichia coli* - fusão *sfi-lacZ*)



Detecção: Cor amarela quantificável em espectrofotômetro.

Mecanismos de Variação Genética

Mutação

Recombinação

Transformação

Conjugação Bacteriana

Transdução

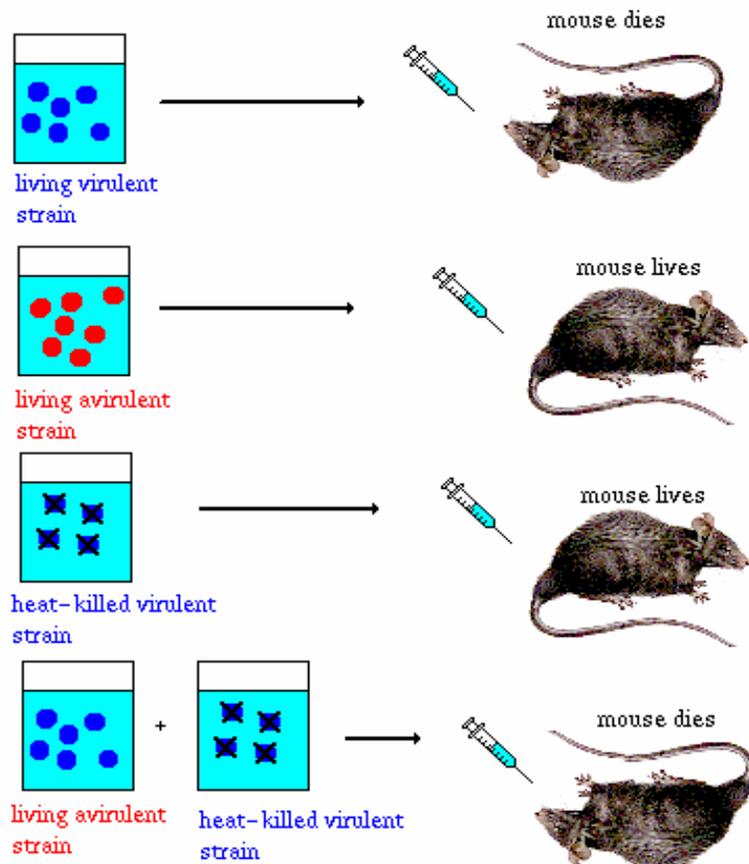
**Elementos Transponíveis -
Transposons**

4.2. Recombinação

1928: Frederick Griffith

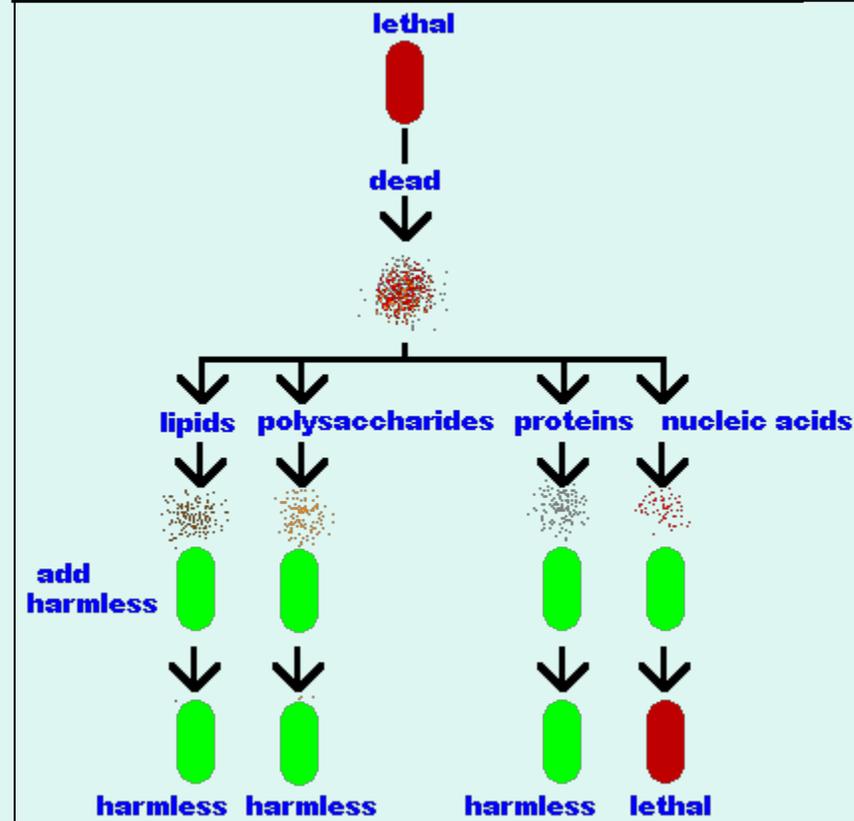
Streptococcus pneumoniae

(*Diplococcus pneumoniae*)



Transformação bacteriana

1944: Avery, MacLeod, McCarty

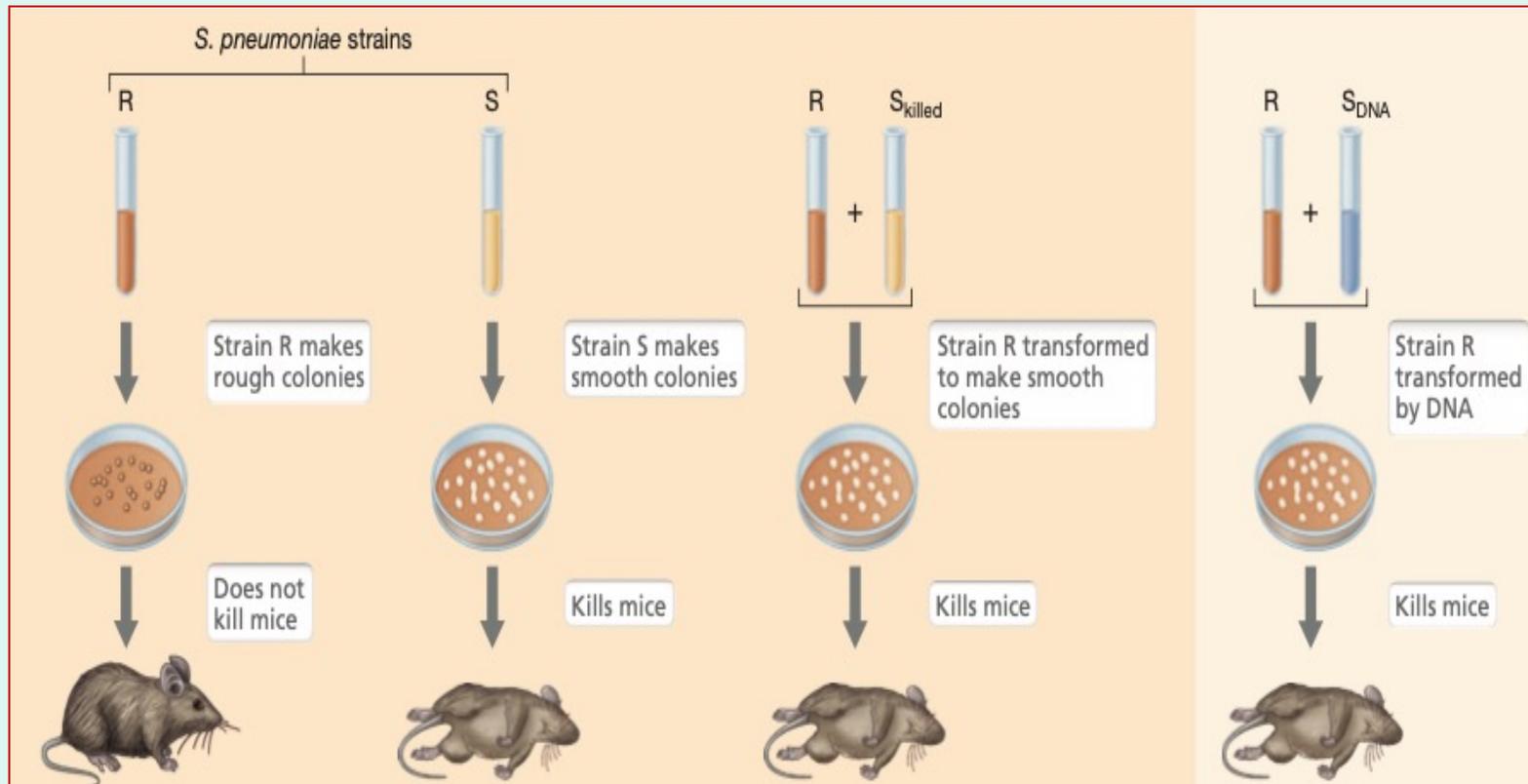


A natureza do princípio transformante

4.2. Recombinação

1928: Frederick Griffith

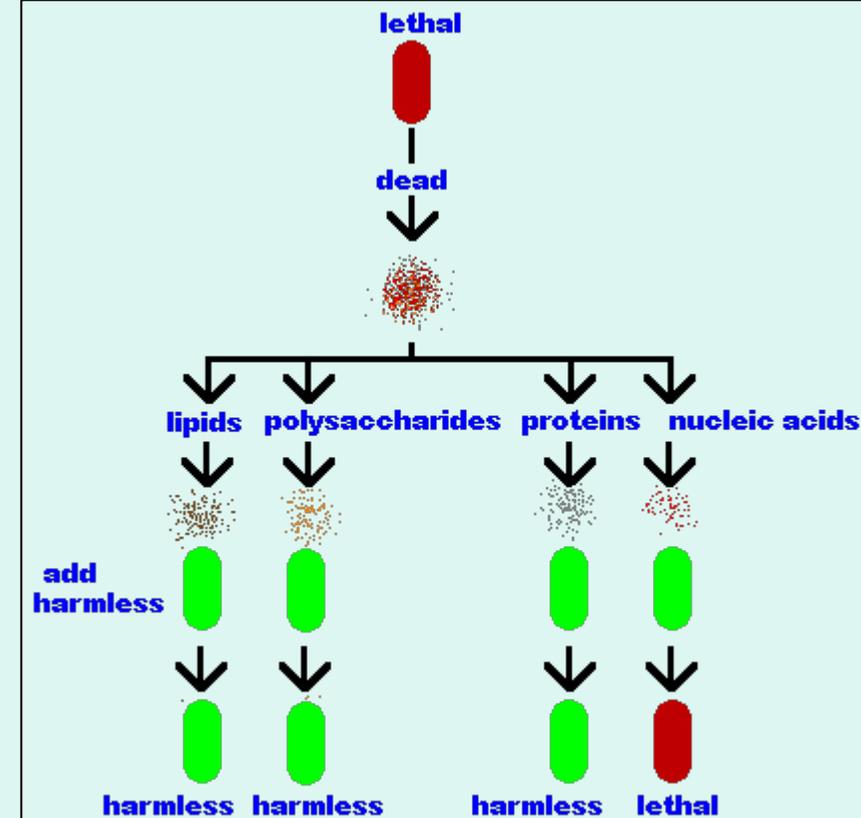
Streptococcus pneumoniae
(*Diplococcus pneumoniae*)



Fonte: Microbiologia de Brock, 16^o ed., 2021.

Transformação bacteriana

1944: Avery, MacLeod, McCarty



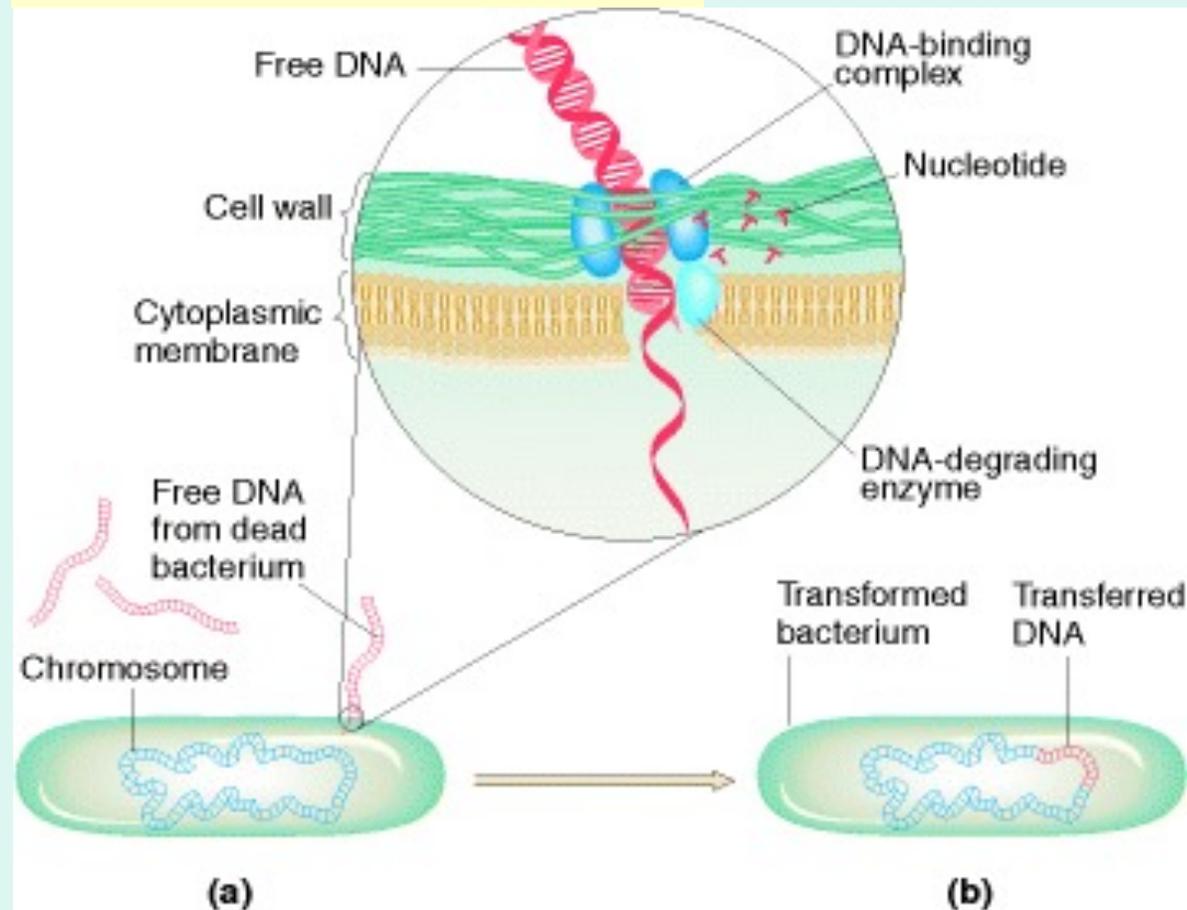
A natureza do princípio transformante

4.2. Recombinação

- Transformação

Mecanismo de transferência do material genético

Como ocorre?



Algumas bactérias recebem DNA linear.

Algumas bactérias recebem preferencialmente plasmídios.

4.2. Recombinação

- Transformação

Entrada de DNA nú na célula.

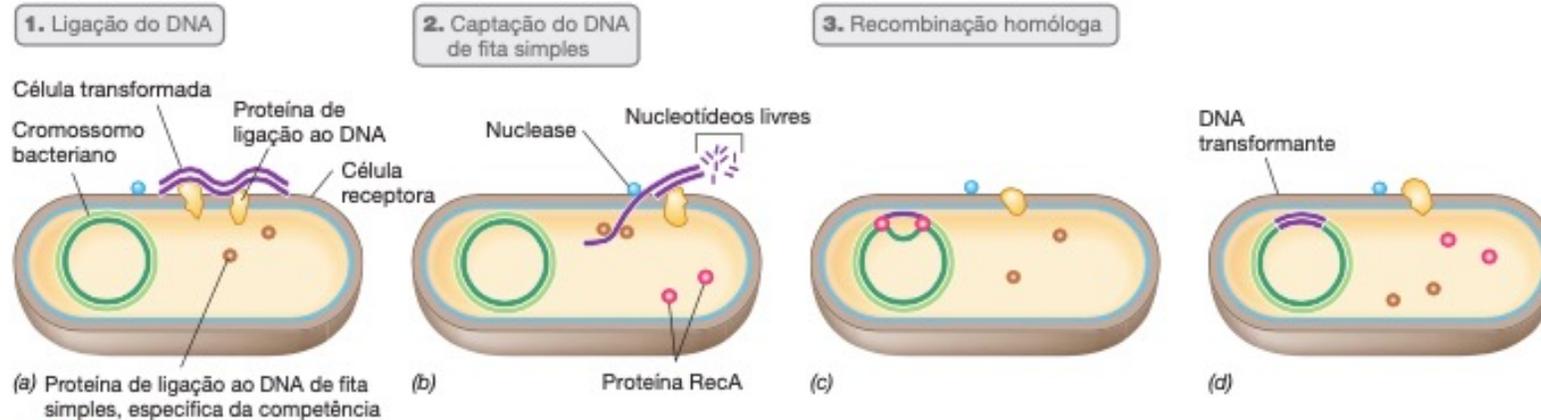


Figura 10.13 Mecanismo de transformação em uma bactéria gram-positiva. (a) Ligação do DNA de dupla-fita por uma proteína de ligação ao DNA associada à membrana. (b) Passagem de uma das duas fitas para o interior da célula, enquanto a atividade de nuclease degrada a outra fita. (c) Ao pe-

netrar na célula, a fita simples liga-se a outras proteínas específicas, sendo a recombinação com regiões homólogas do cromossomo bacteriano mediada pela proteína RecA. (d) Célula transformada.

- Algumas bactérias recebem preferencialmente fragmentos de DNA linear,

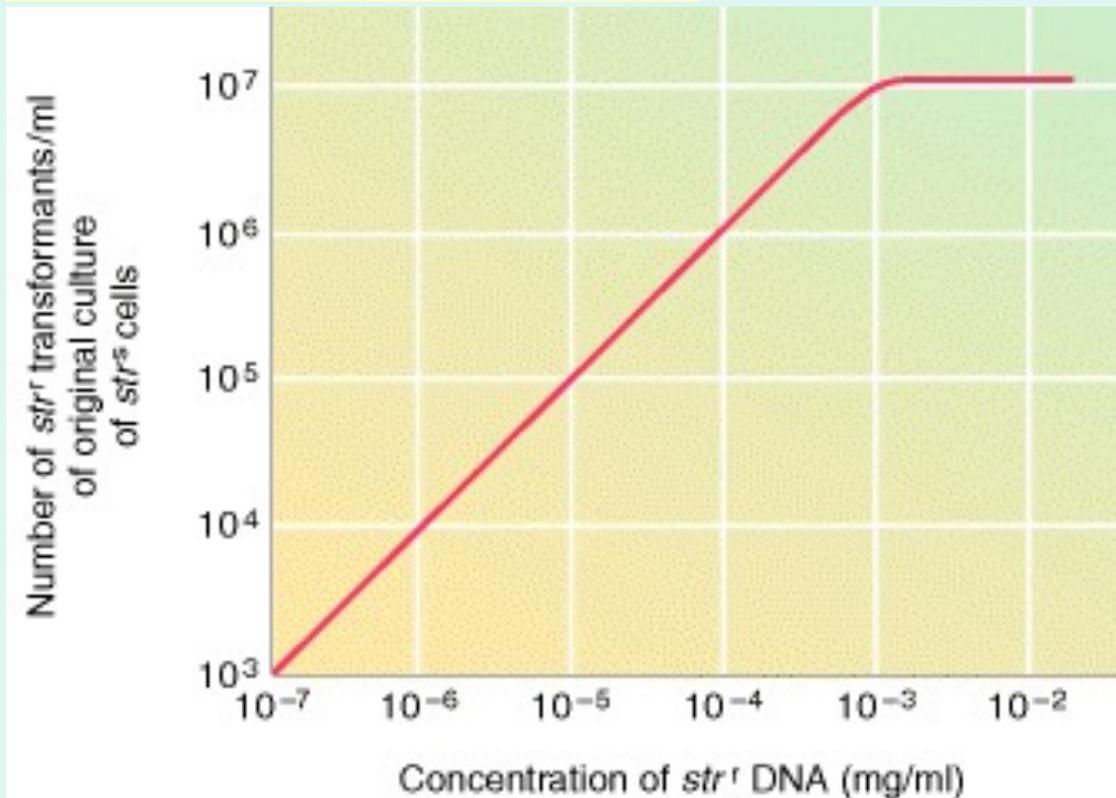
Ex.: *Streptococcus pneumoniae*

- Algumas bactérias recebem preferencialmente plasmídeos,
Ex.: *Escherichia coli*.

4.2. Recombinação

- Transformação

O que é então?



Entrada de DNA nú na célula.

- Algumas bactérias recebem preferencialmente fragmentos de DNA linear, Ex.: *Streptococcus pneumoniae*

- Algumas bactérias recebem preferencialmente plasmídeos, Ex.: *E. coli*.

GENÉTICA BACTERIANA

Mecanismos de Variação Genética

Mutação

Recombinação

Transformação

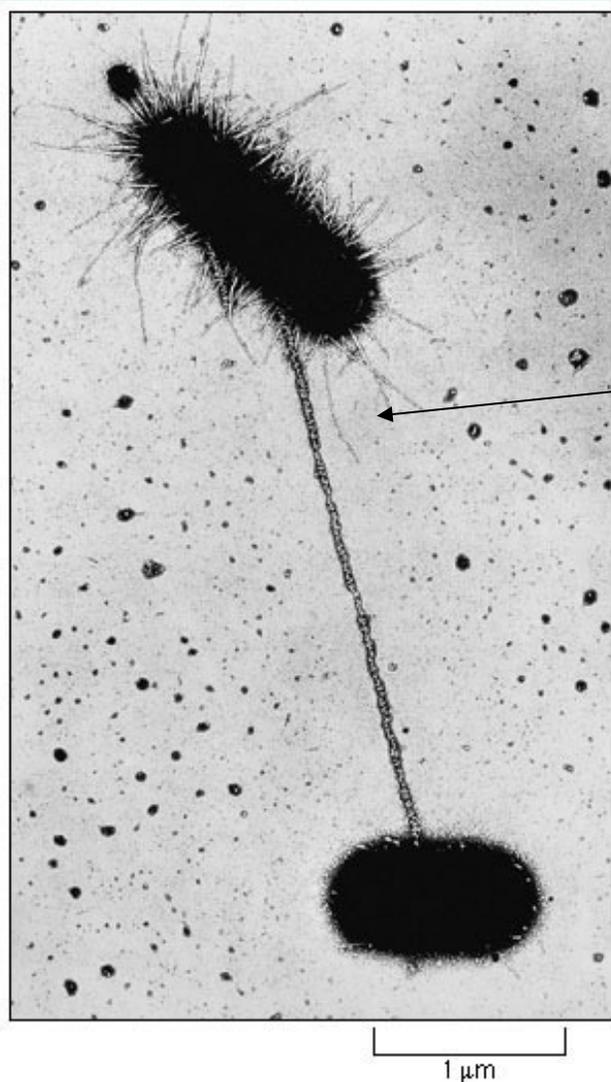
Conjugação Bacteriana

Transdução

Elementos Transponíveis -
Transposons

4.2. Recombinação

- Conjugação Bacteriana



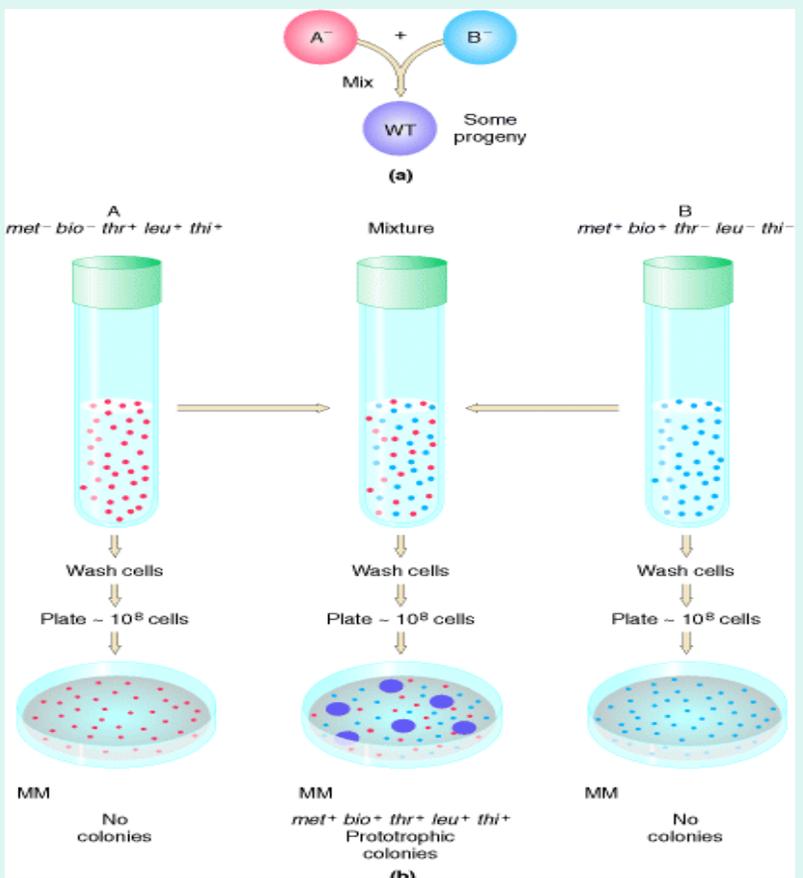
Mecanismo de transferência do material genético

Pili (fímbria)
de conjugação

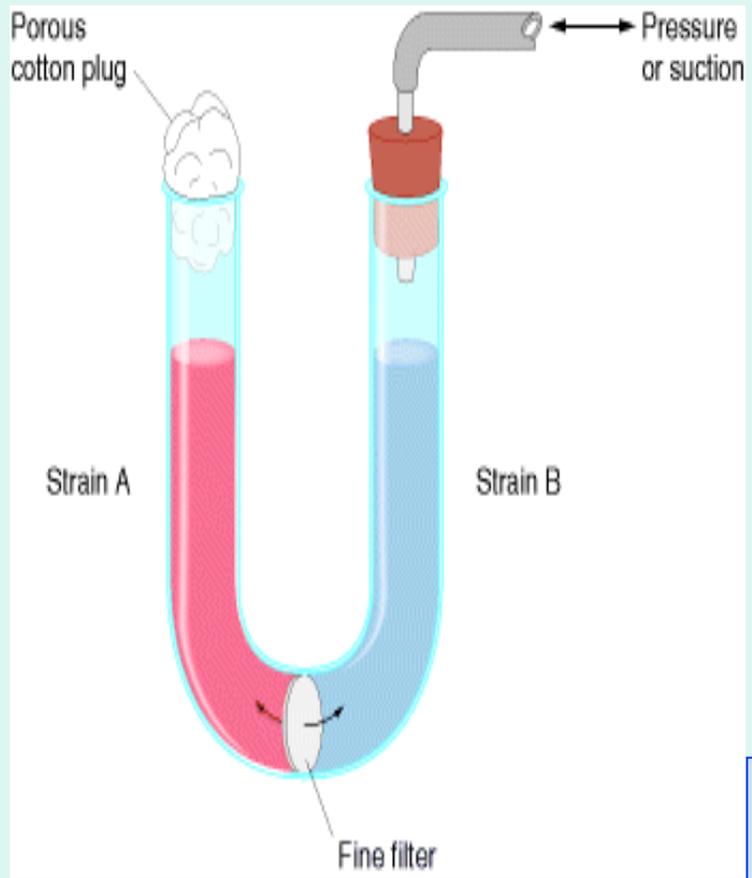
4.2. Recombinação

- Conjugação Bacteriana

1946: J. Lederberg e E.L. Tatum



A conjugação ocorre quando as duas bactérias estão em contato direto

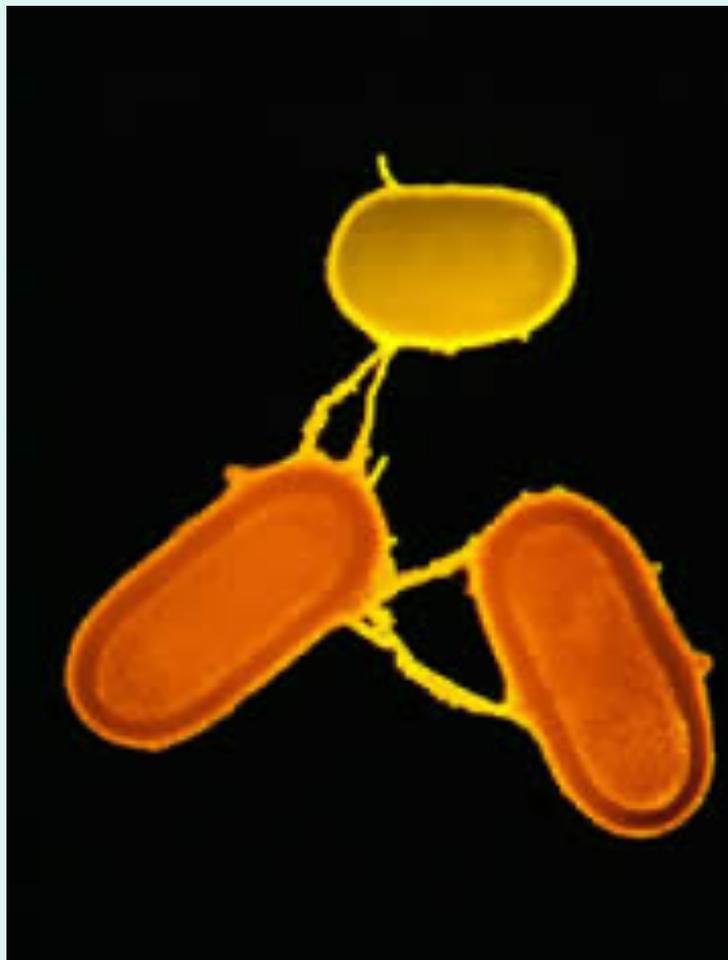


A conjugação NÃO ocorre quando

as duas bactérias estão separadas por uma membrana semipermeável que permite a passagem de DNA mas não permite a passagem de células bacterianas

4.2. Recombinação

- Conjugação Bacteriana



A conjugação bacteriana tripartite

Fonte: [Nature, 19/11/2001](#)

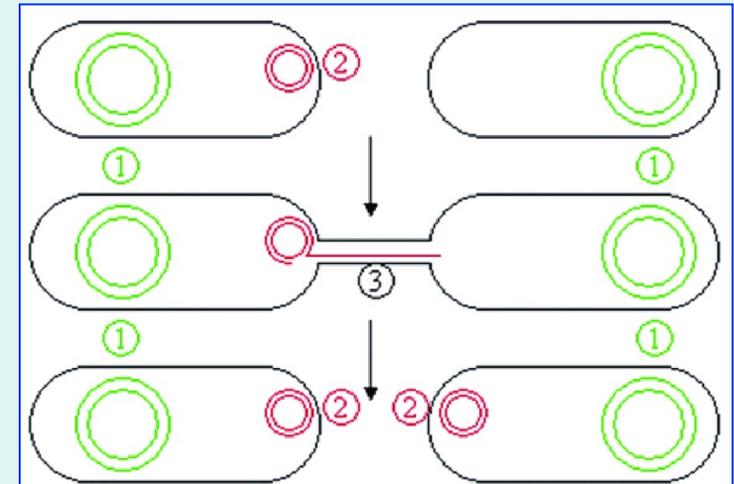
doi:10.1038/news011122-4

4.2. Recombinação

- Conjugação Bacteriana

Tabela 2: Determinantes Genéticos de origem em plasmídeo

Características	Exemplos de Plasmídeos
Fertilidade	F, R1, Col
Produção de Bacteriocina	Col E1
Resistência a metais pesados	R6
Resistência a drogas (antibióticos)	R1
Produção de Enterotoxina	Ent
Metabolismo de canfora	Cam
Tumor em plantas	T1 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)

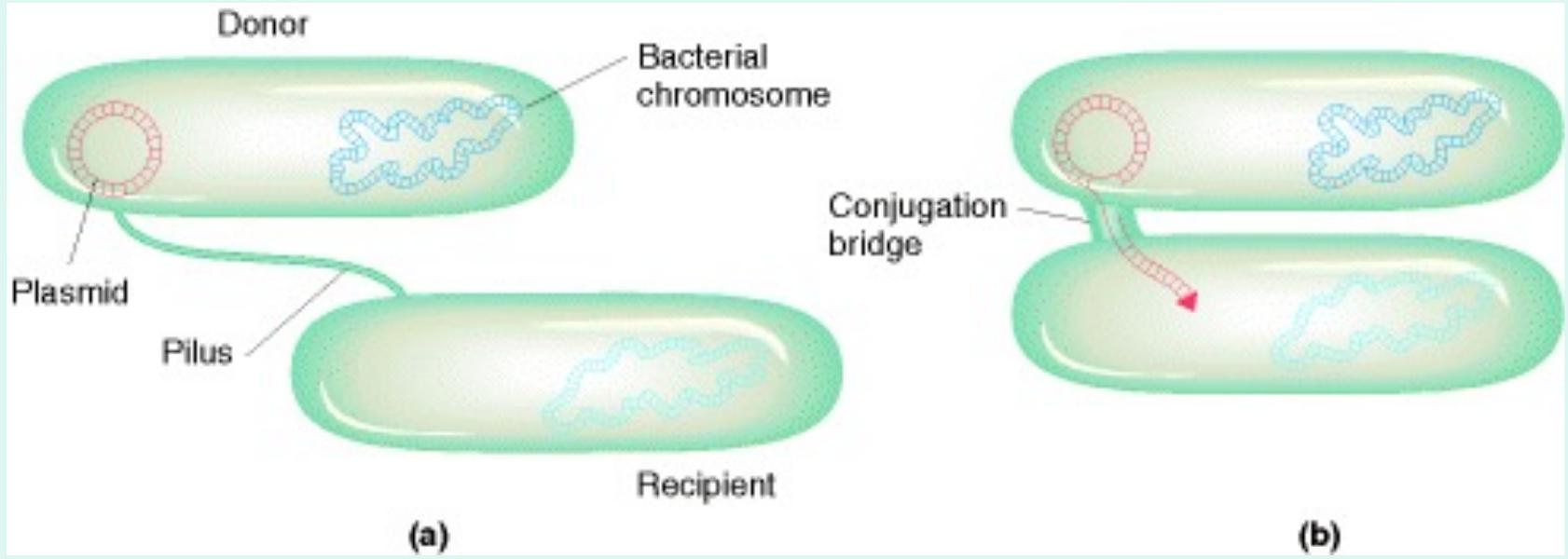


Na conjugação bacteriana, uma das fitas do plasmídeo é transferida para a outra bactéria, as duas bactérias participantes (dadora e receptora) sintetizam a fita complementar.

Após a conjugação, ambas as bactérias têm cópias do plasmídeo.

4.2. Recombinação

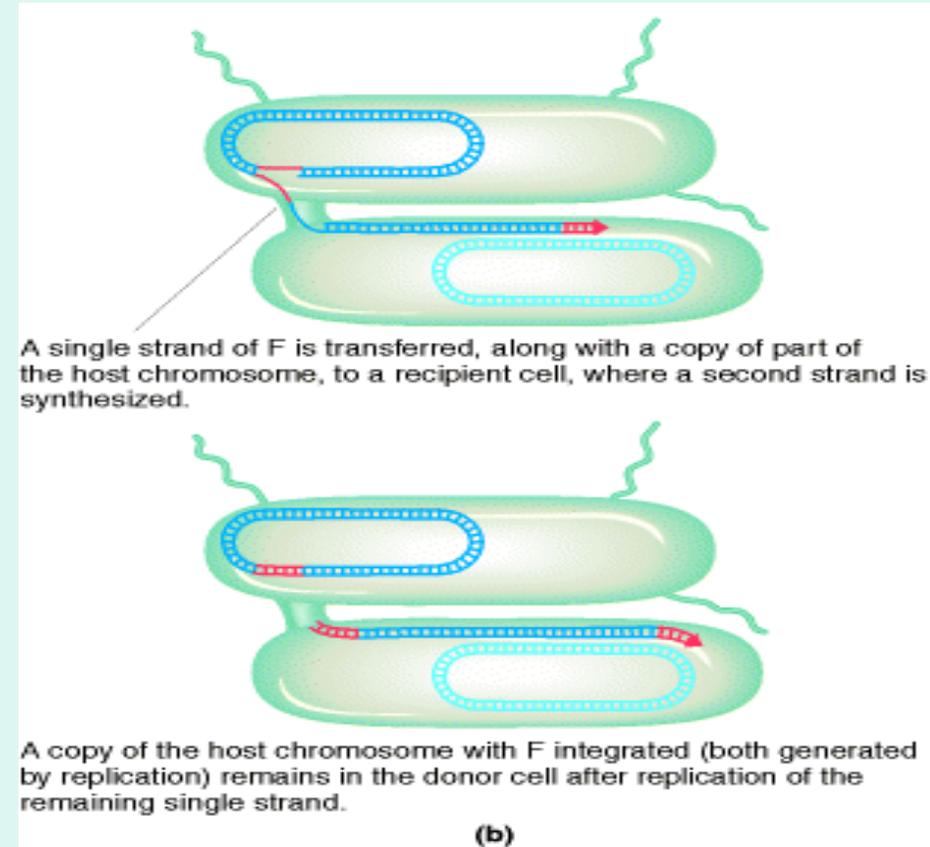
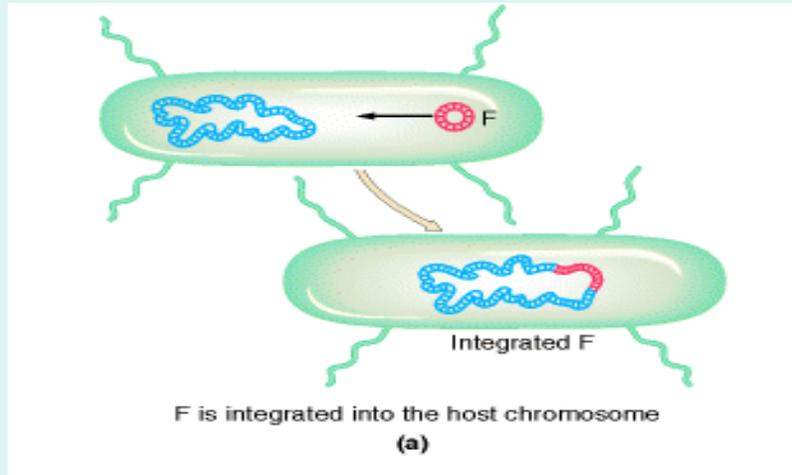
- Conjugação Bacteriana



Transferência de plasmídeos

4.2. Recombinação

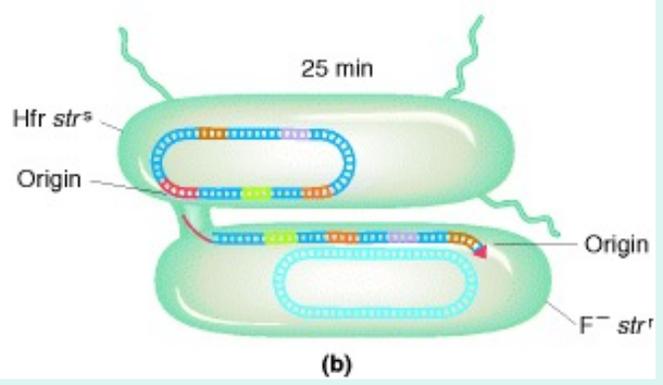
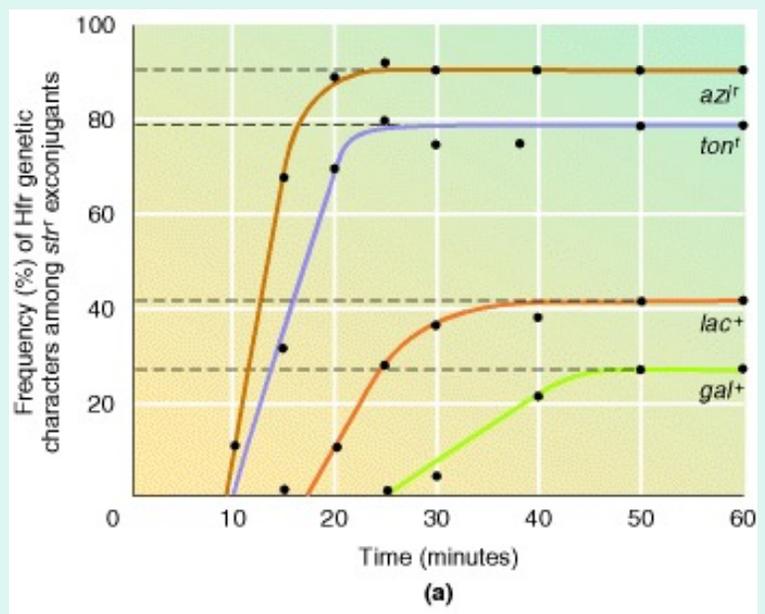
- Conjugação Bacteriana



Bactéria Hfr: Transferência de genes cromossômicos.

4.2. Recombinação

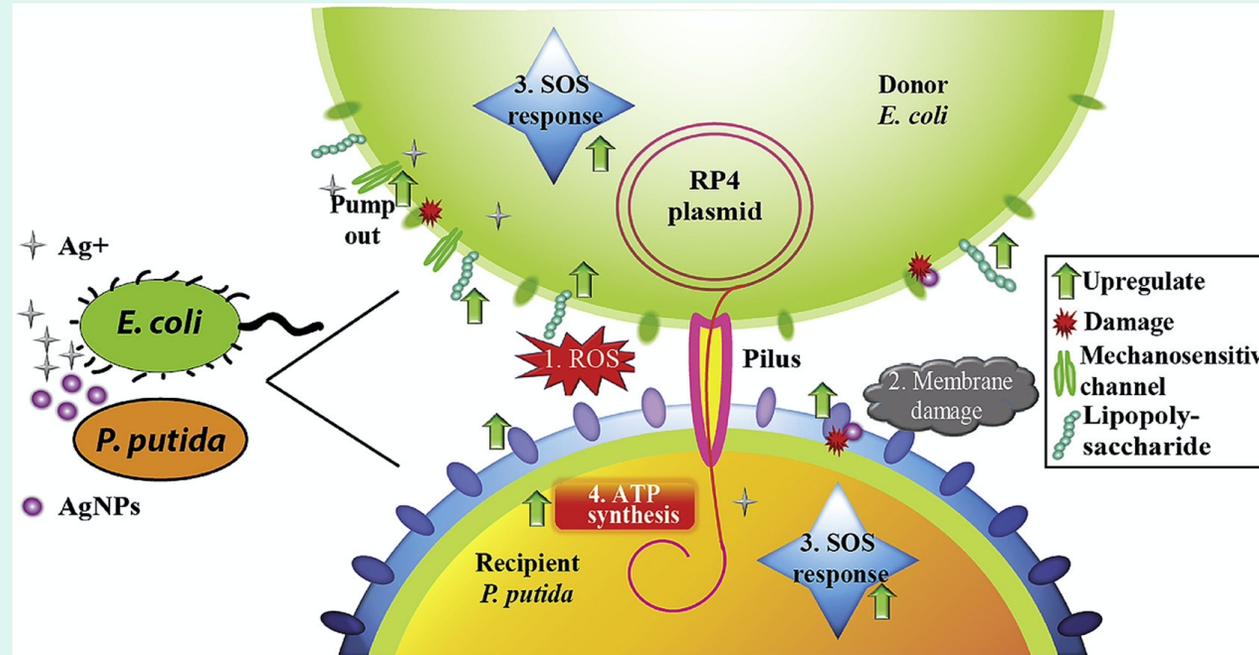
- Conjugação Bacteriana



Bactéria Hfr: Transferência de genes cromossômicos.

4.2. Recombinação

- Conjugação



Plasmídeos promíscuos são capazes de se transferir para bactérias de diferentes gêneros, como RP4 que é capaz de se transferir para qualquer bactéria Gram-negativa.

Fonte.: [Lu et al. 2020.](#)

Mecanismos de Variação Genética

Mutação

Recombinação

Transformação

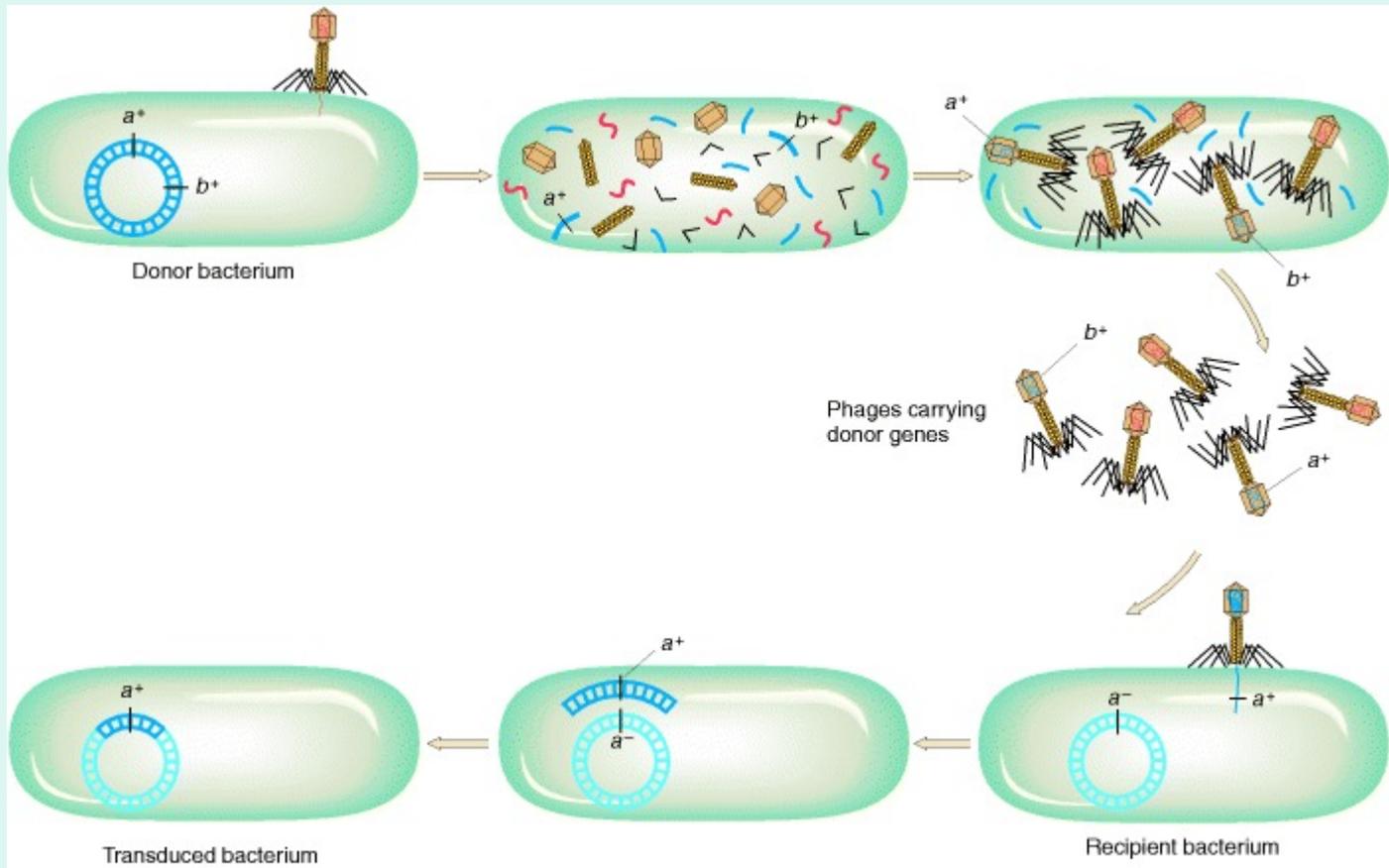
Conjugação Bacteriana

Transdução

Elementos Transponíveis -
Transposons

4.2. Recombinação

- Transdução

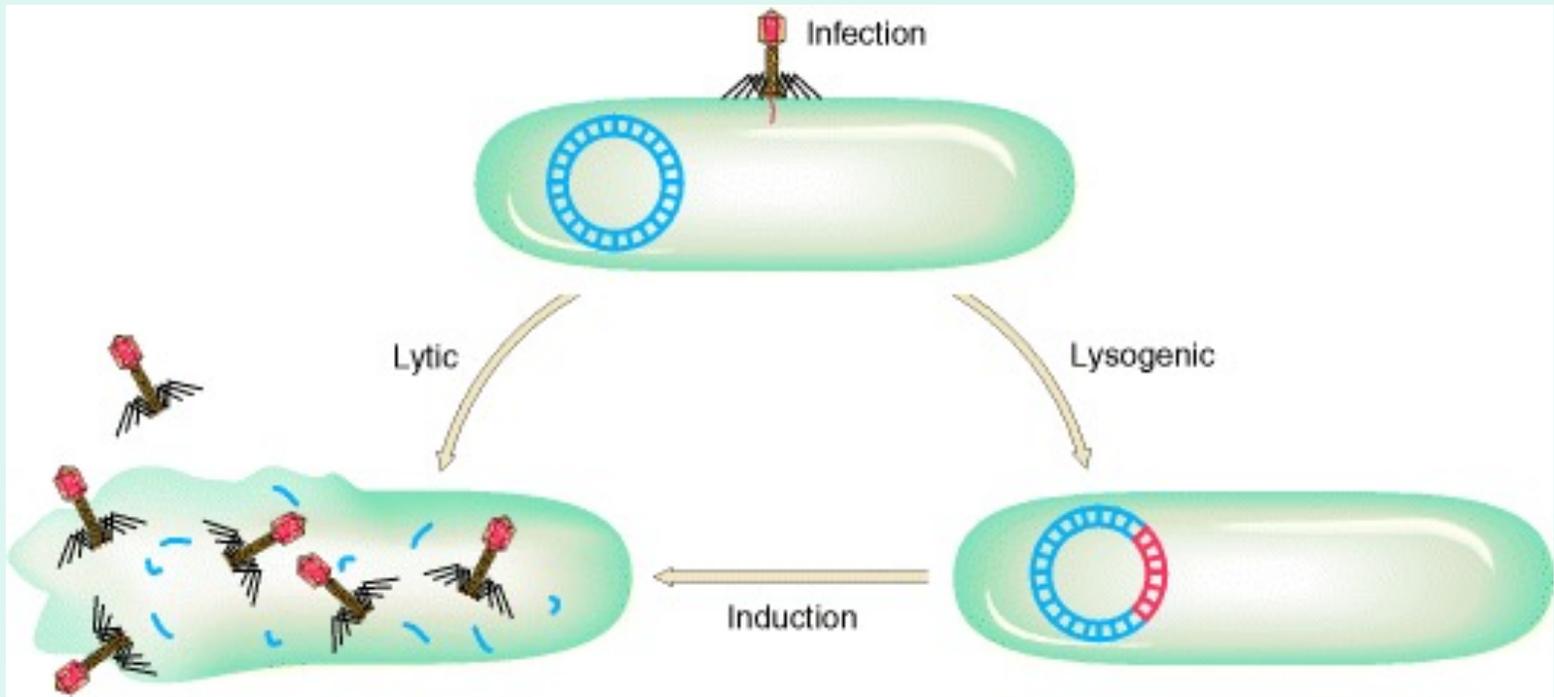


4.2. Recombinação

- Transdução

Transdução generalizada

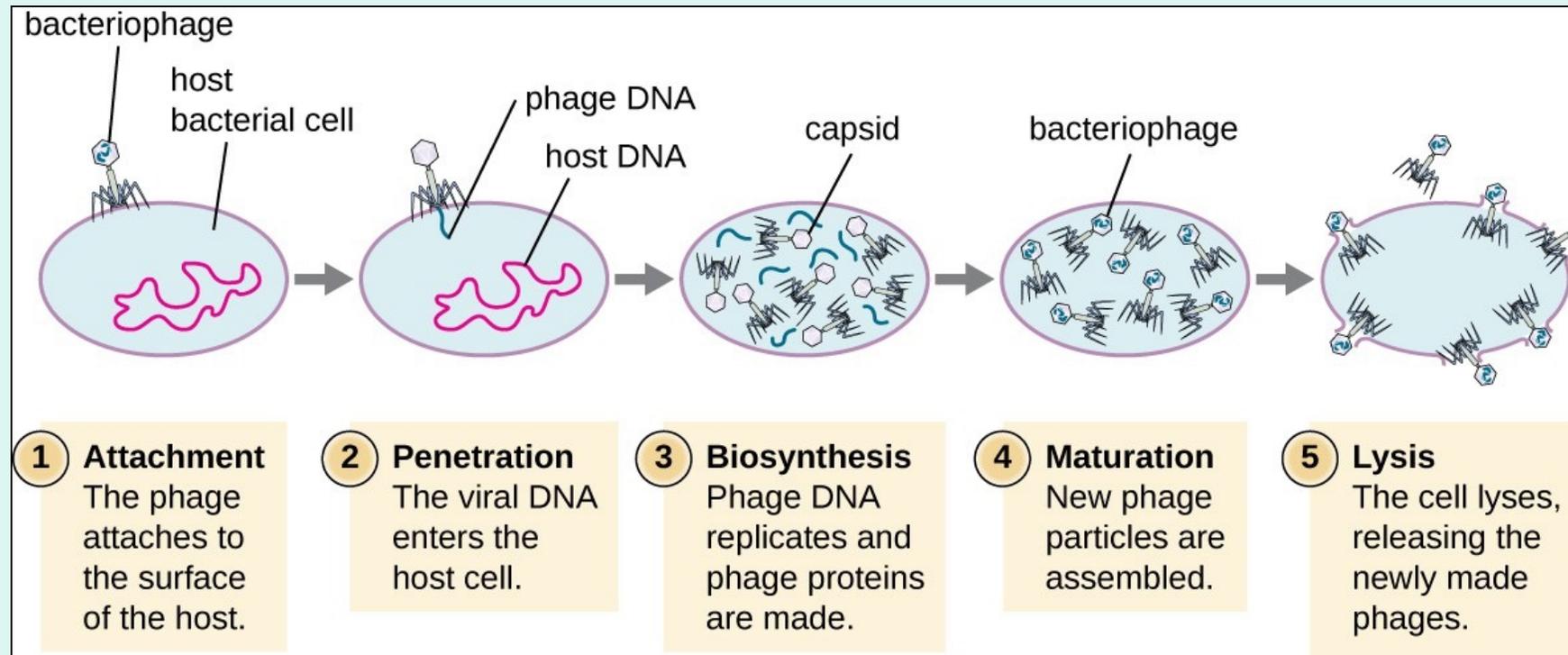
Transdução especializada



4.2. Recombinação

- Transdução

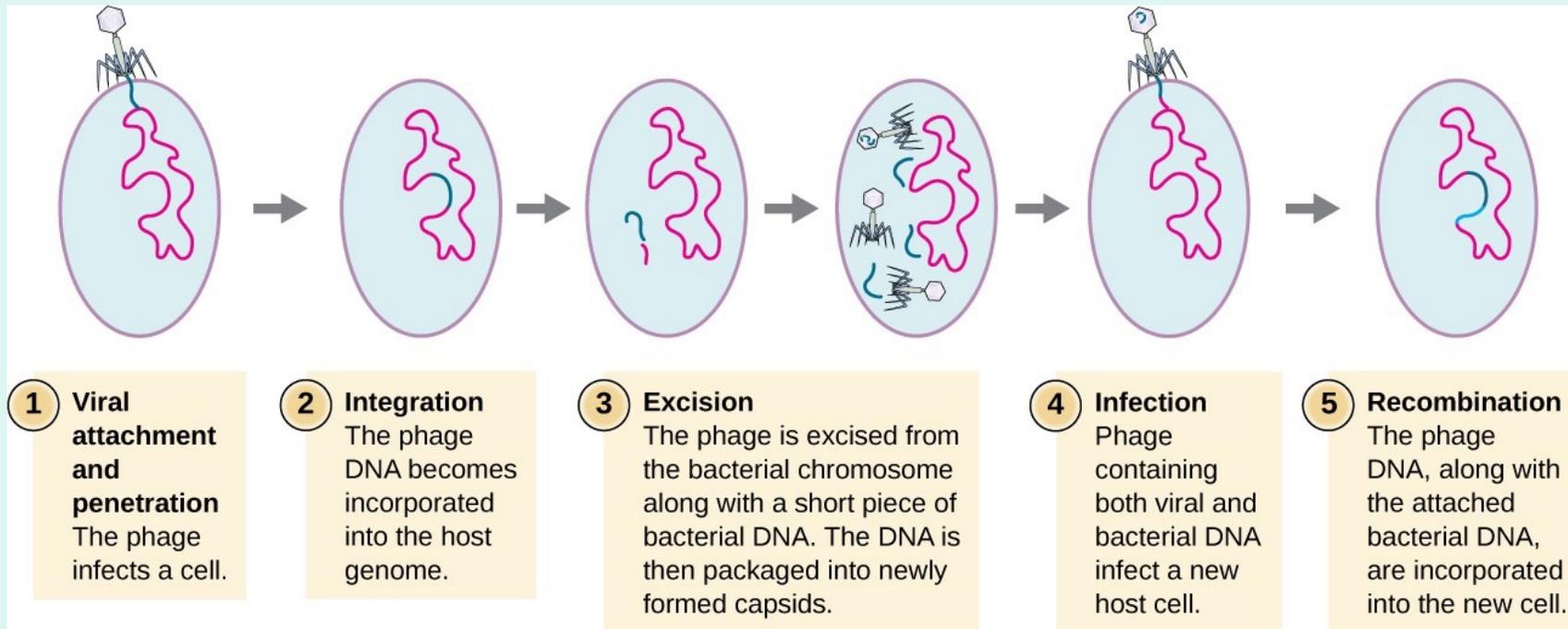
Transdução generalizada



4.2. Recombinação

- Transdução

Transdução especializada



Mecanismos de Variação Genética

Mutação

Recombinação

Transformação

Conjugação Bacteriana

Transdução

**Elementos Transponíveis -
Transposons**

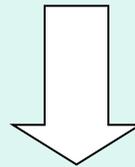
4.2. Recombinação

- Elementos genéticos Transponíveis

TRANSPOSONS

A maioria dos genes tem uma posição fixa no cromossomo

Nos anos 1940 foram identificadas sequências de DNA que alteram, suas posições.



Elementos Transponíveis

4.2. Recombinação

A descoberta dos TRANSPOSONS

Experiência clássica de **Bárbara McClintock**



1902 – 1992

Premio Nobel Fisiologia, 1983



Observou
elevada instabilidade
observada em grãos
de milho.

Não podiam ser
explicados por
Mutação
e também não
pelo que se
conhecia de
Recombinação.

1940: Resultados que desafiavam a
genética Clássica

4.2. Recombinação

- Transposons

- Controlling elements
- Cassettes
- Jumping genes
- Roving genes
- Mobile genes
- Mobile genetic elements
- Transposons
- **TRANSPOSABLE GENETIC ELEMENTS**

?

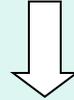
Tantos nomes ...

Porque não se entendia o que eram de fato!

4.2. Recombinação

- Transposons

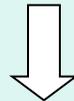
Transferência de um segmento de DNA de uma posição para outra



REARRANJOS ESTRUTURAIS

- O que é transposto?

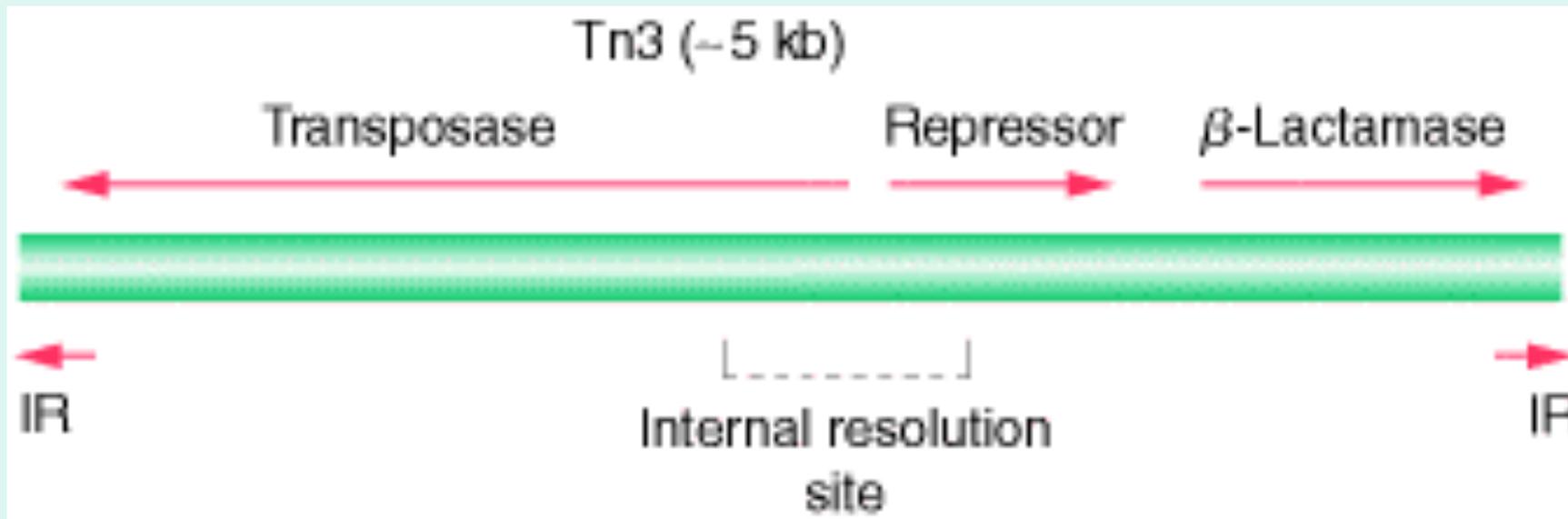
- um gene;
- um pequeno número de genes ligados;
- qualquer entidade genética deste tamanho.



“ELEMENTO GENÉTICO”

4.2. Recombinação

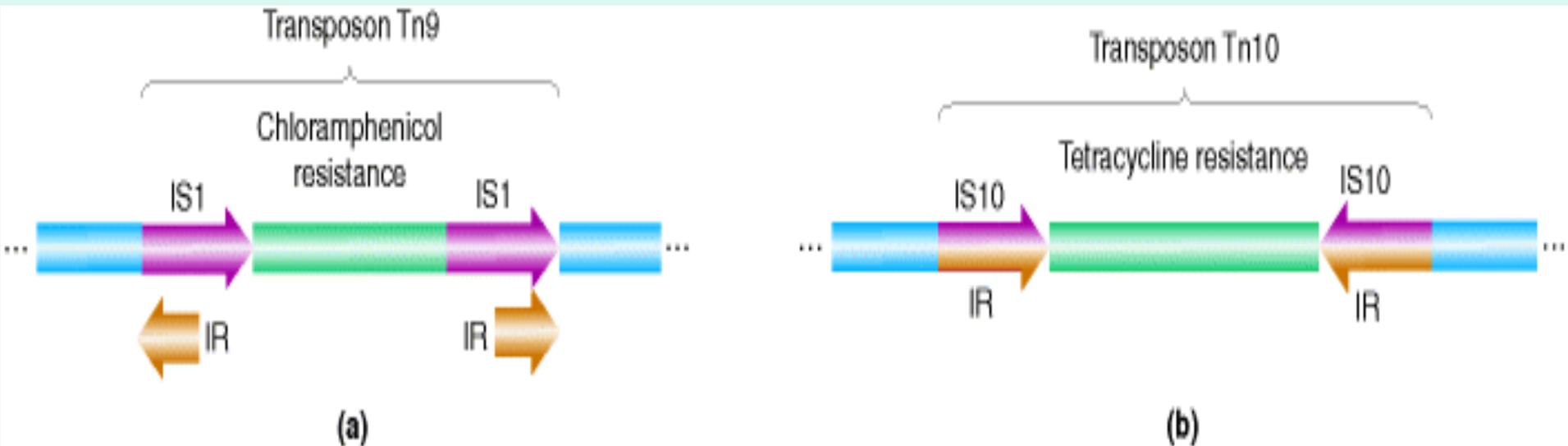
- Transposons



Tn 3

4.2. Recombinação

- Transposons



Tn 9

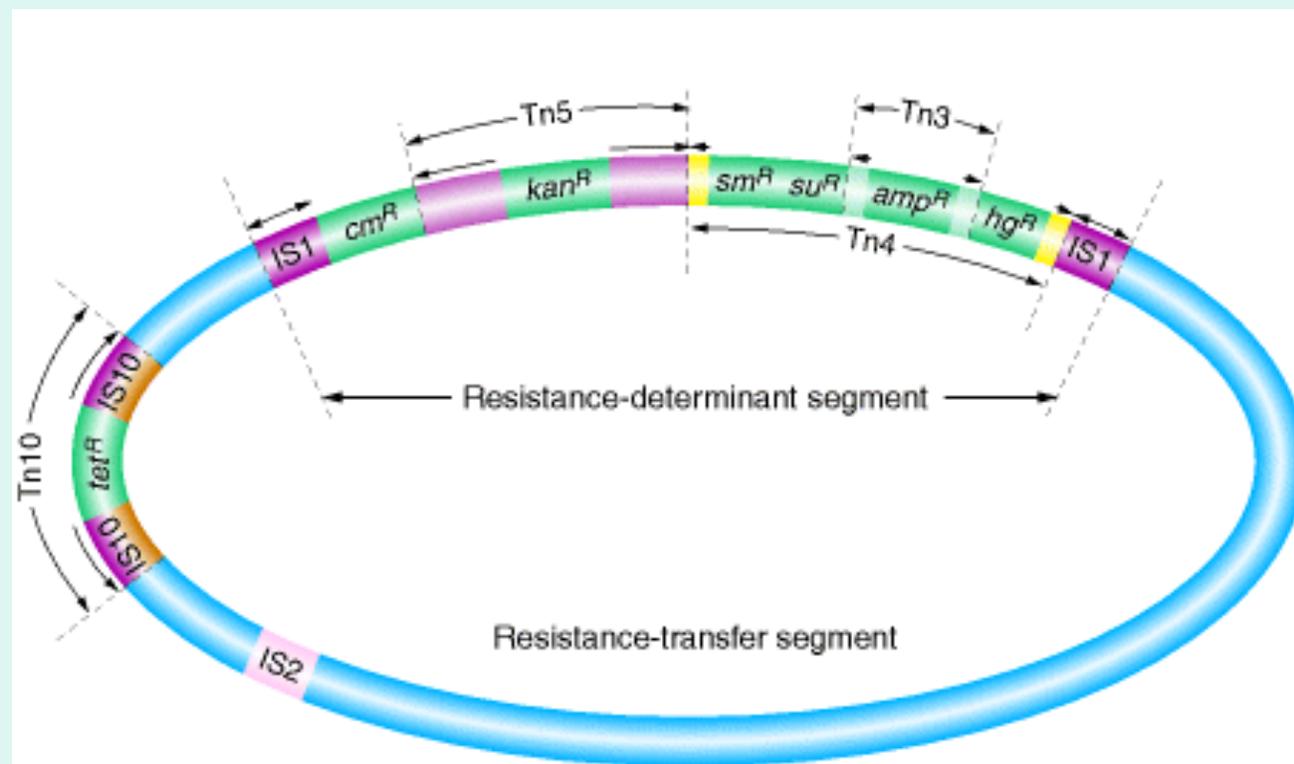
Tn 10

Quadro: Alguns Transposons de bactérias

Transposon	Marcador	Comprimento (bp)	“Inverted repeat” - IR
Tn1	Ampicilina	4.957	38
Tn2	Ampicilina		
Tn3	Ampicilina		
Tn4	Ampicilina,	20.500	Curto
	Estreptomicina,		
	Sulfanilamida		
Tn5	Canamicina	5.400	1500
Tn6	Canamicina	4.200	Não detectado
Tn7	Trimetoprim,	14.000	Não detectado
	Estreptomicina,		
Tn9	Cloranfenicol	2.638	18/23*
Tn10	Tetraciclina	9.300	1400
Tn951	<i>lac</i>	16.600	Curto
Tn1681	Enterotoxina termoestável	2.088	768 (IS1)

4.2. Recombinação

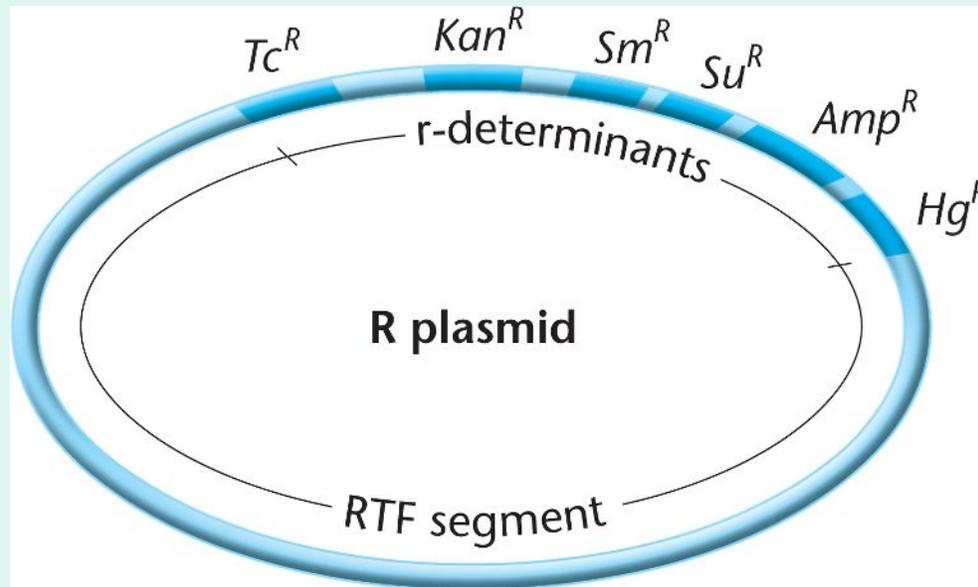
- Transposons



Participação dos **elementos transponíveis** na evolução dos plasmídeos que conferem às bactérias resistência a múltiplos antibióticos

4.2. Recombinação

- Transposons



Plasmídeos R: Os **determinantes-r** neste diagrama são:

- Tc, tetraciclina;
- Kan, Canamicina;
- Sm, estreptomicina;
- Su, sulfonamida;
- Amp, ampicilina; e
- Hg, mercúrio.

O plasmídeo **RP4**, derivado do Fator R de *Pseudomonas aeruginosa*, confere às bactérias Gram-negativas resistência a múltiplos antibióticos: Carbenicilina, Neomicina, Canamicina e Tetraciclina.

5. Sistema “CRISPR/Cas9”, ou simplesmente, **CRISPR** – Você sabe o que é isto?

O nome completo de **CRISPR** é tão complicado que é mencionado abreviadamente, vem do inglês “**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**” ou seja, **Repetições Palindrômicas Curtas** que estão **Agrupadas e Regularmente Inter-espaçadas**.

Isto ajudou? Bem vamos...vamos lá:

A **CRISPR** é na verdade um **mecanismo de defesa antigo e natural encontrado em diversas bactérias**.

Nos **anos 1980**, cientistas observaram um padrão estranho em alguns genomas bacterianos. Uma sequência de DNA poderia ser repetida diversas vezes, com sequências únicas entre as repetições.

Eles chamaram essa configuração estranha de “**agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente Inter-espaçadas**”, ou **CRISPR**, na sigla em inglês.

Isso era um enigma até cientistas perceberem que as **sequências únicas entre as repetições** combinavam com o DNA de **bacteriófagos**.

Assim, **CRISPR** seria como um “**sistema imunológico**” bacteriano, **que mantém partes de vírus “perigosos”** ao redor **para poder reconhecer e oferecer defesa** às ameaças nos ataques seguintes.

A segunda parte desse mecanismo de defesa é um conjunto de enzimas chamadas **Cas** (**proteínas associadas à CRISPR**), que **podem cortar precisamente o DNA e eliminar vírus invasores**.

Convenientemente, os genes que codificam **Cas** estão sempre próximos às sequências **CRISPR**.

Existem diversas enzimas **Cas**, mas a mais conhecida é chamada **Cas9**. Ela vem da bactéria ***Streptococcus pyogenes***, que é conhecida por causar infecção na garganta. Juntos, eles formam o sistema **CRISPR/Cas9**, frequentemente abreviado para apenas **CRISPR**.

Conforme a região **CRISPR** se enche com o DNA de bacteriófagos, ela se torna uma galeria das moléculas mais procuradas, representando os inimigos que a bactéria encontrou.

A bactéria pode então usar esse DNA viral para transformar as enzimas **Cas** em armas guiadas com precisão.

Depois, a bactéria copia o material genético em cada espaçador e o coloca em moléculas RNA.

As enzimas **Cas** deslizam pela célula e, se encontrarem material genético de um vírus que corresponde à um **RNA CRISPR**, o RNA o se liga a ele. Então, as enzimas **Cas** cortam o DNA em dois, impedindo a replicação desse vírus.

Fonte: Carl Zimmer



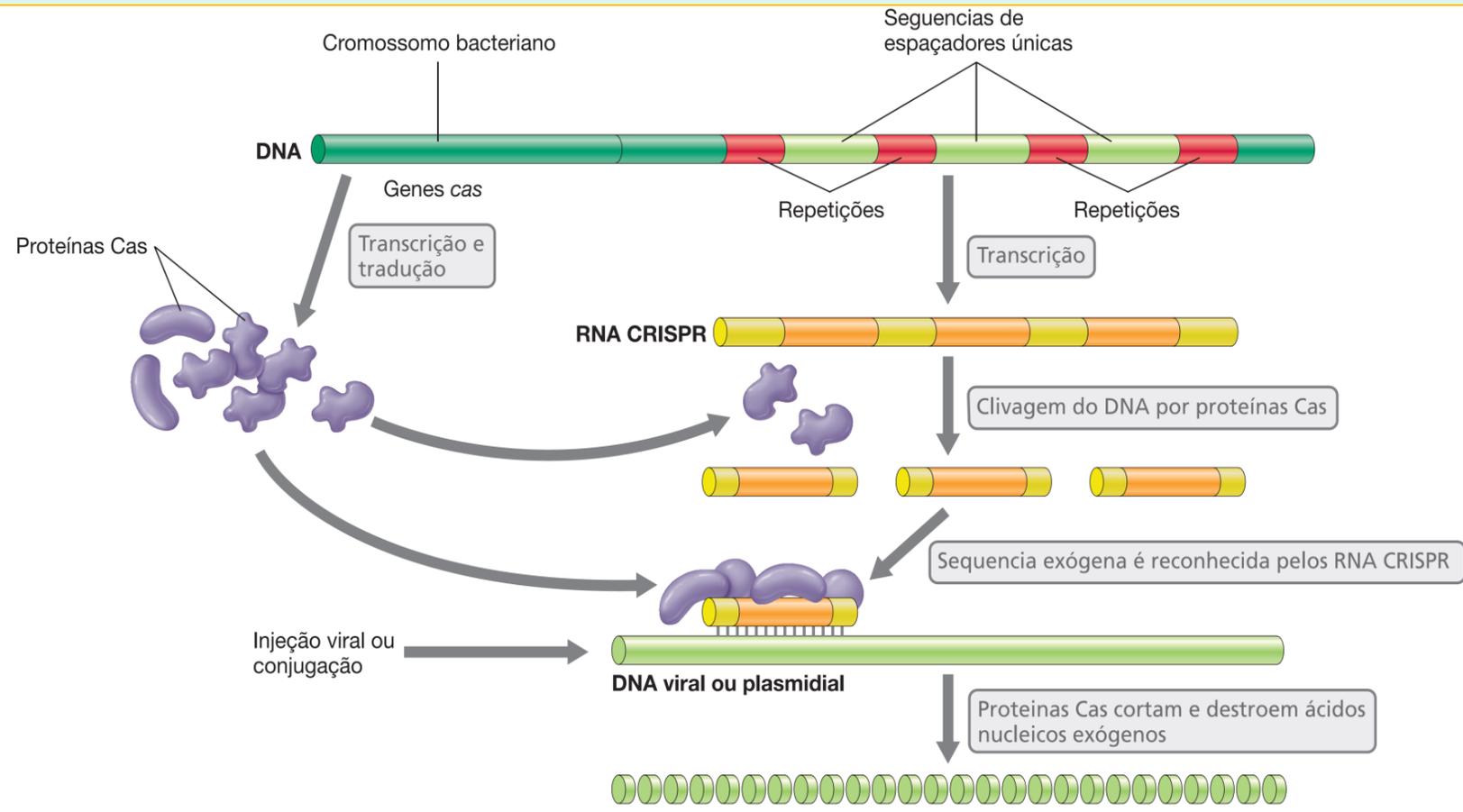
Potencial Biotecnológico:

vídeo: Genome Editing with CRISPR-Cas9

<https://youtu.be/2pp17E4E-O8>

O sistema CRISPR permite edição de genomas de bactérias, de leveduras e até mesmo de humanos.

5. Sistema “CRISPR/Cas9”, ou simplesmente, **CRISPR** – Você sabe o que é isto? (continuação)



A operação do sistema CRISPR: A região CRISPR no cromossomo bacteriano é transcrito em longas moléculas de RNA que depois são processadas em segmentos por algumas das proteínas **Cas**. Cada segmento espaçador corresponde a encontros anteriores com ácidos nucleicos exógenos que entraram na célula. Se uma dessas pequenas moléculas de RNA CRISPR (correspondendo a um espaçador) reconhece e pareia suas bases com o ácido nucleico adquiridos por transdução ou por conjugação, outras proteínas **Cas** destroem o ácido nucleico exógeno.

6. Questões simples para Estudo

1. As mutações em bactérias podem ocorrer por qual dos seguintes mecanismos?

- (A) Substituição de bases
- (B) Deleções
- (C) Inserções
- (D) Rearranjos
- (E) Todas as alternativas anteriores

2. A forma de troca genética na qual o DNA doado é introduzido no receptor por um vírus bacteriano é:

- (A) Transformação
- (B) Conjugação
- (C) Transfecção
- (D) Transdução
- (E) Transferência horizontal

3. A forma de troca genética em bactérias mais suscetíveis à atividade de desoxirribonuclease durante o processo de captação do DNA é:

- (A) Transformação
- (B) Conjugação
- (C) Transfecção
- (D) Transdução
- (E) Todas as alternativas anteriores

4. Qual é o elemento genético que para sua transferência, intra-espécie ou interespecie, requer interação física das bactérias viáveis participantes ?

- (A) Bacteriófago de DNA de fita simples
- (B) Bacteriófago de DNA de fita dupla
- (C) Bacteriófago de RNA de fita simples
- (D) Plasmídeo
- (E) Transposon

5. A formação de um cruzamento durante o processo de conjugação genética em *Escherichia coli* requer:

- (A) A lise do doador
- (B) Um pilus sexual
- (C) A transferência das duas fitas do DNA
- (D) Uma endonuclease de restrição
- (E) A integração de um transposon



**Instituto de
Ciências
Biomédicas USP**



Obrigada!
Elisabete Vicente
EJV_USP
bevicent@usp.br
(2022)

Até a próxima !

Respostas:
1-E; 2-D; 3-A;
4-D; 5-B