

Microbiologia básica

Genética de procariotos

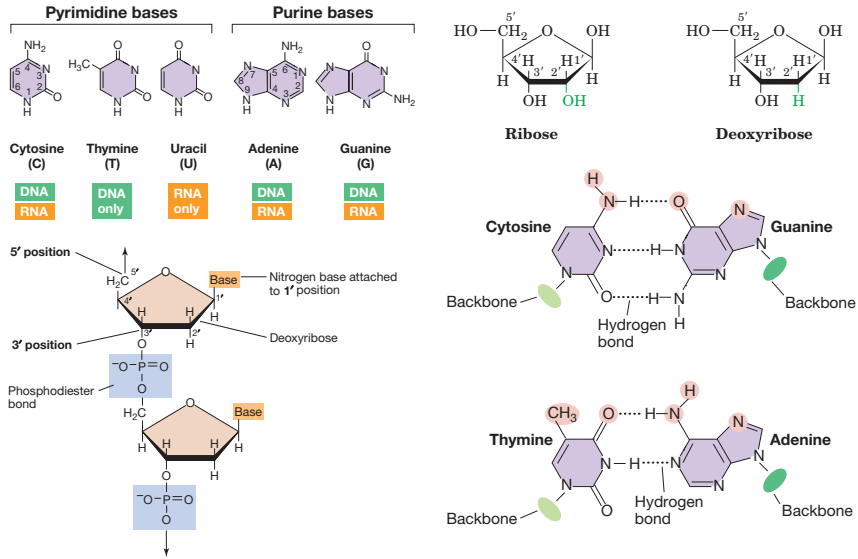
Robson Francisco de Souza. Ph.D
robfsouza@gmail.com
LEEP: Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas
ICB/USP – 2019

Tópicos

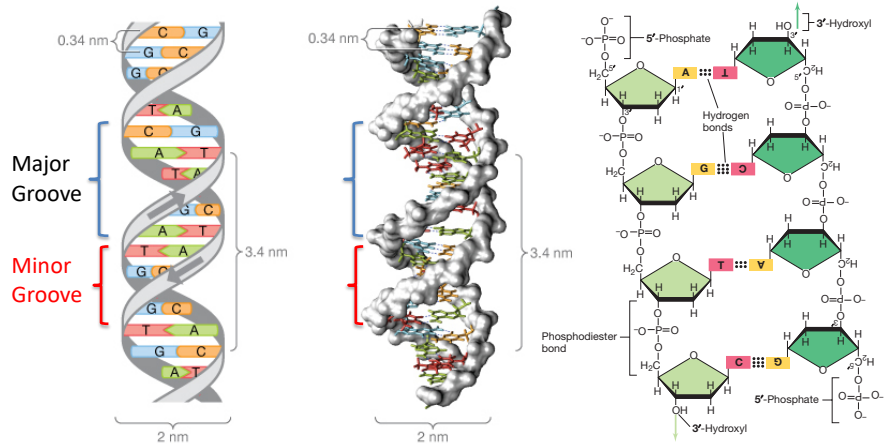
- **Genomas de procariotos**
 - Composição e estrutura química do DNA
 - Organização dos genomas e estrutura dos genes em procariotos

- **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

Genoma: tipos de moléculas

Organismo	Elemento	Ácido nucléico	Descrição
Procarioto	Cromossomo	DNA dupla fita	A maioria é circular, muito longo
Eucarioto	Cromossomo	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

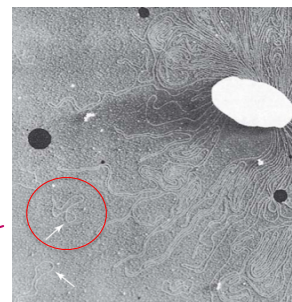
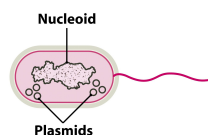
* Plasmídeos são muito raros em eucariotos

Cromossomos

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

Plasmídeos

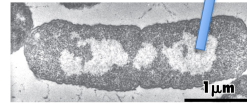
- Usam as polimerases do cromossomo
- Controlam seu número na célula
- Codificam genes para segregação



Cromossomos de procariotos

```
>gi|49175990|ref|NC_000913.2| Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655,
complete genome
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCT
GATAGCAGCTTCTGAATCGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTC
ACTAAATACCTTAAACCAATATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAATTACAGAGTACACA
ACATCCATGAACGCAATAGCACCCACCATTACCACACACCATCACCATTACCACAGGTAACG
GTGCGGGCTGACCGGTACAGGAAACACAGAAAAAGCCCGACCTGACAGTGGCGCTTTT
TTTTTCGACCAAAGTAAAGAGTAAACACCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCA
GTGGCAATGCAAGACTTTTCTGCGTGTTCGCGATATCTGAAAGCAATGCCAGGCAAG
GGCAGGTGGCCAGCTCTCTCTGCCCCGCCAAAATCACCACACACCTGGCGCATGAT
TGAAAAAACATTAGCGGCGAGGATGCTTTACCATAATCAGCGATGCCGAACGATTTTTT
GCCGAACCTTTGACGGGACTCGCCGCCGCCAGCCGGGGTCCCGCTGGCGCAATGAAAA
CTTTGCGATCAGGAATTTGCCAAAATAAACAATGCTCTGCATGGCATTAGTTGTTGGG
GCAGTGGCCGGATAGCATCAACGCTGCGCTGATTTCGCCGTGGCGAGAAAATGTCATGCC
ATTATGGCCGGGTATTAGAACGCGCGCGTCAACAAGTATGTTATCGATCCGGTCAAAA
AACCTGTGGCAGTGGGCAATACCTCGAATCACCCTGATGTCGAGTCCACCCGCGG
TATTGGCCAAAGCCGATTCGGCTGATCACATGGTCTGATGGCAGGTTTCCAGCCGGT
AATGAAAAAGCGAATCGTGGTCTGGACGCAACGGTCCGACTACTCTGCTGCGGTGC
TGGCTGCTGTATTACGCCGATTTGCGAGATTGGACGGACGTGACGGGGTCTATAC
CTGCGACCCGCTCAGGTGGCCGATGGAGGTTGTGAAGTGCATCTCACCAGGAAGCG
ATGGAGCTTCTCTACTCGCGCTAAAATTCTTCAACCCGACCATACCCCACTGCC
AGTTCAGATCCTTGCCTGATAAAAATACCGAAATCTCAAGCACCAGGTACGCTCAT
TGGTCCAGCCGGTATTGAAGCAATACCGGTCAAGGGCATTTCGAATGAATAACATG
GCAATGTCAGCTTCTGCTCGGGGATGAAGGGATGGTGGCAGTGGCGCGCGCTCT
TTCAGCGATGTCACGCCGCTATTTCCGTGGTCTGATTACGCAATCATCTCCGAATA
CAGCATCAGTTCTGCGTTCACAAAGGACTGTGTGCGAGTGAACGGCAATCAGGAAG
GAGTTCTACTGGAACGAAAGAGGCTTACTGGAGCCGCTGGCAGTGCAGGAAAGCGTGG
CCATTATCTGGTGGTGGTGAAGTATGCGCACCTTGGTGGGATCTCGGGAAAATCTT
TGCAGCACTGGCCGCGCAATATCAACATTTGCGCATGCTCAGGGATCTCTGAACGG
TCAATCTCTGTGCTGATAAATACGATGATGCGCACCTGGCGTGGCGGTACTCATCA
TGCCTTCAATACCGATCAGTTATCGAAGTGTGTTGATTGGCGTGGTGGCGTGGCGG
TGGCGCTGGAGCAATGAAGCTGAGCAAGCTGGCTGAAGAATAACATACGACTTA
CGTGTCTGGGTGTTGCCAATCGAAGGCTCTGCTCACCATTGATACATGGCTTAACTCG
AAAATGGCAGGAAGACTGGCCAAAGCAAGGCGCTTAACTCGGGCGCTTAATTCG
CCTCGTGA...
```

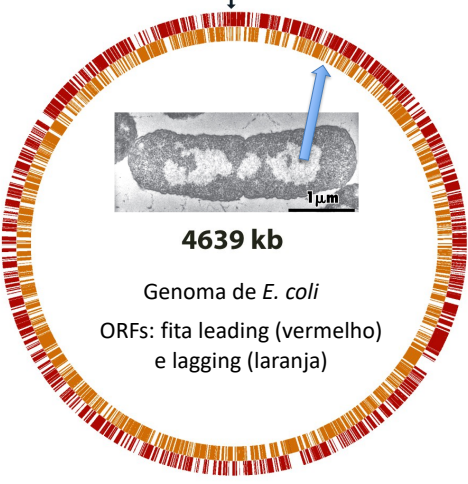
Origin of replication



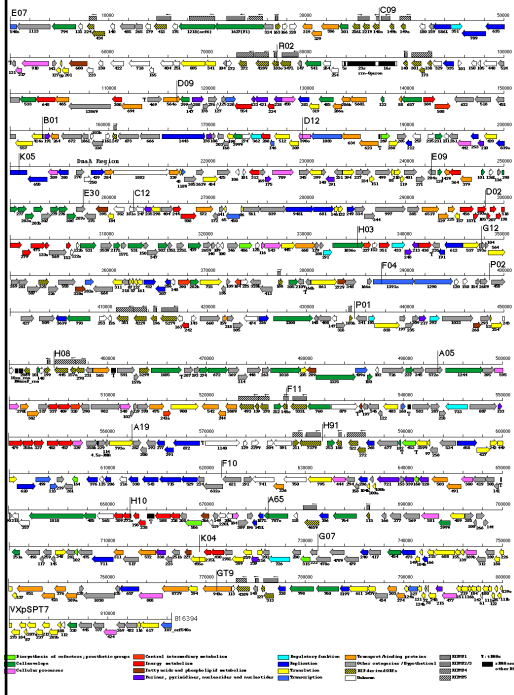
4639 kb

Genoma de *E. coli*

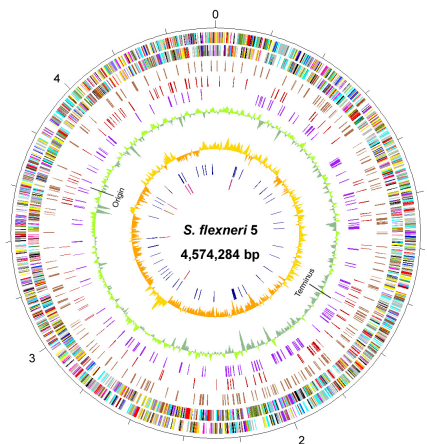
ORFs: fita leading (vermelho) e lagging (laranja)



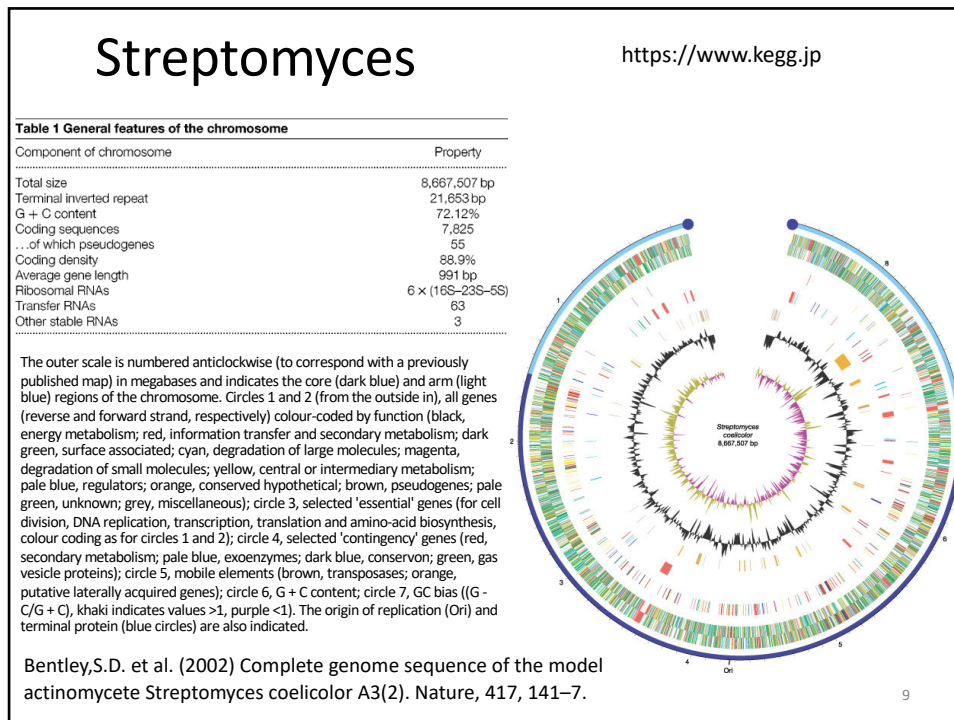
Gene Map of the *Mycoplasma pneumoniae* Genome



Genomas completos: exemplos



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



Estrutura dos genes em procarionotos

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

Transcription bubble

5' Sense (coding) strand 3'
3' Antisense (noncoding) strand 5'

RNA

RNA polymerase (core enzyme) Sigma factor

Sigma recognizes promoter and initiation site

Transcription begins; sigma released. RNA chain grows

Termination site reached; chain growth stops

Polymerase and RNA released

(a)

Síntese de RNA: início

ZOOM

RNA polymerase (core enzyme) Sigma

Transcription

5' mRNA start 3'

1. CTG TTGACAATTAATCATCGAACTAG TTAAGTAGTACGCAAG
 2. CTATTCCTGTGGATAACCATGTGTATAGAGTTAGAAAACA
 3. TGGTTCAAAATCGCCTTTTGGTGTATATACTCACAGCATA
 4. TTTTGGAGTTGTGTATAACCCCTCATCTGTATCCAGCTT
 5. TAGTTGCATGAACCTCGCATGTCTCCATAGAATCCGGCTACT
 6. TTTTGCACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGGCTC

Consensus **TTGACA** **TATAAT**

-35 sequence Pribnow box

Promoter sequence

RNA polymerase (core enzyme) Sigma factor

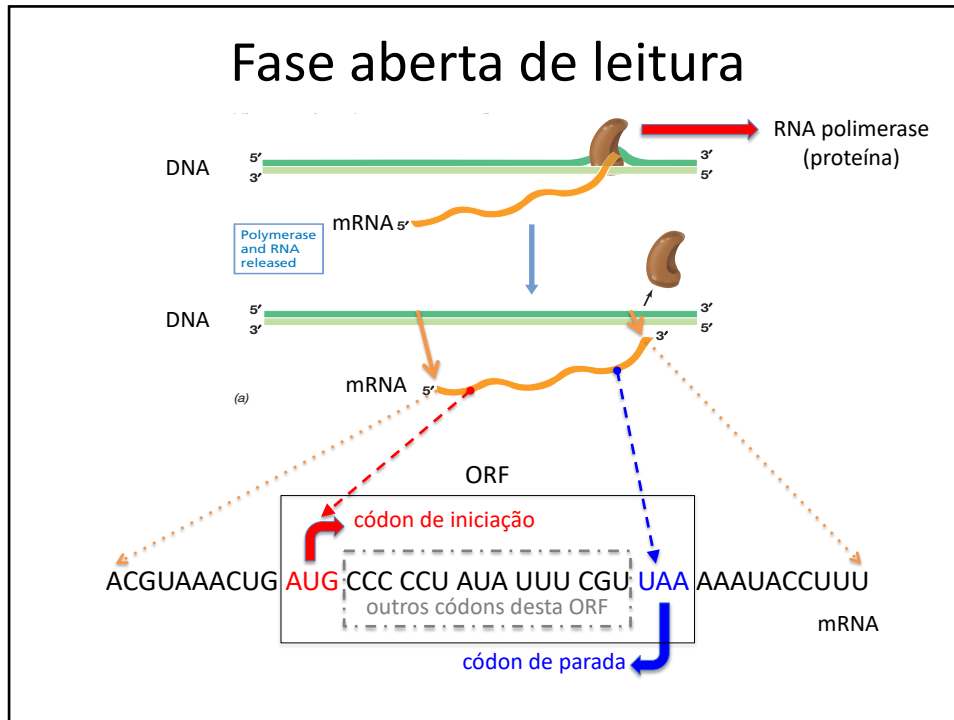
Sigma recognizes promoter and initiation site

Transcription begins; sigma released. RNA chain grows

Termination site reached; chain growth stops

Polymerase and RNA released

- 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

“Open reading frame” ou ORF

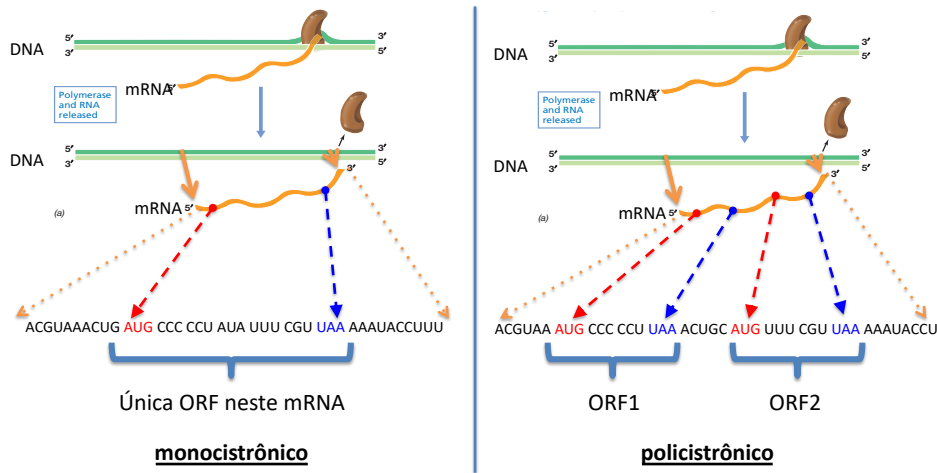
- **Definição:** uma fase aberta de leitura é a sequência de códons em uma molécula mRNA que determina os aminoácidos de uma única proteína.
- ORFs são compostas por um **códon de iniciação** e um **códon de parada**, e todos os códons intermediários (ver próximos slides).

...ACGUAAACUG AUG CCC CCU AUA UUU CGU UAA AAAUACCUUU... mRNA

- 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

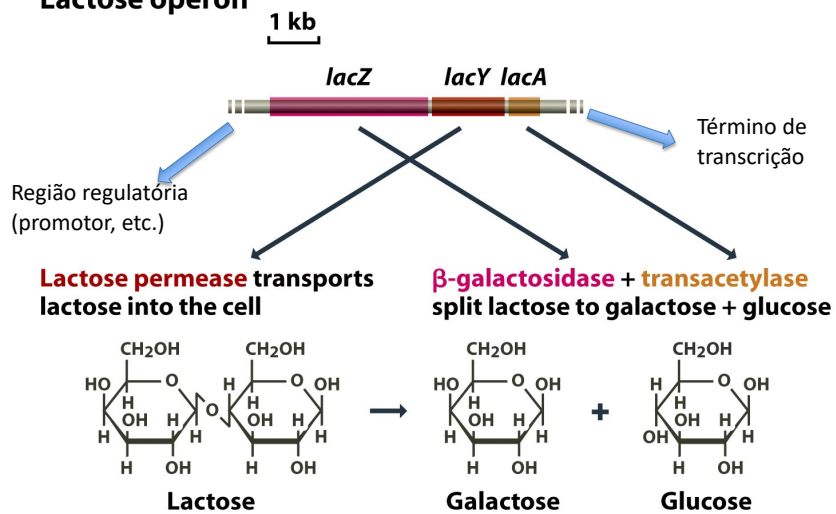
Em procariotos, uma única molécula de mRNA pode conter uma ou mais ORFs

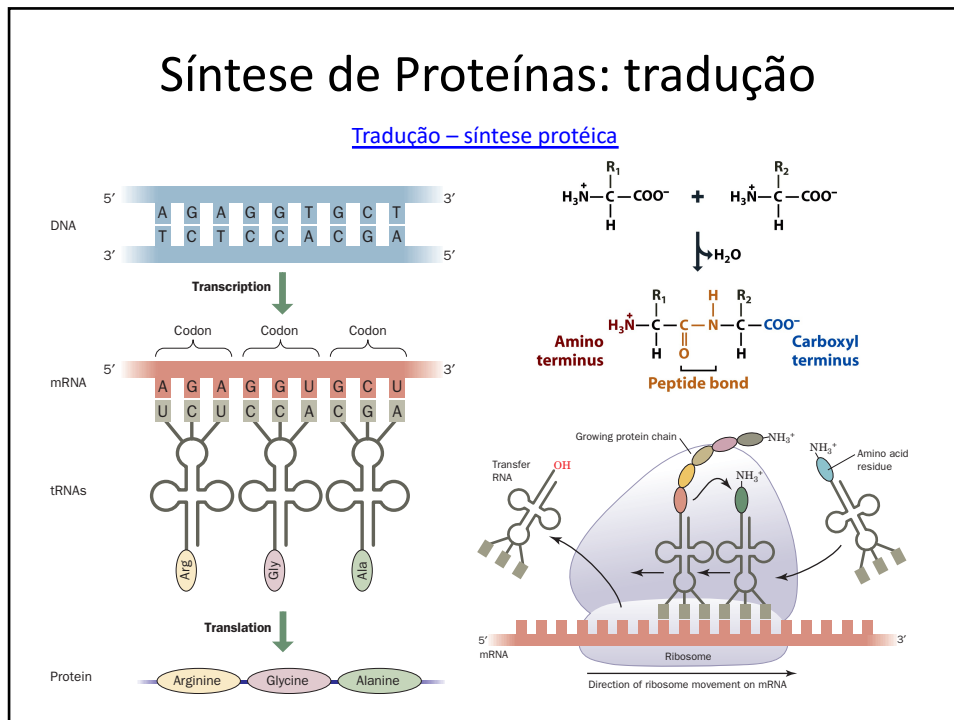


Definição: operon é um conjunto de genes vizinhos, codificantes ou não, transcritos em uma única molécula de mRNA policistrônico.

Genomas de procariotos: operons

Lactose operon





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

- **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

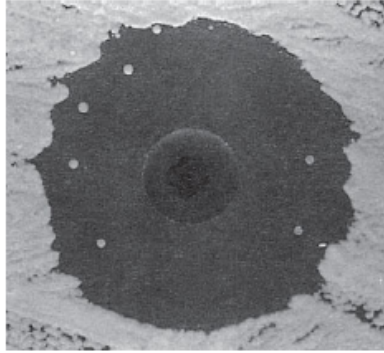
Nomenclatura das mutações / mutantes			
Tipo de alteração	Exemplo	Categoria	Definição
Selvagem	wt	selvagem	referência
Fenotípicas	His ⁺	selvagem	Posso fazer minha própria histidina
	His ⁻	auxotrófico	Tenho que comer histidina pra viver
	Lac ⁺	selvagem	Posso comer lactose
	Lac ⁻		Não como lactose
Genotípicas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

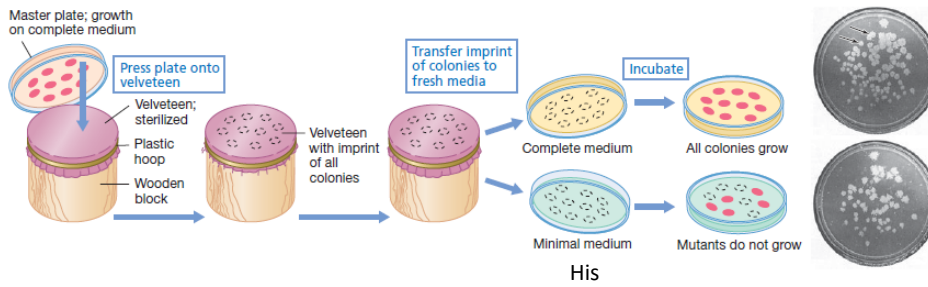


Fungos *Aspergillus nidulans*
Variação na pigmentação

Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Problema: selecionar uma **deficiência**

Técnica de Plaqueamento de Réplica



Problema: selecionar uma **deficiência**

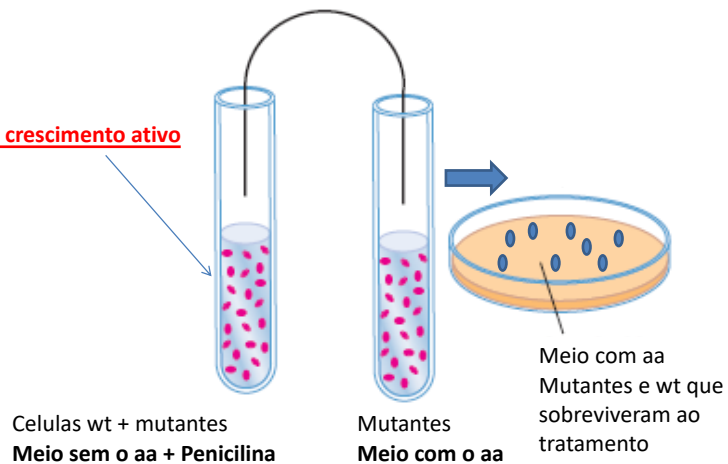
Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Problema: selecionar uma **deficiência**

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

Penicilina:

Mata células **em crescimento ativo**



Mutagênese

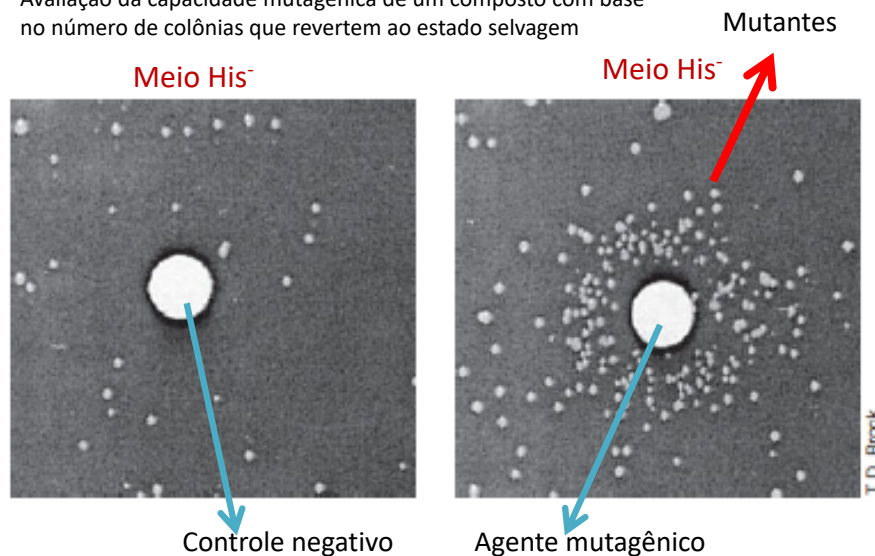
- **Espontâneas**
 - Causadas por erros do sistema de replicação
 - Muito raras nos genomas baseados em DNA
 - Ocorrem com frequência 1000x maior em genomas de RNA
- **Induzidas**
 - Provocadas por agentes químicos ou físicos externos à célula

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 reverts ao estado selvagem



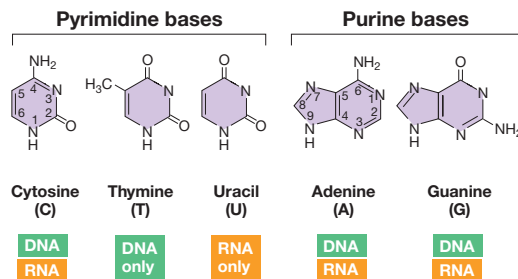
Tipos de mutações

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

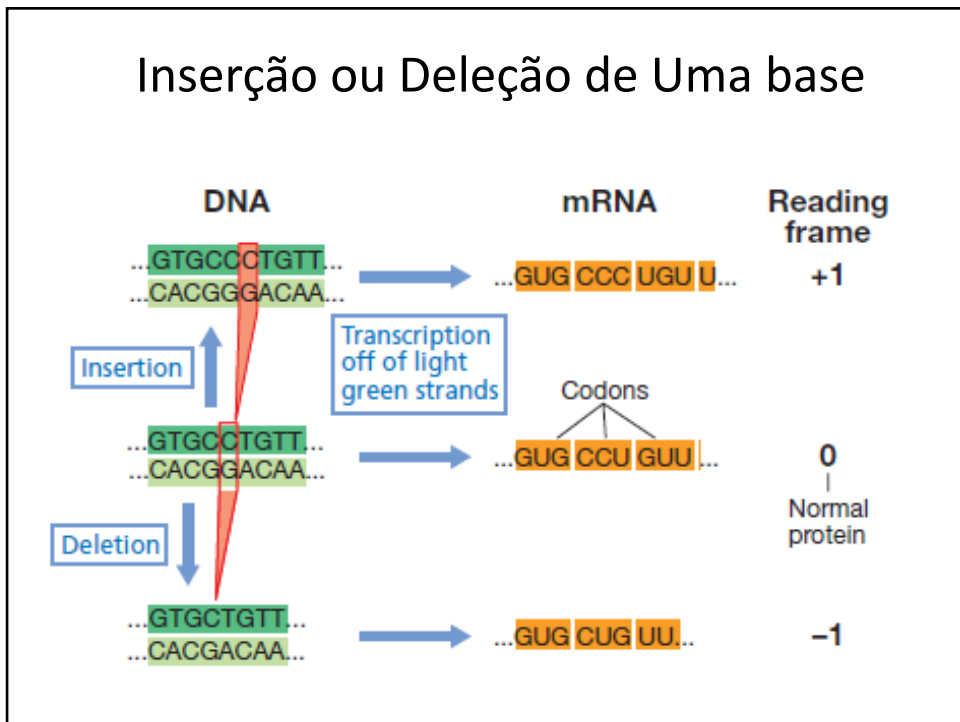
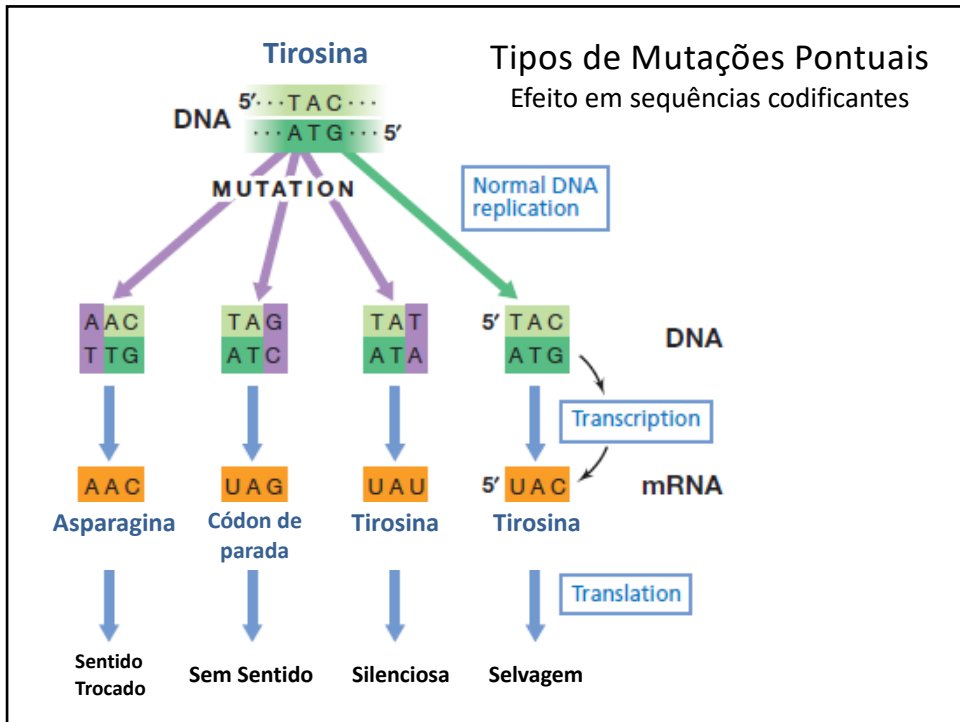
		Second Position					
		U	C	A	G		
First Position	U	UUU	Ser / S	UAU	STOP	UGU	Third Position
		UUC		UAC		UGC	
		UUA		UAG		UGA	
		UUG		UGG		UGA	
C	CUU	Pro / P	CAU	STOP	CGU		
	CUC		CAC		CGC		
	CUA		CAA		CGA		
	CUG		CAG		CGG		
A	AUU	Thr / T	AAU	STOP	AGU		
	AUC		AAC		AGC		
	AUA		AAA		AGA		
	AUG		AAG		AGG		
G	GUU	Ala / A	GAU	STOP	GGU		
	GUC		GAC		GGC		
	GUA		GAA		GGA		
	GUG		GAG		GGG		

Tipos de mutação: mutações pontuais

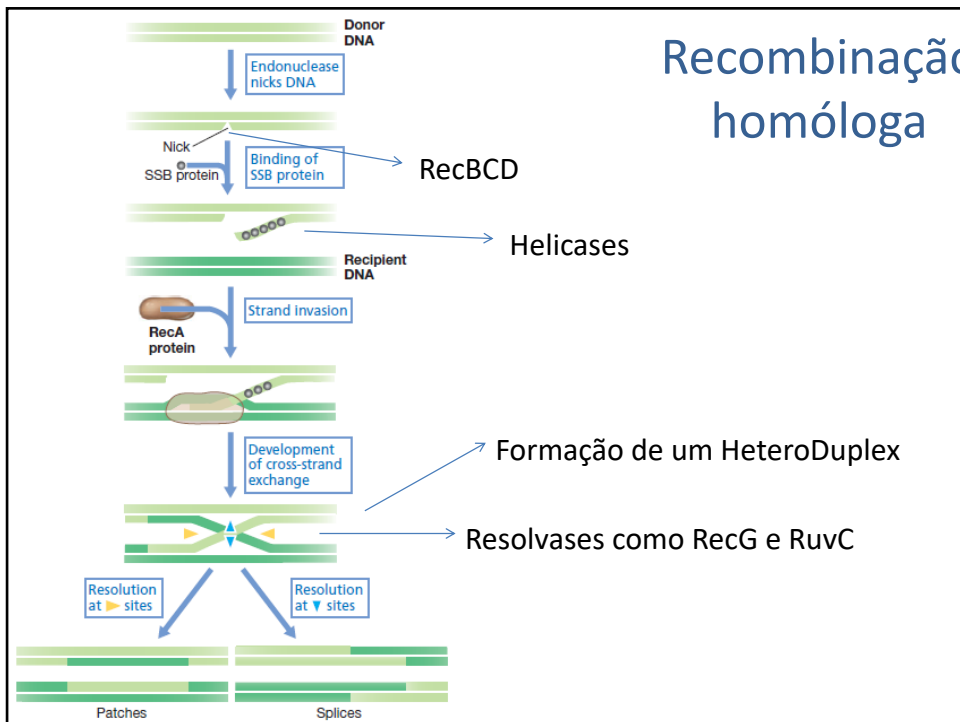
Mutações pontuais correspondem à **troca de uma única base no genoma**
São também conhecidas como polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)



Transição		Transversão	
Purina – Purina	Pirimidina – Pirimidina	Purina – Pirimidina	Pirimidina – 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



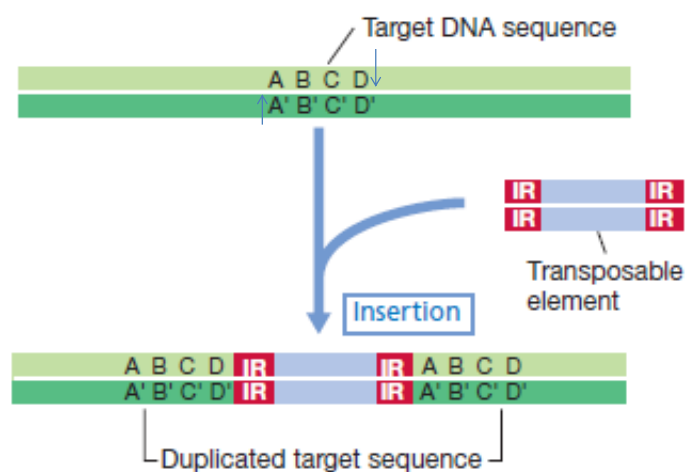
Recombinação e Transposição

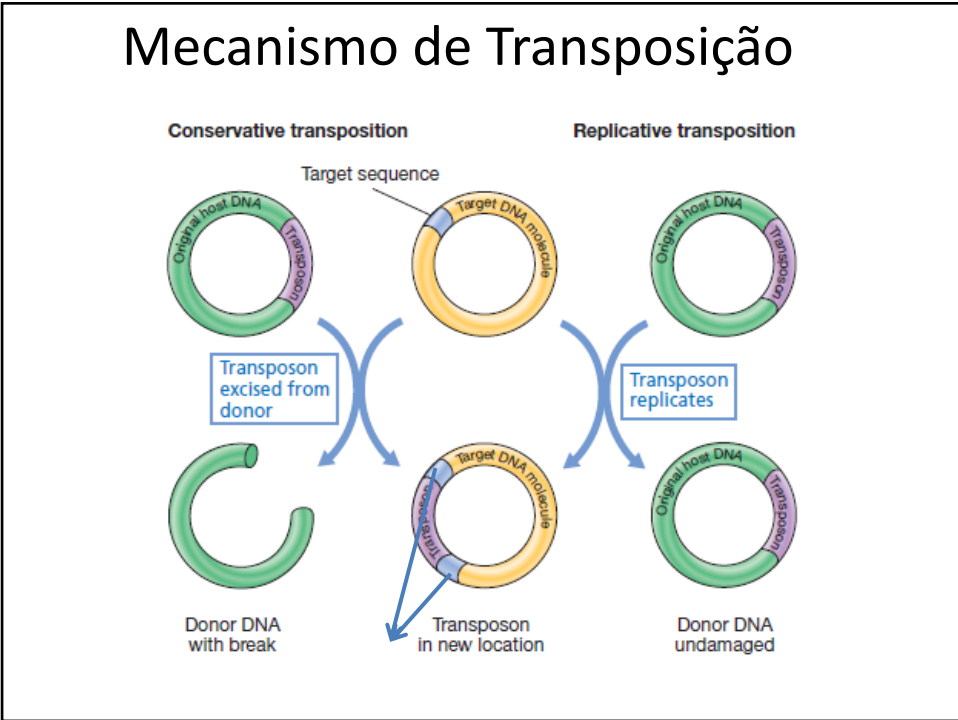
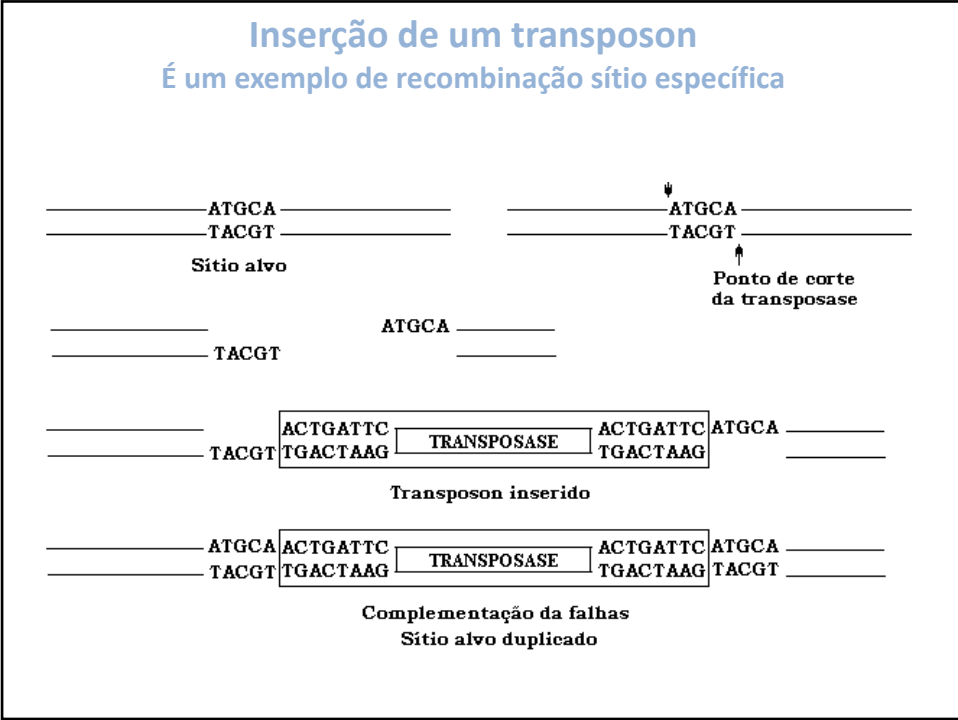


Transposição

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

Transposição

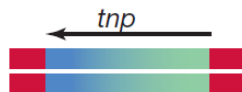




Elementos Transponíveis

IS: Sequência de Inserção

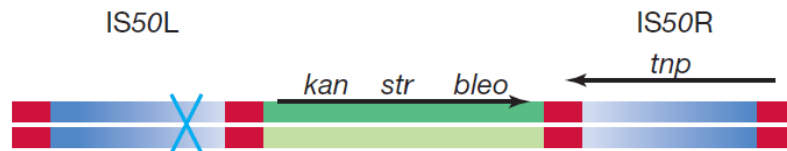
IS2



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

Transposon

Tn5



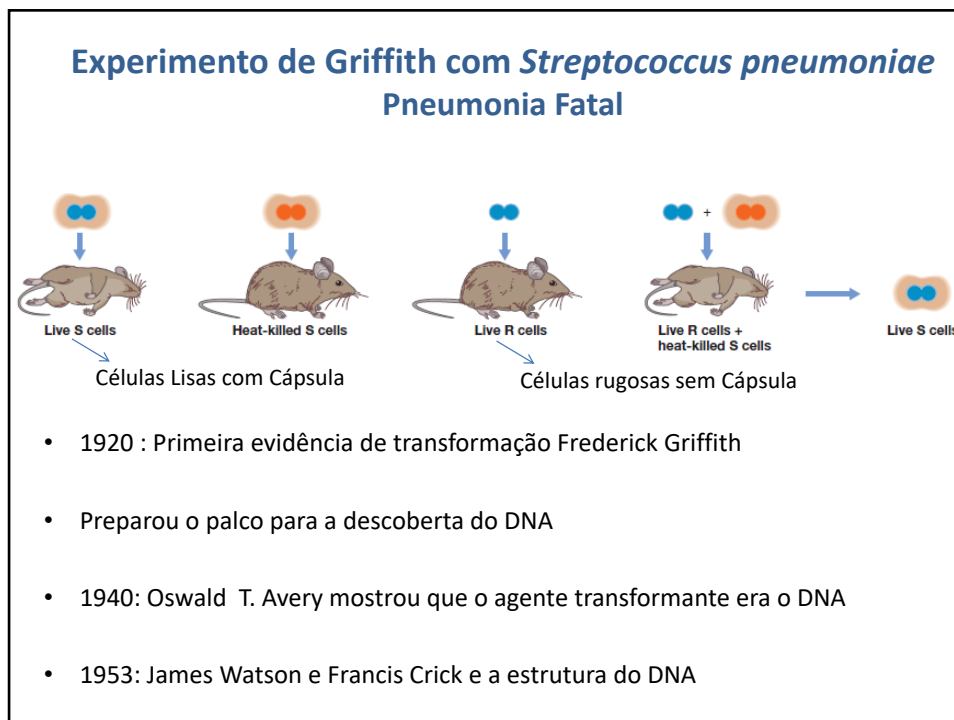
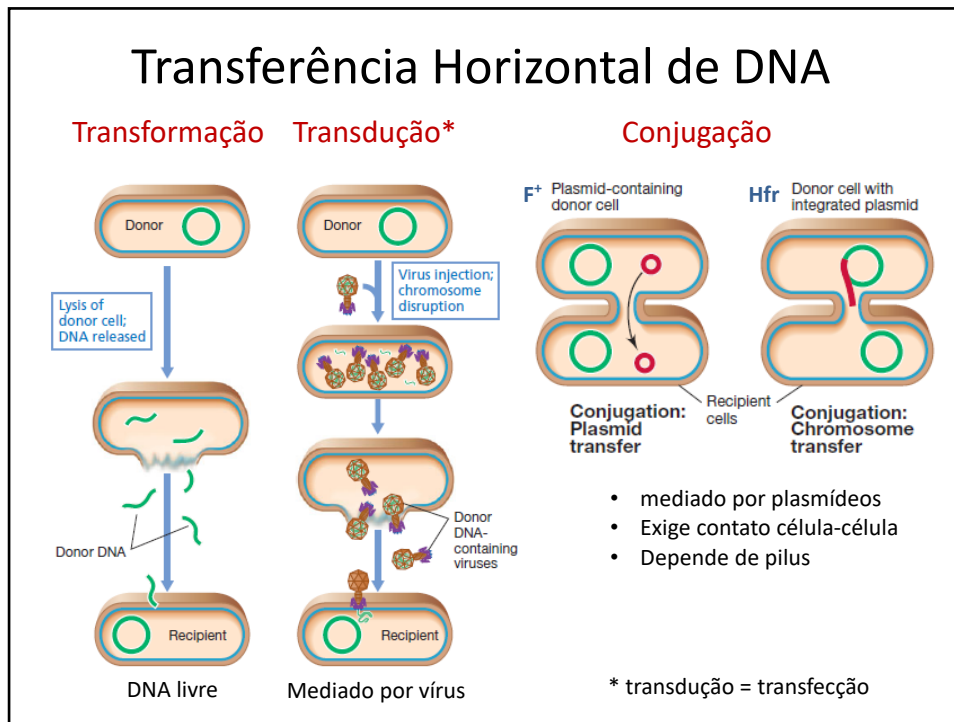
Mutação sem sentido na primeira transposase impede transposição independente

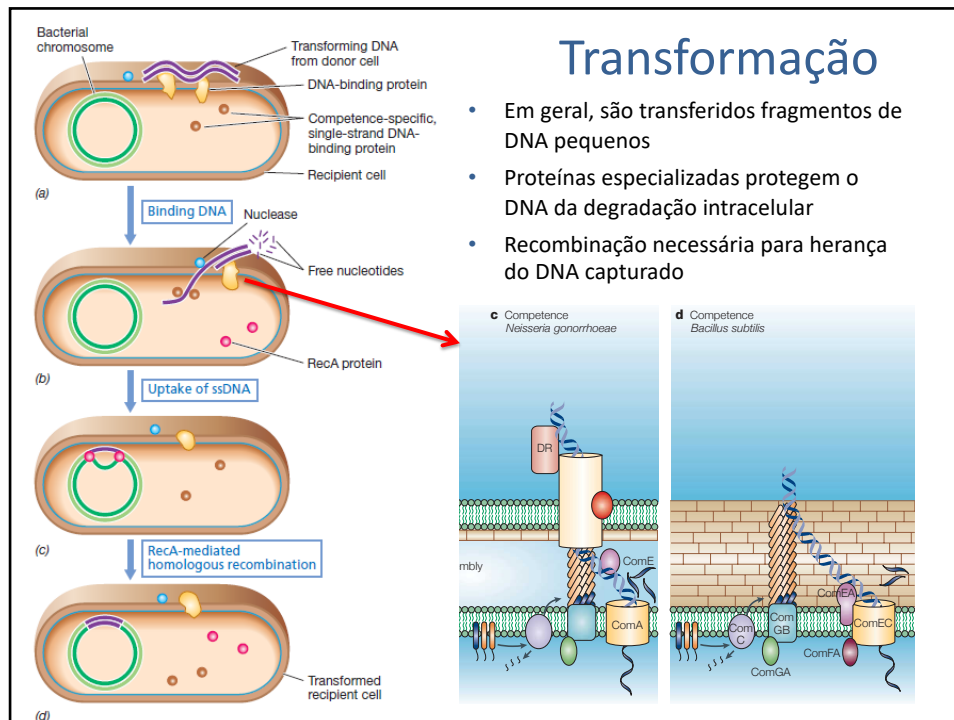
- Elemento transponível composto
- Pode carregar genes não envolvidos na mobilização do elemento

Permuta Genética em Procaríotos

Três Mecanismos de Troca Genética

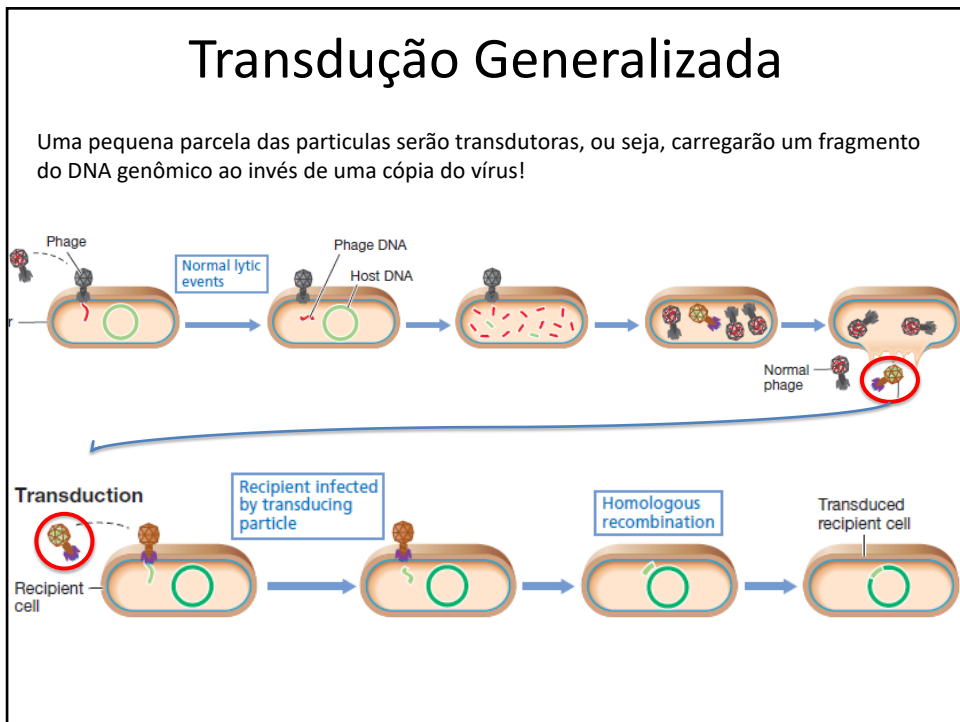
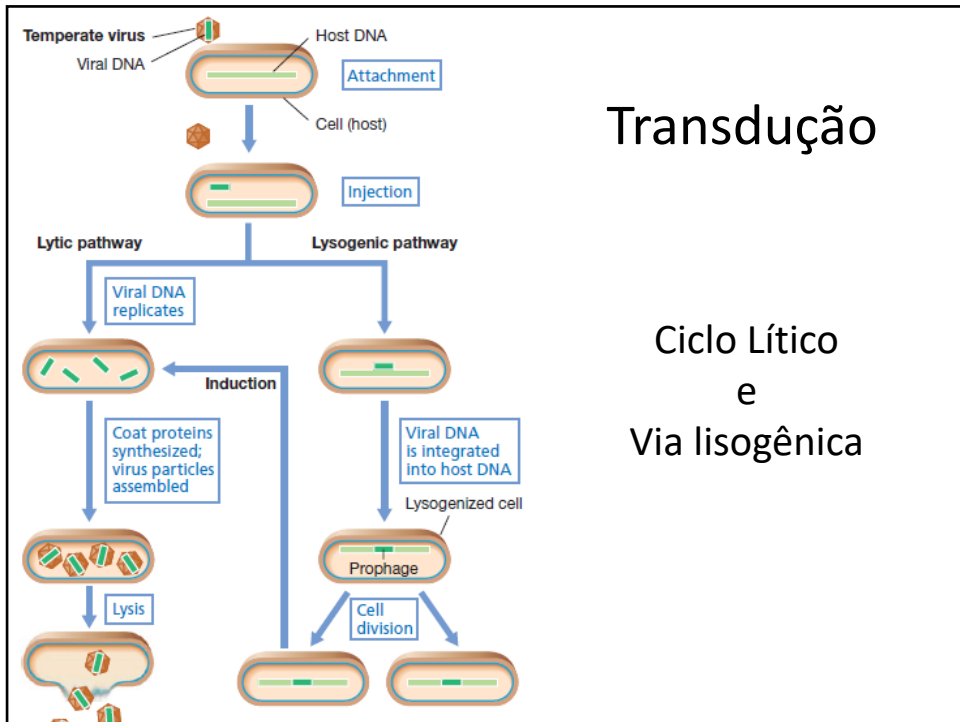
- Transformação
 - Competência
- Transdução
 - Generalizada
 - Específica
- Conjugação
 - Plasmídeos
 - Cepas Hfr

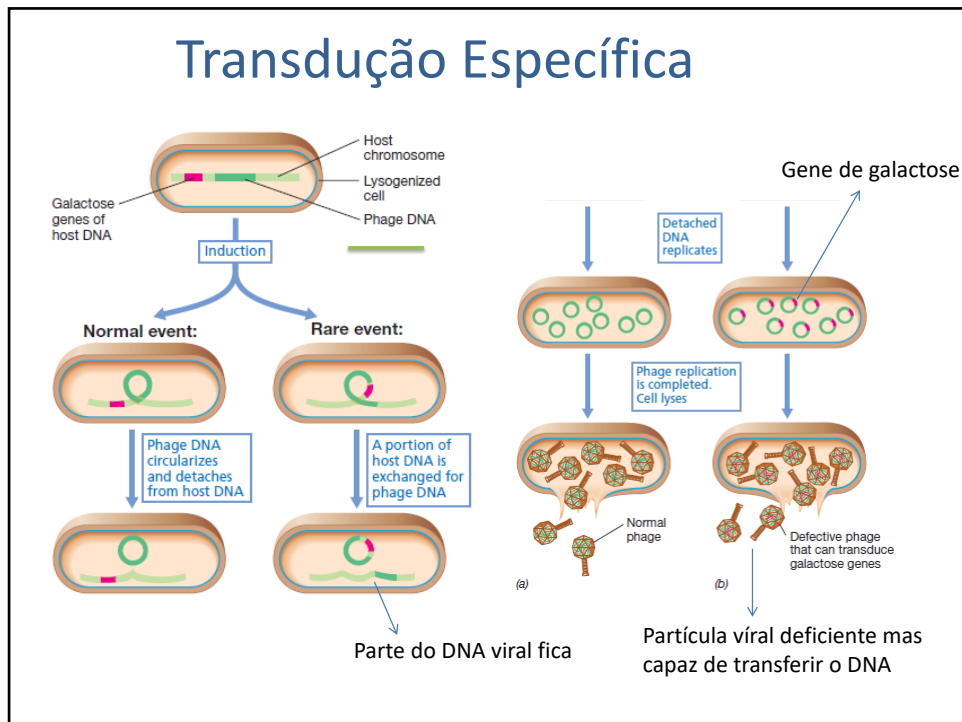




Competência na Transformação

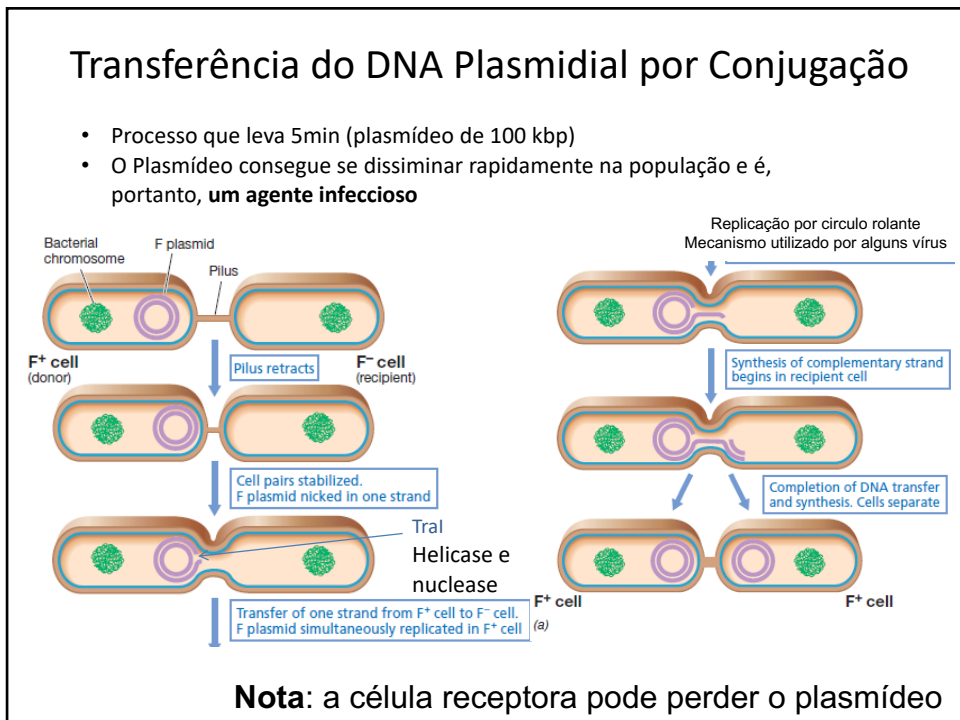
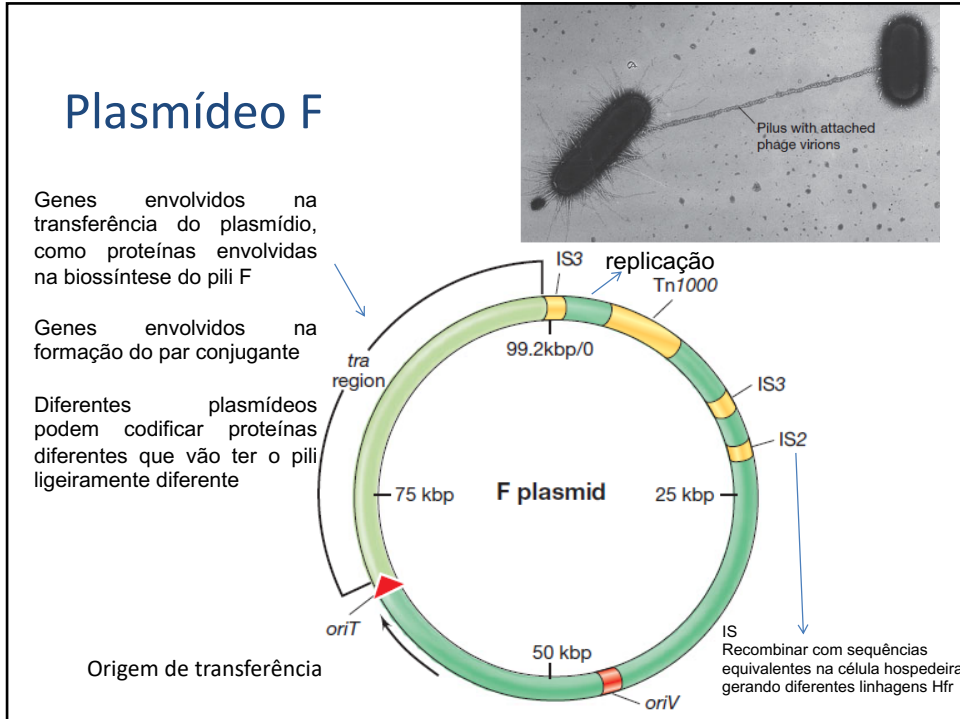
- Bactérias naturalmente transformáveis são chamadas **competentes**. Exemplos:
 - *Bacillus*: 20% das células se tornam competentes e permanecem por horas
 - *Streptococcus* durante o ciclo de crescimento 100% ficam competentes – período curto de tempo
- Células não competentes
 - Tratamentos físicos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



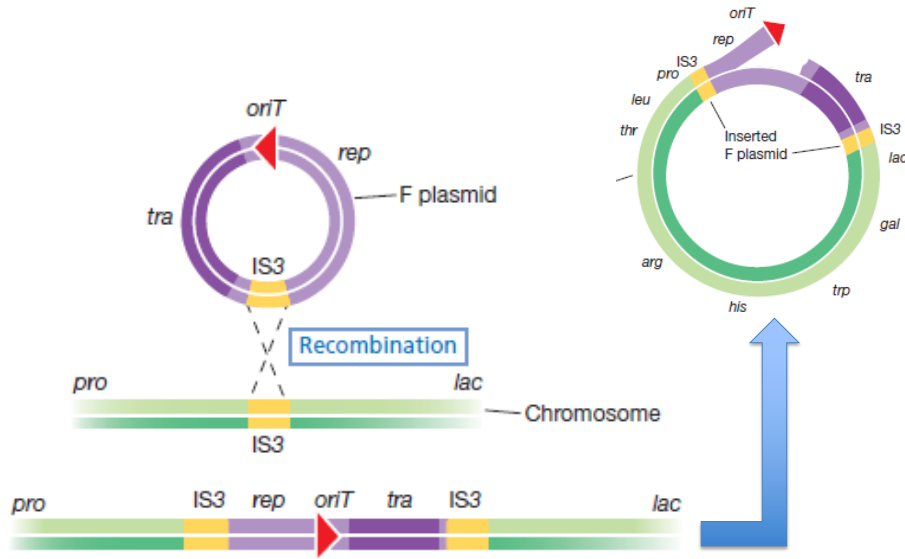


Conjugação

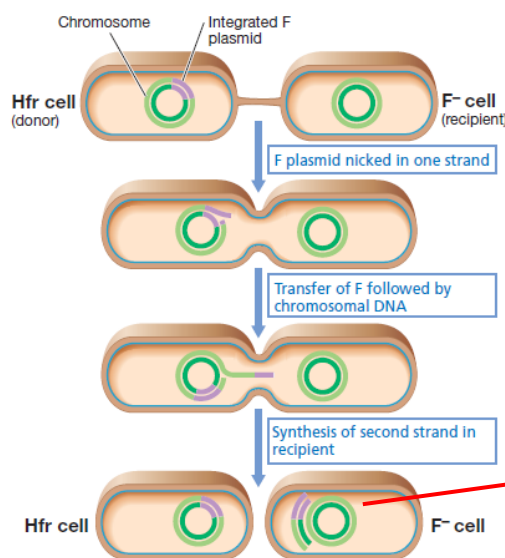
- Conjugação: Transferência genética entre duas células que envolve contato
- Envolve: célula doadora e receptora
- Mecanismo de transferência pode exibir diferenças dependendo do plasmídeo envolvido
- A maioria das bactérias Gram-negativas usam um mecanismo semelhante ao do plasmídeo F
- Normalmente,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



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



Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação

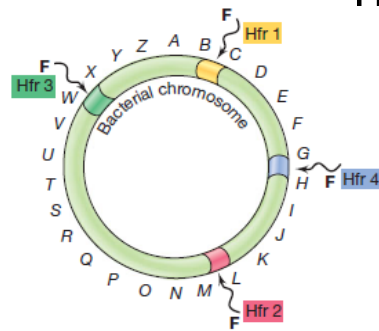


- Hfr: Alta frequência de recombinação
- Plasmídeo está integrado
- Transferir grandes quantidades de genes
- Receptora não será Hfr : apenas uma parte do plasmídeo é transferida

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

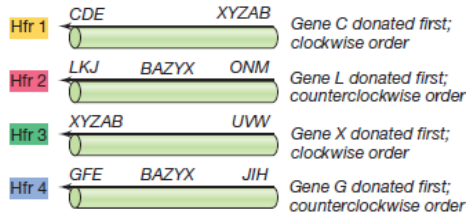
Formação de Diferentes Linhagens Hfr

Hfr

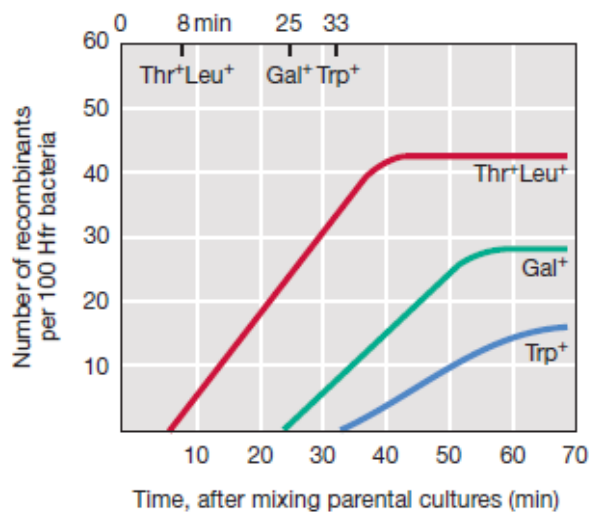


- Diferentes linhagens Hfr: Ilustrado 4 linhagens diferentes
- Diferentes sítios de inserção
- Direção de inserção pode ser diferente – transferência de genes é diferente

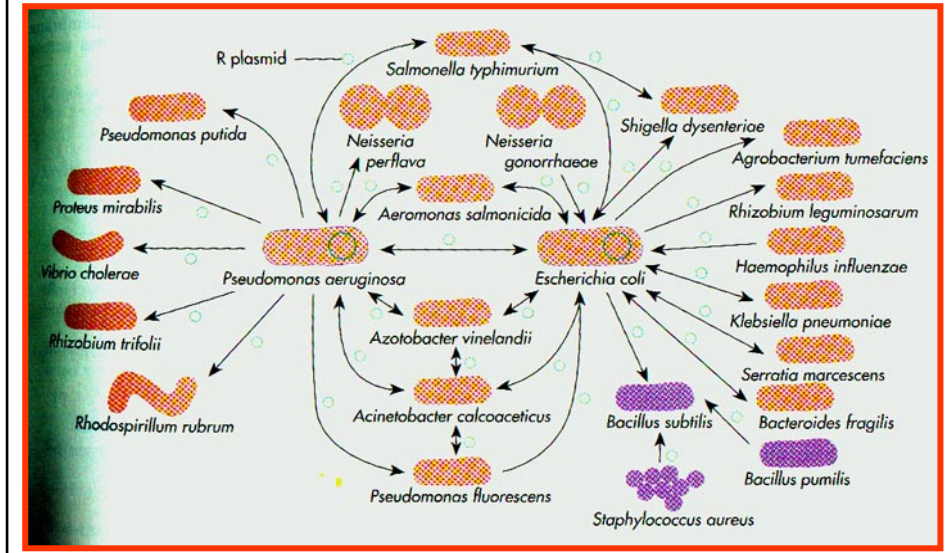
(a)



Tempo de transferência de genes em uma cultura de acasamento

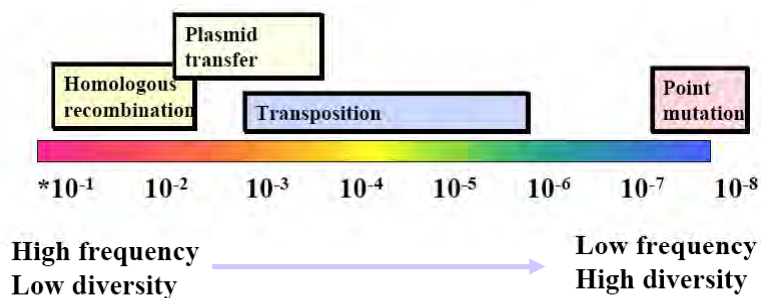


Malha de transferência lateral de genes em bactérias



Origens da diversidade genética em bactérias

- Resistência cromossomal
 - Mutações cromossômicas
- Resistência extra-cromossomal
 - Transferência lateral



* As frequency per cell per generation

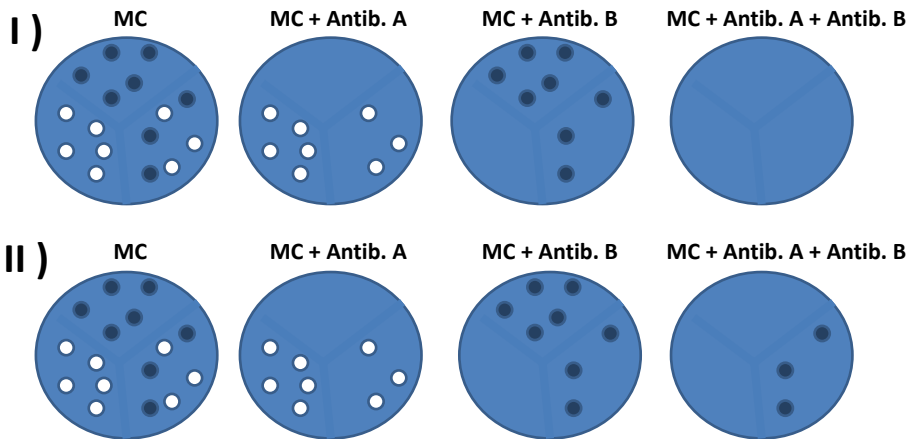
Perguntas

- 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?

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?

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