

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

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

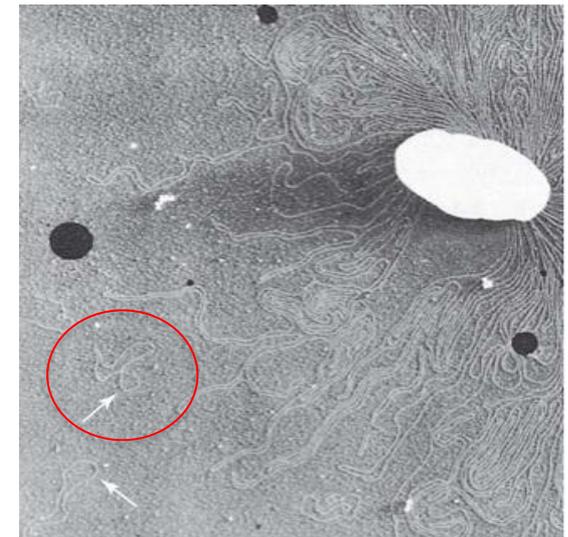
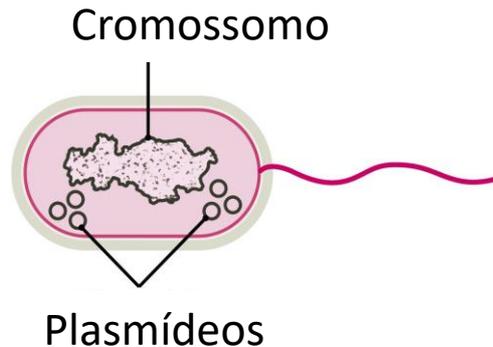
* Plasmídeos são muito raros em eucariotos

Cromossomos

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

Plasmídeos

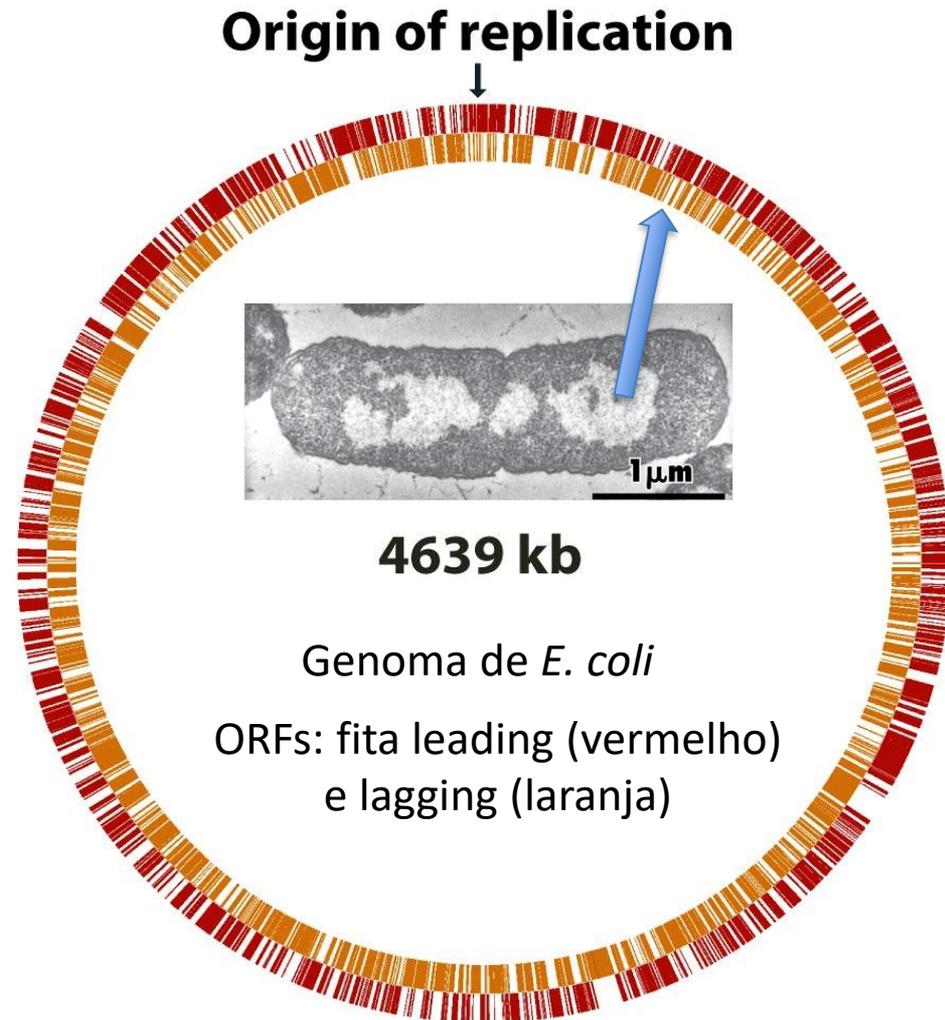
- Usam as polimerases do cromossomo
- Controlam seu número na célula
- Codificam genes para segregação



Cromossomos de procariotos

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

```
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCT
GATAGCAGCTTCTGAACGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTC
ACTAAATACTTTAACCAATATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAGAGTACACA
ACATCCATGAAACGCATTAGCACCACCATTACCACCACCATCACCATTACCACAGGTAACG
GTGCGGGCTGACGCGTACAGGAAACACAGAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTTTT
TTTTTCGACCAAAGGTAACGAGGTAACAACCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCA
GTGGCAAATGCAGAACGTTTTCTGCGTGTGGCCGATATTCTGGAAAGCAATGCCAGGCAGG
GGCAGGTGGCCACCGTCTCTCTGCCCGCCAAAATCACCACCACTGGTGGCGATGAT
TGAAAAAACATTAGCGGCCAGGATGCTTTACCAATATCAGCGATGCCGAACGTATTTTT
GCCGAACTTTTGACGGGACTCGCCGCGCCAGCCGGGTTCCCGTGGCGCAATTGAAAA
CTTTTCGTCGATCAGGAATTTGCCCAAATAAACATGTCTGCATGGCATTAGTTTGTGGG
GCAGTGGCCGATAGCATCAACGCTGCGCTGATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTGCATCGCC
ATTATGGCCGGCGTATTAGAAGCGCGGGTCAACAGTACTGTTATCGATCCGGTCGAAA
AACTGCTGGCAGTGGGGCATTACCTCGAATCTACCGTCGATATTGCTGAGTCCACCCGCG
TATTGCGGCAAGCCGATTCCGGCTGATCACATGGTGCTGATGGCAGGTTTACCAGCCGGT
AATGAAAAAGCGAAGTGGTGGTCTTGGACGCAACGGTTCCGACTACTCTGCTGCGGTGC
TGGCTGCCTGTTTACGCGCCGATTGTTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTCTATAC
CTGCGACCCGCGTCAGGTGCCCGATGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCCTACCAGGAAGCG
ATGGAGCTTCTACTTCGGCGCTAAAGTCTTCAACCCCGCACCATTACCCCATCGCC
AGTTCAGATCCCTTGCCTGATTAATAAATACCGGAAATCCTCAAGCACCAGGTACGCTCAT
TGGTGCCAGCCGTGATGAAGACGAATTACCGGTCAAGGGCATTTCGAATCGAATAACATG
GCAATGTTACAGCTTTCTGGTCCGGGGATGAAAGGGATGGTCCGCATGGCGGCGCGCTCT
TTGCAGCGATGTCACGCGCCCGTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATCATCTTCCGAATA
CAGCATCAGTTTCTGCGTCCACAAAGCGACTGTGTGCGAGCTGAACGGGCAATGCAGGAA
GAGTTCTACCTGGAACGAAAGAAGGCTTACTGGAGCCGCTGGCAGTGACGGAACGGCTGG
CCATTATCTCGGTGGTAGGTGATGGTATGCGCACCTTGCCTGGGATCTCGGCGAAATCTT
TGCCGCACTGGCCCGCGCAATATCAACATTGTCGCCATTGCTCAGGGATCTTCTGAACGC
TCAATCTCTGTCGTGGTAAATAACGATGATGCGACCACTGGCGTGCAGGTTACTCATCAGA
TGCTGTTCAATACCGATCAGGTTATCGAAGTGTGTTGATTGGCGTGGTGGCGTTGGCGG
TGCCTGCTGGAGCAACTGAAGCGTCAGCAAAGCTGGCTGAAGAATAAACATATCGACTTA
CGTGTCTGCGGTGTTGCCAACTCGAAGGCTCTGCTCACCATGTACATGGCCTTAATCTGG
AAAACGGCAGGAAGAAGTGGCGCAAGCCAAAGAGCCGTTAATCTCGGGCGCTTAATTCG
CCTCGTGA...
```



Tópicos

- **Origens da diversidade genética**
 - Mutação
 - Mecanismos
 - Isolamento
 - Recombinação e transposição
 - Transferência lateral de genes
 - Transformação
 - Transdução
 - Conjugação

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 durante o **reparo de danos no DNA**, em particular quando são ativados os mecanismos de reparo propensos a erro

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 mutagênicos

Análogos de bases

5-Bromouracil	Incorporada como timina; par com guanina (G)	AT => GC, às vezes GC => AT
2-Aminopurine	Incorporada como adenina, par com citosina (C)	AT => GC, às vezes GC => AT

Compostos que reagem com o DNA

Ácido nitroso (HNO ₂)	Deamina adenina e citosina	AT => GC e GC => AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reage com citosinas	GC => AT

Agentes alquilantes

<u>Monofuncional</u> : etil-metanosulfonato	Adiciona grupos metil à guanina; pareamento com timina	GC => AT
<u>Bifuncionais</u> : mitomicina, nitrosoguanidina	Ligações cruzadas entre as fitas do DNA; região danificada removida pela DNase	Mutações de ponto e deleções

Corantes intercalantes

Acridinas, brometo de etídeo	Inserem-se entre dois pares de bases	Microinserções ou microdeleções
------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------

Radiação

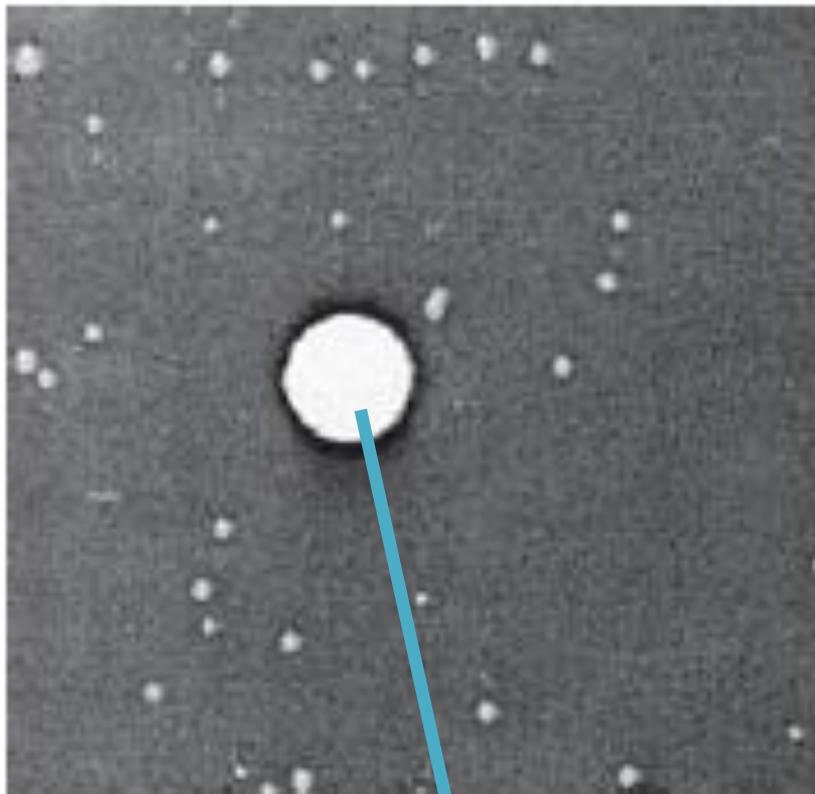
Ultravioleta	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção
Radiação ionizante (raios-X)	Dímeros de pirimidinas	Reparo com erro ou deleção

Teste de Ames (Bruce Ames)

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

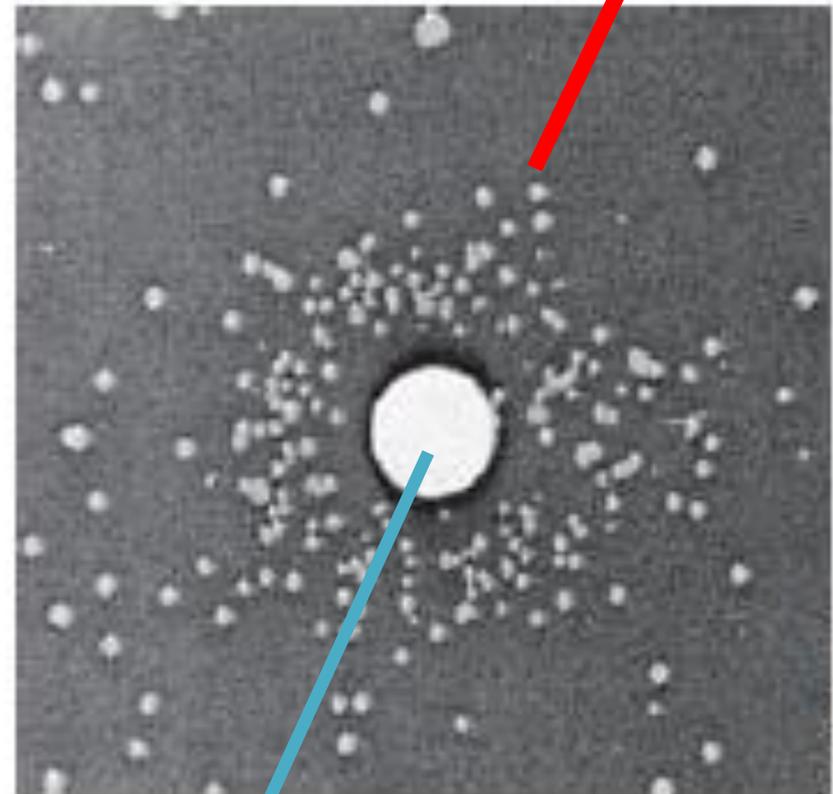
Mutantes

Meio His⁻



Controle negativo

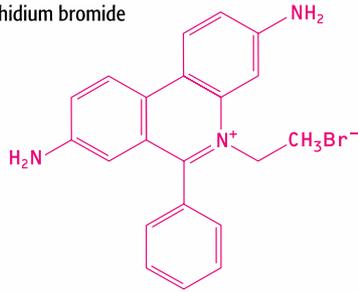
Meio His⁻



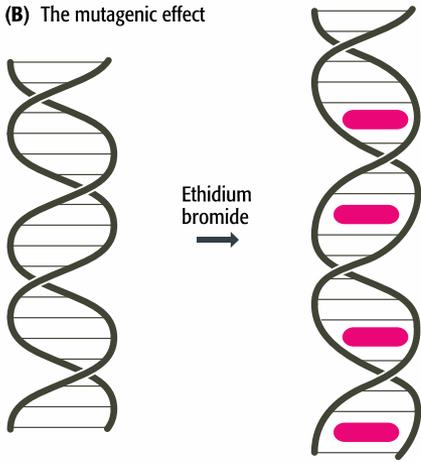
Agente mutagênico

Alguns exemplos de danos no DNA

(A) Ethidium bromide

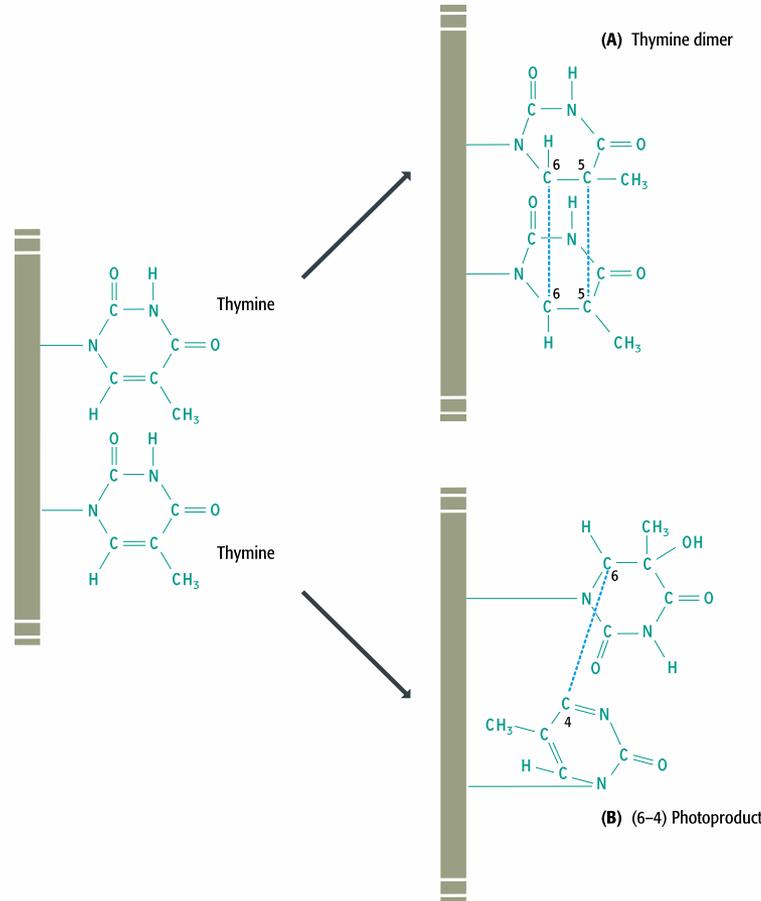


(B) The mutagenic effect



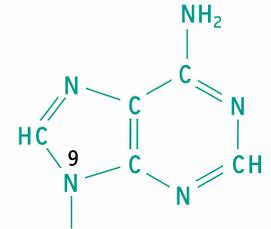
Brometo de etídio:
causa inserção de bases

(A) Thymine dimer



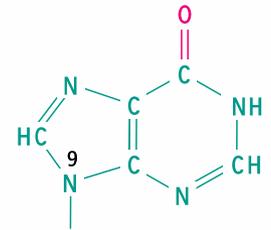
Radiação UV

Adenine



Deamination

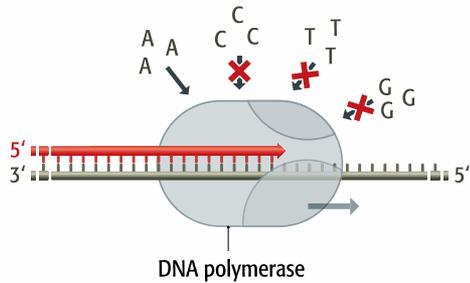
Hypoxanthine



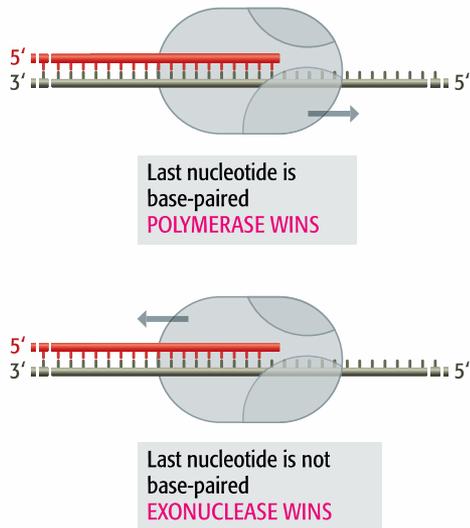
Conversão de adenina
em hipoxantina:
espontânea ou por
agentes deaminantes

Mecanismos de reparo do DNA

(A) Nucleotide selection



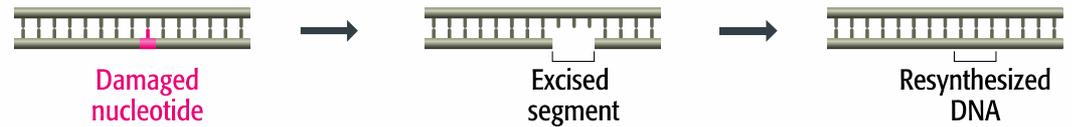
(B) "Proofreading"



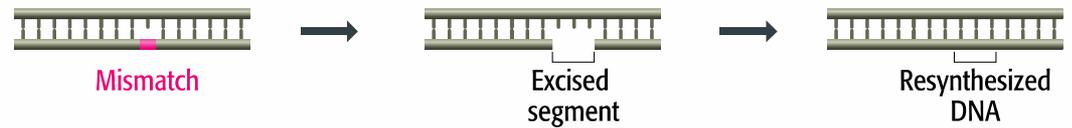
(A) Direct repair



(B) Excision repair



(C) Mismatch repair

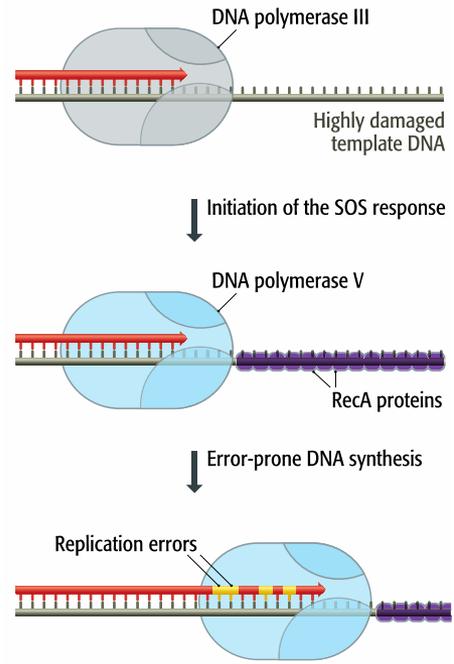
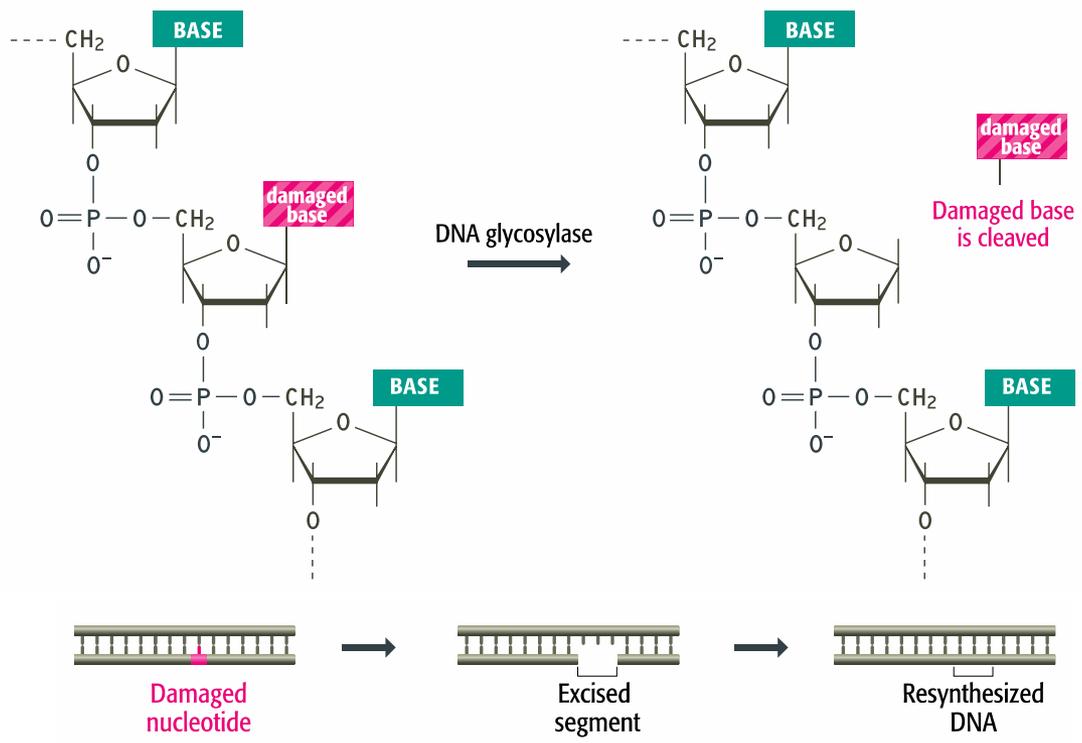


(D) Nonhomologous end-joining



Acurácia da replicação

Mecanismos de reparo do DNA



Sistema SOS: bactérias

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

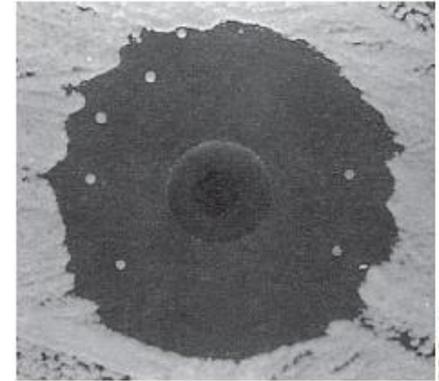
- **Mutações selecionáveis**

- 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

Mutação selecionável



Disco central com antibiótico

Mutação não-selecionável

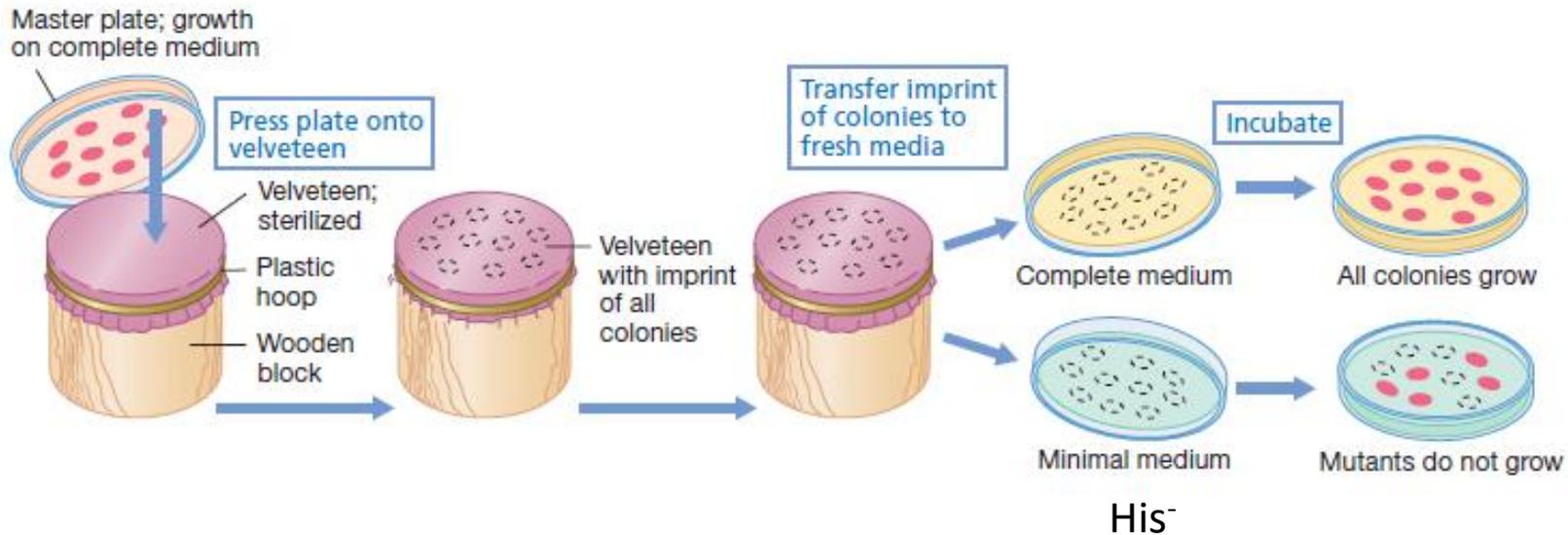


Varição na pigmentação
Fungos *Aspergillus nidulans*

Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Problema: selecionar uma **deficiência**

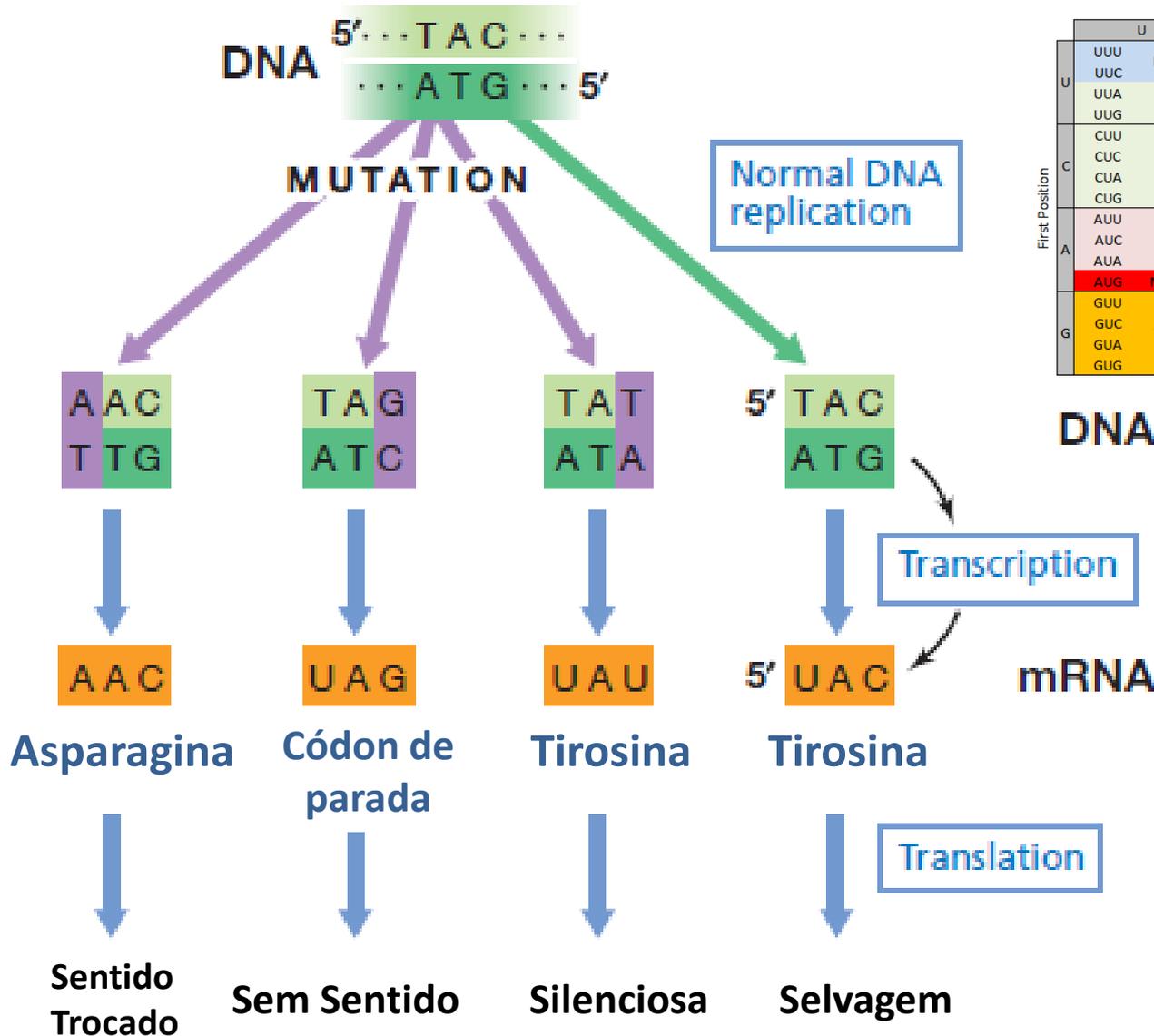
Técnica de Plaqueamento de Réplica



Tirosina

Tipos de Mutações Pontuais

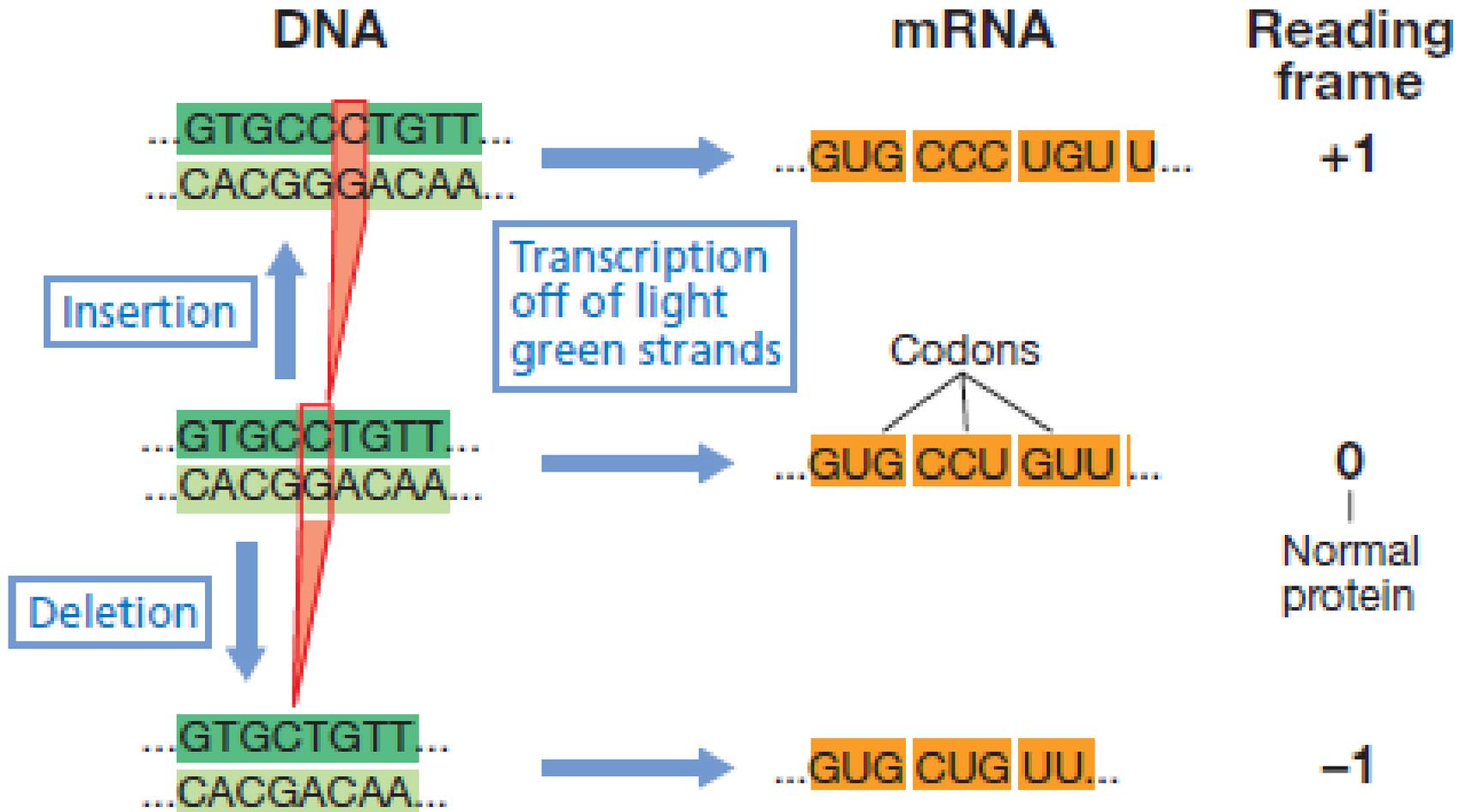
Efeito em sequências codificantes



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

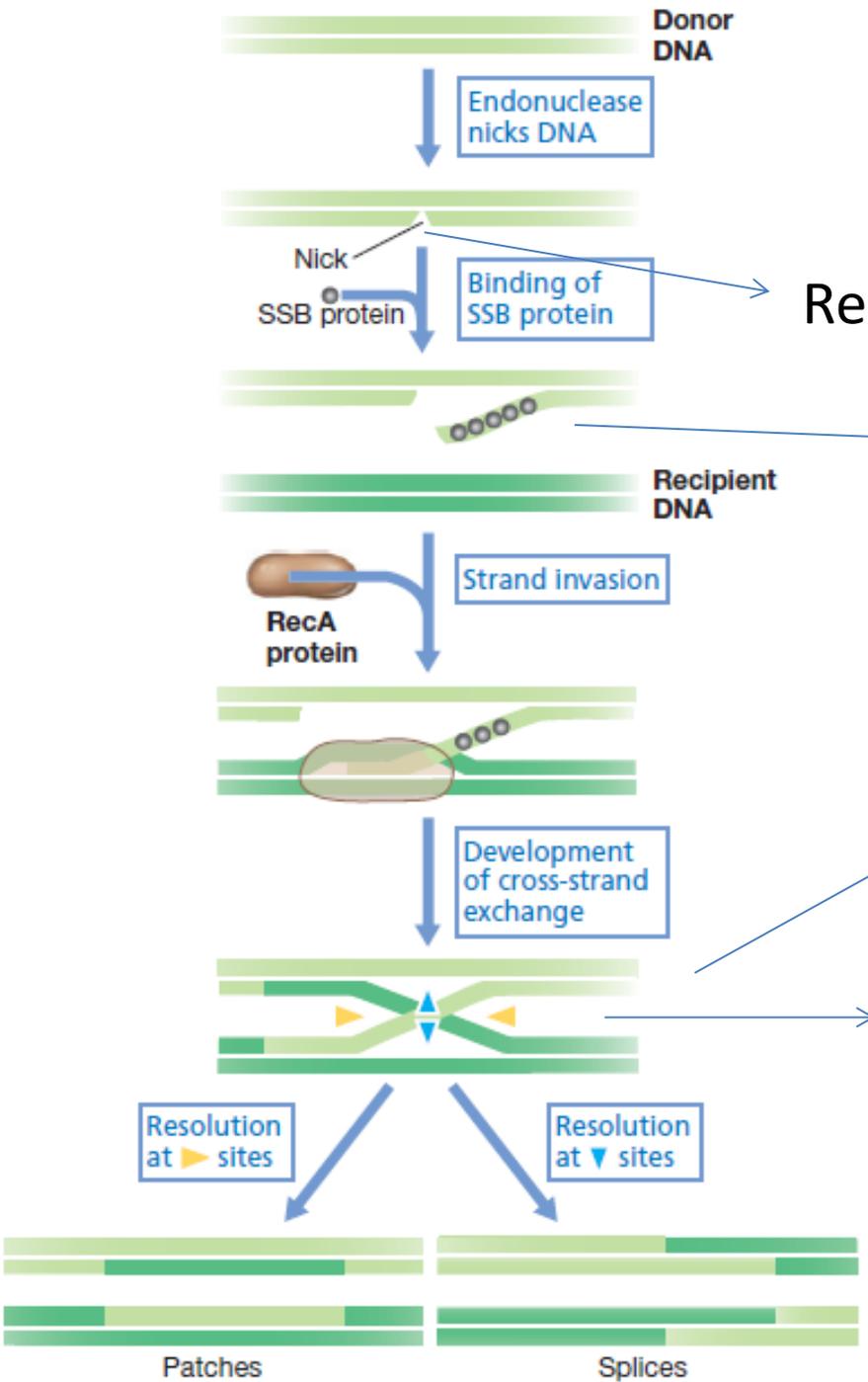
O efeito das mutações sobre regiões codificantes será determinado pela fase de leitura e pela estrutura do código genético

Inserção ou Deleção de Uma base



Recombinação e Transposição

Recombinação homóloga



RecBCD

Helicases

Formação de um HeteroDuplex

Resolvases como RecG e RuvC

Patches

Splices

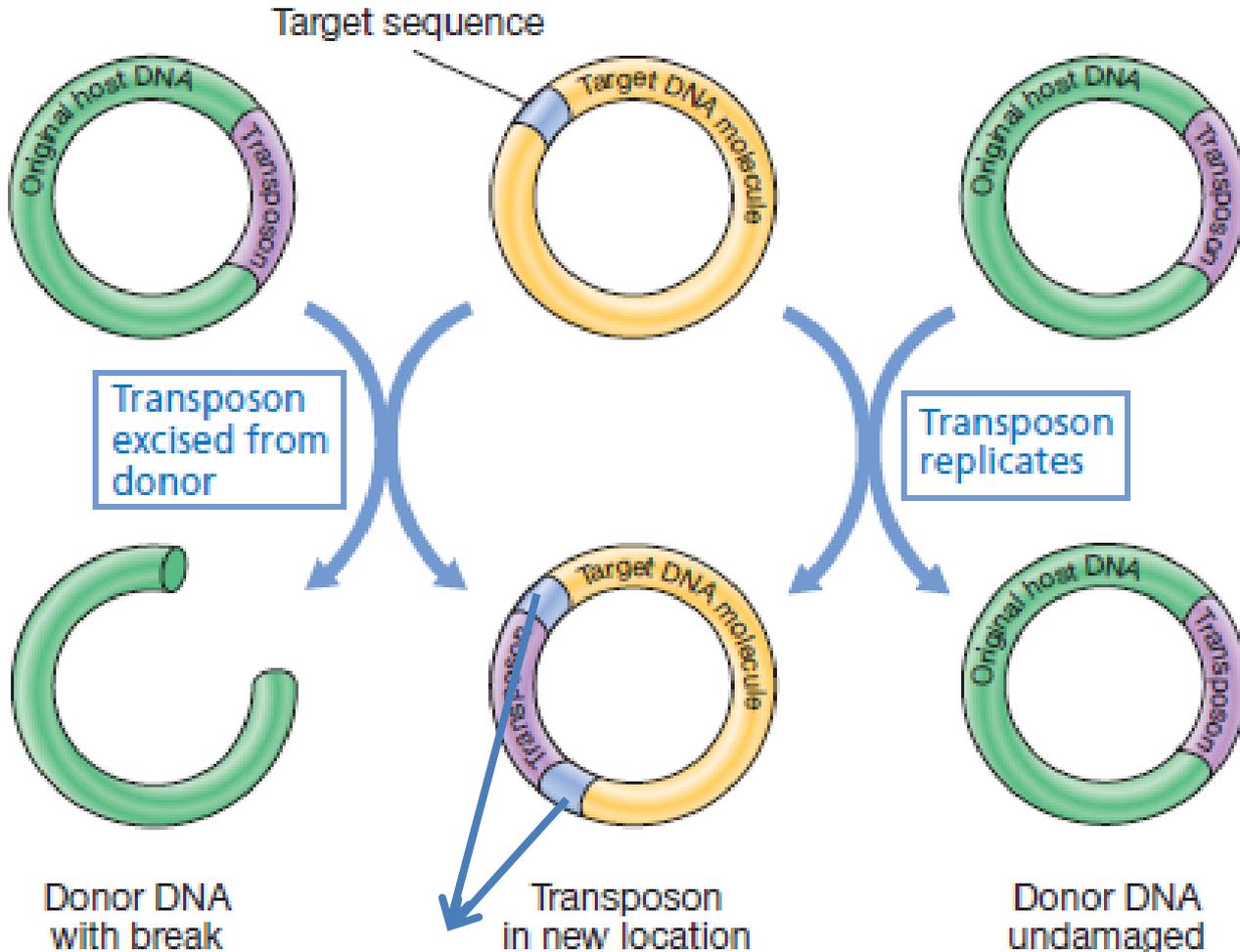
Transposição

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

Mecanismo de Transposição

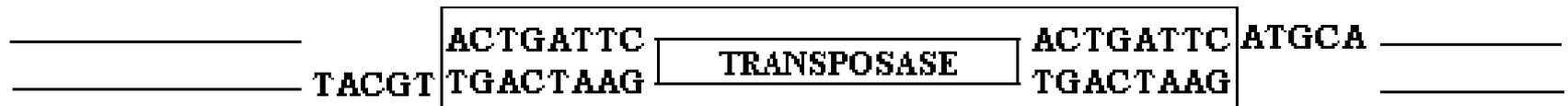
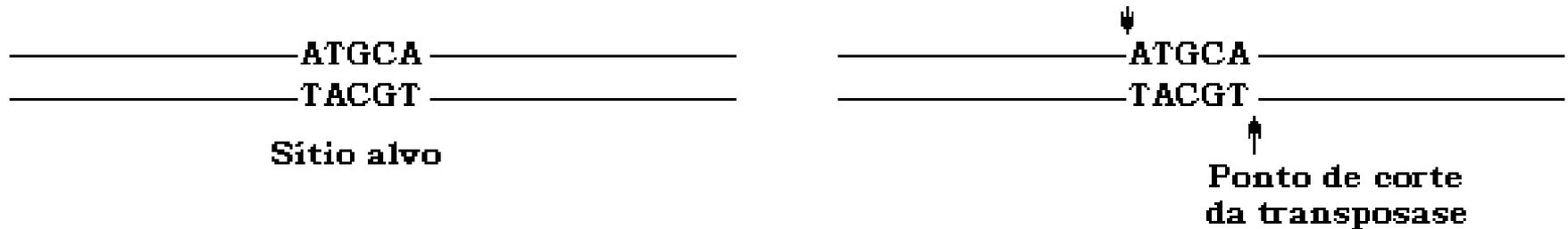
Conservative transposition

Replicative transposition

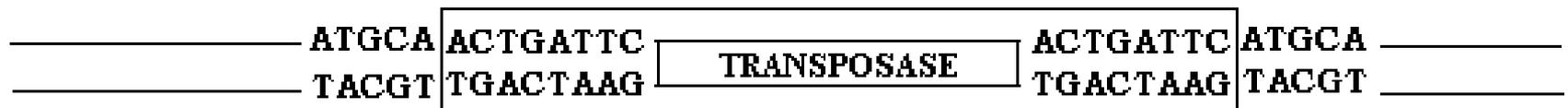


Inserção de um transposon

É um exemplo de recombinação sítio específica



Transposon inserido



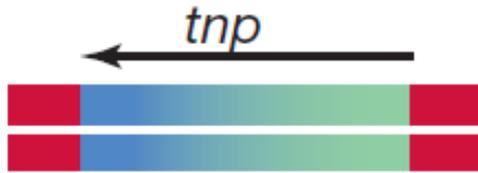
Complementação da falhas

Sítio alvo duplicado

Elementos Transponíveis

IS: Sequência de Inserção

IS2

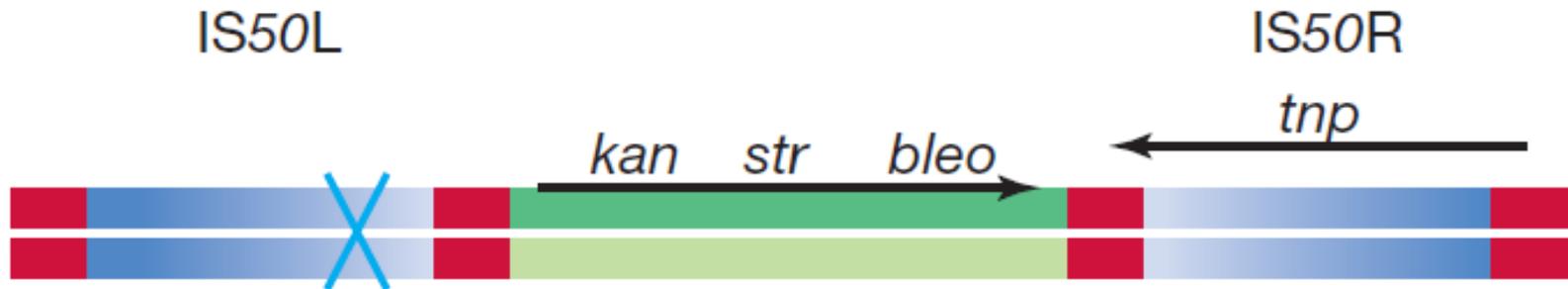


- Elemento transponível mais simples
- Repetições invertidas (IR) de 10-50pb
- Possui apenas um gene (transposase)

Transposon

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

Tn5

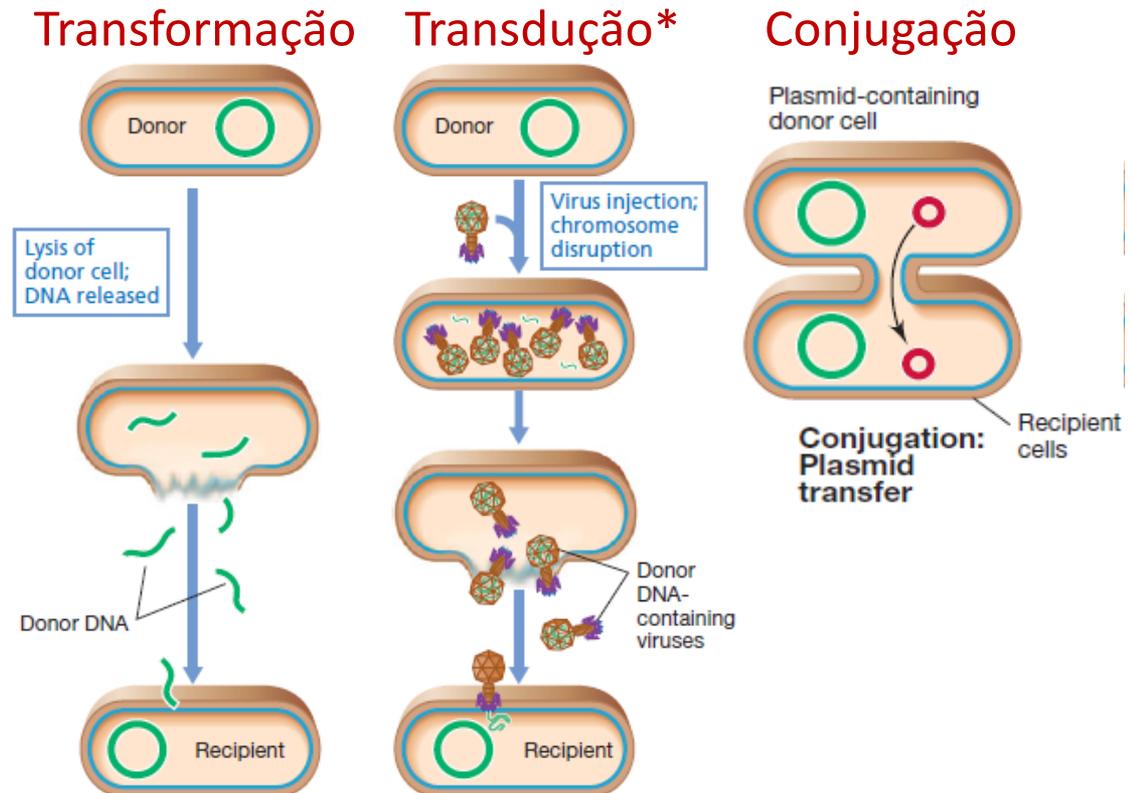


Mutação sem sentido na primeira transposase impede transposição independente

Permuta Genética em Procaríotos

Três Mecanismos de Troca Genética

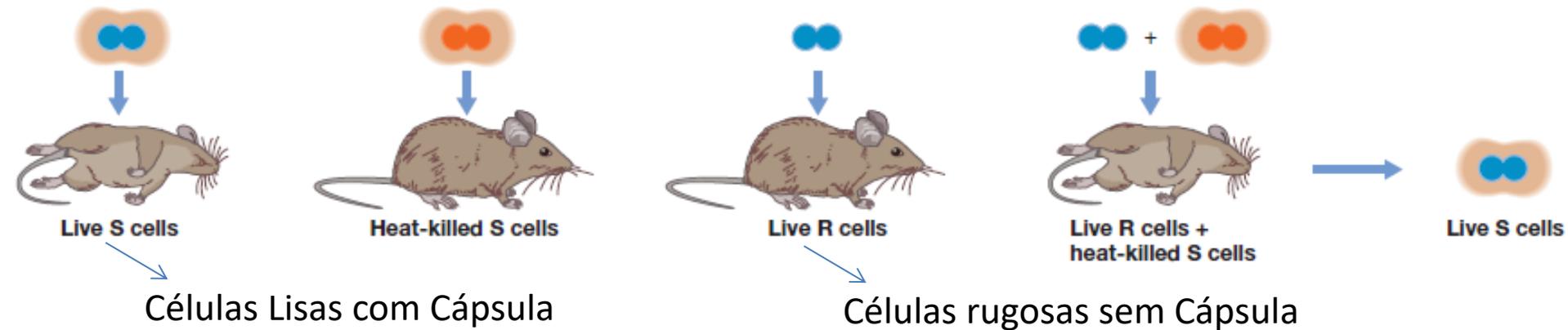
- Transformação
 - Competência
- Transdução
 - Generalizada
 - Específica
- Conjugação
 - Plasmídeos
 - Cepas Hfr



Transferência lateral de genes via Transformação

Experimento de Griffith com *Streptococcus pneumoniae*

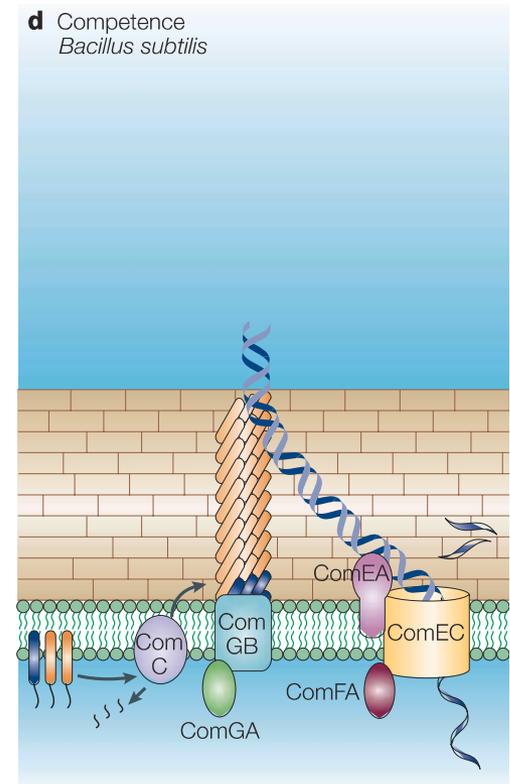
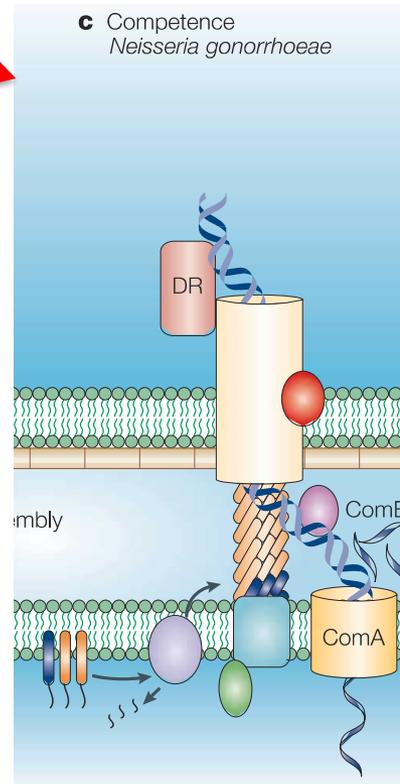
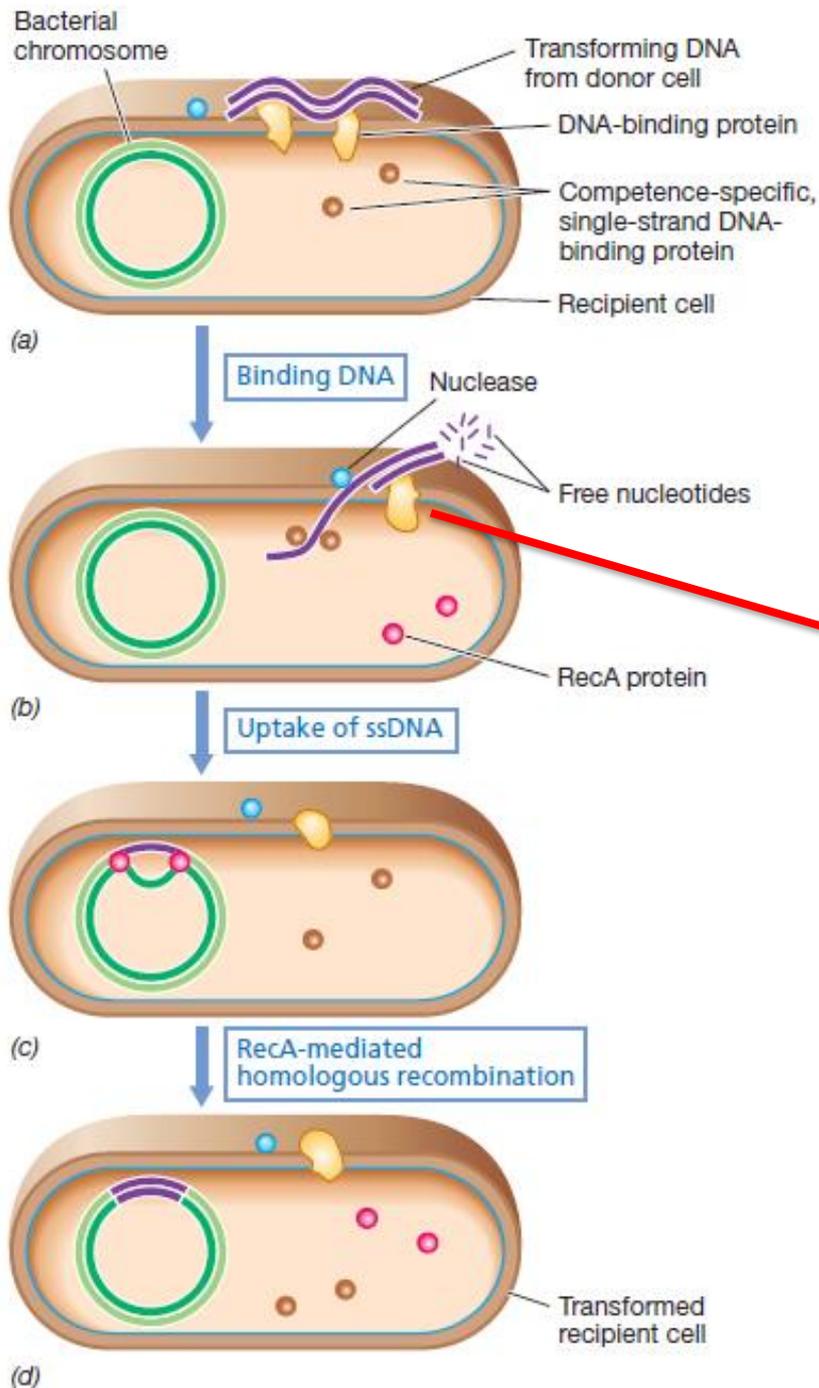
Pneumonia Fatal



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

Transformação

- Em geral, são transferidos fragmentos de DNA pequenos
- Proteínas especializadas protegem o DNA da degradação intracelular
- Recombinação necessária para herança do DNA capturado

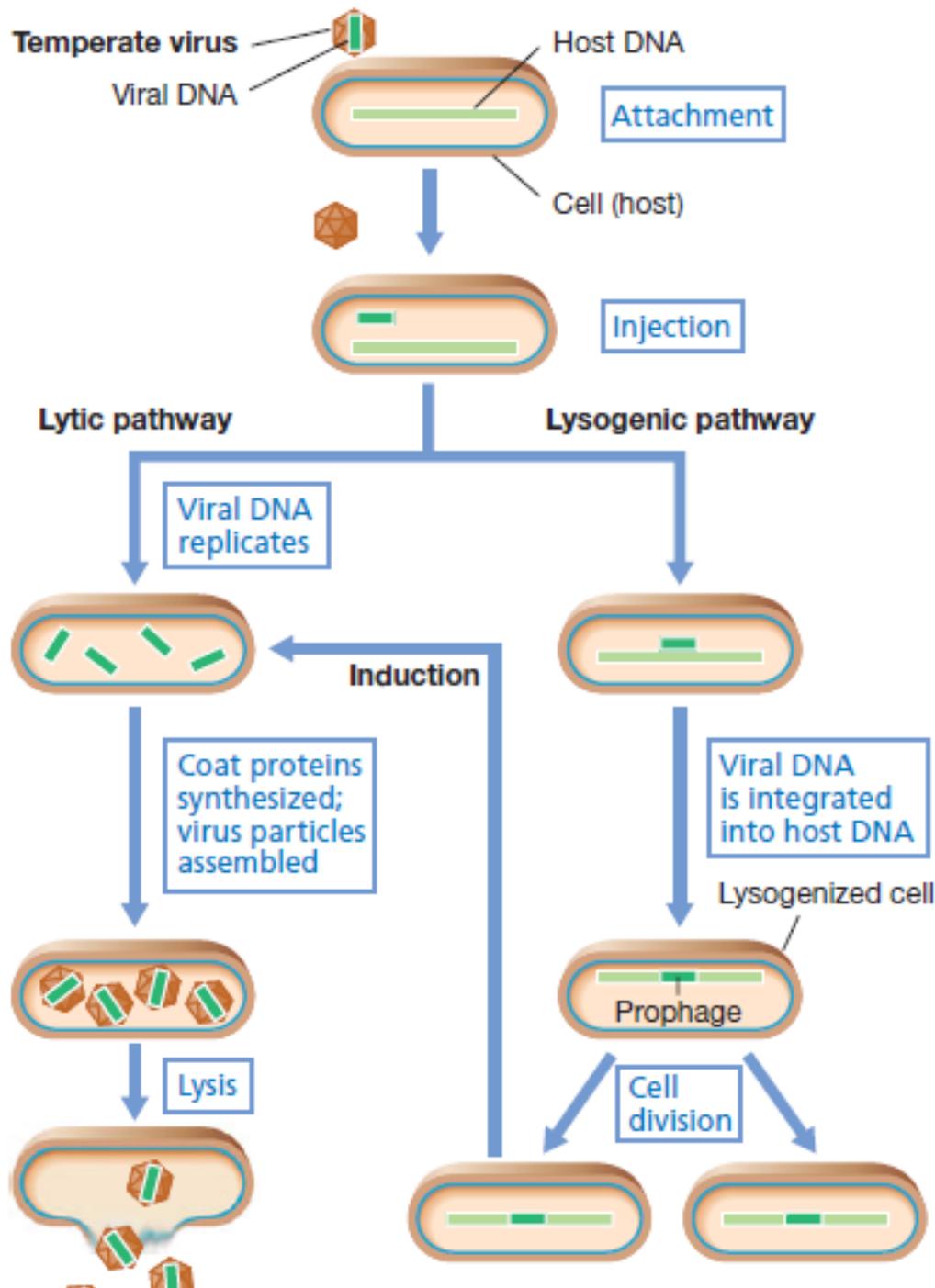


Competência na Transformação

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

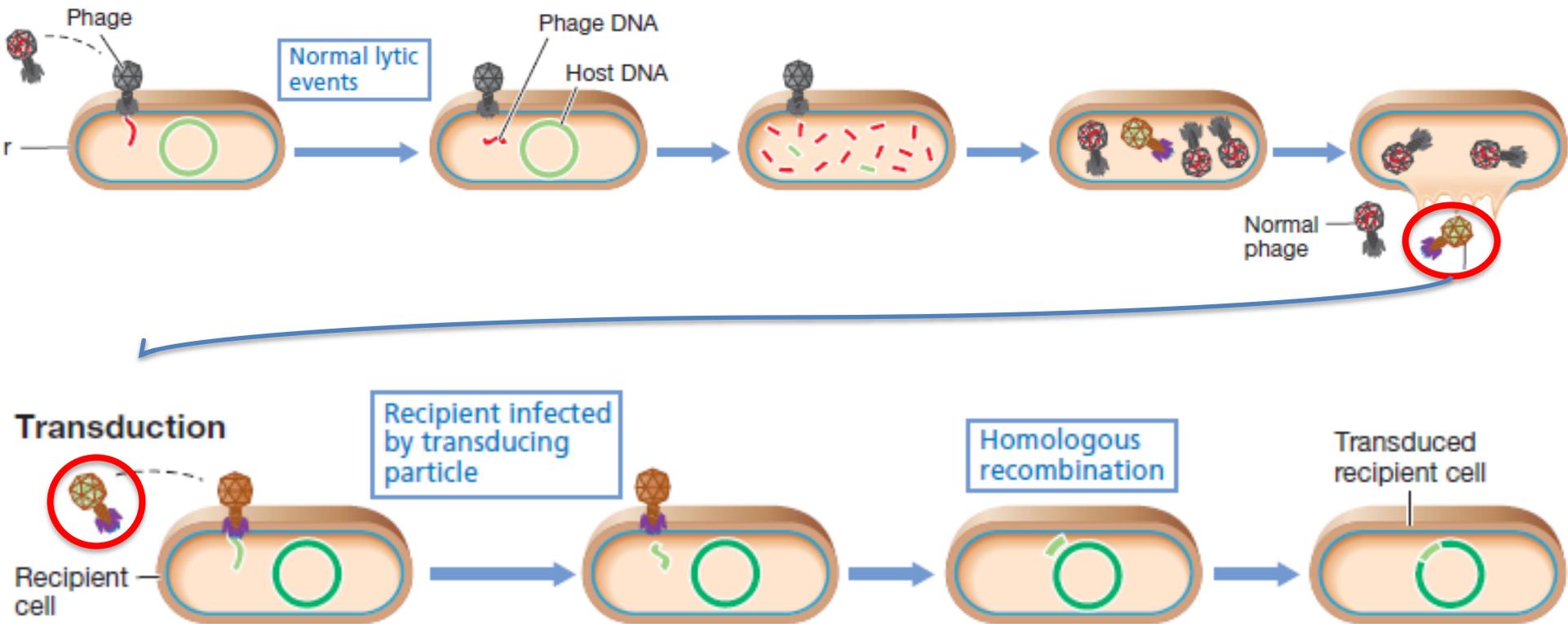
Transdução

Ciclo Lítico
e
Via lisogênica

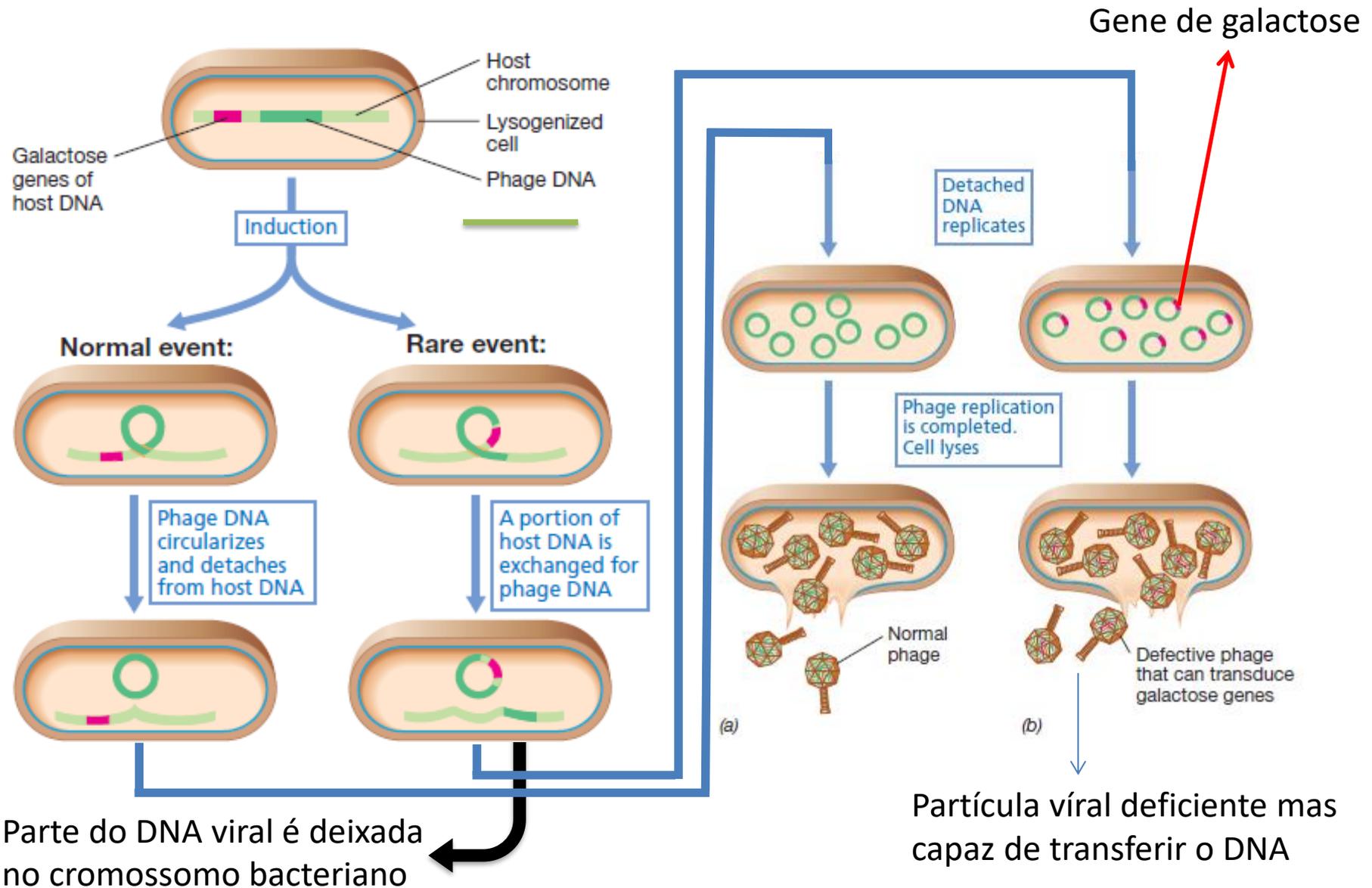


Transdução Generalizada

Uma pequena parcela das partículas serão transdutoras, ou seja, carregarão um fragmento do DNA genômico ao invés de uma cópia do vírus!



Transdução Específica



Conjugação

- Conjugação: Transferência genética entre duas células que envolve contato
- Envolve: célula doadora e receptora
- Mecanismo de transferência pode exibir diferenças dependendo do plasmídeo envolvido
- A maioria das bactérias Gram-negativas usam um mecanismo semelhante ao do plasmídeo F
- Normalmente, o plasmídeo é replicado por polimerases celulares e segregado por proteínas próprias
- Pode também ser integrado no cromossomo da célula hospedeira por intermédio de sequências de inserção (IS)

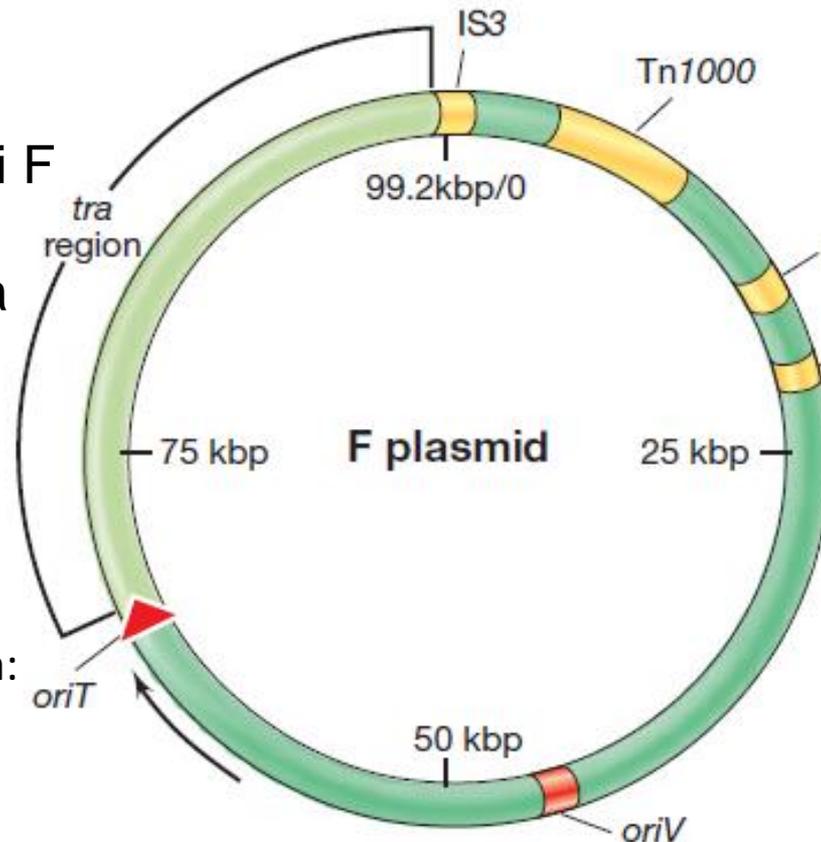
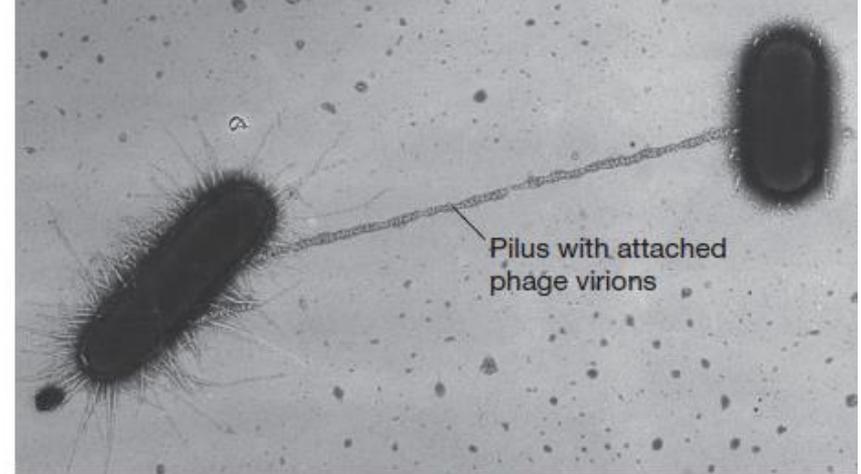
Plasmídeo F

O plasmídeo F
carrega:

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

Genes envolvidos na
formação do par
conjugante

Origem de transferência:

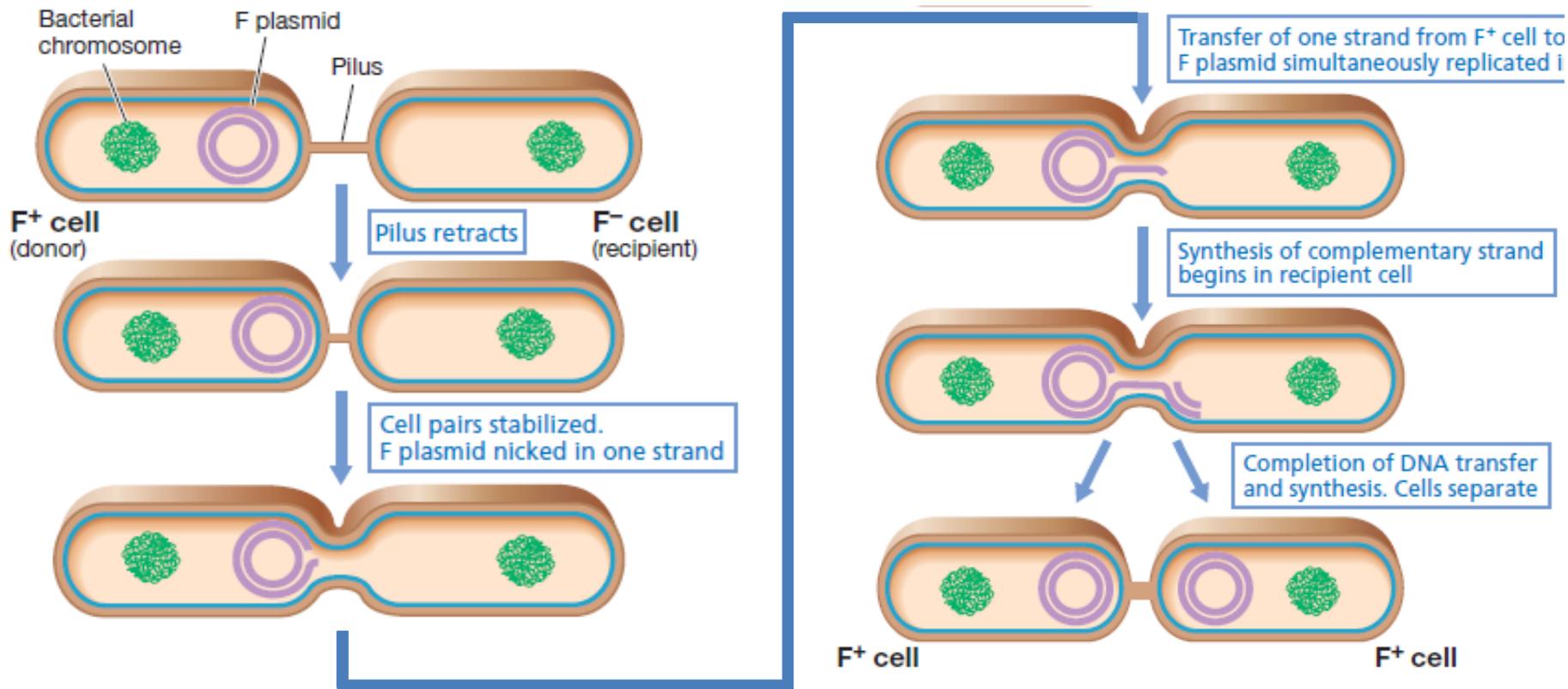


IS: pode
recombinar com
sequências
equivalentes na
célula hospedeira
gerando diferentes
linhagens Hfr

Transferência do DNA Plasmidial por Conjugação

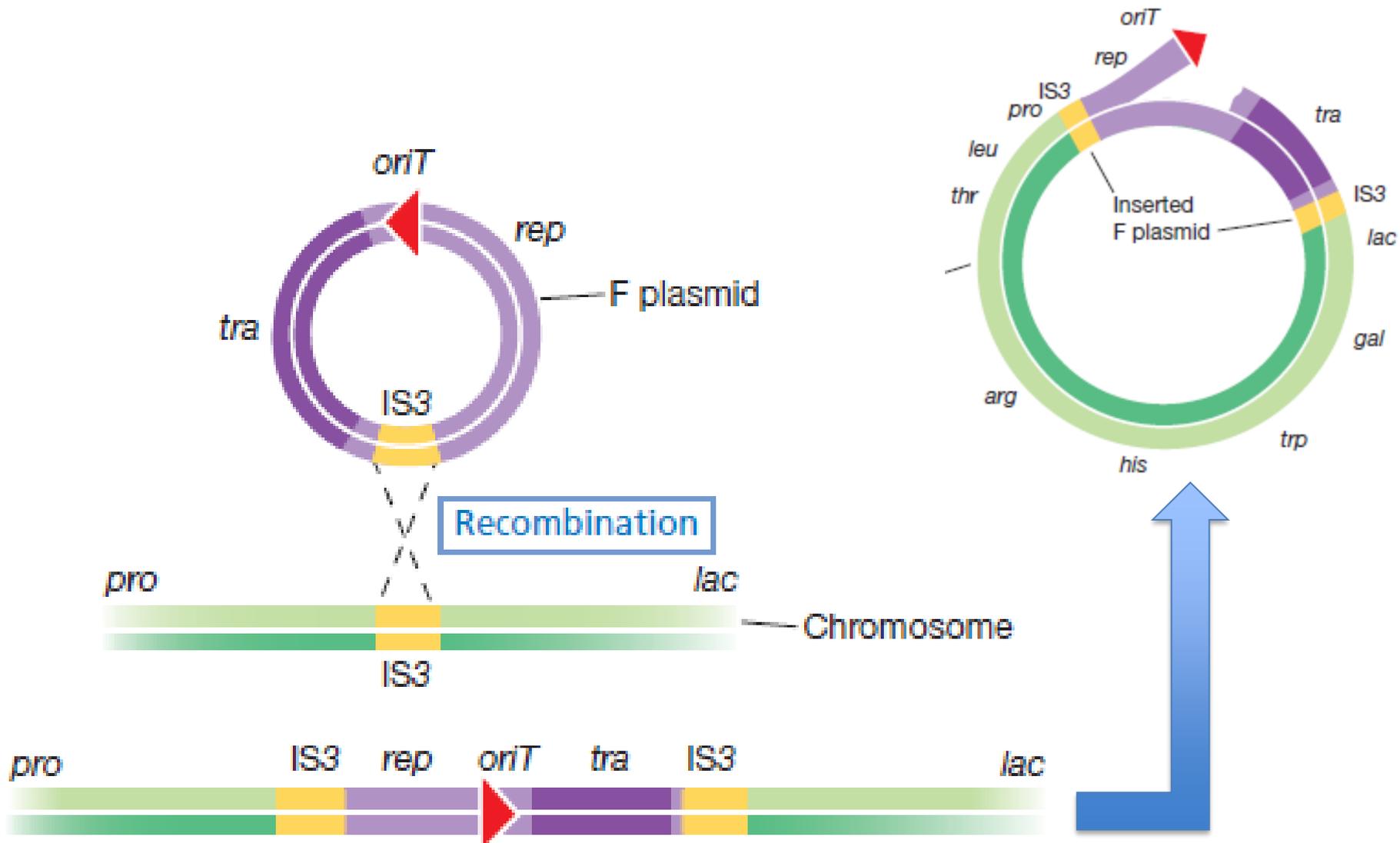
- Processo que leva 5min (plasmídeo de 100 kbp)
- O Plasmídeo consegue se dissimular na população e é, portanto, **um agente infeccioso**

Replicação por círculo rolante
Mecanismo utilizado por alguns vírus

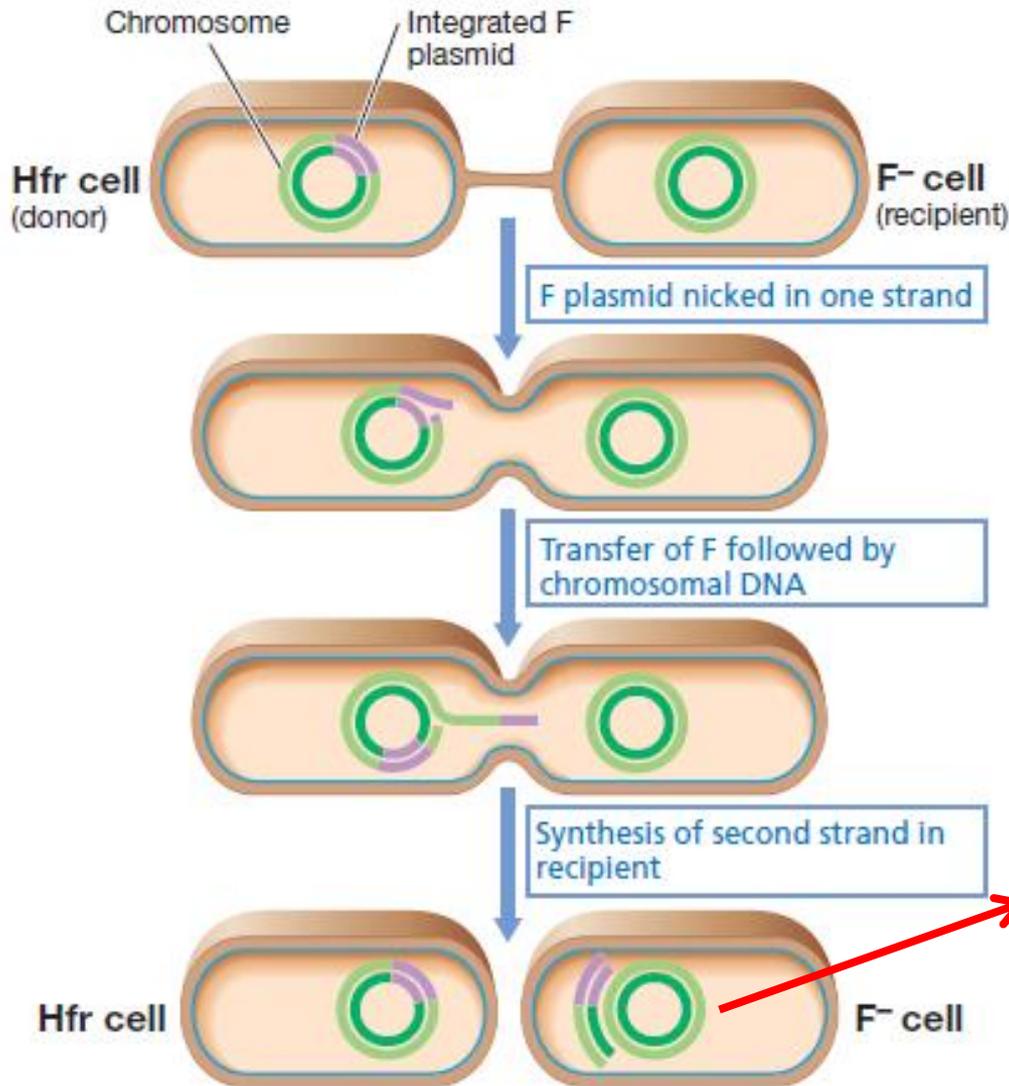


Nota: a célula receptora pode perder o plasmídeo depois da transferência

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



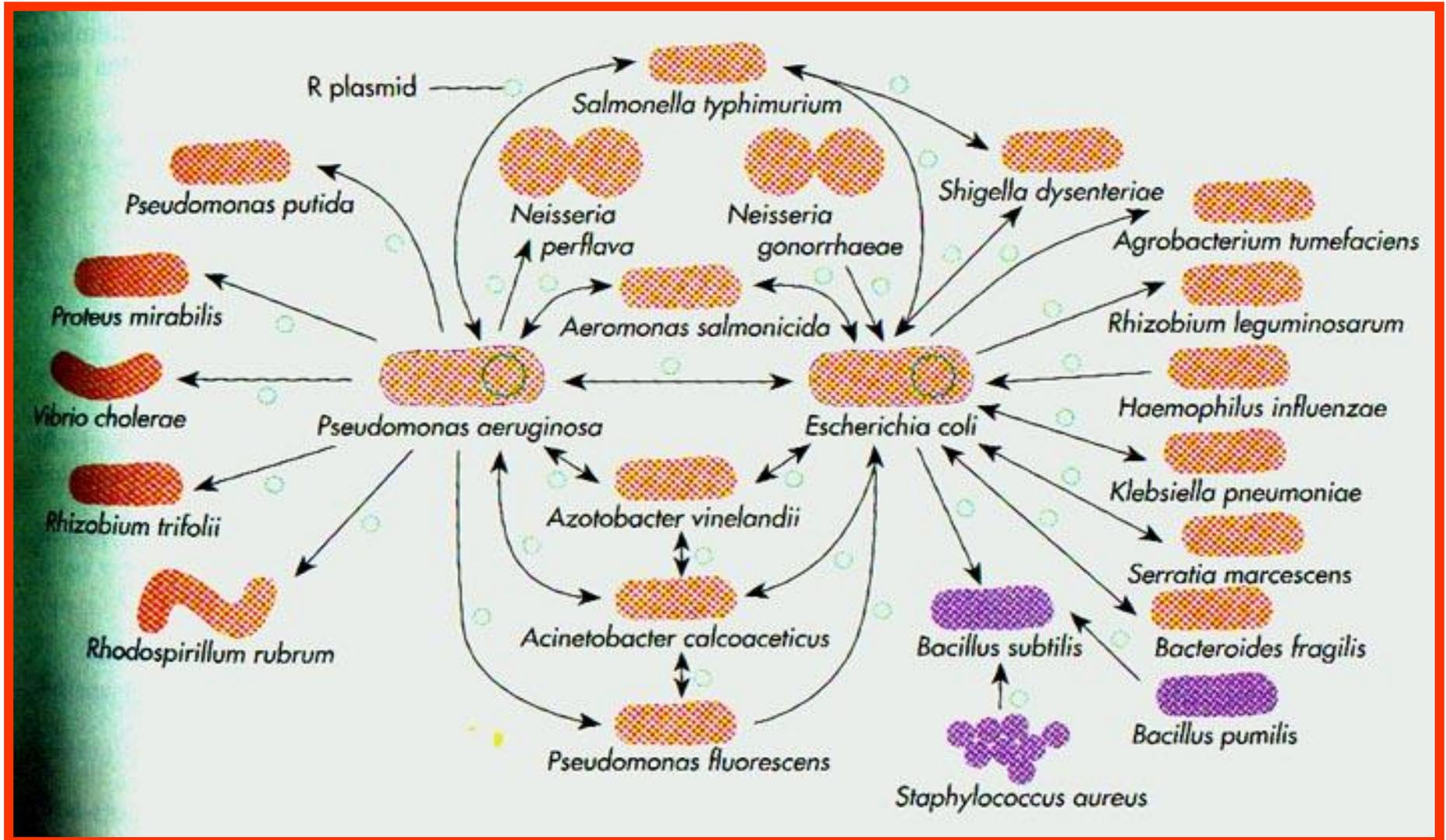
Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação



- 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 será integrado na célula aceptora por recombinação da parte homóloga (região verde idêntica ao cromossomo)

Malha de transferência lateral de genes em bactérias



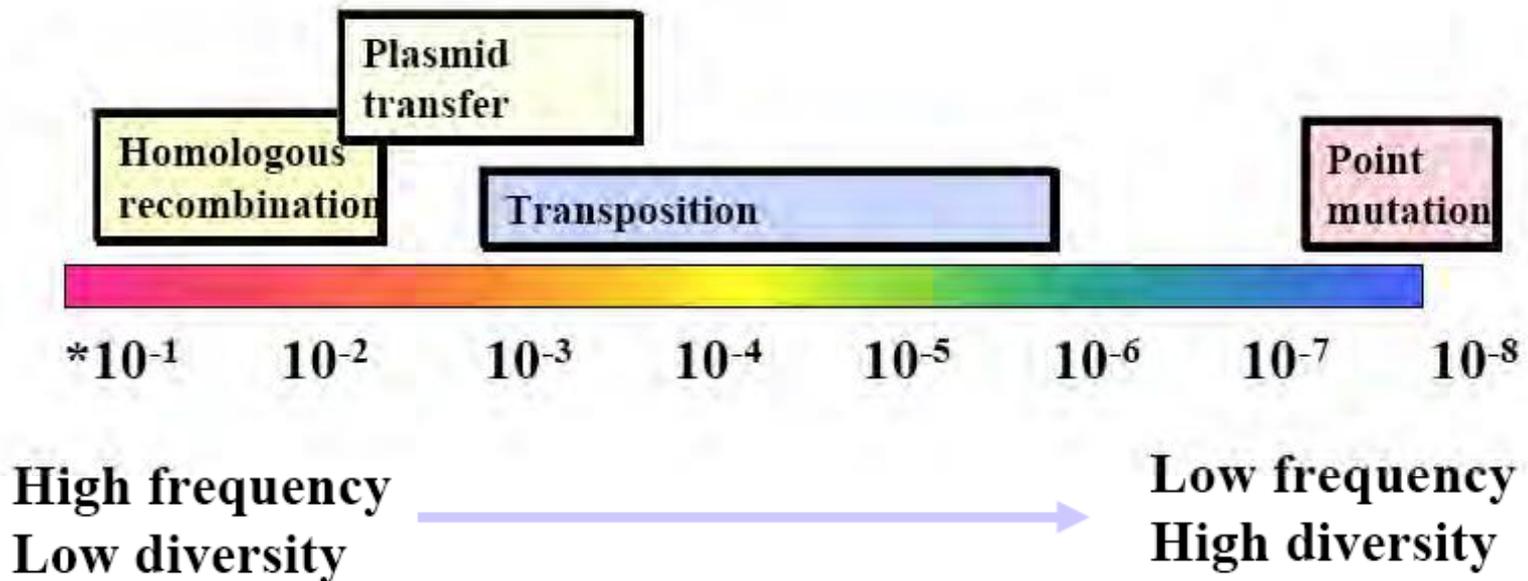
Origens da diversidade genética em bactérias

– Resistência cromossomal

- Mutações cromossômicas

– Resistência extra-cromossomal

- Transferência lateral



* As frequency per cell per generation

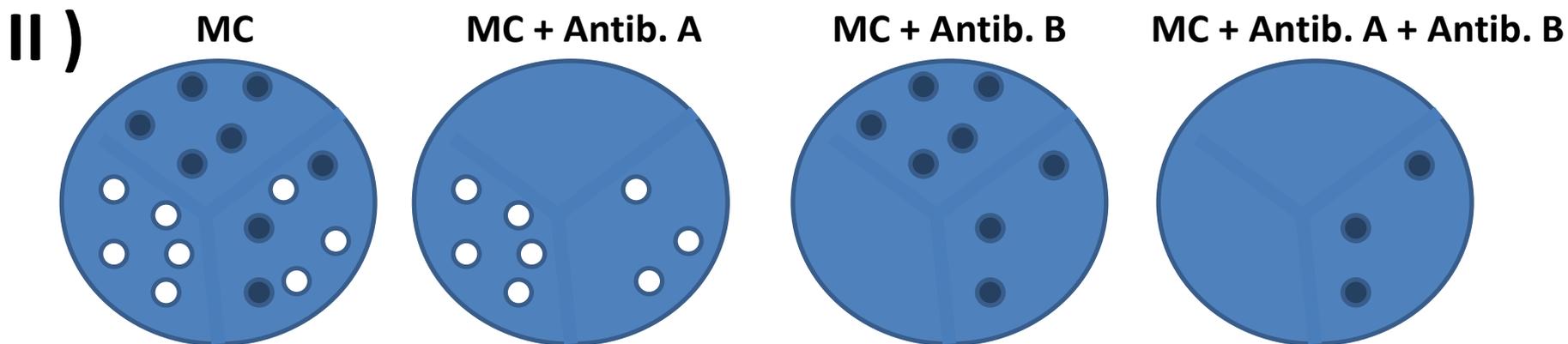
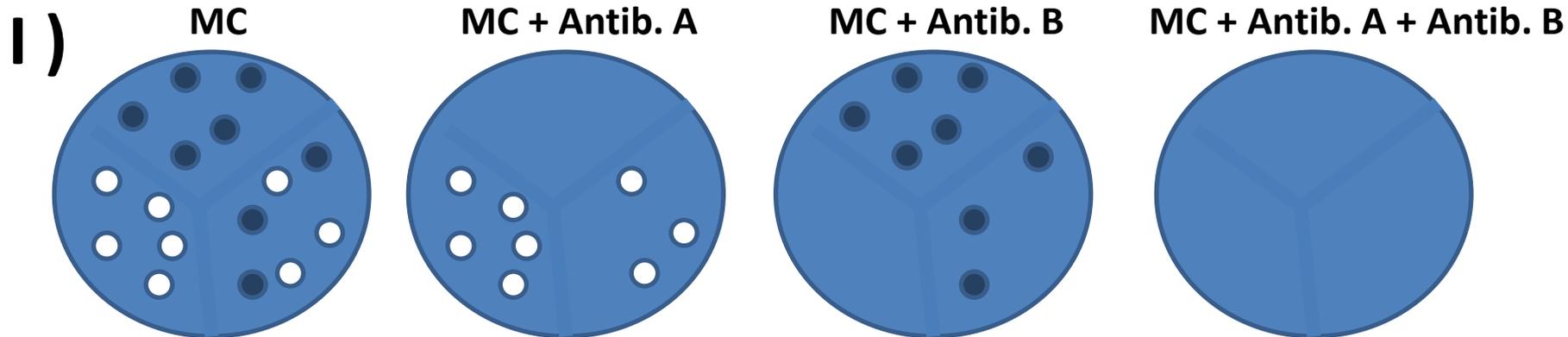
Perguntas

- 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