



Departamento de Genética
USP Ribeirão Preto-FMRP

GENOMAS PROCARIOTOS E LOCUS RIBOSSOMAL

Aparecida Maria Fontes

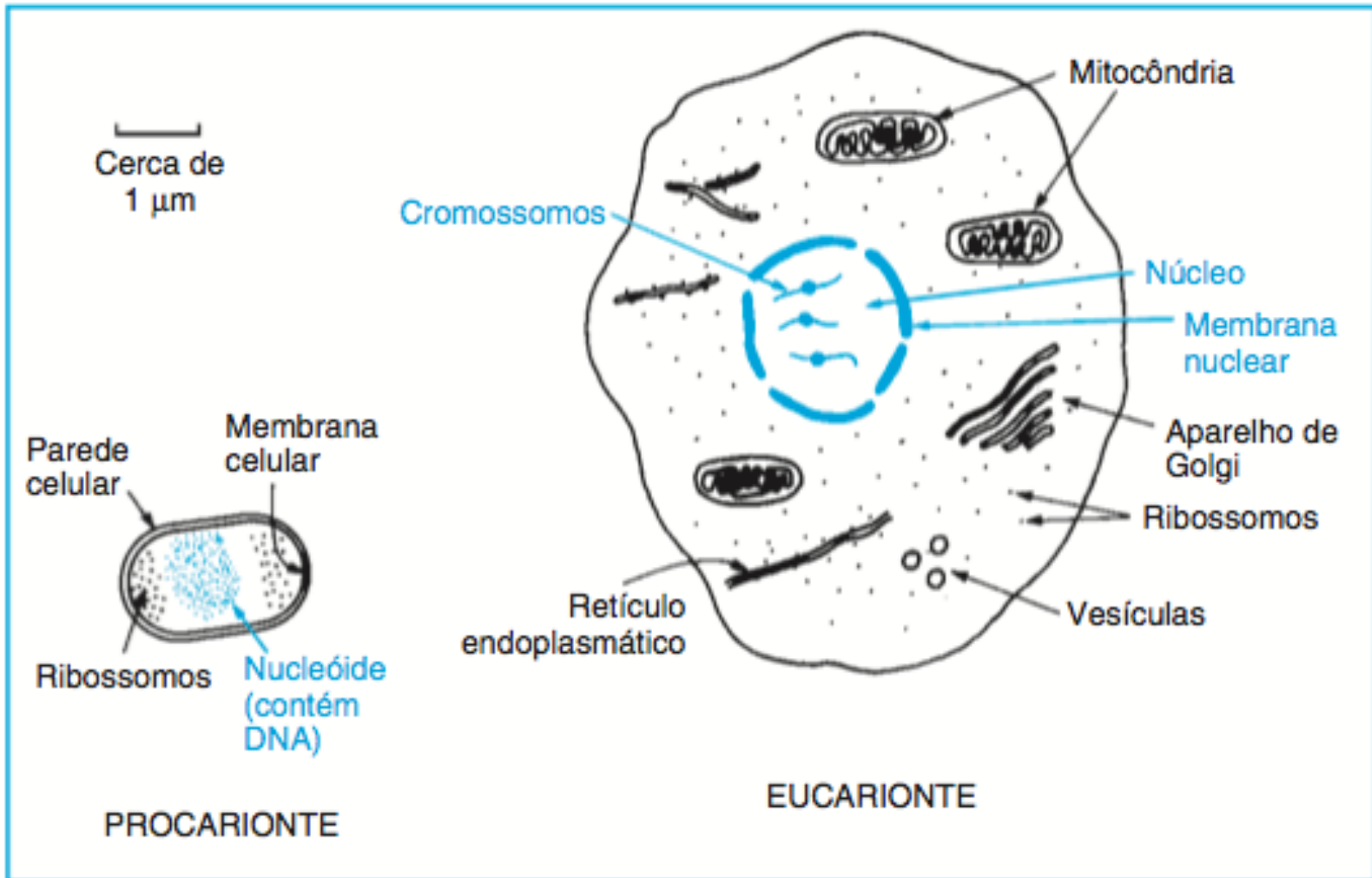
Ribeirão Preto – Fevereiro/ 2020

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

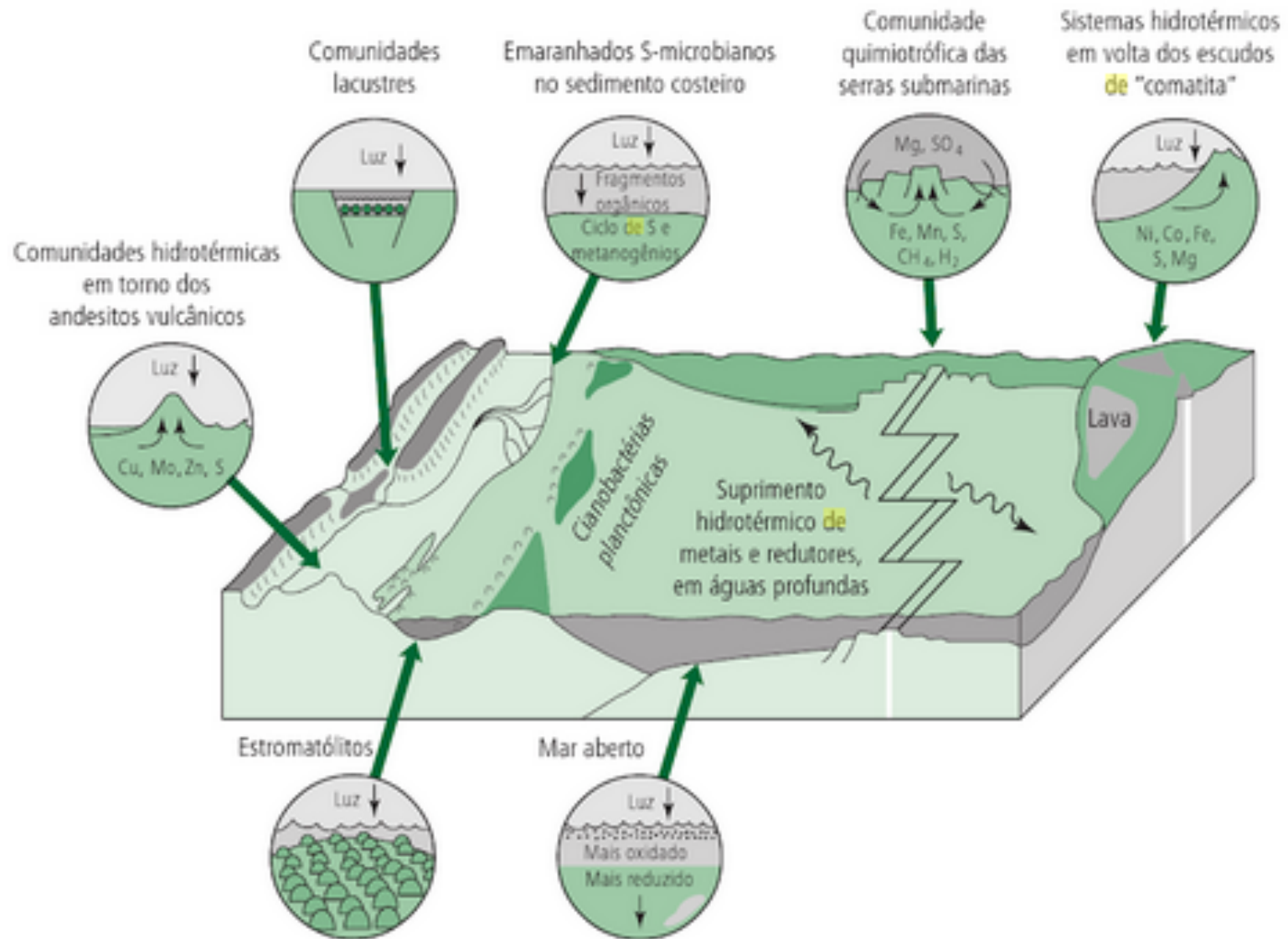
Quando ocorreu a origem da vida na Terra?

- Há 4,5 bilhões de anos.

As evidências fósseis sugerem sobre quando surgiram os primeiros procaríotos?

- 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

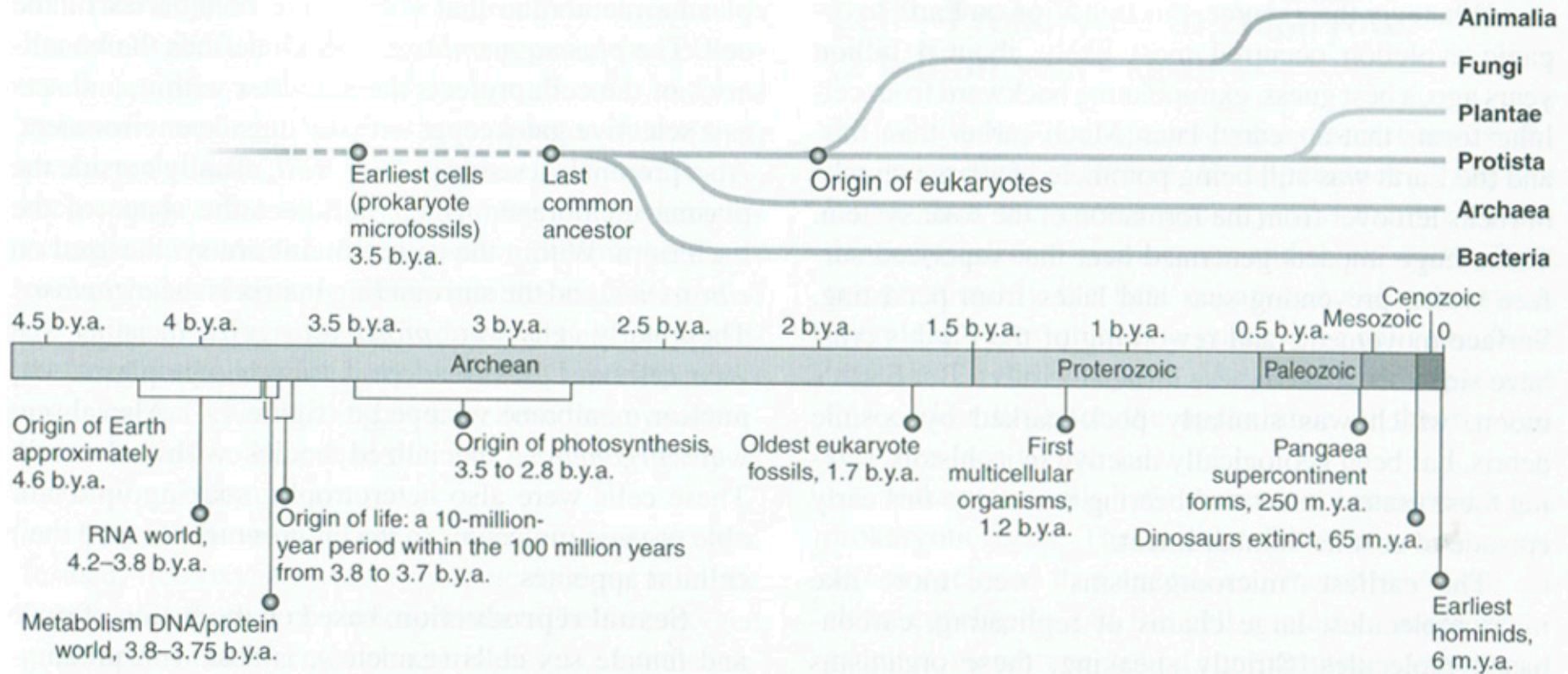
Evidências fósseis sugerem sobre quando ocorreram a origem dos eucariotos?

- Há 2 bilhões de anos.

E a vida pluricelular?

- Há 1,2 bilhão de anos.

A origem da vida



Genômica evolutiva

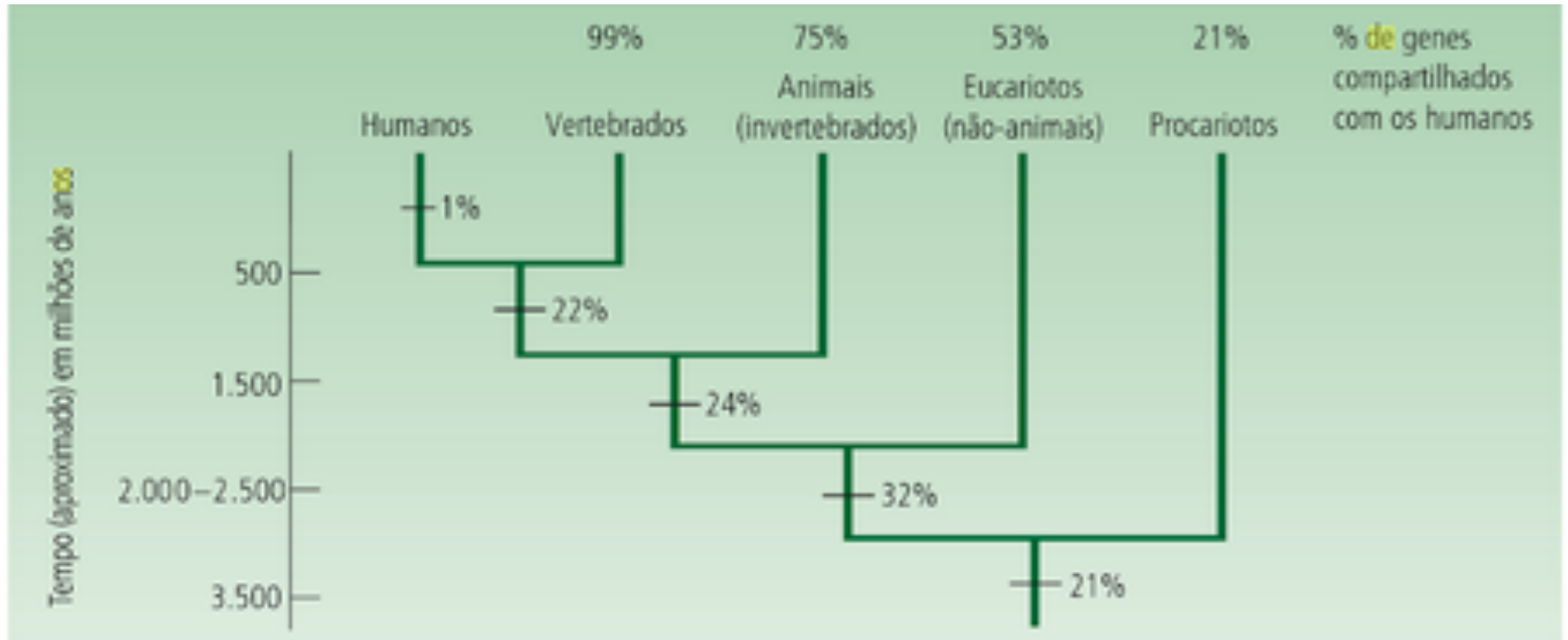
Qual a percentagem de genes humanos são compartilhados com procaríotos ?

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 > 50°C)
 - ❖ Halófilas (crescem em concentrações salinas 3.5-4.5 M)

Marcador molecular para estudio filogenia

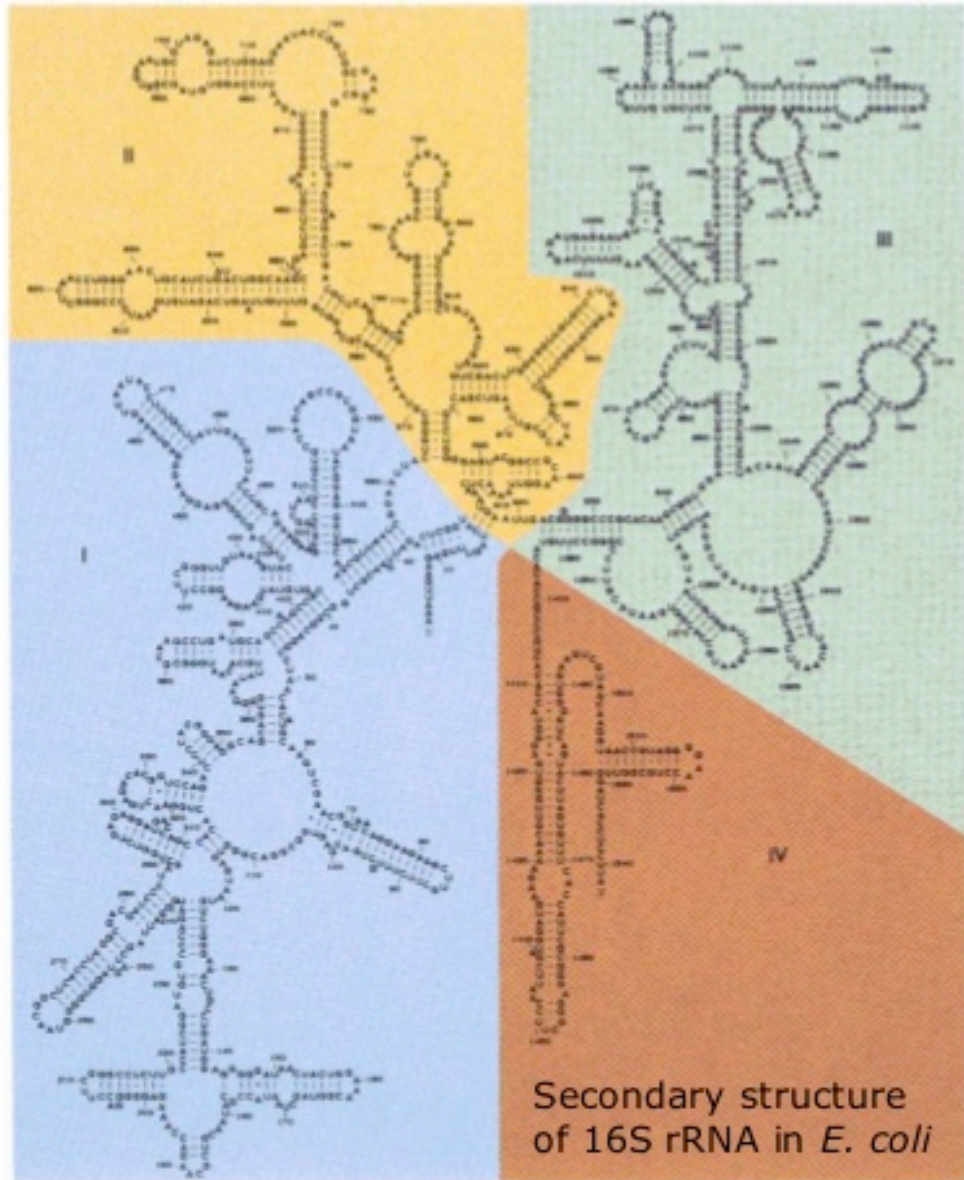
Molecular Phylogenetics

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).



Genoma de *E. coli* K12

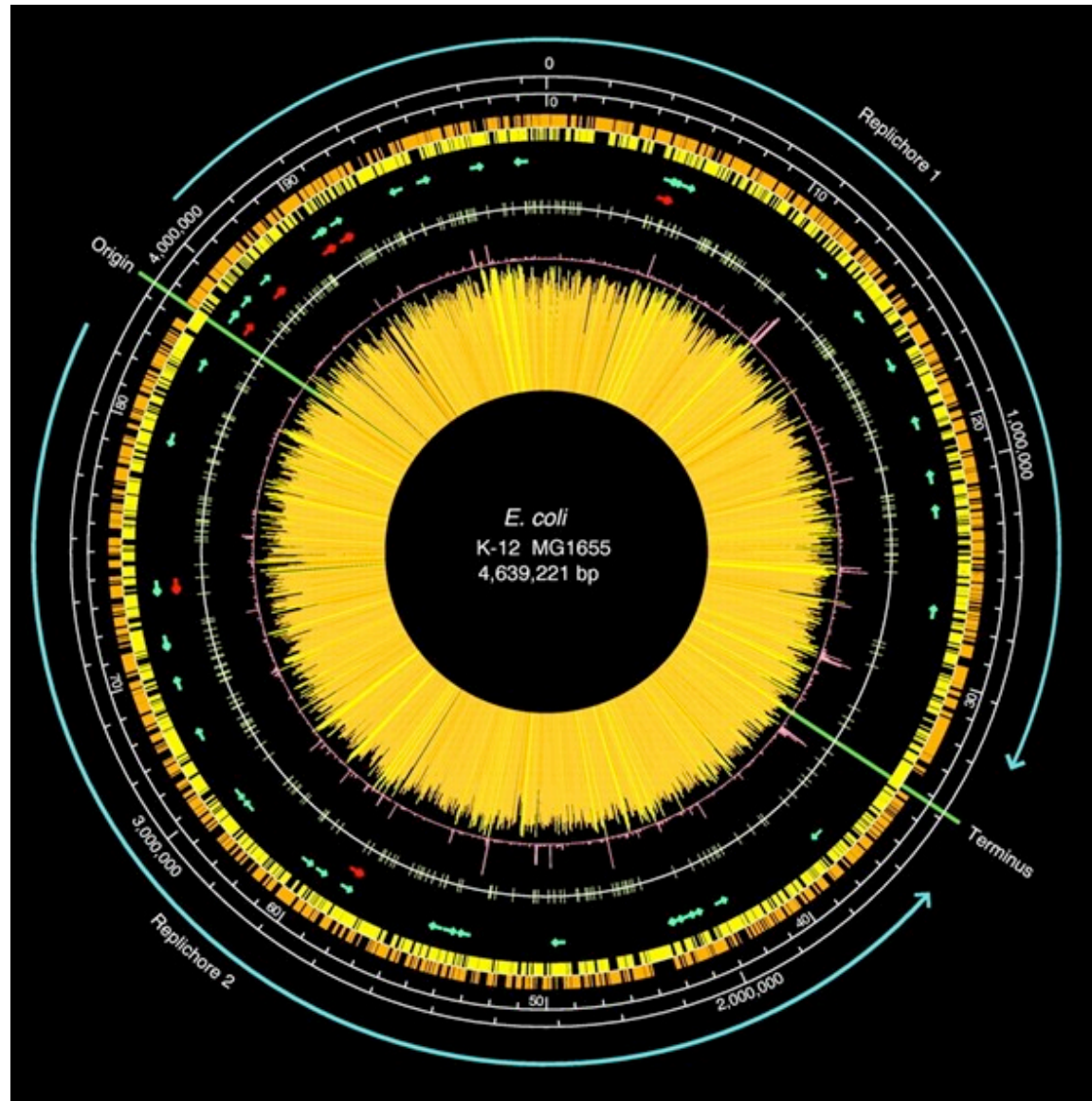
Orange squares
-forward genes

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

<i>Espécie</i>	<i>Comprimento do genoma (kb)</i>	<i>Nº de genes para</i>			
		<i>Proteínas conhecidas</i>	<i>Proteínas não-identificadas</i>	<i>rRNAs</i>	<i>tRNAs</i>
<i>Escherichia coli</i>	4.639	1.897	379	21	84
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.830	1.007	736	18	54
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580	374	96	3	33
<i>Methanococcus jannaschii</i> 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	N.º 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



Enterobacteriaceae*: *E. coli

Epsilonproteobacteria



***Helicobacter*: ulcera**

TRANSCRIÇÃO GÊNICA

Em procariotos

Transcrição gênica

Como se chama a reação química subjacente à transcrição?

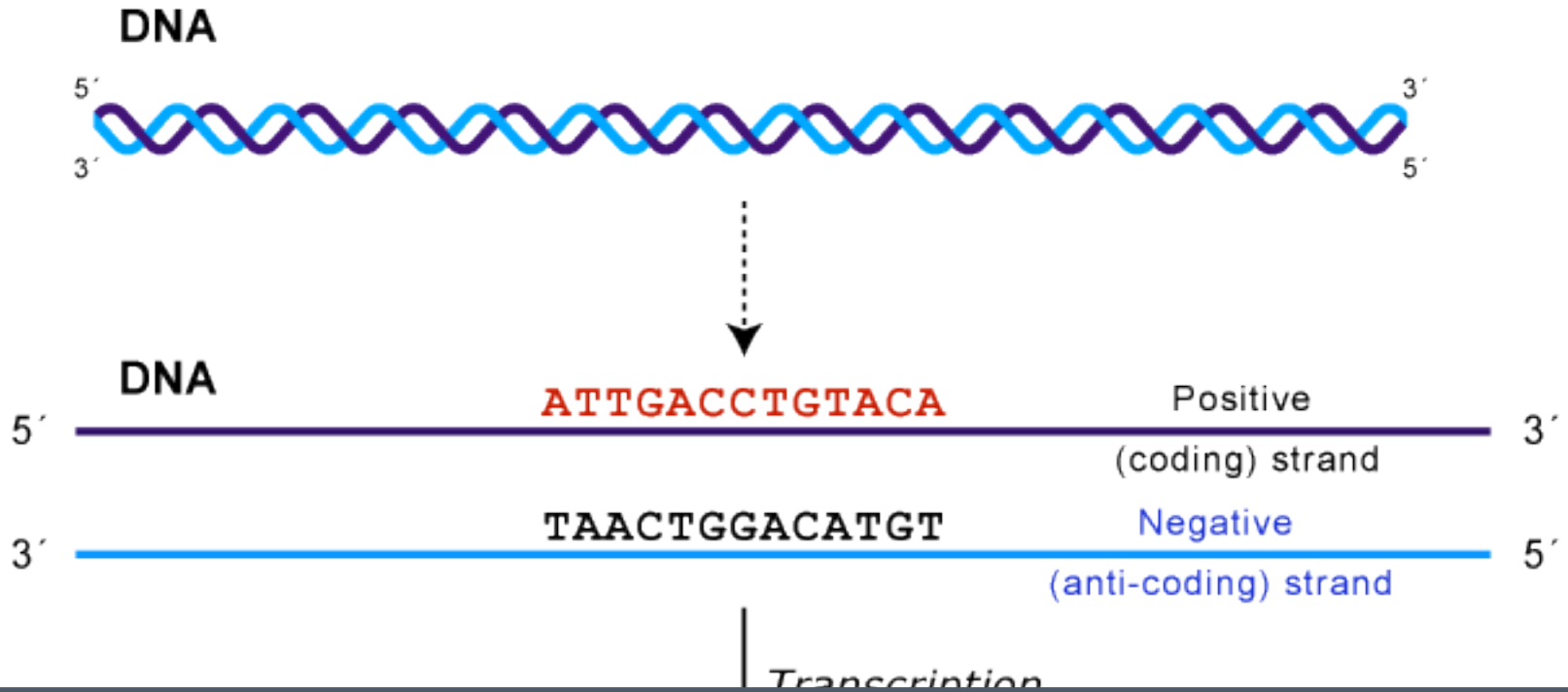
- Síntese de RNA.

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



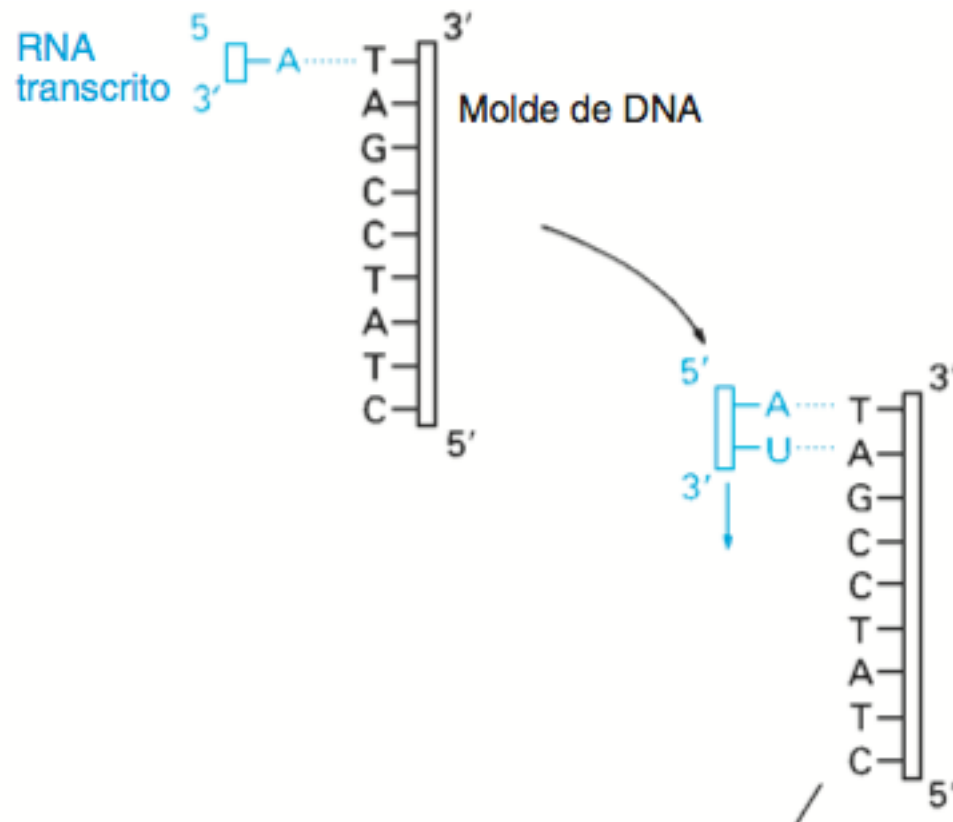
Em relação a fita sense, exceto que o U é substituído pelo T



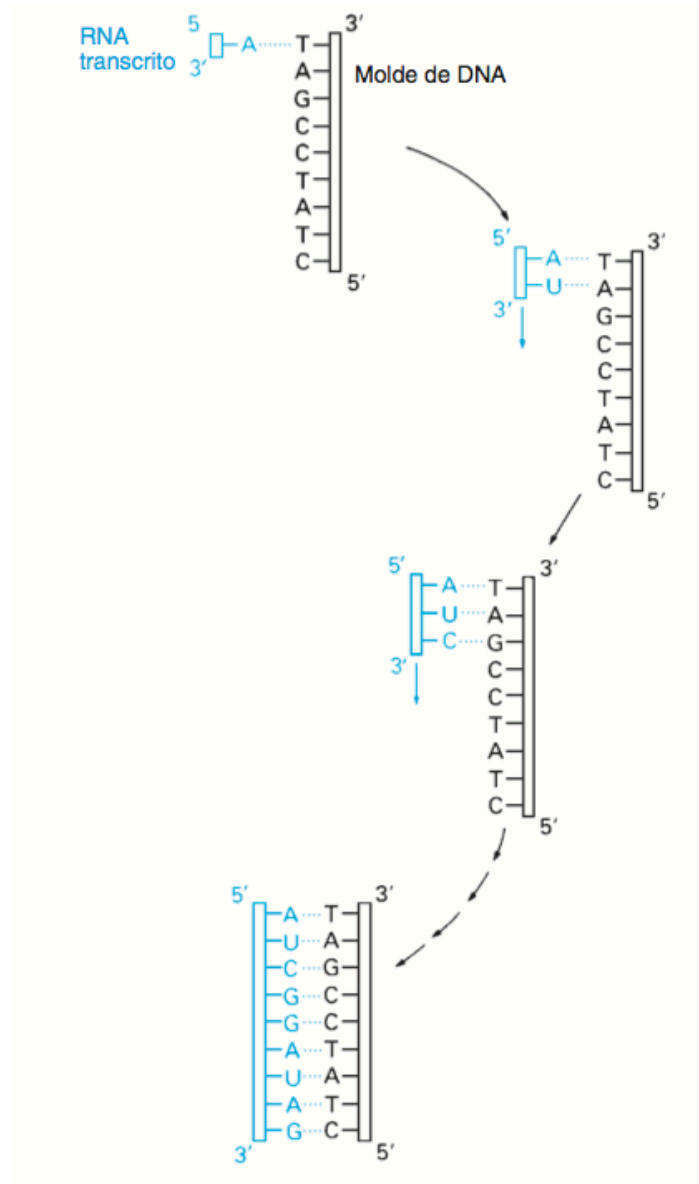
Transcrição gênica

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 distante a -10bp do sítio de início de transcrição.



-35
-10

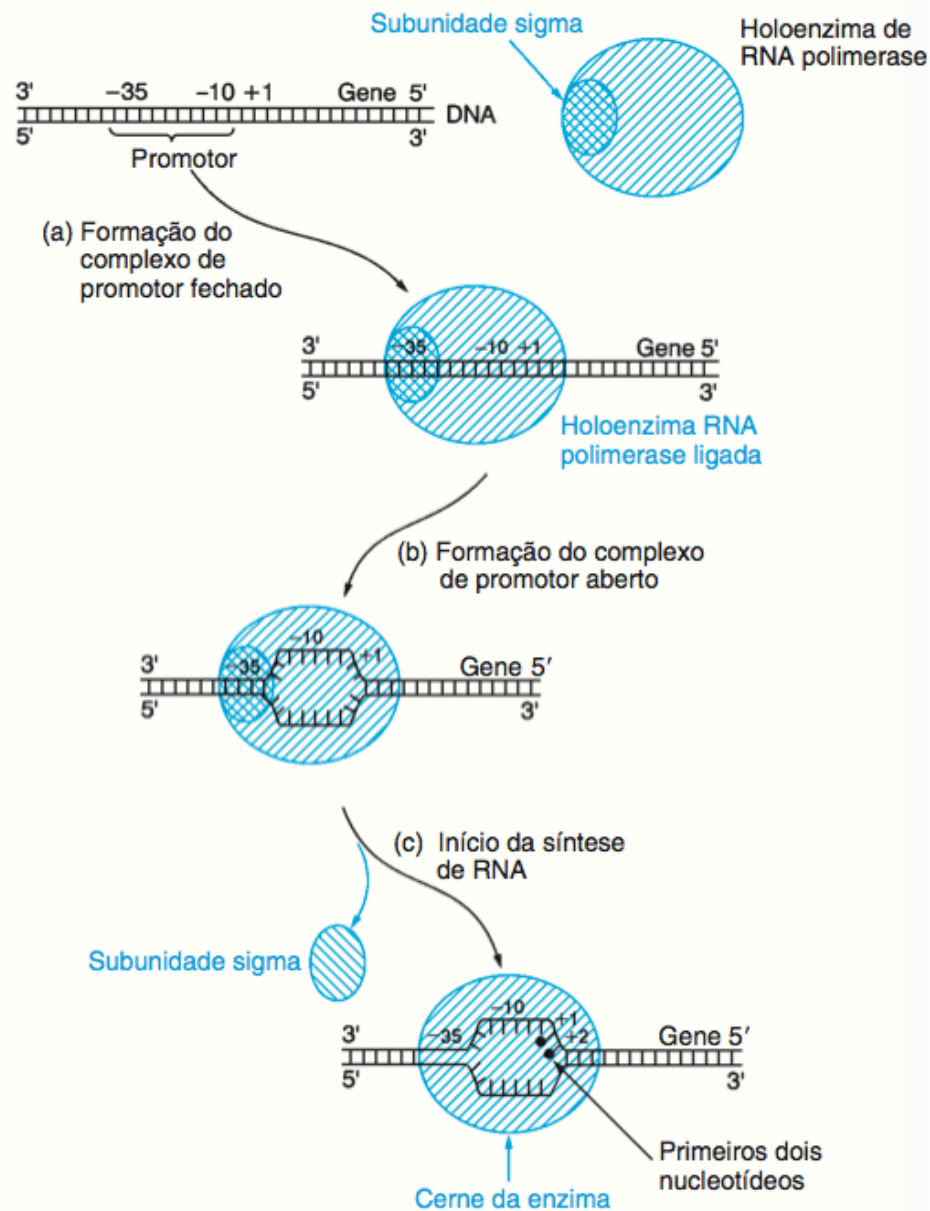
5'-TTGACA-3'
5'-TATAAT-3'

REGIÃO PROMOTORA

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

<i>Gene</i>	<i>Seqüência – 35</i>	<i>Seqüência – 10</i>
Consenso de <i>E. coli</i>	TTGACA	TATAAT
Óperon <i>lac</i>	TTTACA	TATGTT
Óperon <i>trp</i>	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 constituídos os ribossomos?

- ❑ RNAr e proteínas

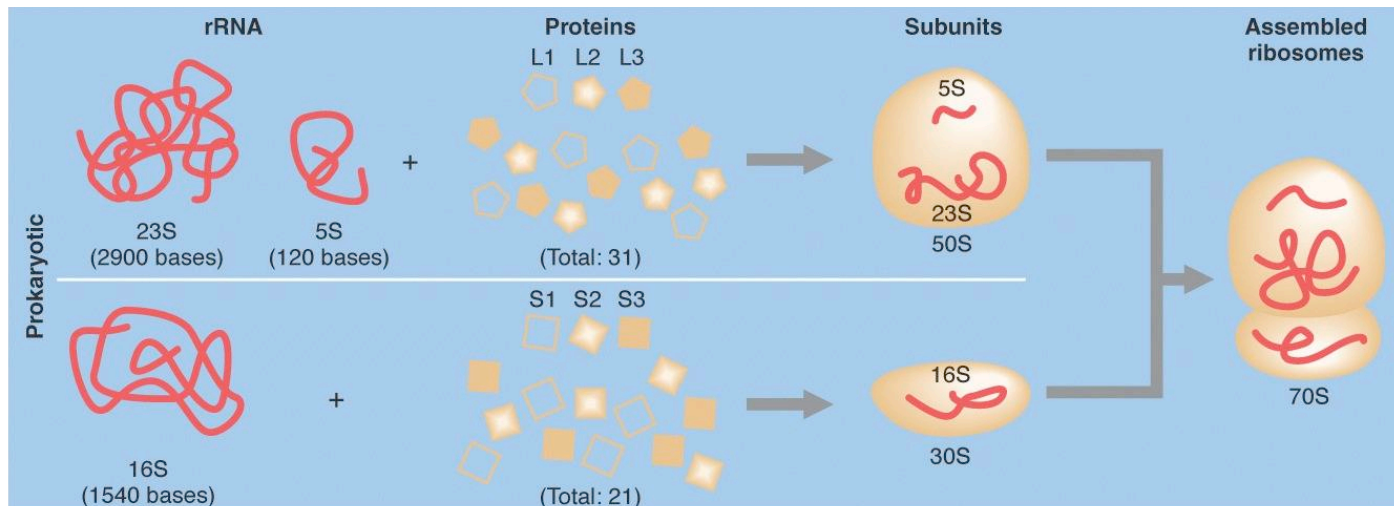
Ribossomos em procariotos

Onde as células realizam a síntese proteica?

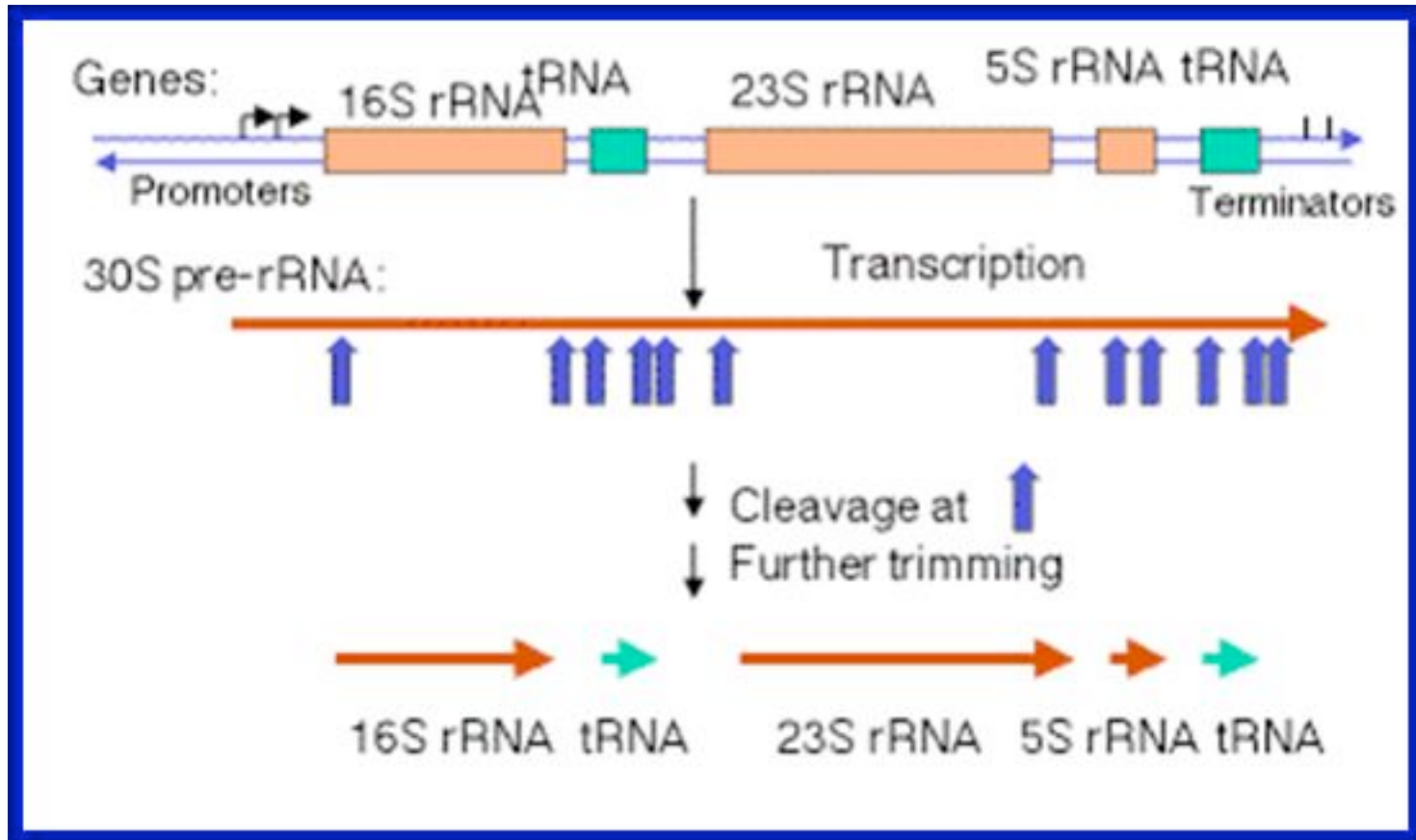
- ❑ Nos ribossomos.

Como são constituídos os ribossomos?

- ❑ RNAs ribossômicos.
- ❑ Proteínas ribossomais.



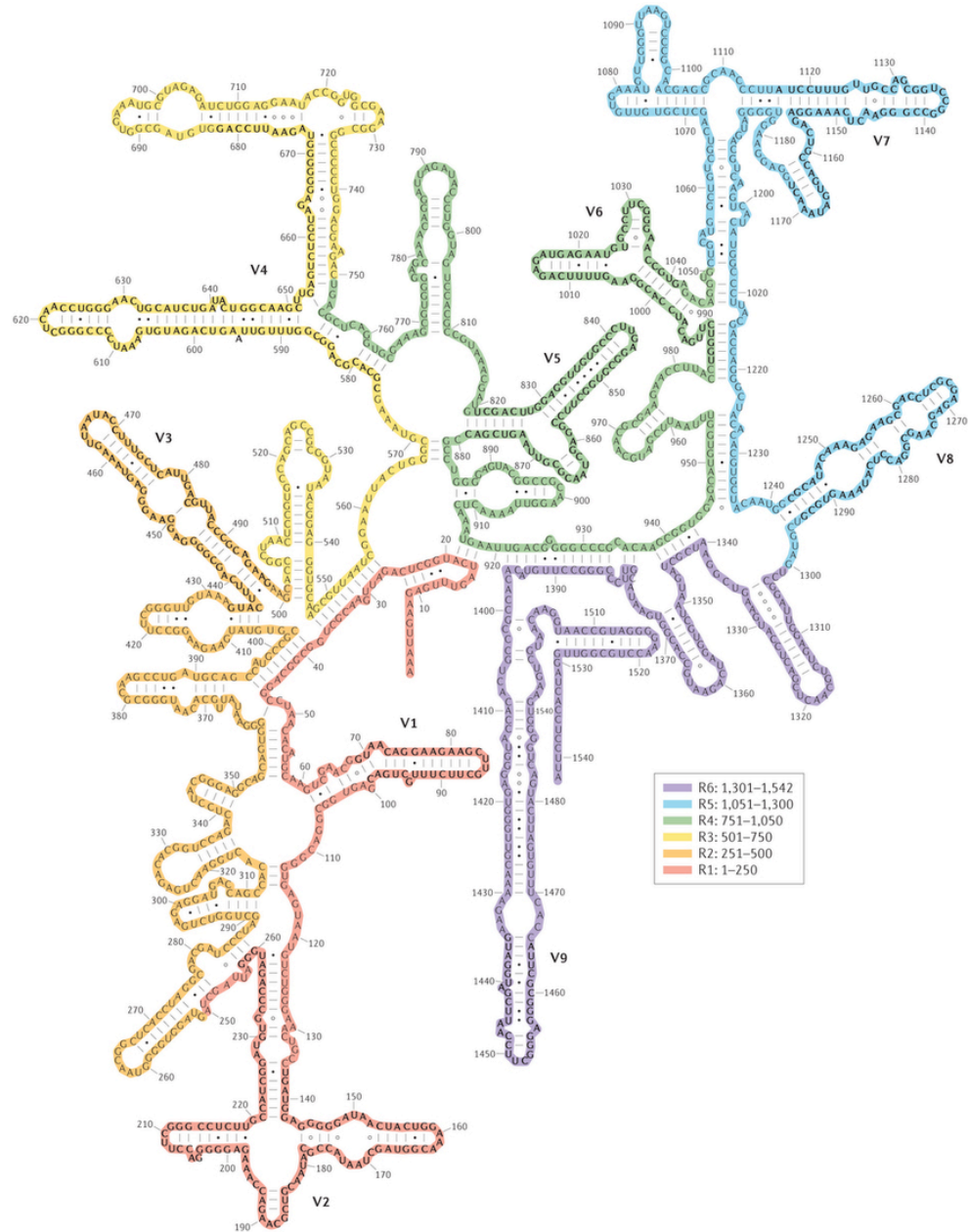
Gene de rRNA em procarioto



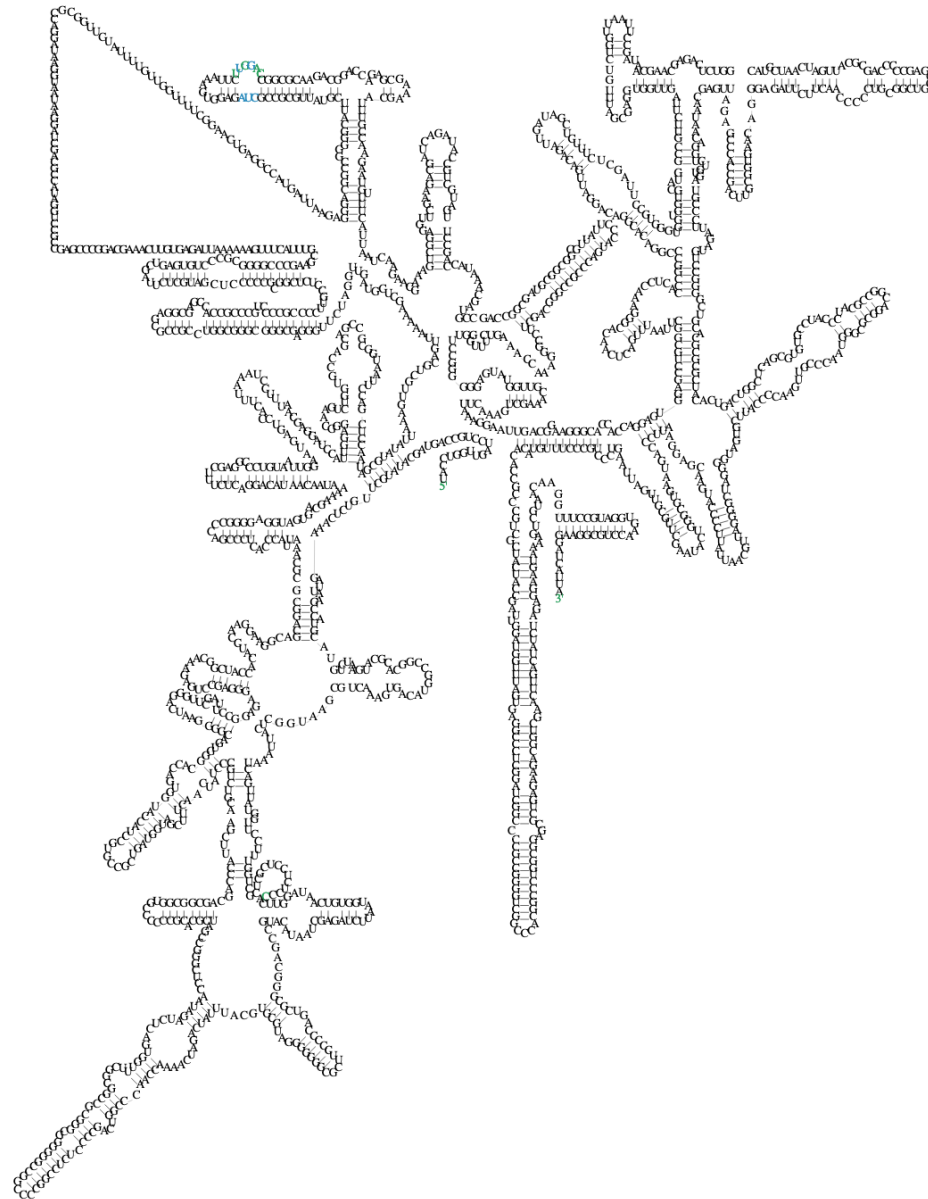
Genomas Comparativos

Microorganism	Chromosome (kbp)	Plasmid (kbp)	Genome (kbp)	rRNA
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655*	4640	-	4640	7
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd*	1830	-	1830	6
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	3650 + 3170 + 1070	200	8090	4+1+1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3000 + 2100 (L)	200, 450	5750	1+1
<i>Rhizobium meliloti</i>	3400	1340, 1700	6440	3
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3045 + 915	31, 42, 63, 97, 105, 110	4408	1+2
<i>Thiobacillus cuprinus</i>	3800	50 (L)	3850	1
<i>Myxococcus xanthus</i>	9455	-	9455	4
<i>Bacillus subtilis</i> *	4215	-	4215	10
<i>Mycoplasma genitalium</i> *	580	-	580	1
<i>Bacillus cereus</i> Fo831/76	2400	40, 230, 260, 360, 760, 960	5010	3
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8000 (L)	350 (L)	8350	6
<i>Synechocystis</i> sp. strain PCC 6803*	3820	2.2, 5.2, 50, 100	3977	2
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31*	910 (L)	9-53 (L and C)	>1250	2
<i>Methanococcus jannaschii</i> *	1660	16, 58	1734	2
<i>Haloferax volcanii</i>	2920	6.4, 86, 442, 690	4144	2

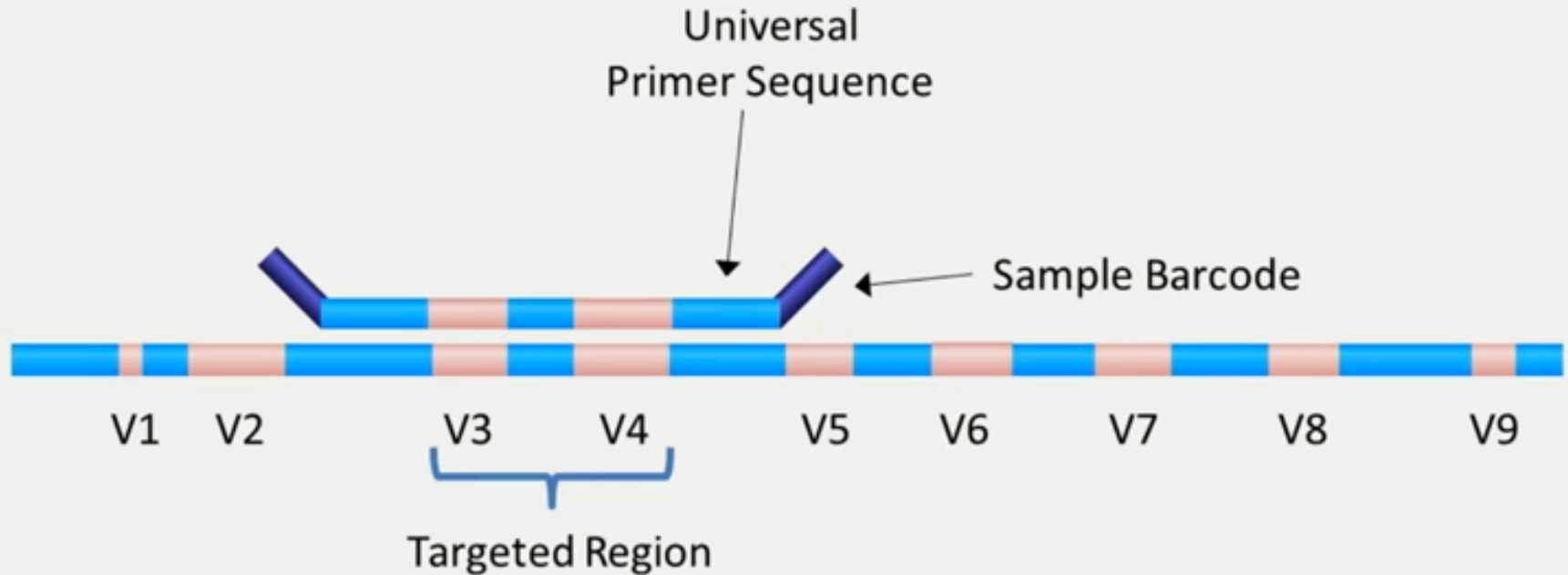
RNA ribossomal 16S em *E. coli*



RNA ribossomal 18S em *Homo sapiens* = 1865 nt



Sequência gênica: RNA ribossomal 16S

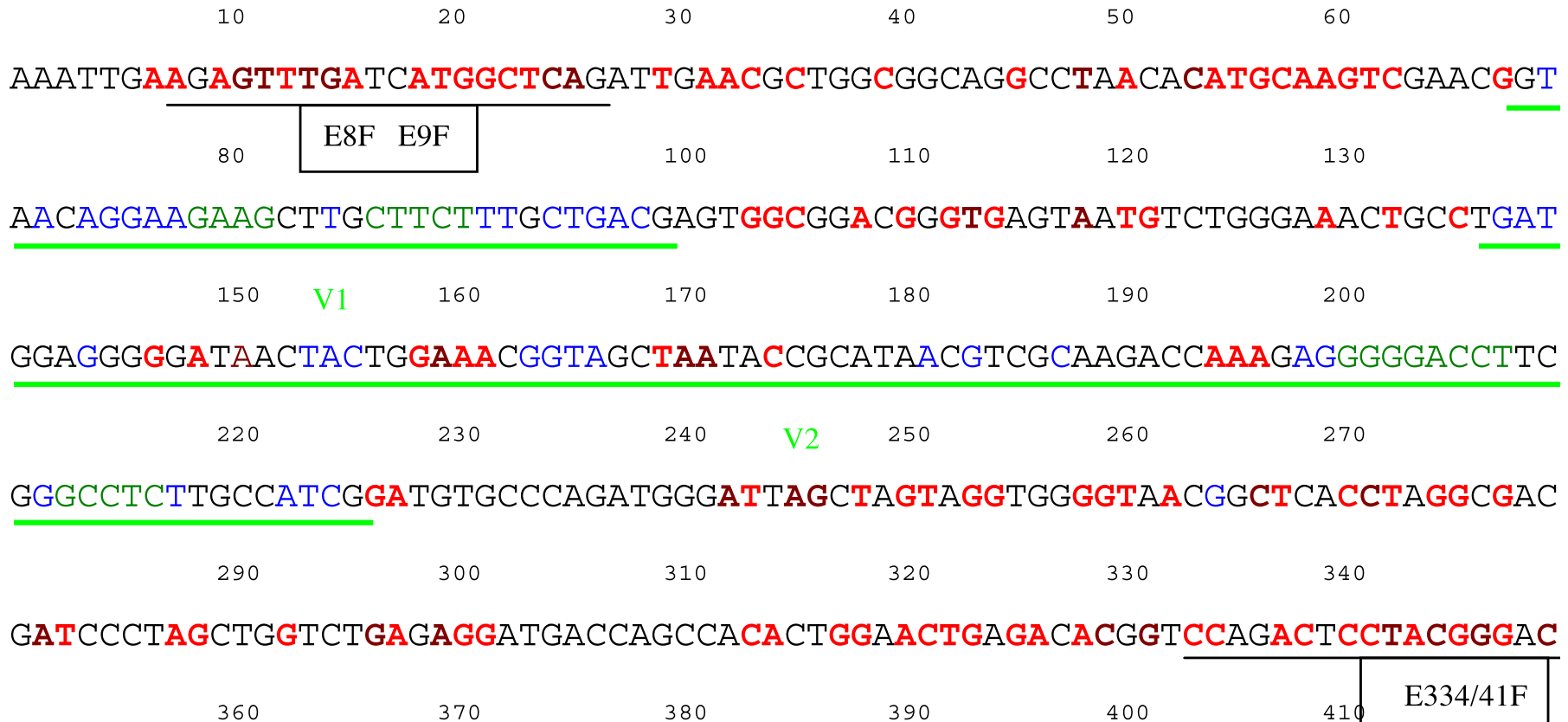


Sequência gênica: RNA ribossomal 16S

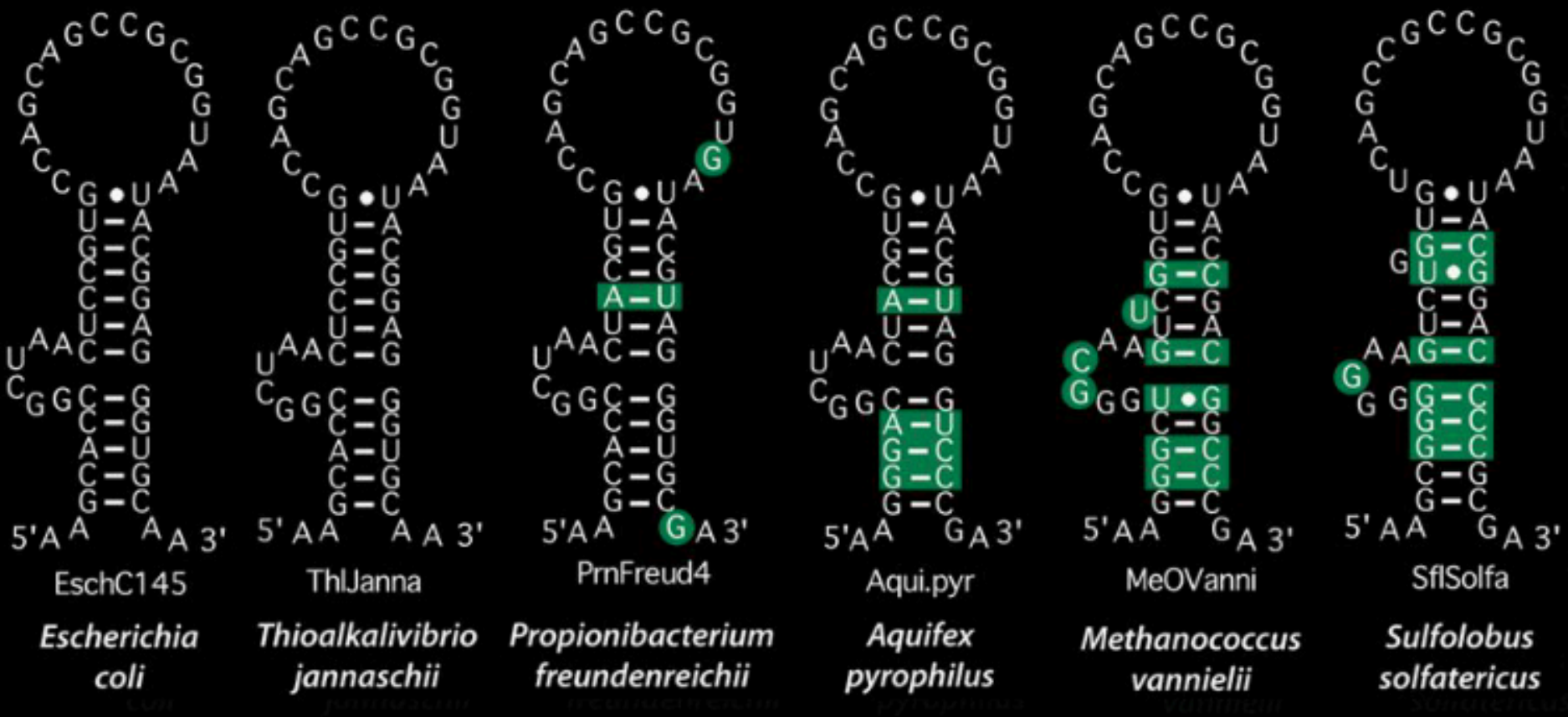
KEY: **totally conserved** **conserved** variable highly variable > 75% variable

variable regions

priming sites



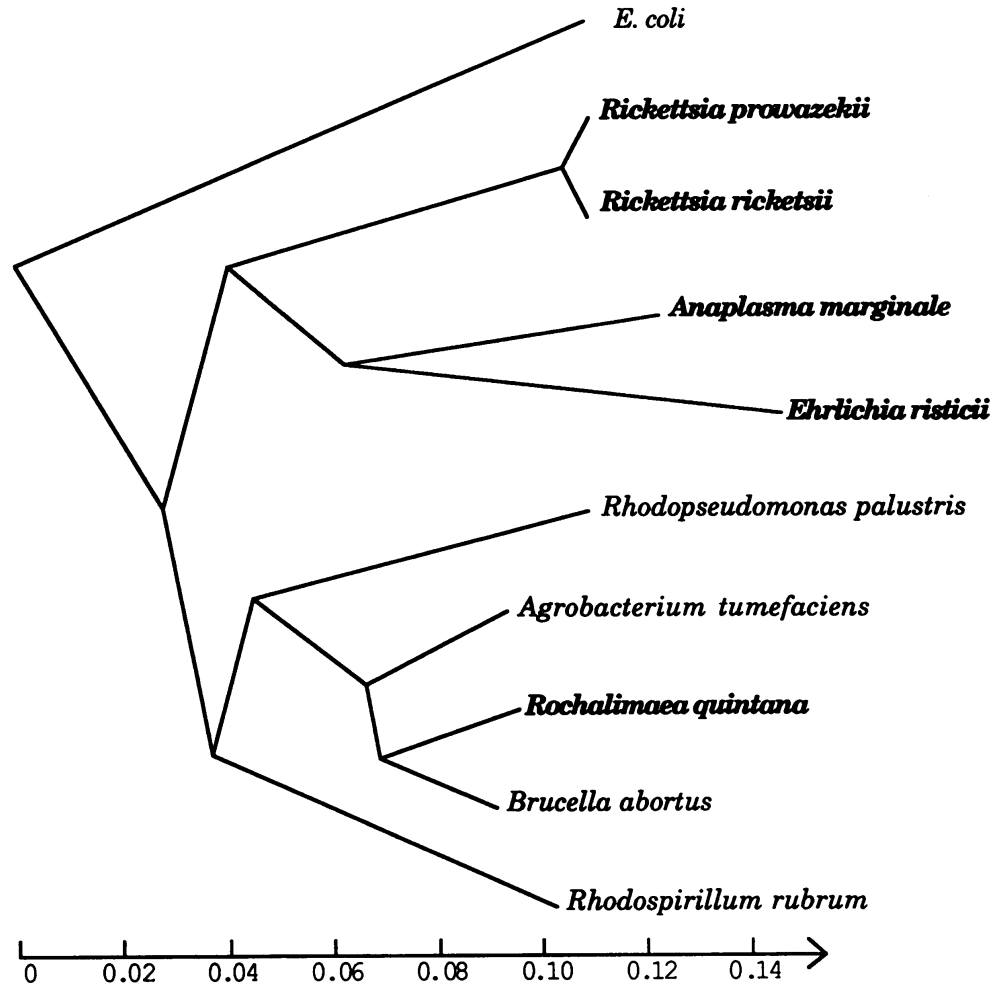
Genoma Comparativos: região variável 16S em 6 espécies



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



Distância filogenética entre as espécies



Exercícios – análises in silico importantes antes da reação de PCR in vitro

1. Verificar se de fato os primers universais do locus ribossomal apresentam homologia com o organismo de interesse;

2. Determinar se o *primer* “universal” tem 100% homologia com uma espécie de procarionto:

Forward primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e

Reverse primer (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') in **Weisburg et al 1991**

3. Obter as informações sobre o tamanho do amplicon das diferentes espécies de procariontos.

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 Environment 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