



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

**QBQ0317 – 2020**

**Recombinação**



**Elementos Genéticos Móveis**

# Metabolismo do DNA

Replicação

Reparo

Recombinação

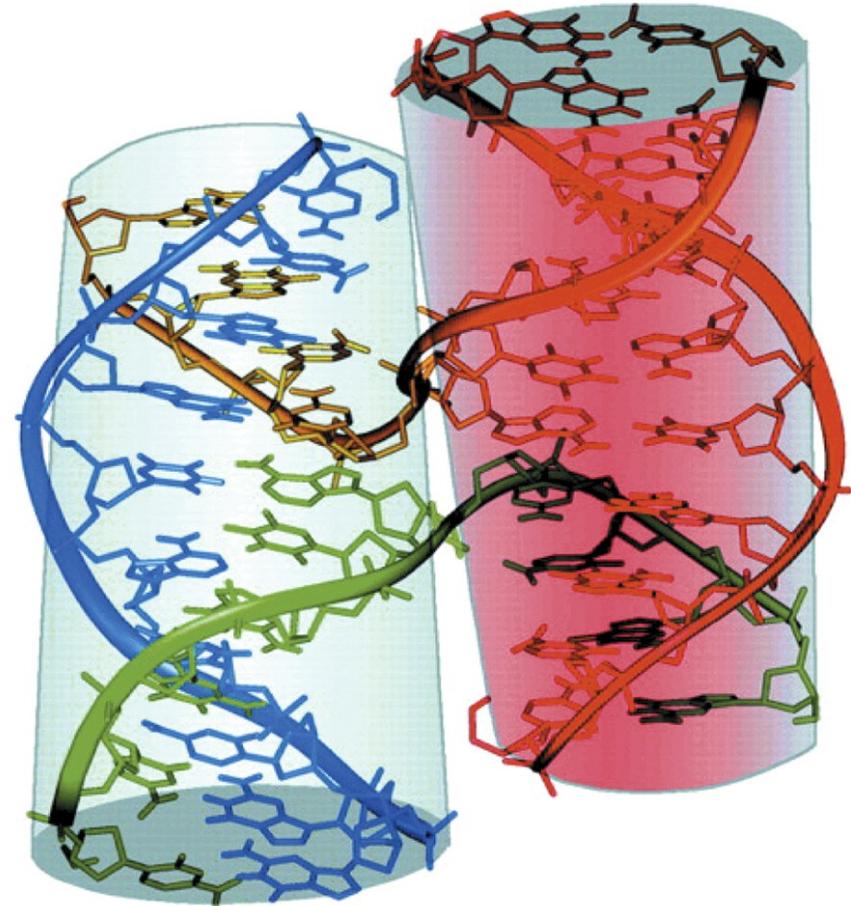


Figure 24-38b Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Recombinação

- **Rearranjos no DNA**
  - novas combinações de genes ou sequências
- **Acoplada a:**
  - replicação
  - reparo
- **Geralmente requer homologia entre as sequências**
  - Recombinação geral (homóloga)
  - Recombinação sítio-específica
- **Geração de diversidade genética**

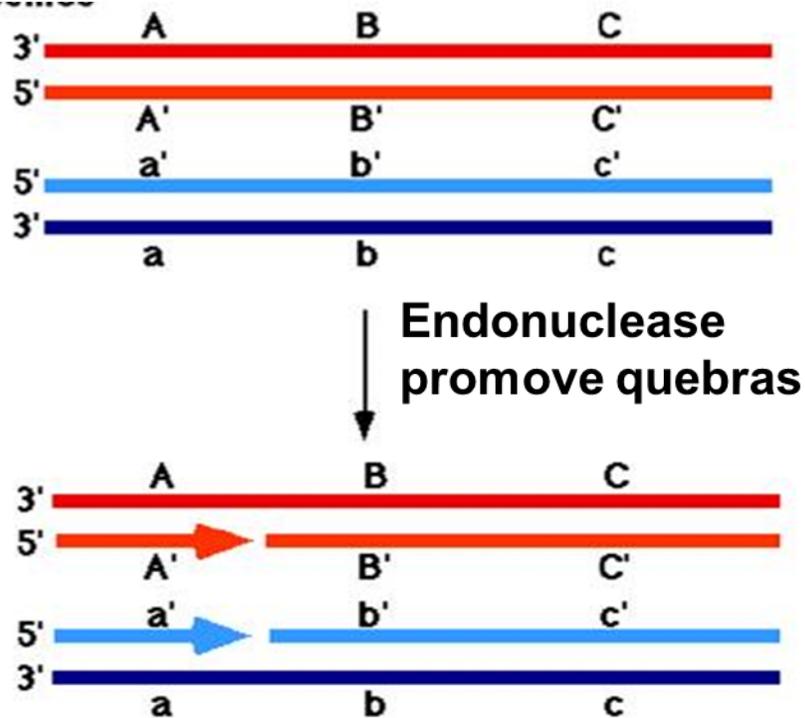
# Tipos de recombinação

- **Recombinação homóloga**
  - Entre sequências com homologia relativamente extensa
    - Reparo de quebras duplas
    - Crossing-over
  - Enzimas comuns a qualquer sequência
- **Recombinação sítio-específica**
  - Entre pequenas sequências específicas
  - Enzimas (recombinases) específicas para cada sequência
    - Integração/excisão de fagos
    - Alguns eventos de transposição

# Recombinação Homóloga

## Modelo de Holliday

Regiões homólogas

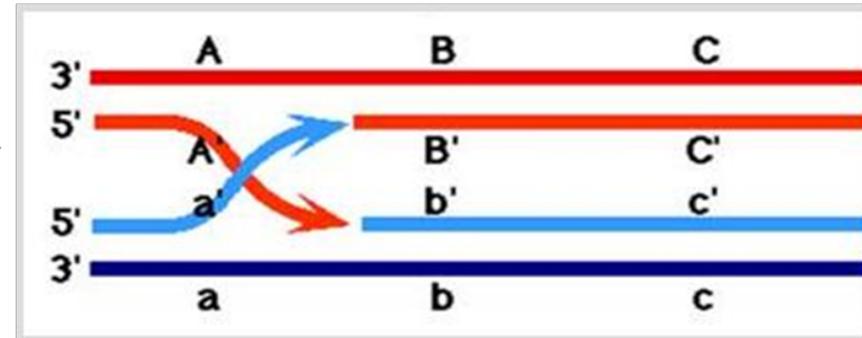


Junção de Holliday

Regiões homólogas: sequências de DNA similares

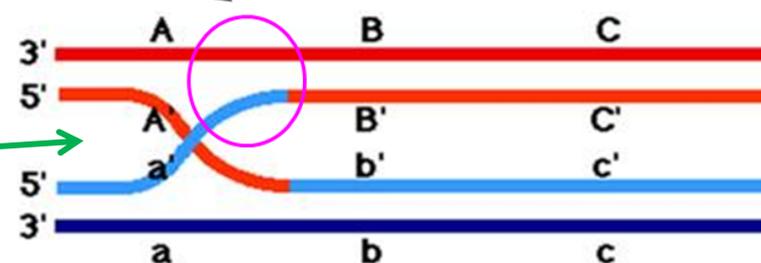
Quebras em uma fita de cada fita dupla

Invasão das fitas



Heteroduplex

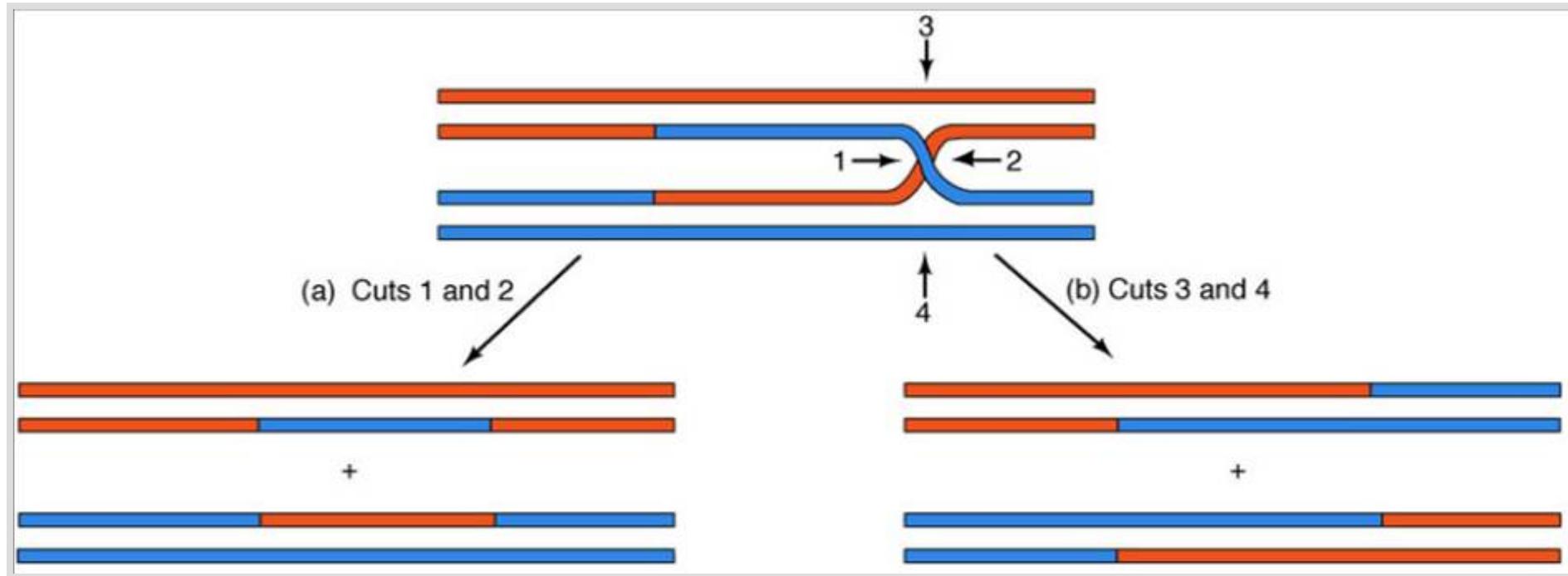
ligation



# Resolução da junção de Holliday



0.5 μm



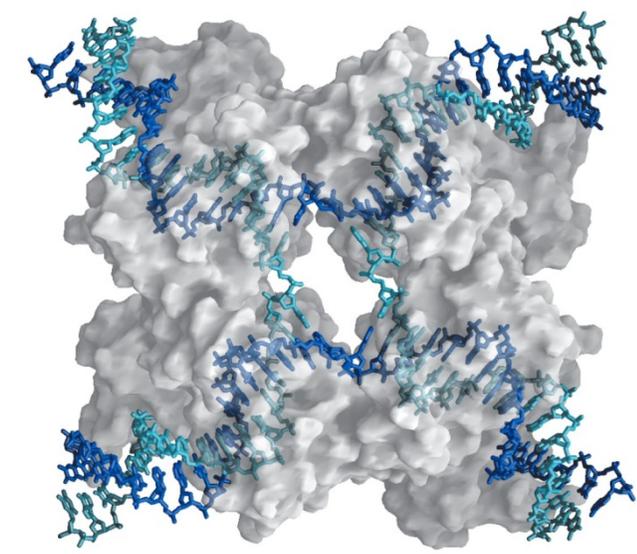
*patch* (remendo)

*crossover*

# Funções da recombinação homóloga

- Gerar diversidade genética (ex: meiose em eucariotos, troca de material genético em bactérias)
- Reparo do DNA (reparo de quebras de fita dupla)
- Replicação (evitar bloqueios)

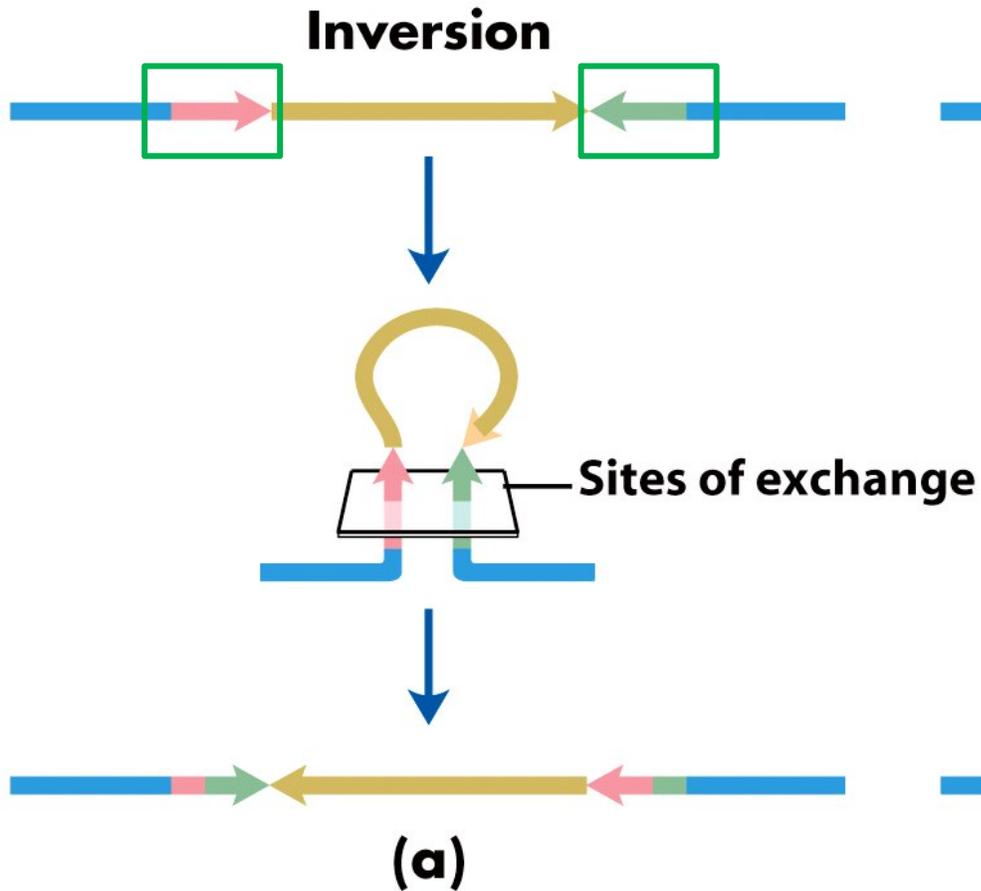
# Recombinação Sítio-Específica



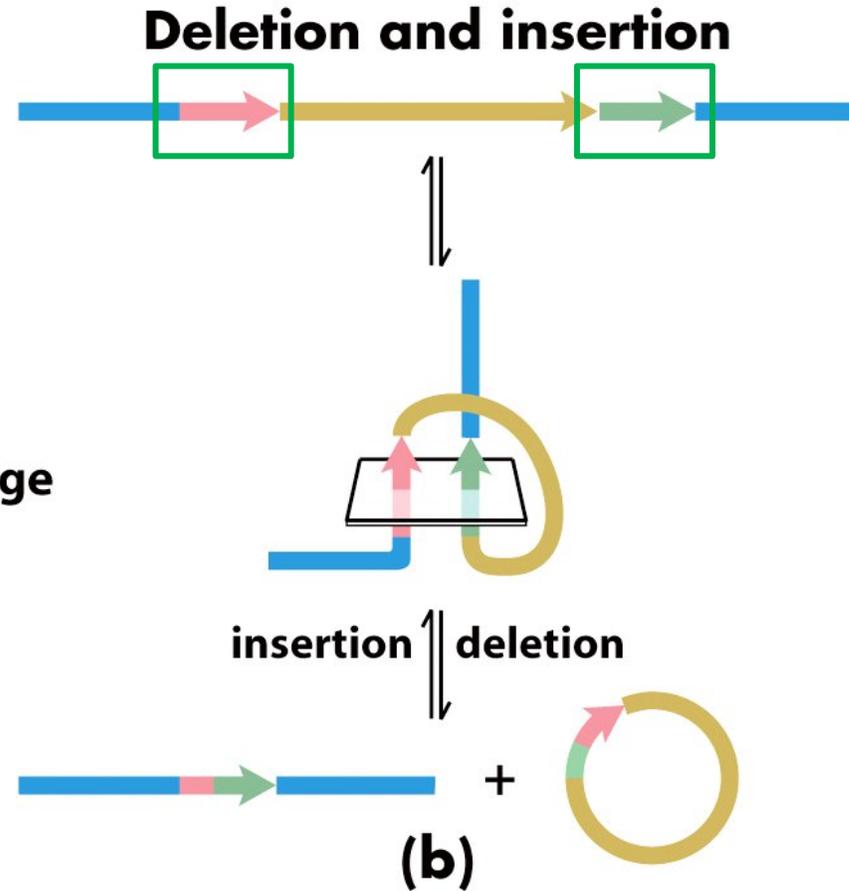
- Sequências de DNA específicas
  - 20 a 200 bp
  - Duas na mesma molécula ou em moléculas diferentes de DNA
- Recombinase
  - Enzima específica para uma determinada sequência de DNA
  - Cliva e religa o DNA, trocando as fitas

# Efeitos da recombinação sítio-específica

Sítios em orientação inversa



Sítios na mesma orientação



# Recombinação Sítio-Específica

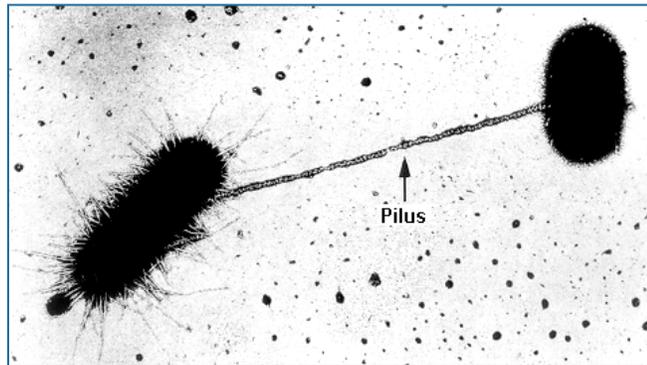
- ciclos de replicação de alguns vírus e plasmídeos
- transferência horizontal de DNA (HGT)
- regulação da expressão gênica
- rearranjos de DNA programados durante o desenvolvimento embrionário
  - Anticorpos (IgG)

# Aplicações Práticas da Recombinação

- Clonagem de genes em laboratório (bactérias, leveduras)
- Construção de organismos recombinantes
  - bactérias
    - Vacinas, medicamentos, produtos biotecnológicos
  - eucariotos
    - Produtos biotecnológicos (principalmente levedura)
    - Transgênicos: alimentos, animais para pesquisa
- Construção de organismos sintéticos

# Elementos genéticos móveis

## Transferência Horizontal



# Elementos genéticos móveis

- Aumentam variabilidade genética
- Rearranjos e trocas, possibilitando novas combinações de genes e sequências
- Podem ser:
  - episômos (replicação autônoma )
  - integrados no cromossomo hospedeiro

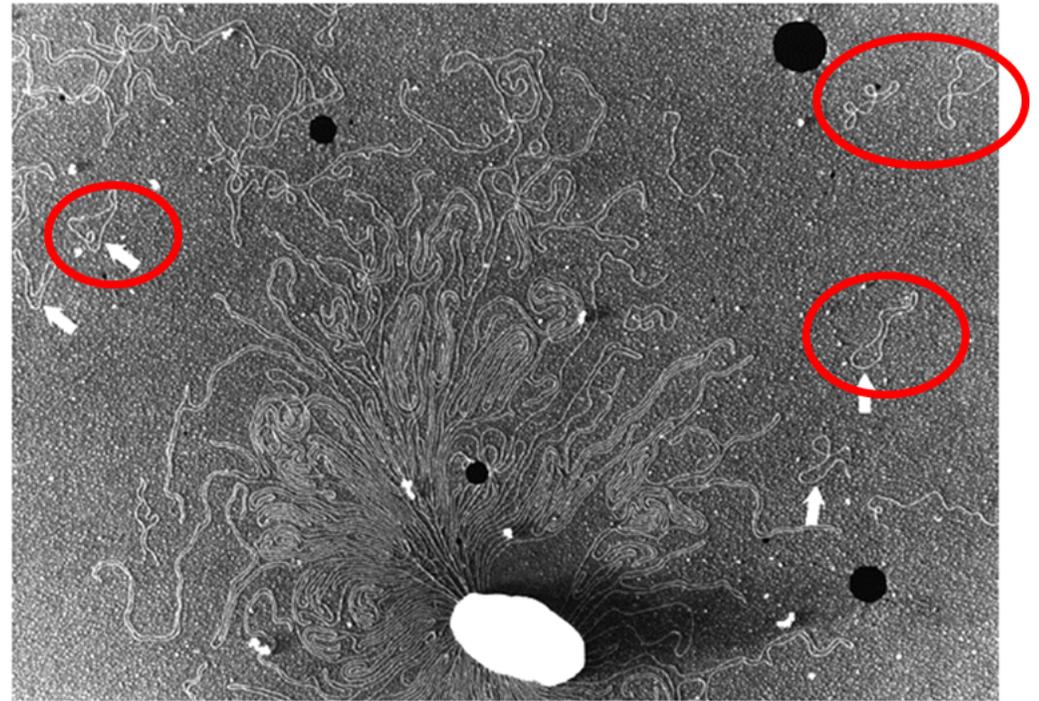
Plasmídeos

Bacteriófagos (fagos)

Transposons

# Plasmídeos

- Moléculas circulares de DNA extracromossomais
  - 1 a 500 kb
  - genes que aumentam o repertório genético do hospedeiro → adaptação
- Presentes em bactérias, arqueias e eucariotos unicelulares
- Usados como ferramentas de biologia molecular



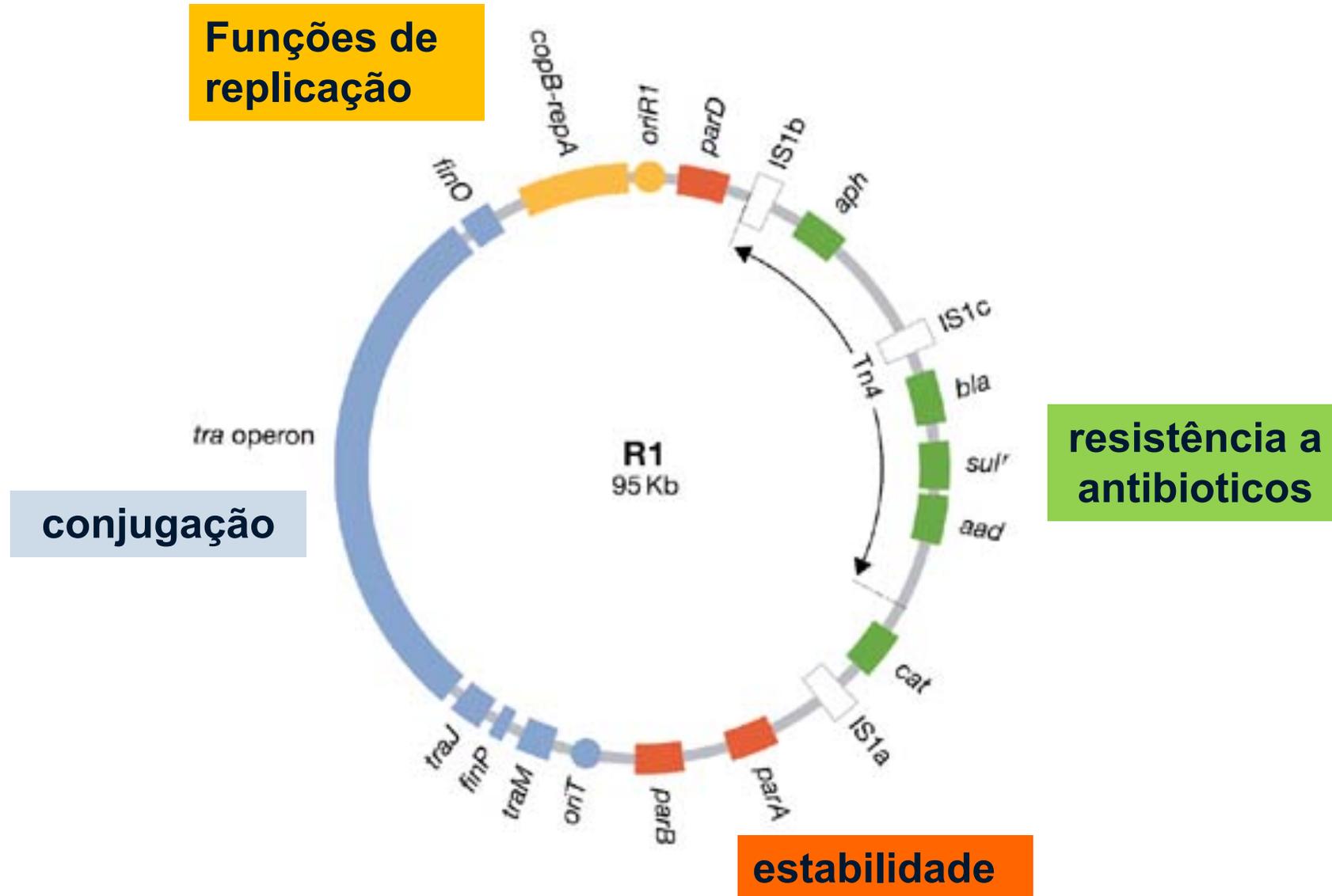
# Plasmídeos

- Replicação autônoma → episômos
  - Origem de replicação e proteínas de início de replicação próprias
  - Dependem das DNA polimerases do hospedeiro
- Número de cópia controlado
  - Multicópia ou
  - 1-2 cópias/célula
- Partição entre as células
  - Mecanismos para impedir que plasmídeos se percam na divisão celular

# Plasmídeos

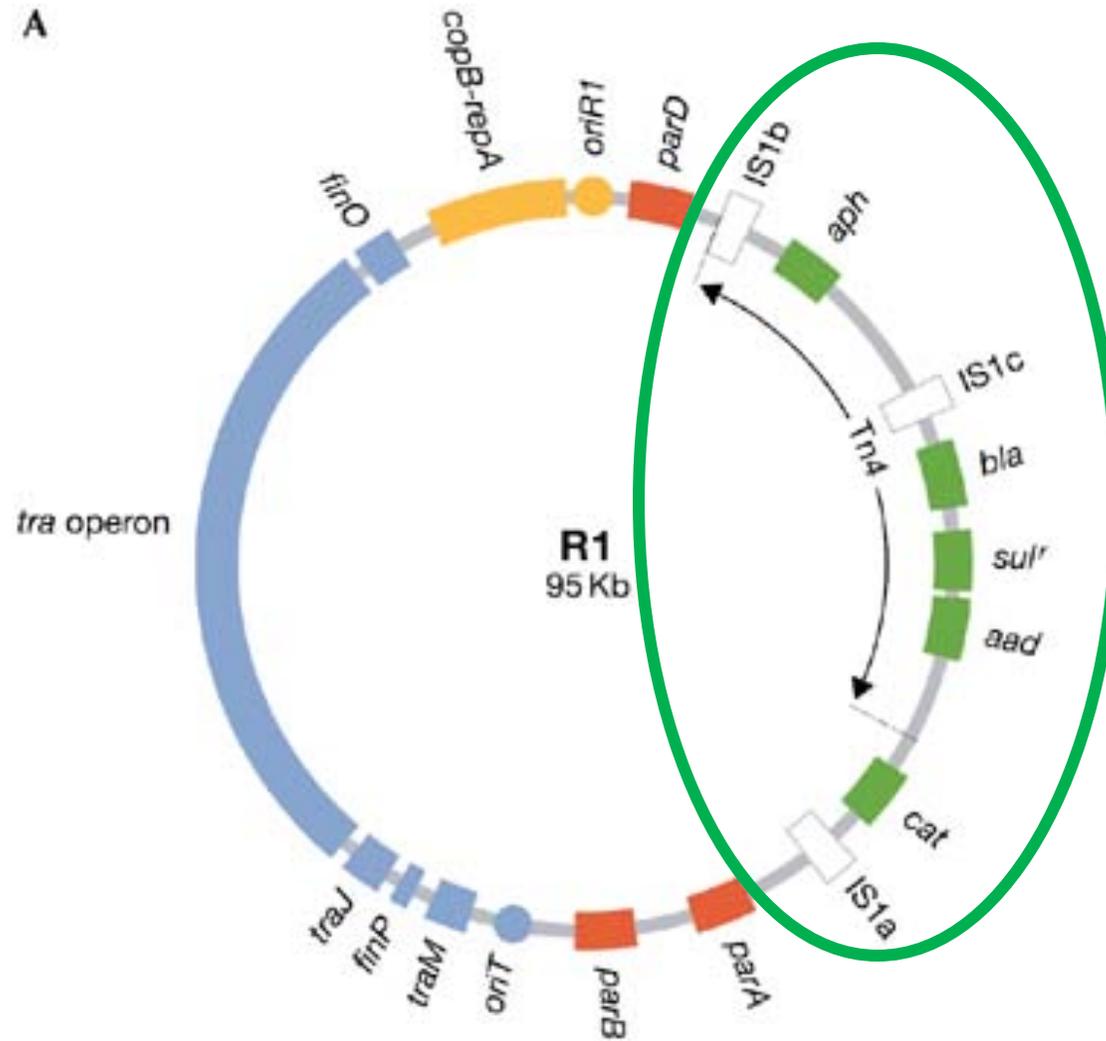
- Podem carregar genes que conferem vantagens adaptativas
  - resistência a antibióticos
  - fatores de virulência
  - metabolismo alternativo
- Podem ser transferidos entre células
  - transformação
    - Hospedeiro competente
  - conjugação
    - Origem de transferência (*oriT*)
    - Genes de mobilização e transferência

# Exemplo: Fatores R (resistência)



# Fatores R (resistência)

A



Canamicina

Ampicilina

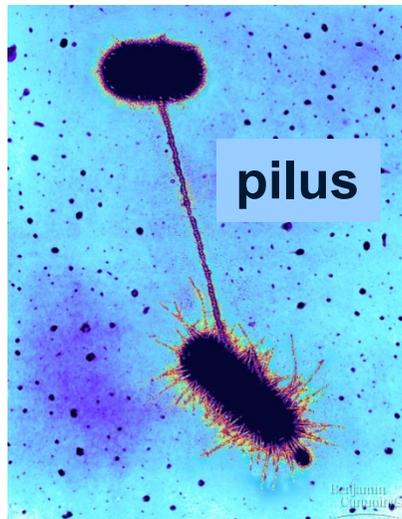
Sulfonilamida

Estreptomicina

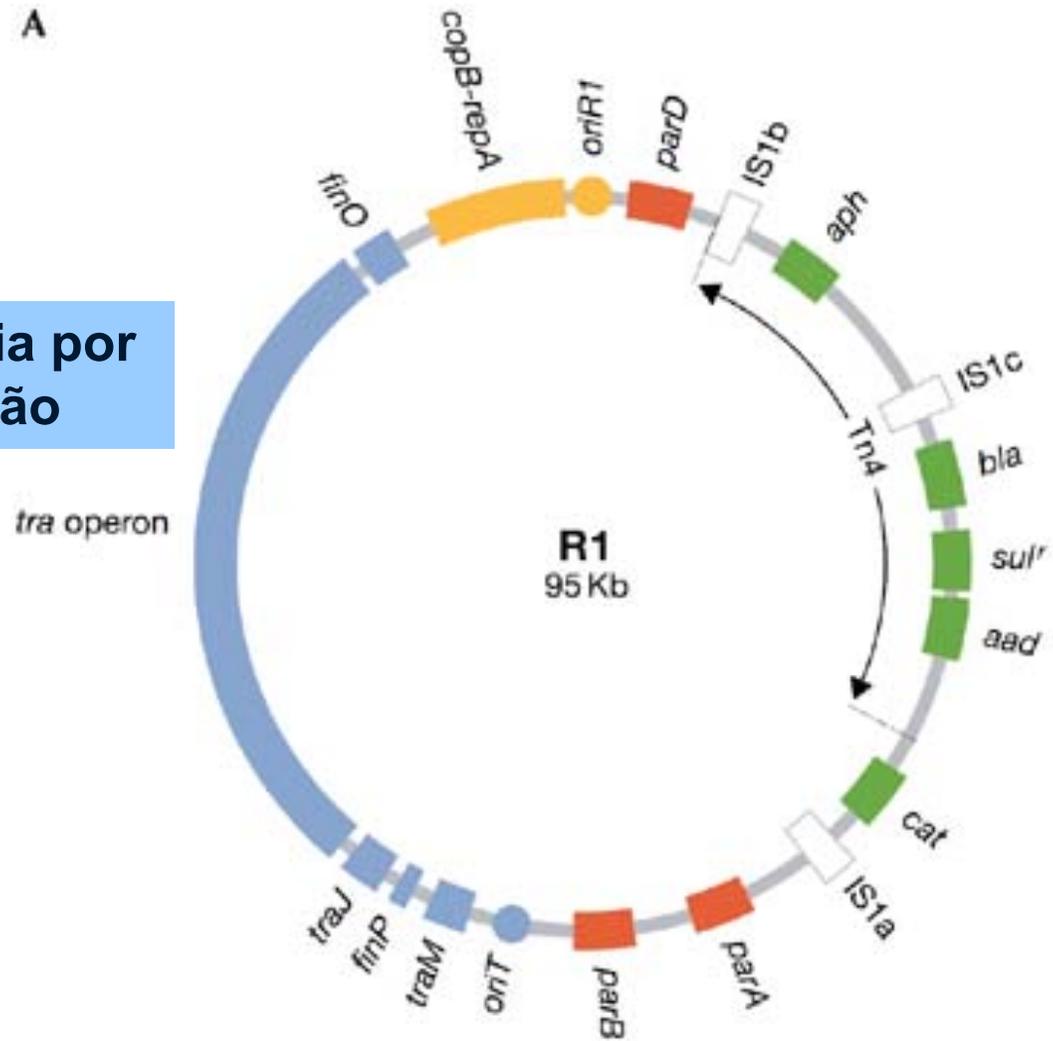
Cloranfenicol

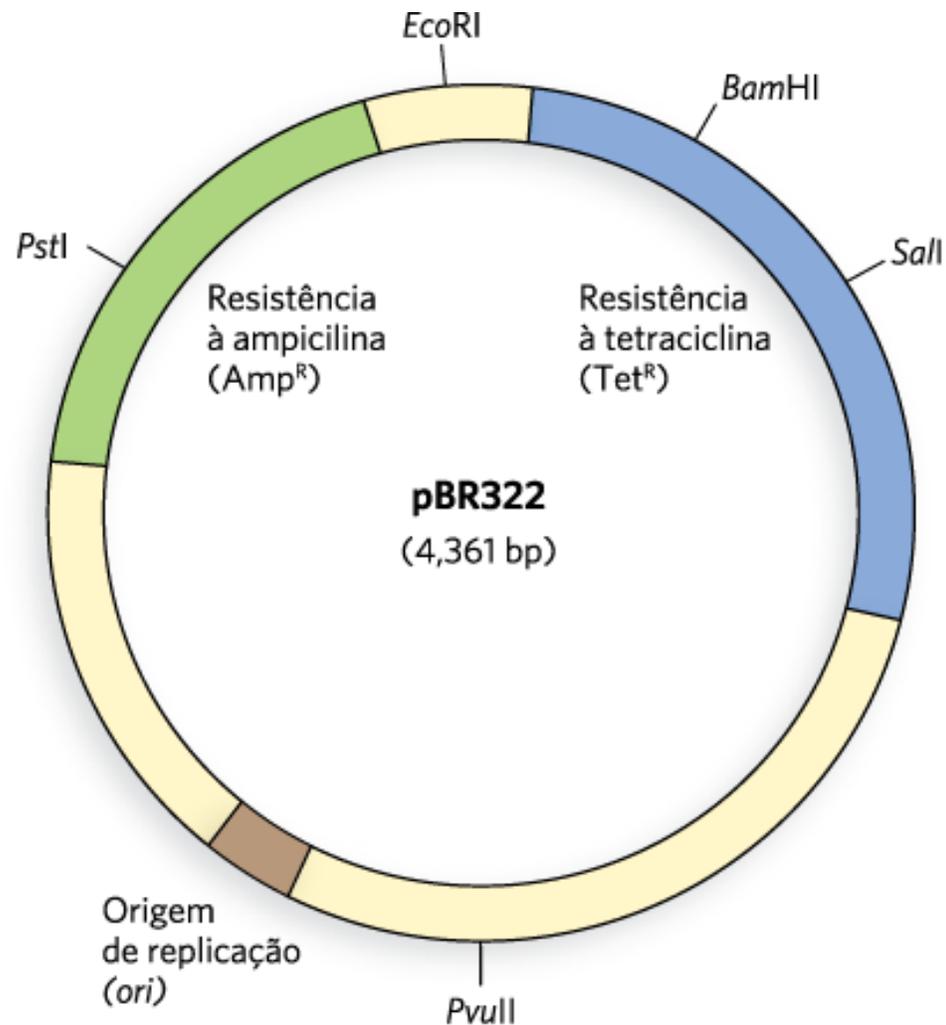
# Fatores R (resistência)

Transferência por  
conjugação



A





Plasmídeos são ferramentas importantes para a clonagem de fragmentos de DNA em laboratório e expressão de proteínas heterólogas

**FIGURA 7-4** O plasmídeo pBR322 construído, de *E. coli*. Esse plasmídeo, um dos primeiros a ser construído, foi particularmente desenhado para clonagem em *E. coli*. Veja o texto para detalhes.

# Como plasmídeos e outros elementos genéticos se movem?

transformação

Transformação

Genoma parcial transferido por captação do DNA

conjugação

Conjugação

Plasmídeos

Conjugação

Transferência de plasmídeos durante conjugação

cromossom

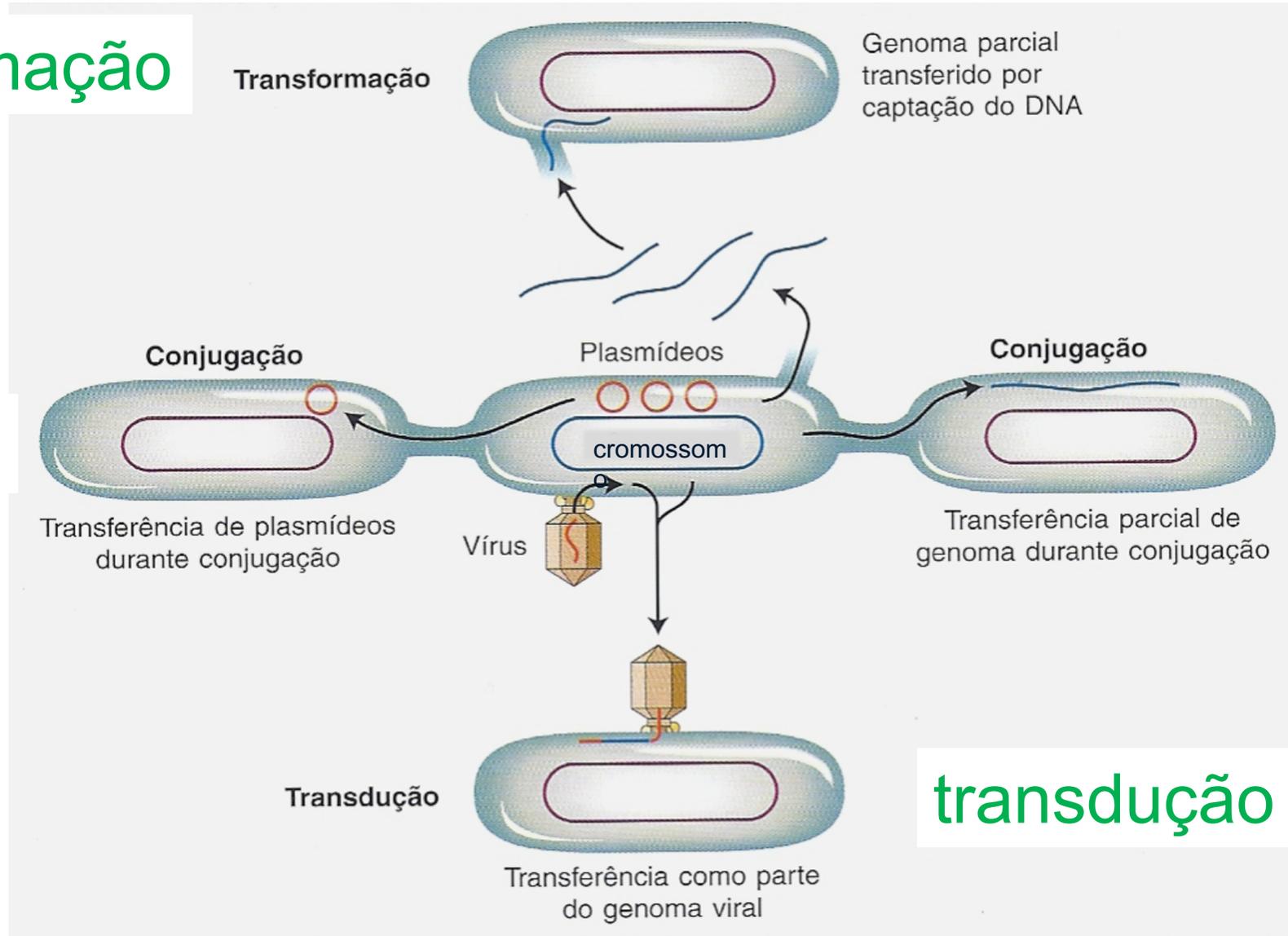
Transferência parcial de genoma durante conjugação

Vírus

Transdução

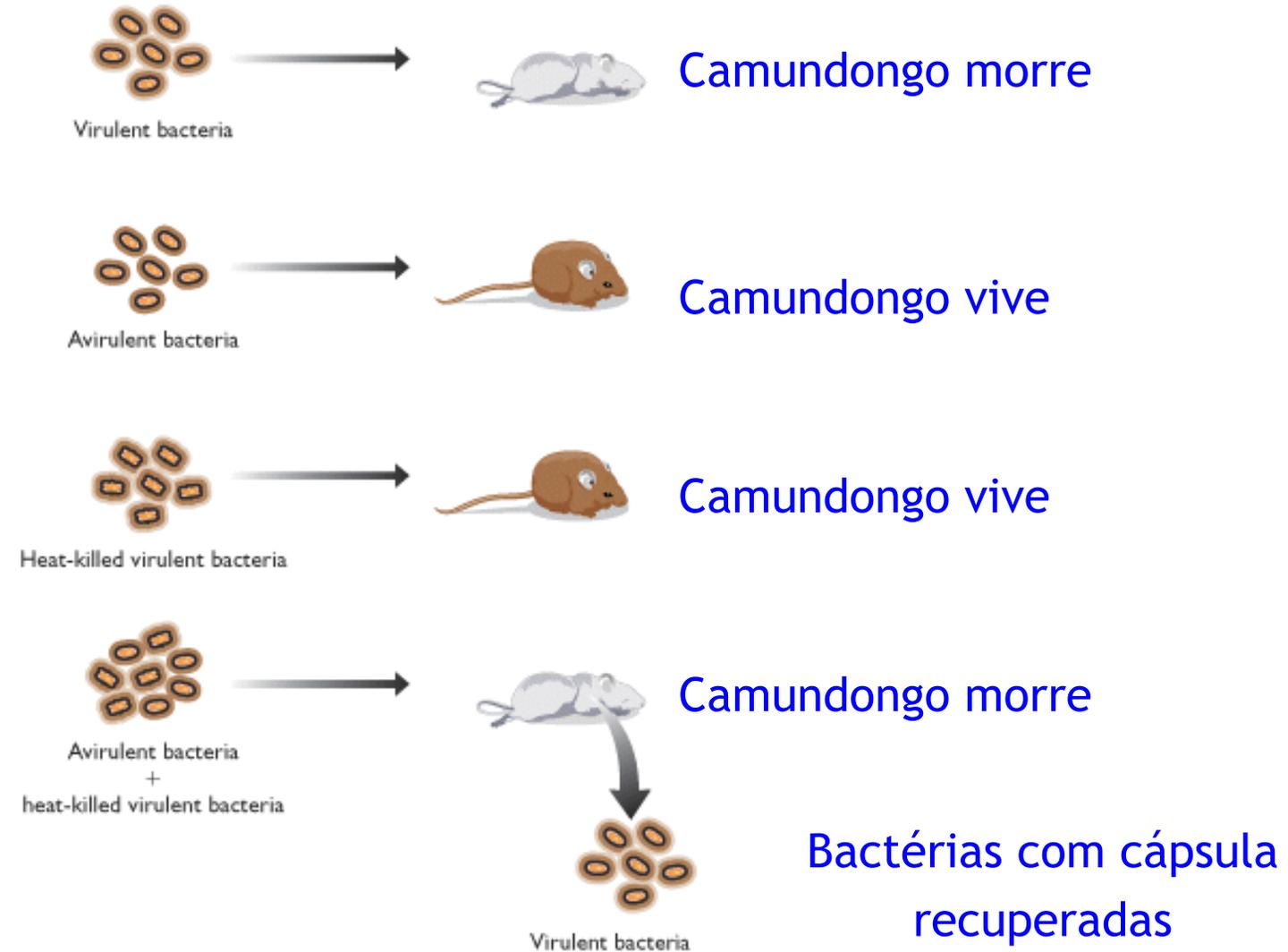
transdução

Transferência como parte do genoma viral

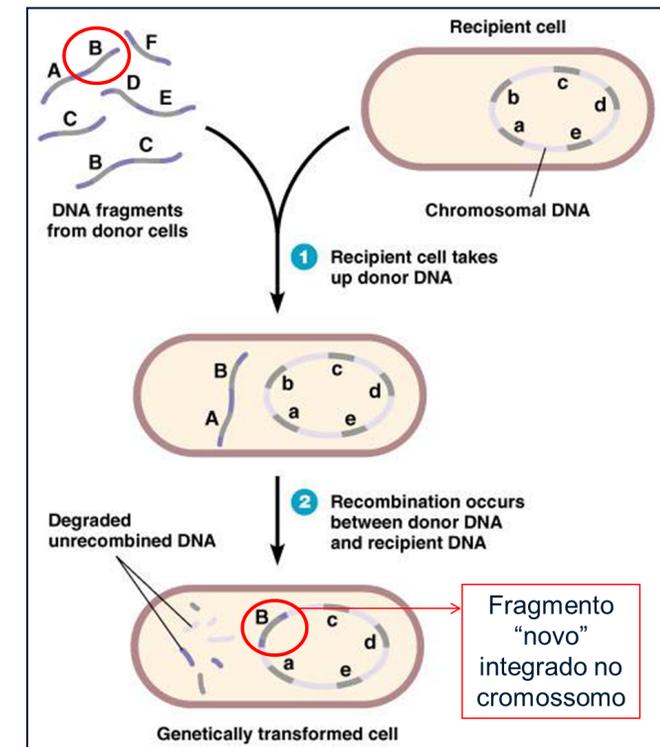
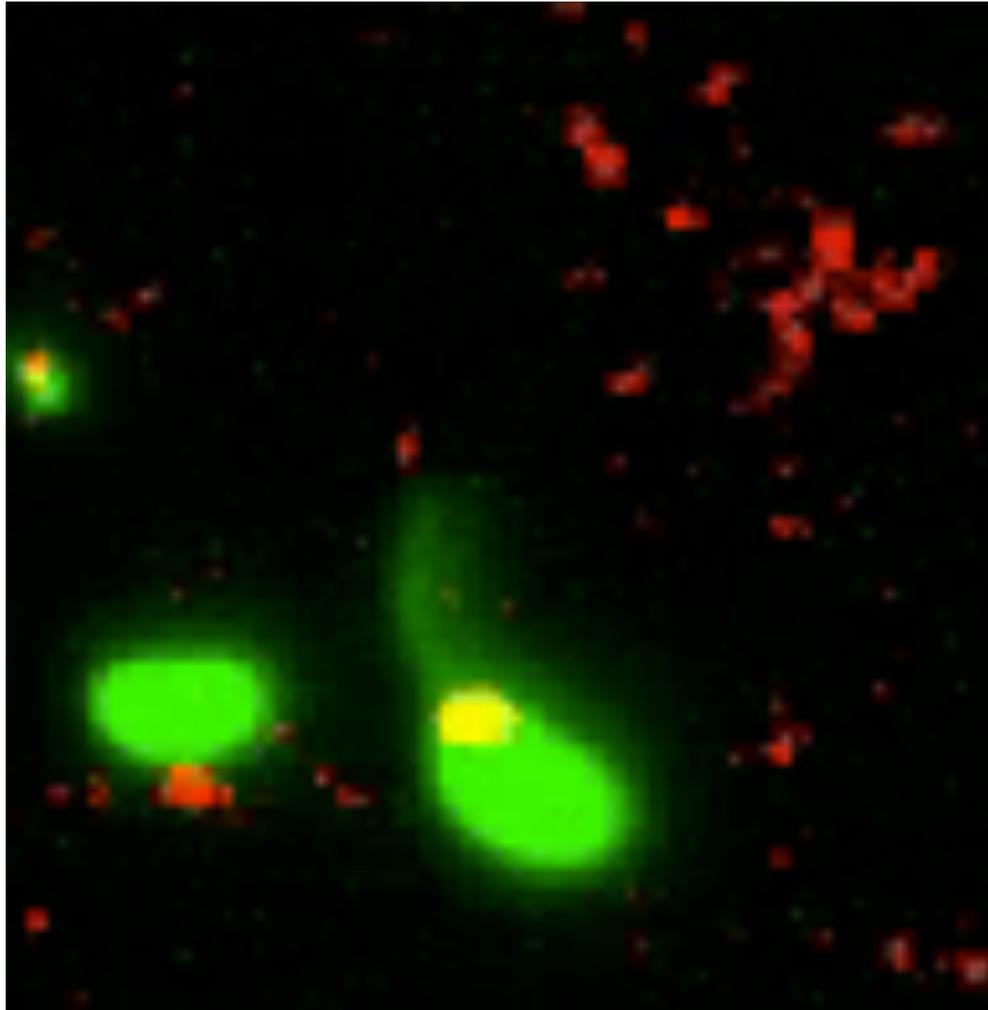


# Transformação por DNA

(B)

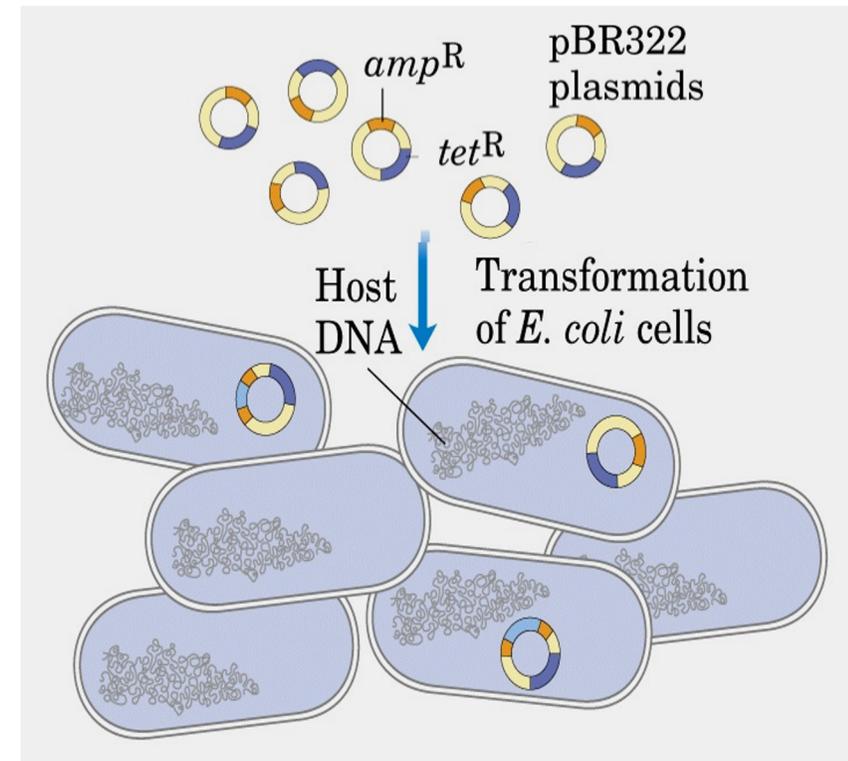


# Transformação natural requer aparato de tomada de DNA (pilus) do meio para o interior da célula



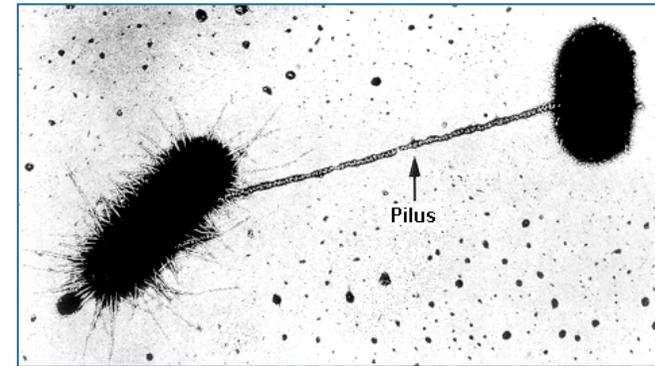
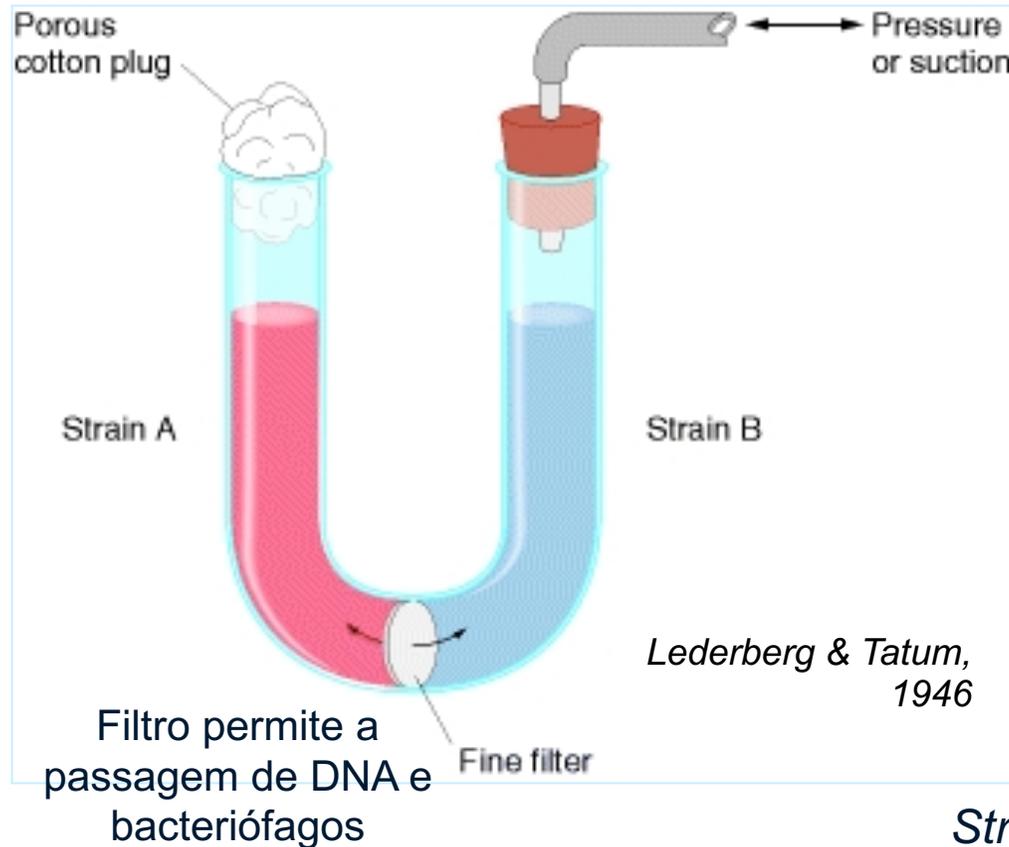
# Transformação de *E. coli* com plasmídeos

- *E. coli* é a bactéria usada para clonagem de DNA e expressão de proteínas recombinantes
- *E. coli* **não** é naturalmente competente para transformação
- Técnicas para induzir competência:
  - tratamento com sais e choque térmico
  - eletrotransformação

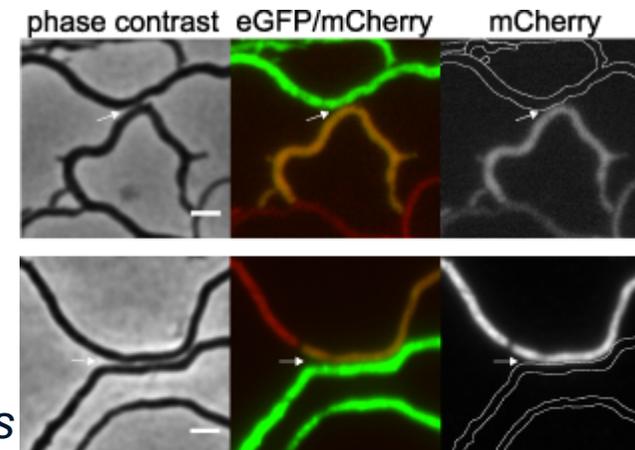


# Conjugação

- Contato celular é necessário
- Se as linhagens são separadas por um filtro, **não** há recombinantes:

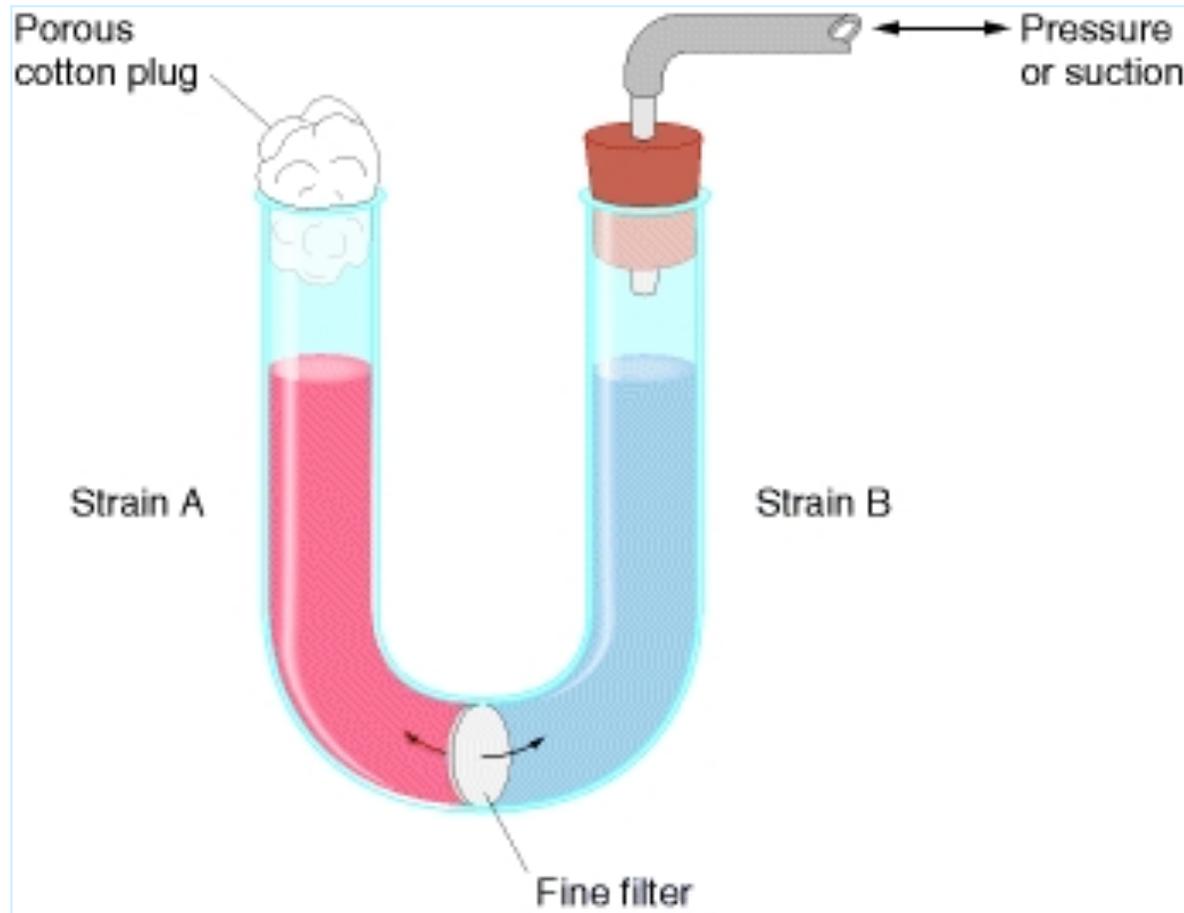


*E. coli*



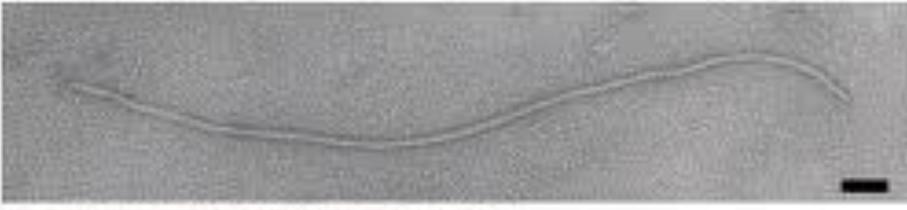
*Streptomyces*

# Transdução



- Recombinação genética entre bactérias que **dispensa o contato** entre as células
- Bacteriófagos (vírus de bactérias)

# Bacteriófagos



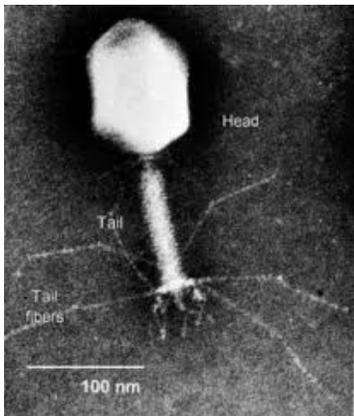
ZC467 – isolado da compostagem do Zoo de São Paulo, infecta *Pseudomonas aeruginosa*

Lab Profa Aline

- Vírus que infectam bactérias
- Muitas famílias diferentes
- 3-140 kb
- Ciclos de vida
  - Lítico – mata as bactérias → fagos virulentos
  - Lisogênico – DNA se integra no cromossomo → fagos temperados

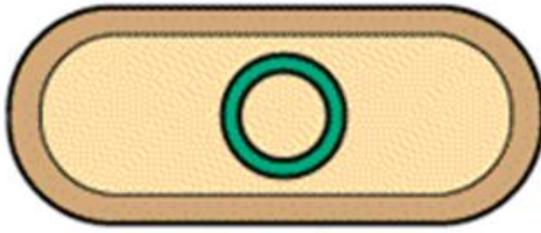


Uso como terapia contra infecções, como alternativa a antibióticos

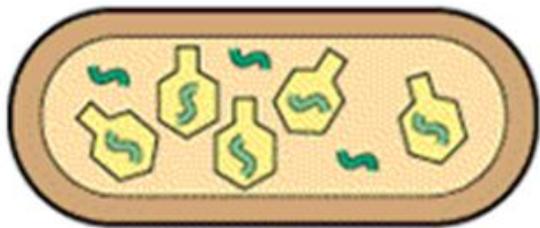


# Transdução

**Doadora**

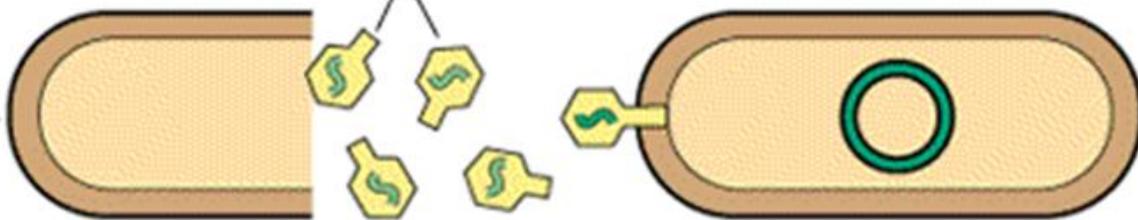


**Infecção com bacteriófago**



**Vírus ao se multiplicar pode carregar sequências do cromossomo bacteriano**

**Vírus infectam outra bactéria e transferem material genético**



- O DNA da bactéria é empacotado com o fago e transferido para outras células

# Mais um elemento genético móvel: Transposons

- Presentes em eucariotos e procariotos
- Segmentos de DNA com a capacidade de mudar de posição no genoma da mesma célula ou de células de espécies diferentes

Elementos saltadores





The Nobel Prize in Physiology or  
Medicine 1983

"for her discovery of mobile genetic elements"

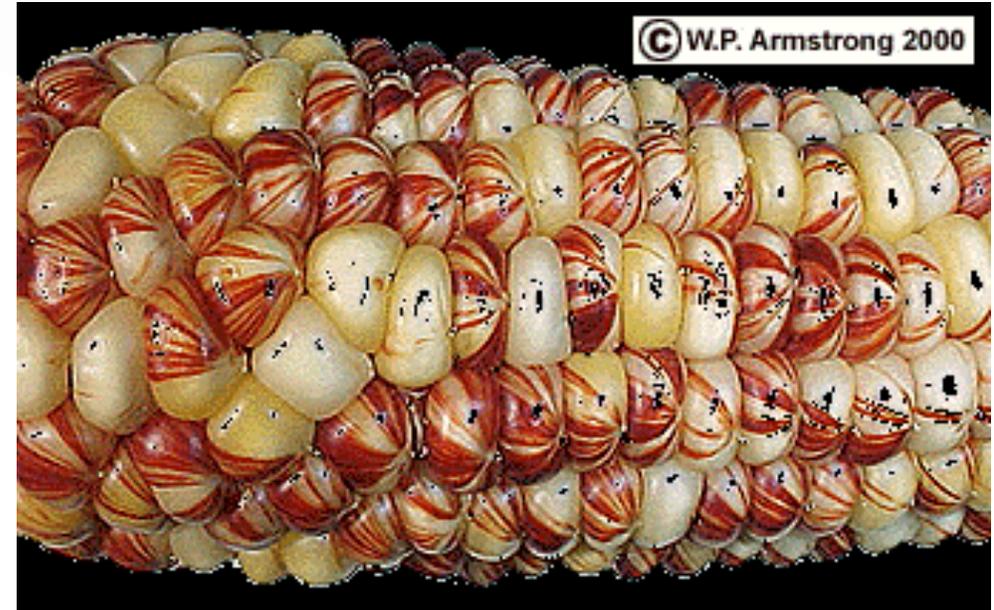


**Barbara McClintock**

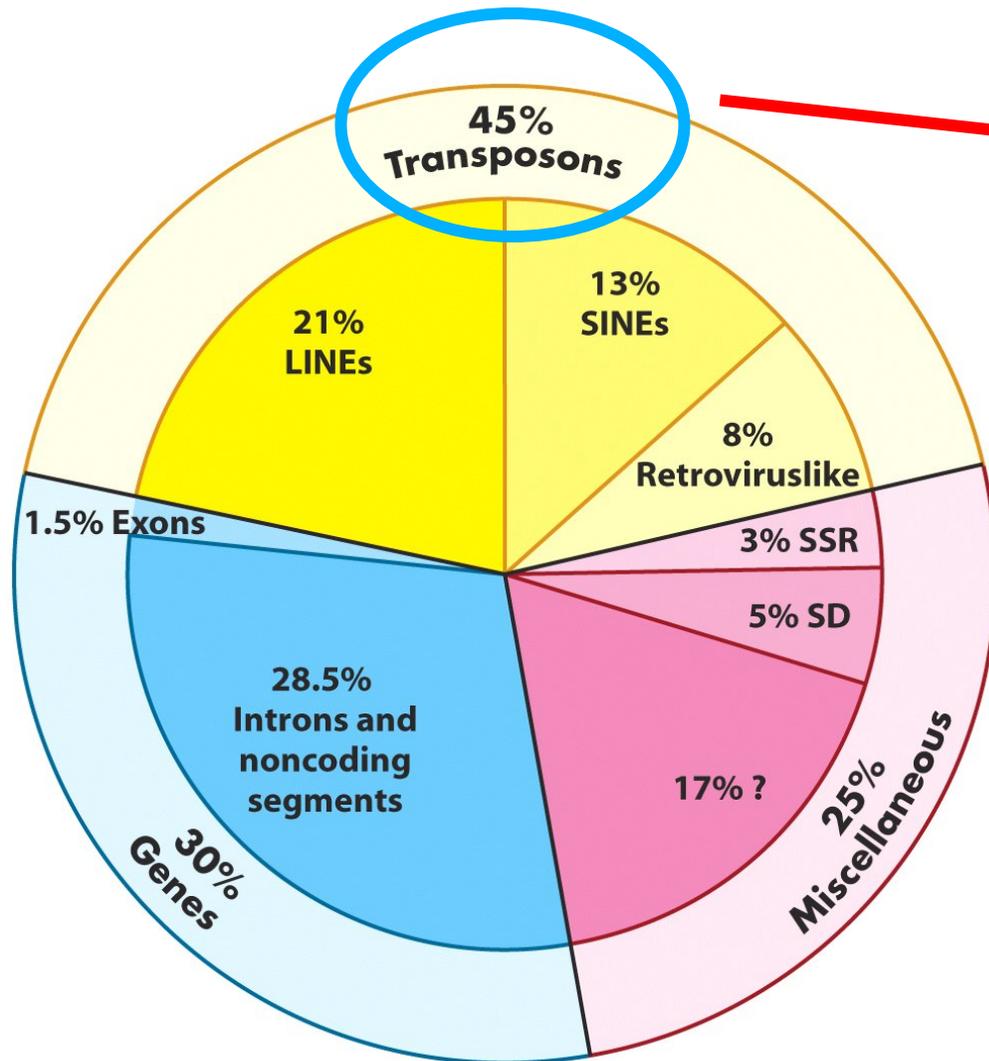
USA

Publicou o primeiro trabalho em 1951

# Transposons



# Transposons somam 45% do genoma humano



Transposons:

Elementos genéticos  
móveis: saltadores

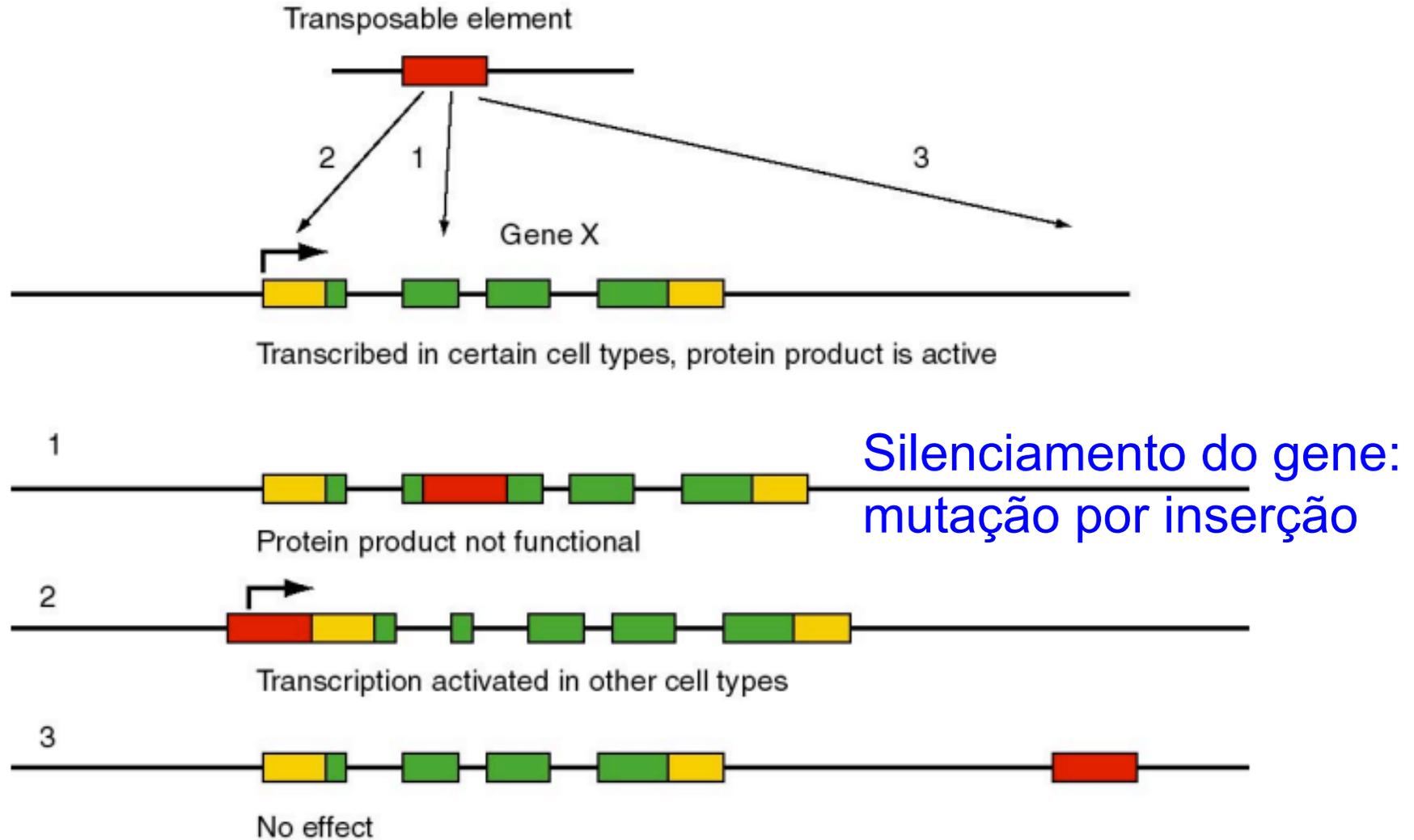
A transposição é  
considerada o  
terceiro tipo geral de  
recombinação.

# Transposons

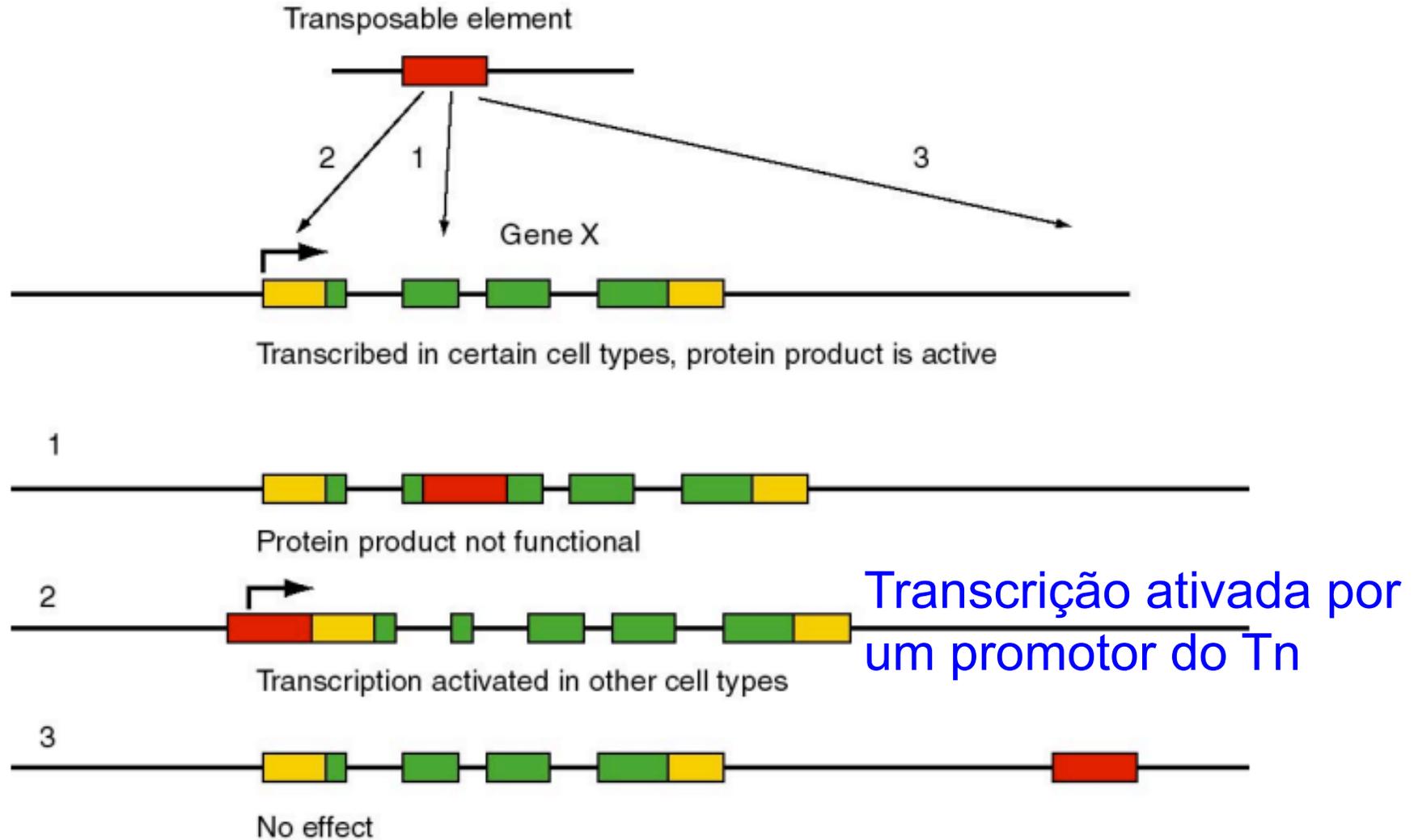
Transposição é considerada o terceiro tipo geral de recombinação.

- Transposição permite o movimento dos transposons no genoma.
- Transposons são encontrados em todas as células.
- Esses segmentos de DNA “saltam” de um sítio doador no DNA para um sítio alvo
- Homologia não é necessária, sendo a nova localização determinada aleatoriamente.

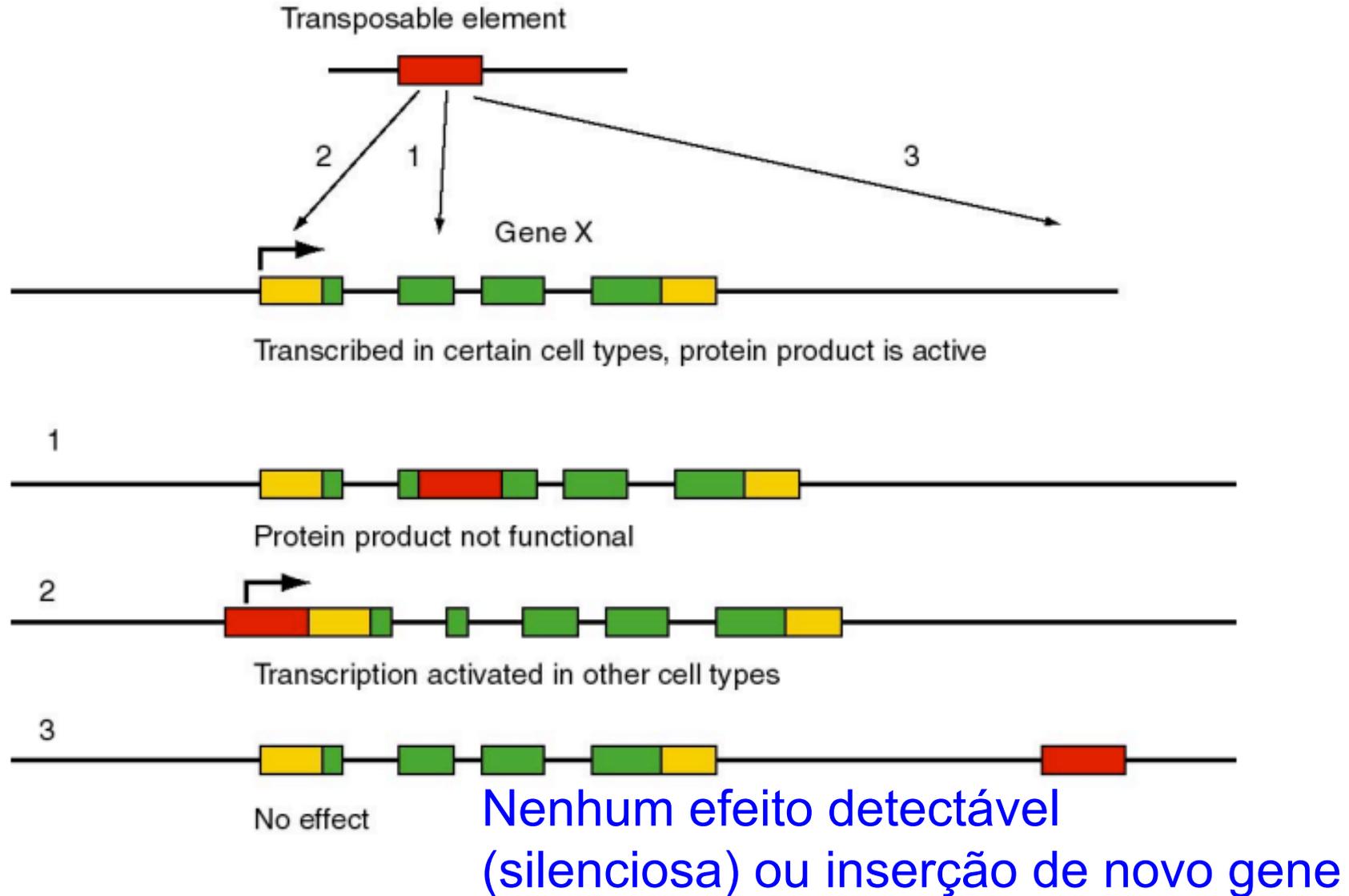
# Efeitos da transposição



# Efeitos da transposição

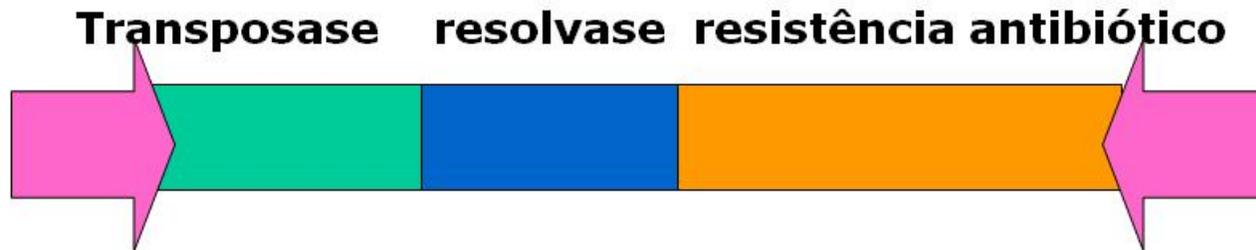
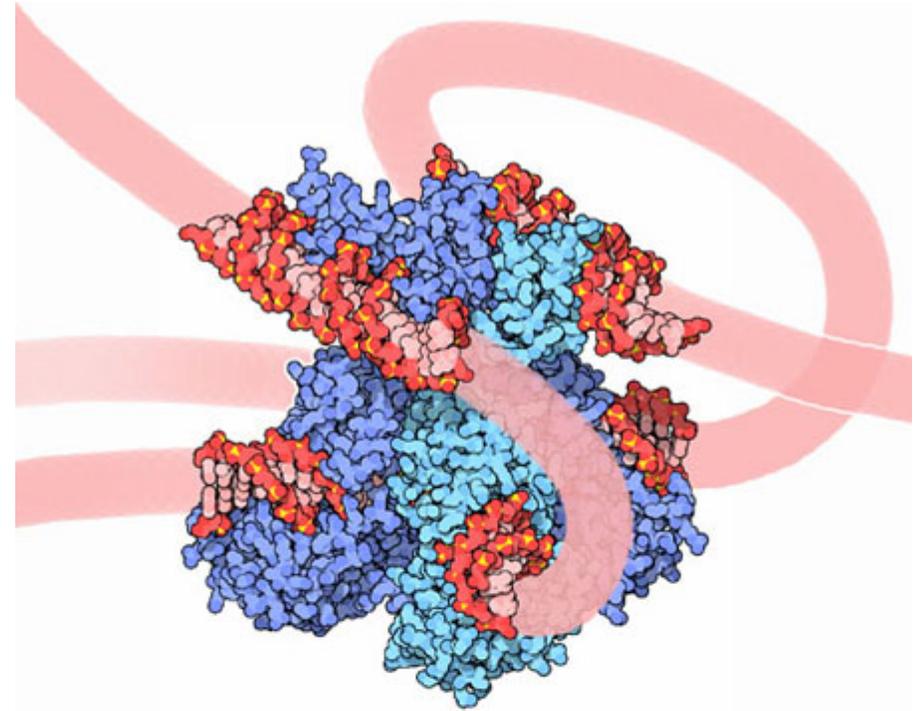


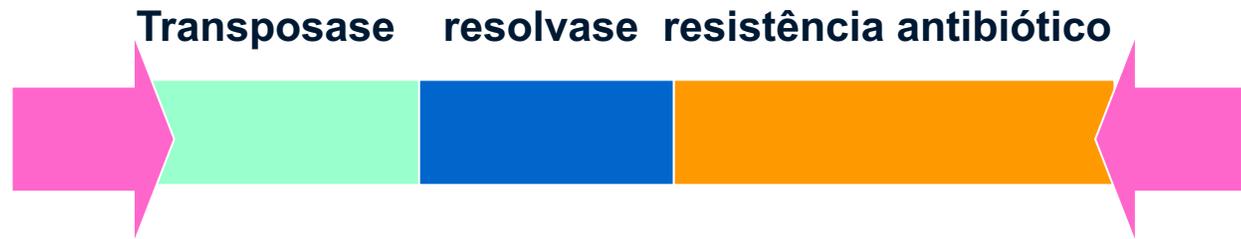
# Efeitos da transposição



# Transposase

- enzima que faz o corte e religação do Tn no DNA-alvo





**transposon**

**Podem transportar genes de resistência a antibióticos**

**Tn1, Tn3**



**Ampicilina**

**Tn7**



**Estreptomicina**

**Tn5**



**Canamicina**

**Tn9**



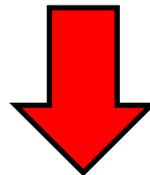
**Cloranfenicol**

**Tn10**

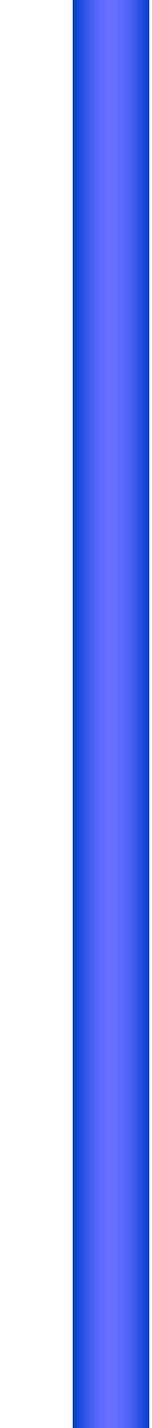
**tetraciclina**

# Elementos genéticos móveis

- **Plasmídeo**: Tamanho variável, dupla-fita, usualmente circular
- **Bacteriófago e vírus de eucariotos**: DNA fita simples ou dupla-fita
- **Transposon**: Segmento de DNA, inserido no cromossomo ou num plasmídeo e que pode saltar de um local para outro

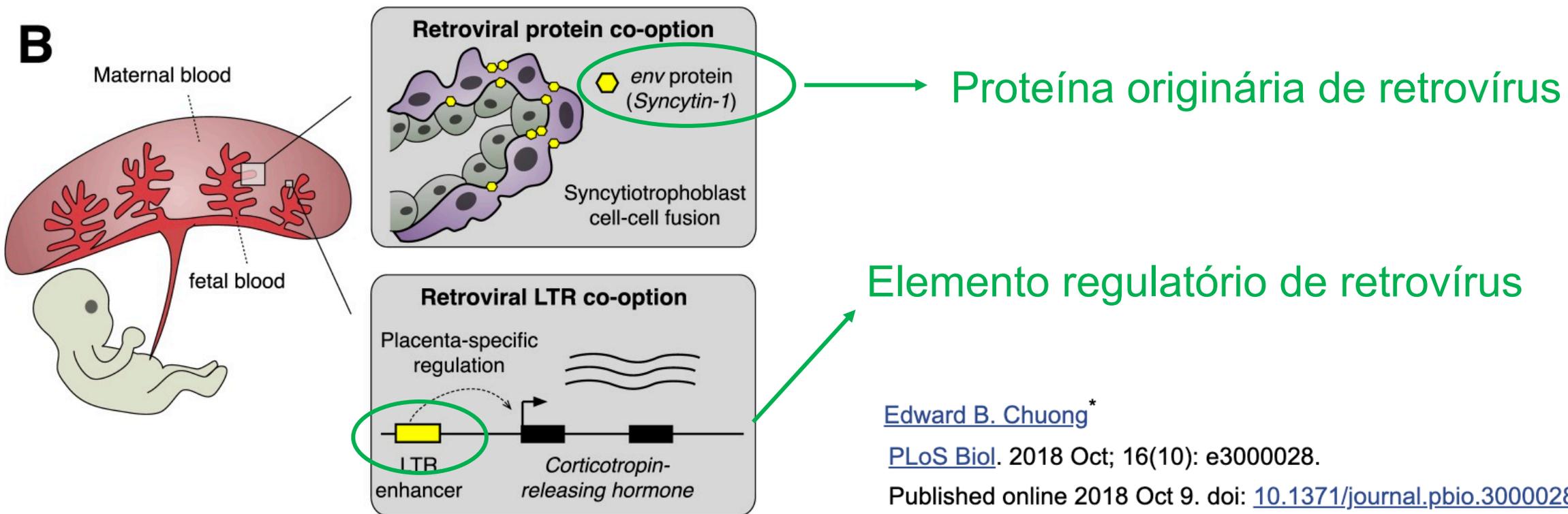


**Mediadores da transferência genética horizontal (HGT)**



# Exemplos de genes humanos adquiridos por transferência horizontal

# Elementos de retrovirus permitiram o surgimento da placenta ao longo da evolução dos animais



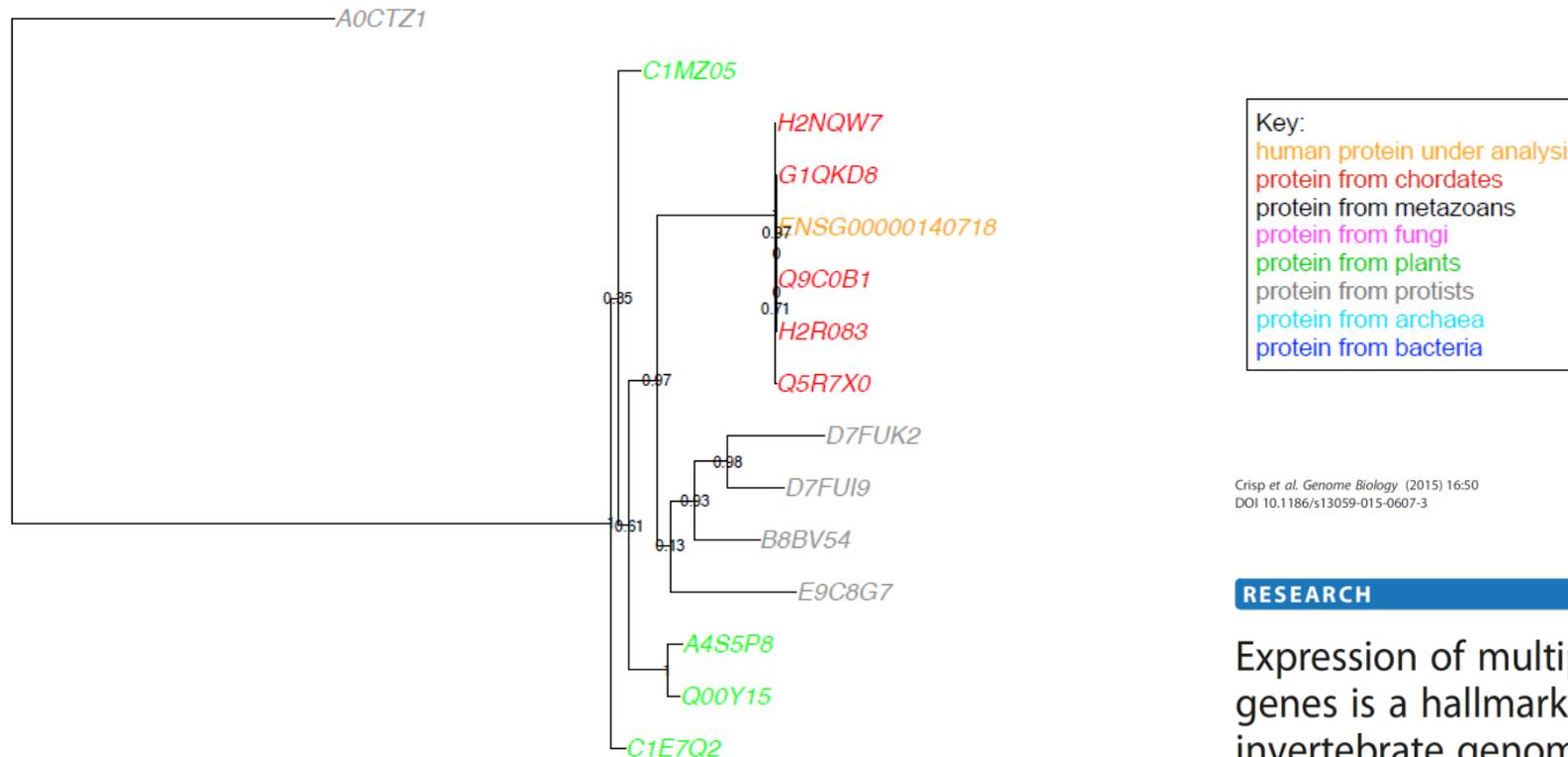
Edward B. Chuong\*

PLoS Biol. 2018 Oct; 16(10): e3000028.

Published online 2018 Oct 9. doi: [10.1371/journal.pbio.3000028](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000028)

# Gene associado a obesidade está presente em algas e vertebrados

Figure S1A. FTO, fat mass and obesity associated gene (ENSG00000140718)



Crisp *et al. Genome Biology* (2015) 16:50  
DOI 10.1186/s13059-015-0607-3



RESEARCH

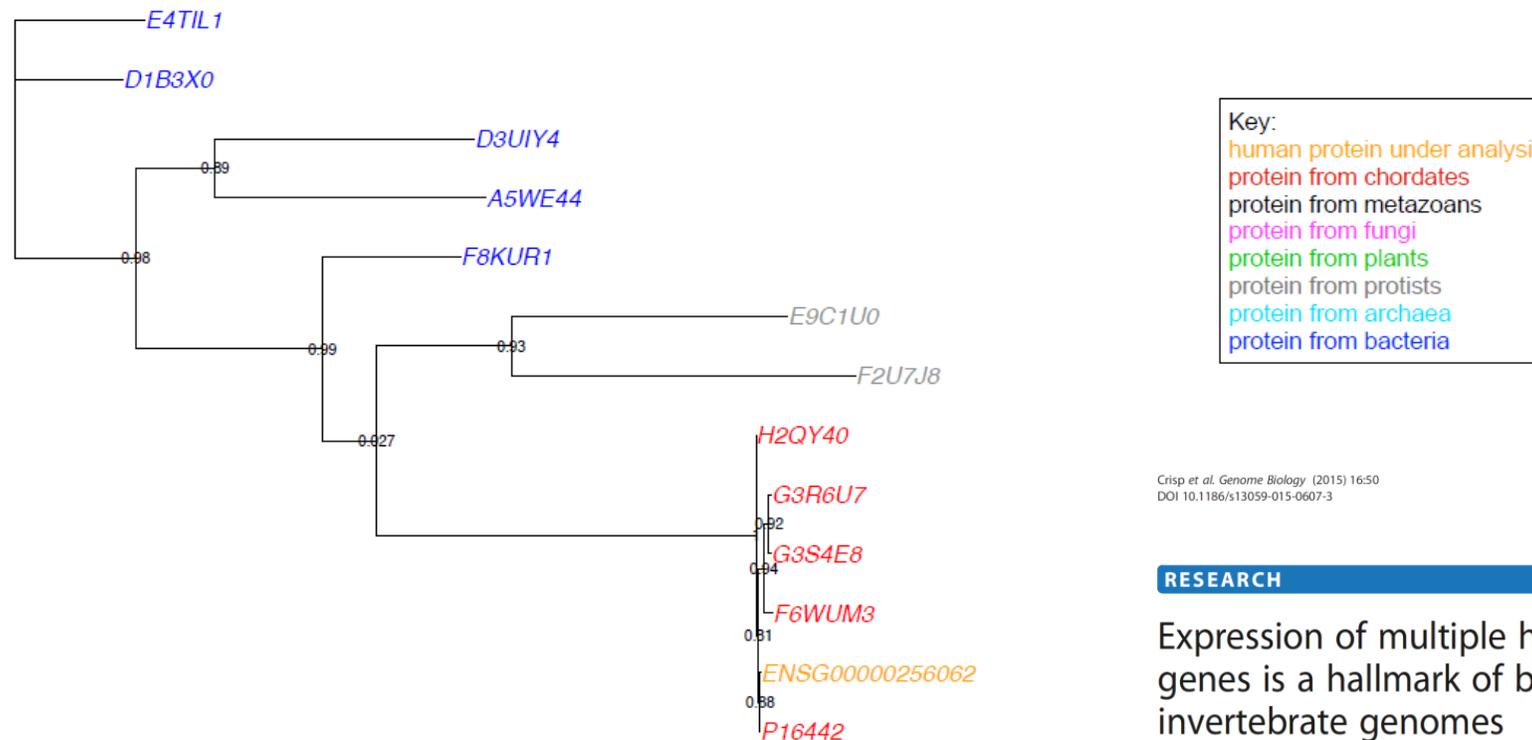
Open Access

Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes

Alastair Crisp<sup>1†</sup>, Chiara Boschetti<sup>1†</sup>, Malcolm Perry<sup>1,2,3</sup>, Alan Tunnacliffe<sup>1\*</sup> and Gos Micklem<sup>2,3\*</sup>

# Proteína do sistema ABO está presente em bactérias e vertebrados

Figure S1B. ABO, transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase; transferase B, alpha 1-3-galactosyltransferase (ENSG00000256062)



Crisp et al. *Genome Biology* (2015) 16:50  
DOI 10.1186/s13059-015-0607-3



RESEARCH

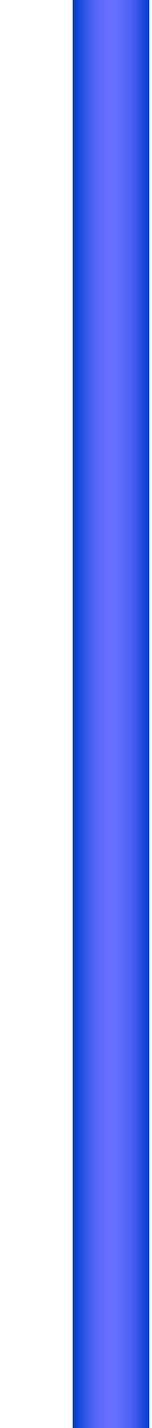
Open Access

Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes

Alastair Crisp<sup>1†</sup>, Chiara Boschetti<sup>1†</sup>, Malcolm Perry<sup>1,2,3</sup>, Alan Tunnacliffe<sup>1\*</sup> and Gos Micklem<sup>2,3\*</sup>

# Questões ainda a responder!

- Como os genes foram transferidos entre organismos filogeneticamente distantes?
- Esses eventos de HGT ainda acontecem em humanos?
- O conhecimento dos mecanismos moleculares de HGT podem gerar técnicas para terapias genéticas ou celulares?

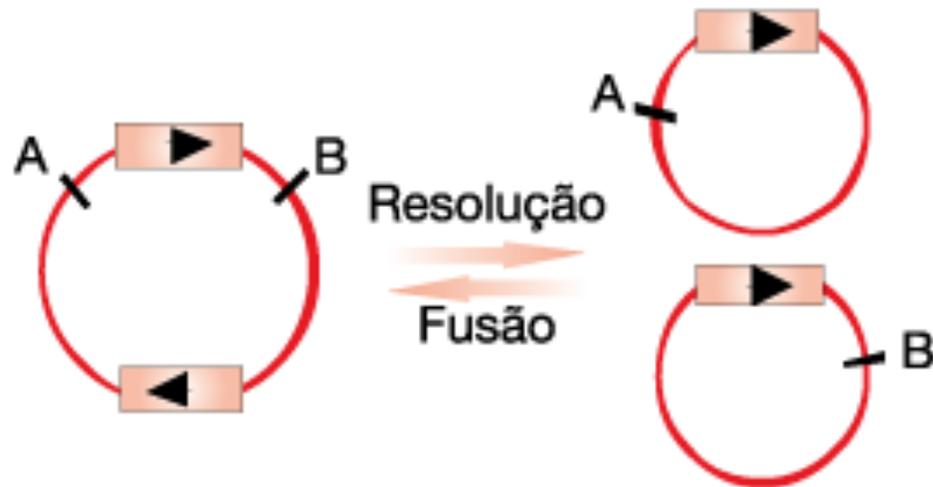


Material extra

# Animação com massinha

- Homologous Recombination & Holliday Junctions (eucarioto)
  - <https://www.youtube.com/watch?v=3qgBKrAZCLg>

# Recombinação sítio-específica



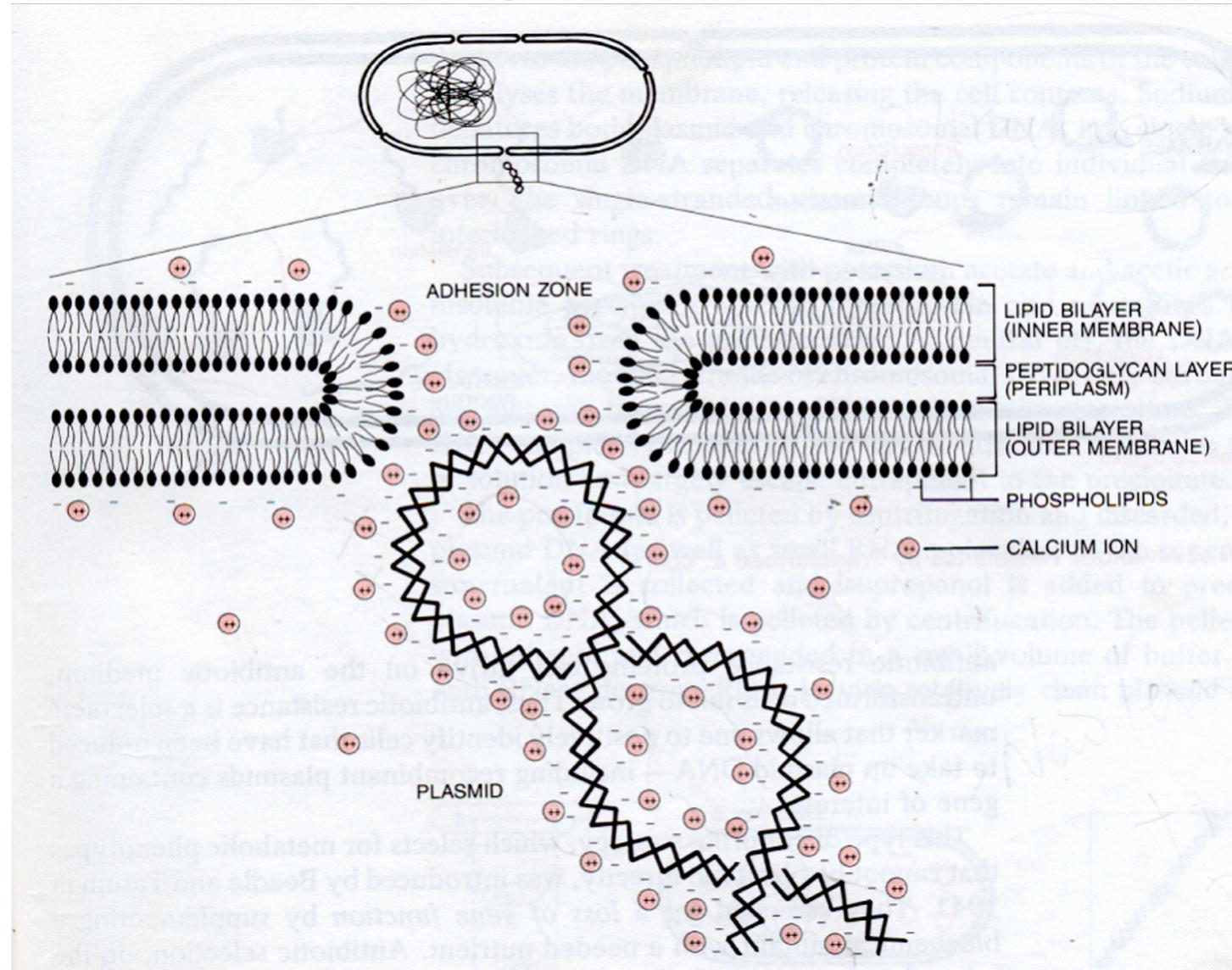
- Pode gerar
  - incorporação de DNA
  - deleções
  - inversões



# Como plasmídeos e outros elementos genéticos se movem?

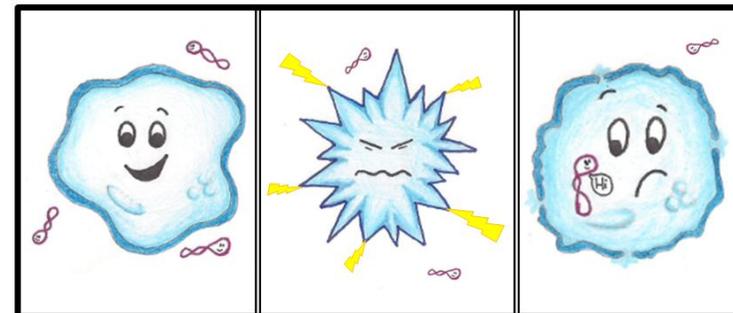
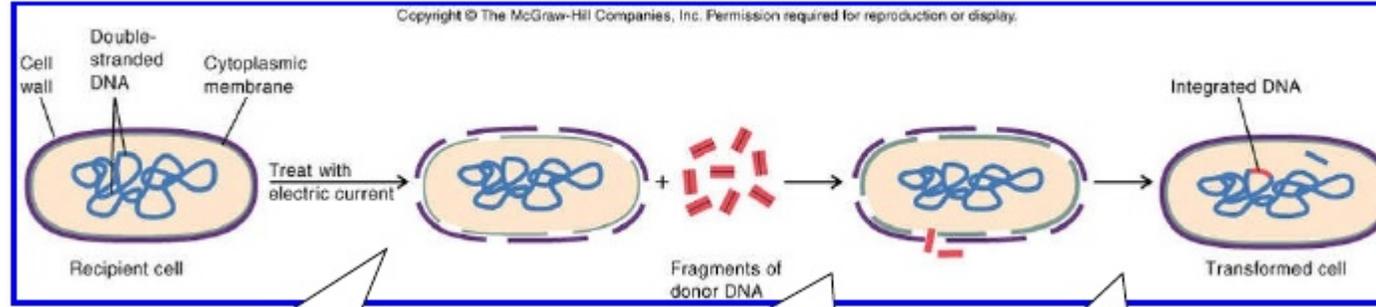
- **Transformação** de bactérias por DNA
  - Griffiths, 1928
  - Avery, MacLeod & McCarty, 1944
- **Conjugação**
  - Lederberg e Tatum, 1946
- **Transdução** por bacteriófagos
  - Lederberg e Zinder, 1951
- **Transposição**
  - Barbara McClintock, 1951

# Transformação de bactérias induzida por choque térmico



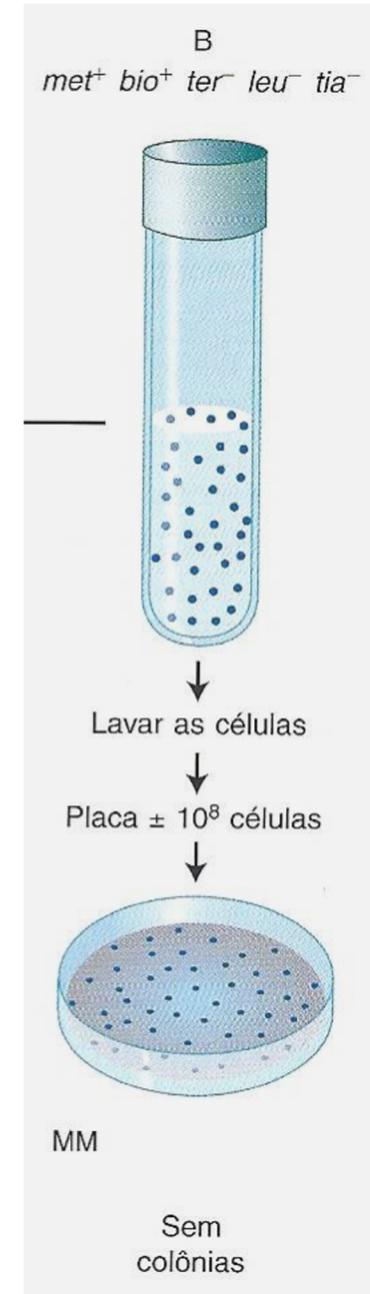
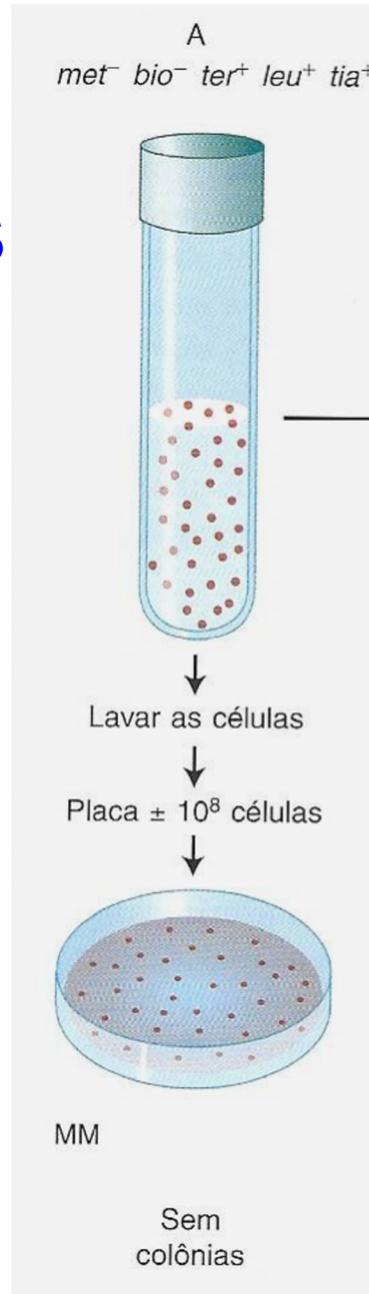
# Eletrotransformação

- Poros na membrana são induzidos por uma corrente elétrica



# Recombinação entre genótipos bacterianos

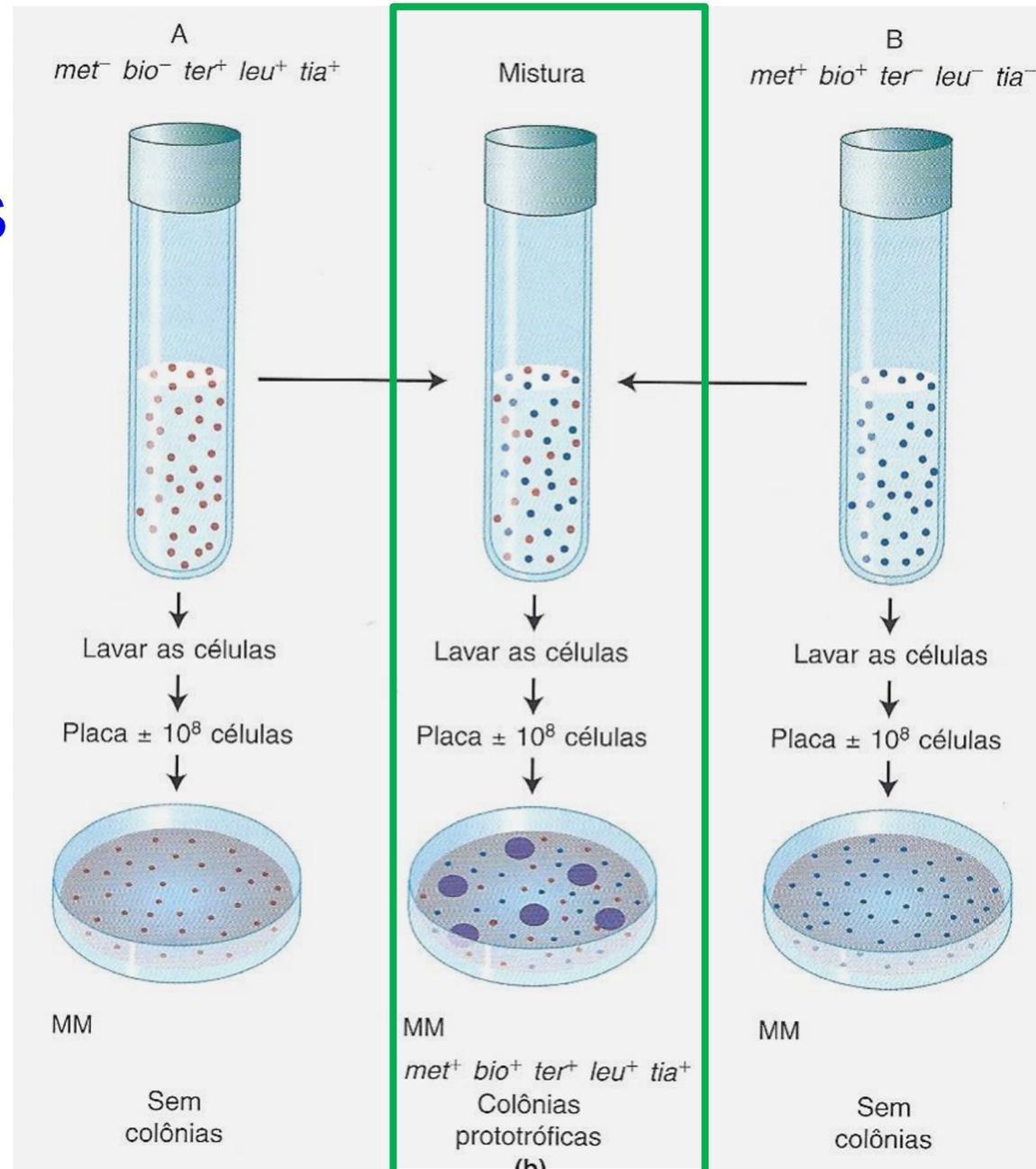
Lederberg & Tatum,  
1946



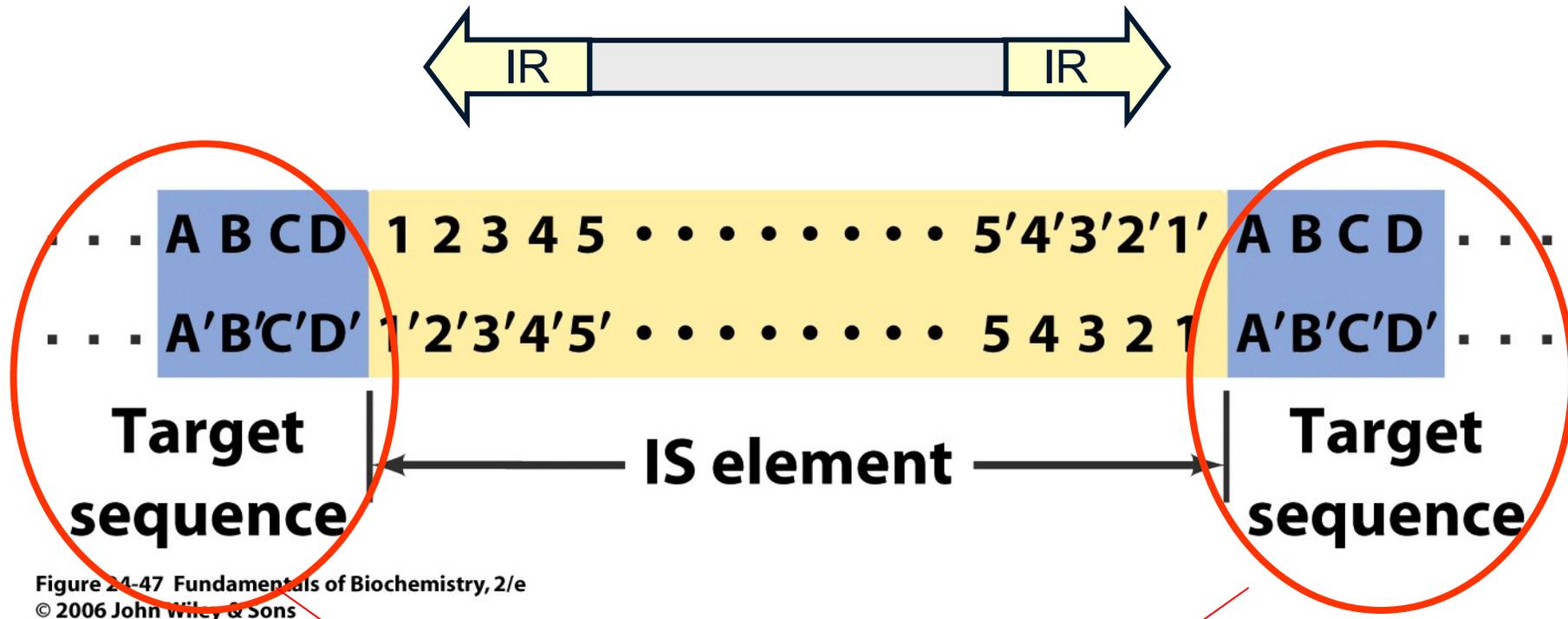
# Recombinação entre genótipos bacterianos

Lederberg & Tatum, 1946

“mistura” de linhagens auxotróficas se recombina para originar linhagem prototrófica

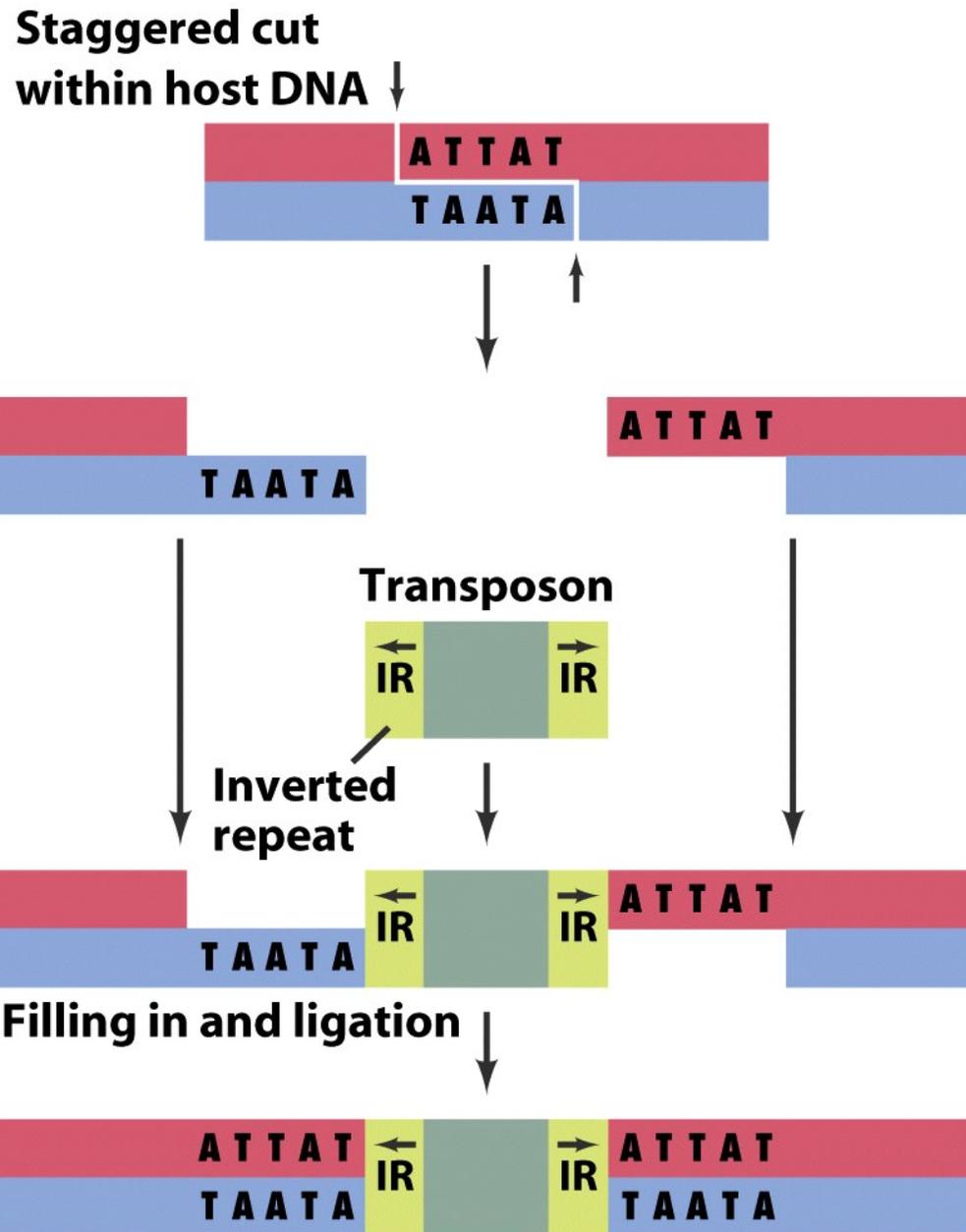


# Sequências de Inserção (IS) presentes nos transposons



Sequências-alvo são duplicadas na transposição

# Sequências-alvo são duplicadas na transposição



1. DNA é quebrado nas duas fitas, em sítios distintos
2. Tn se insere
3. Regiões de fita simples são preenchidas, resultando na duplicação

# Transposon Tn3

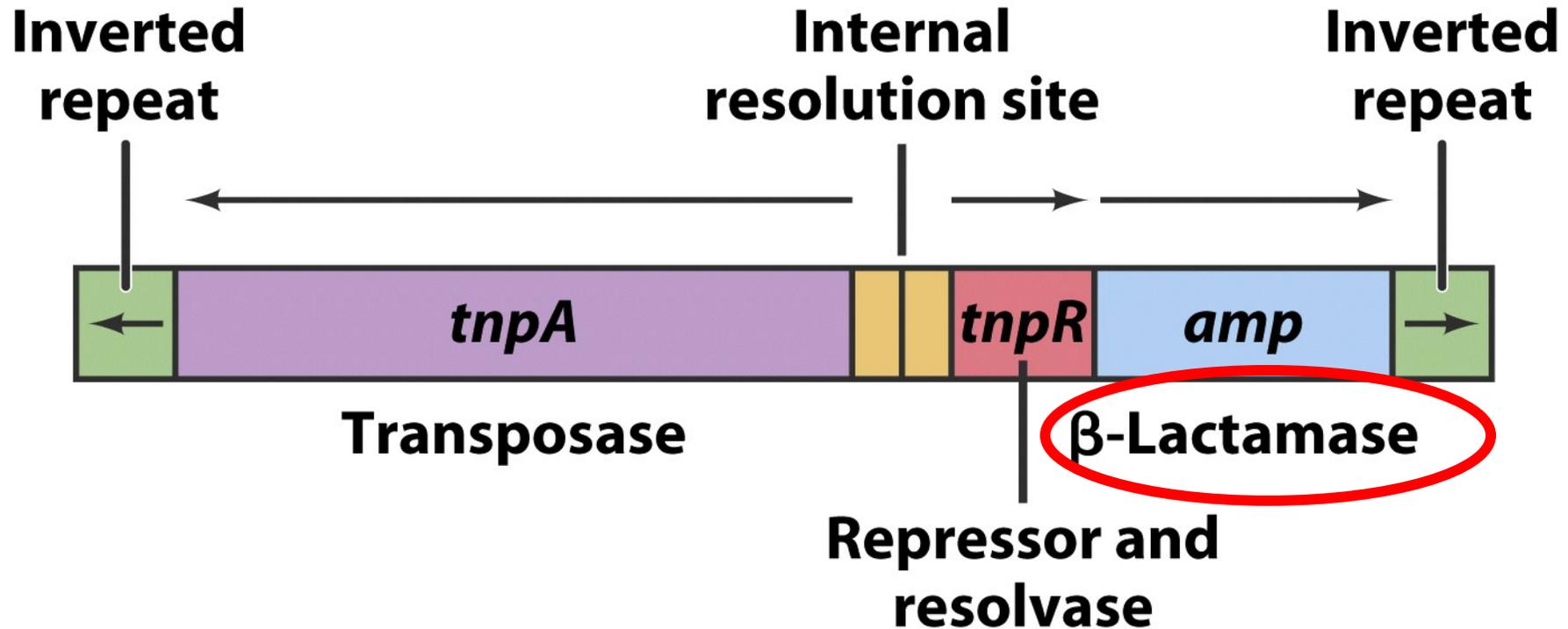


Figure 24-49 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

Transposons podem carregar genes de resistência a antibióticos

# Vias gerais de transposição

- **Direta** ou simples
  - Tn salta de um local para outro
  - “cortar e colar”
- **Replicativa**
  - Tn salta para outro local, mas deixa cópia no local de origem
  - “copiar e colar”
- **Retrotransposição**
  - Intermediário de RNA

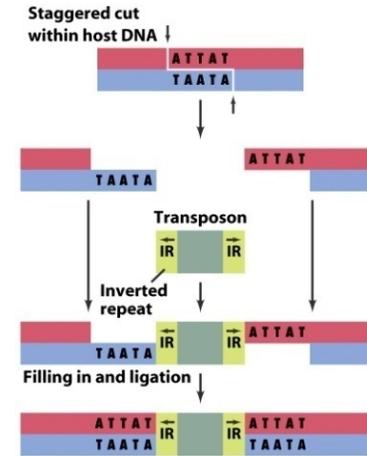
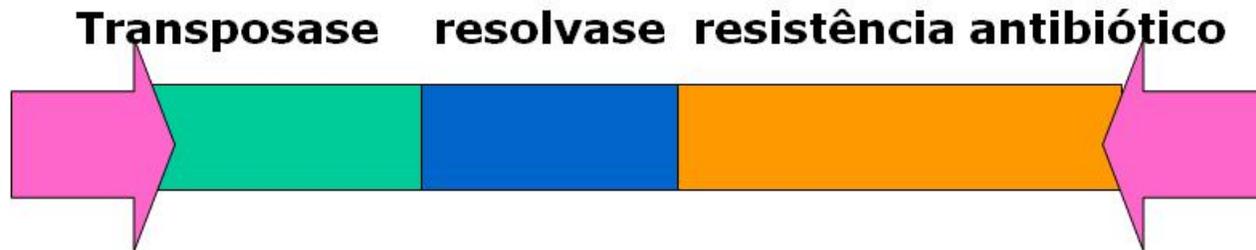
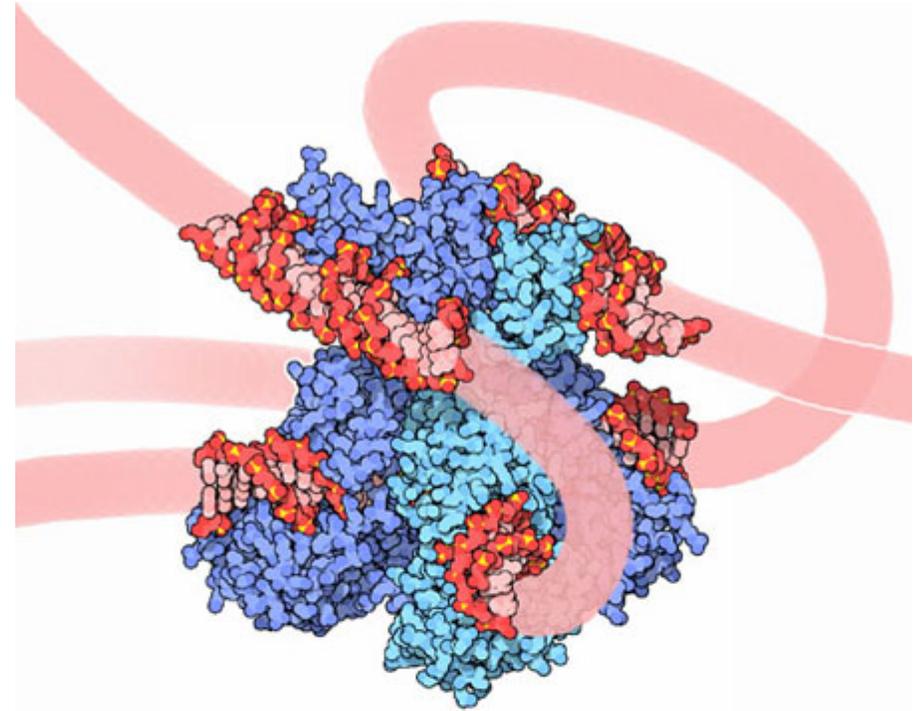


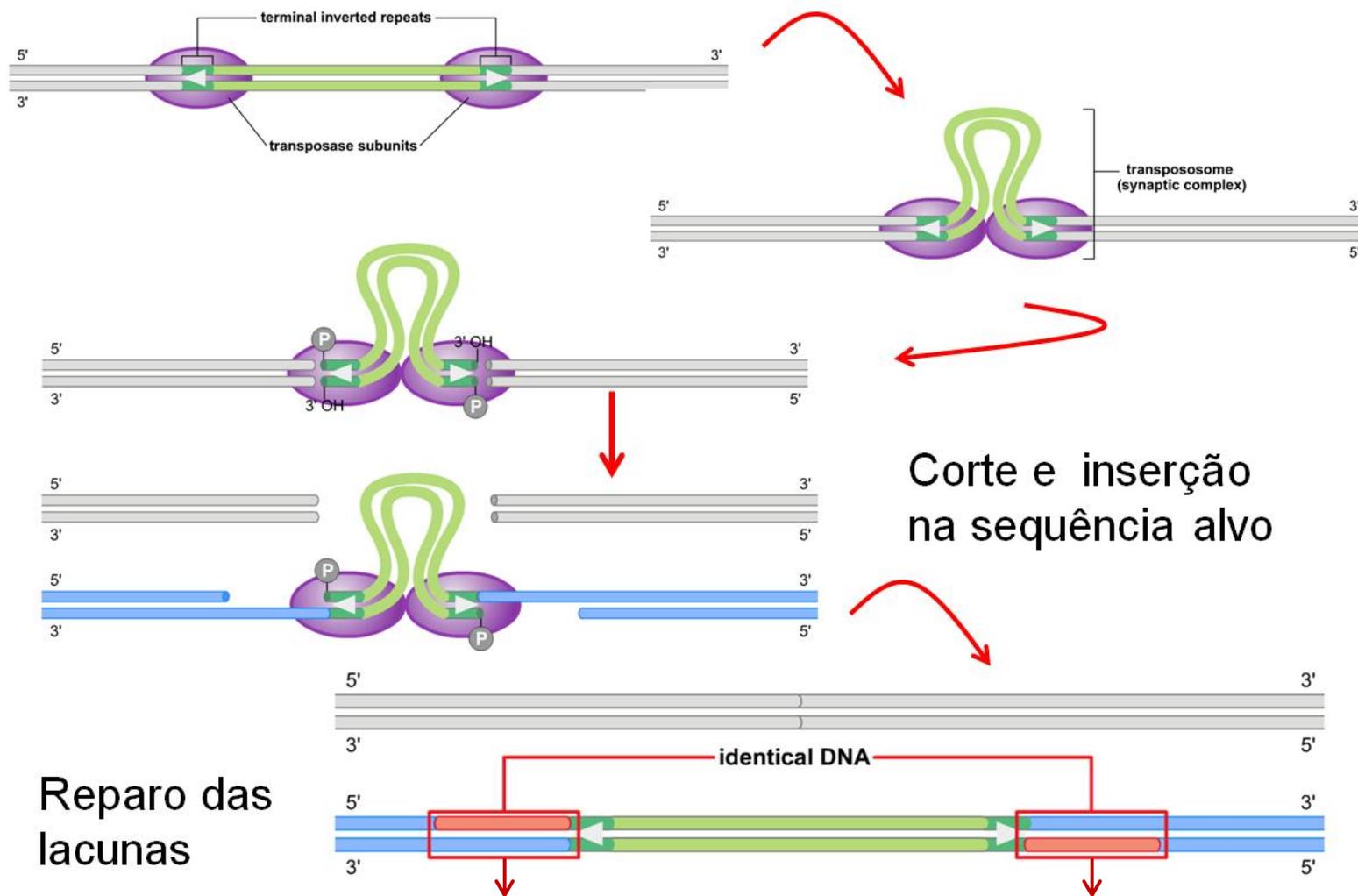
Figure 24-48 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Transposase

- enzima que faz o corte e religação do Tn no DNA-alvo

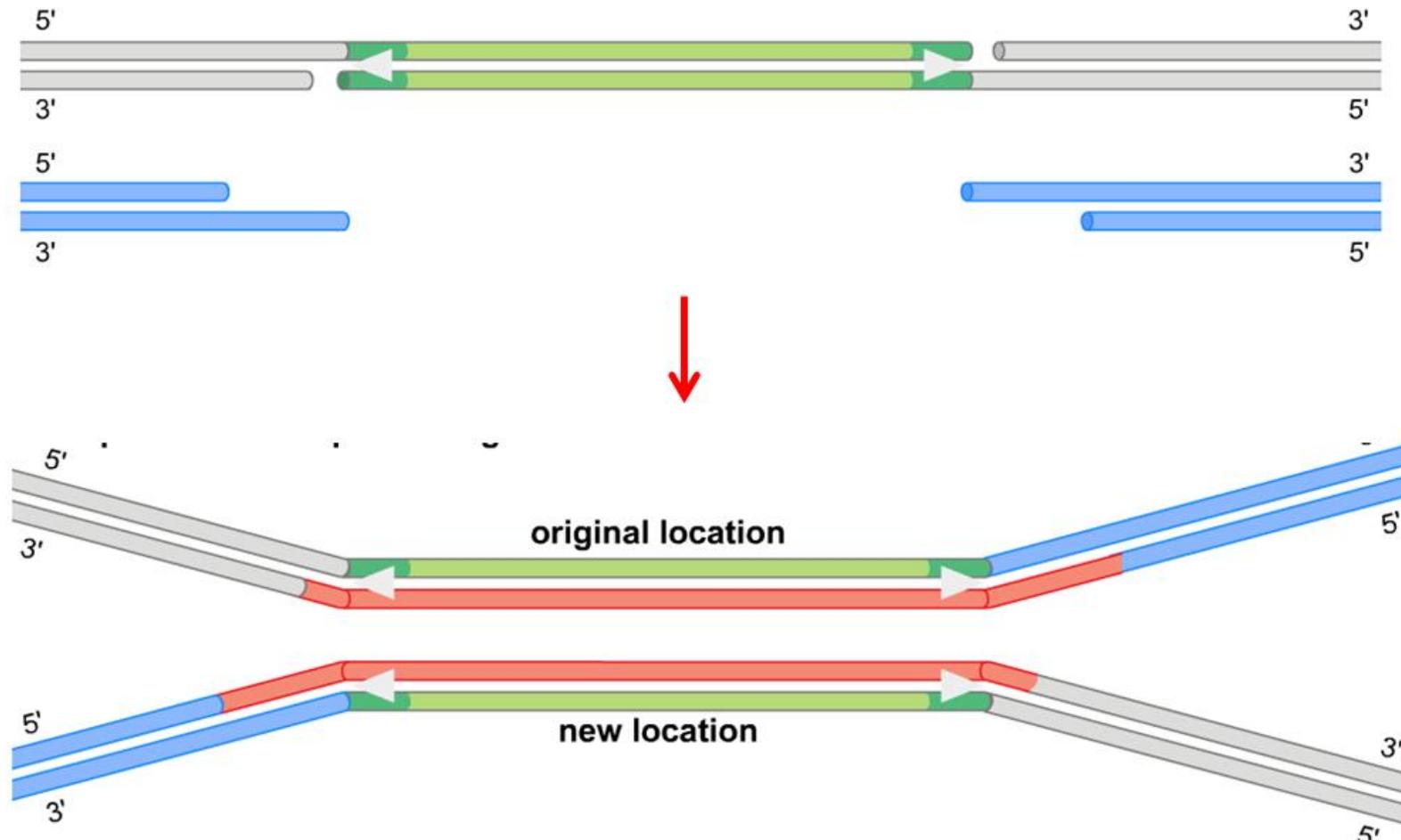


# Via direta: corte e colagem sequências-alvo são duplicadas



Duplicação da sequência-alvo como uma “cicatriz” da transposição

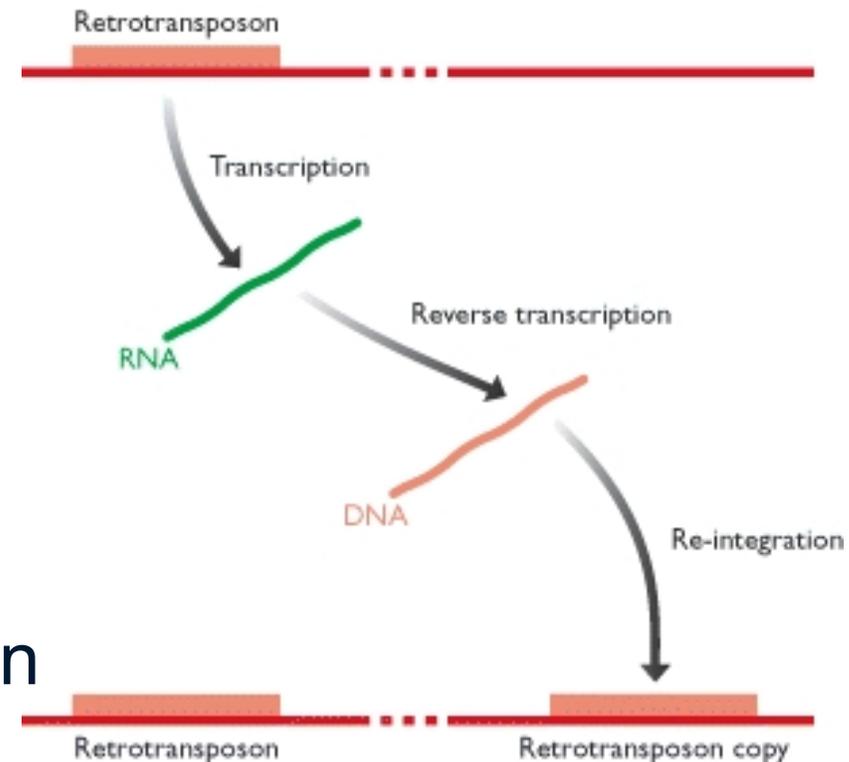
# Via replicativa: copiar e colar



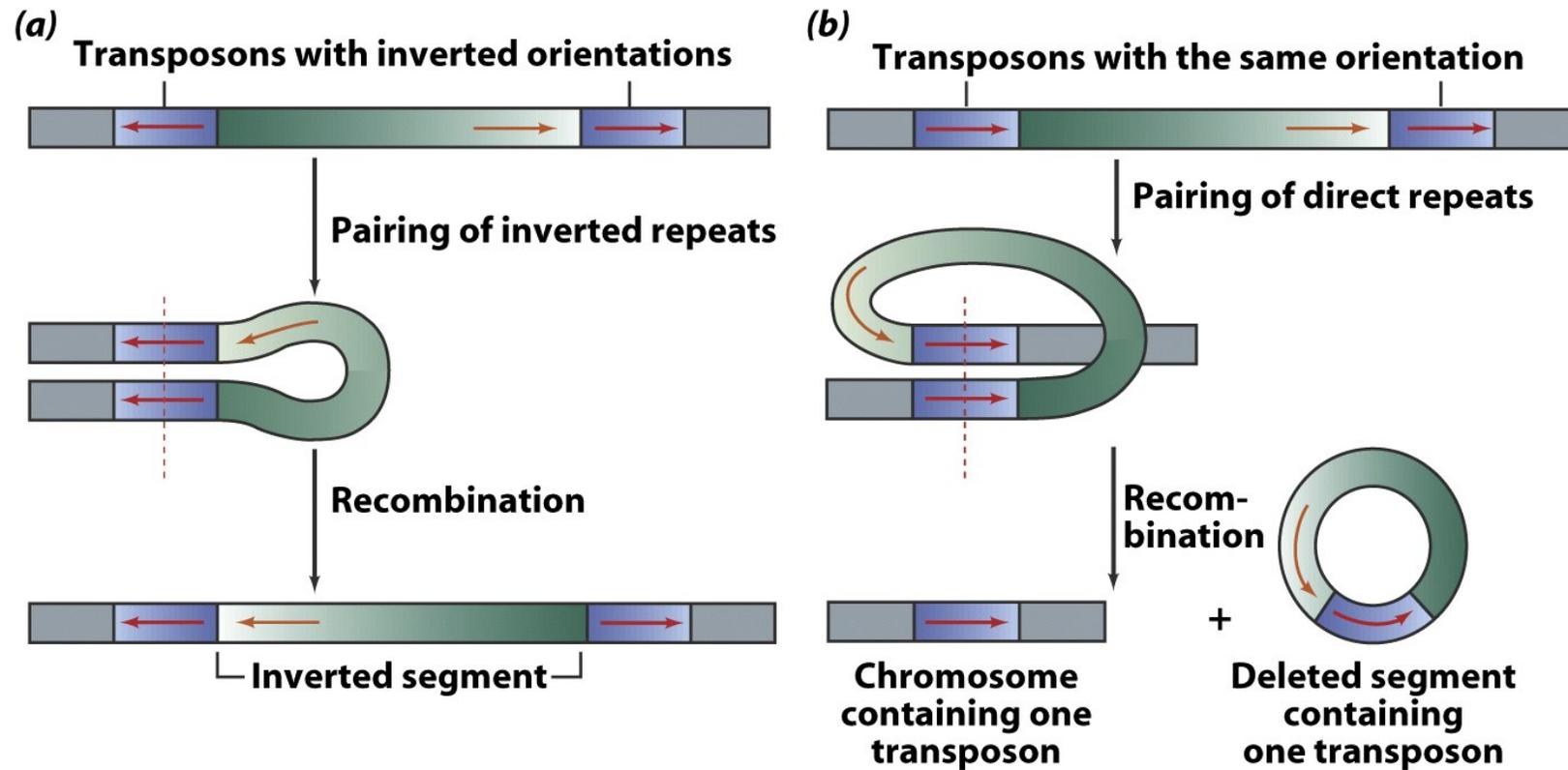
DNA doador mantém uma cópia do Tn

# Retrotransposição - Retrotransposon

- Exclusivo de eucariotos
- Dependem de um intermediário de RNA
- Transcriptase reversa
  - sintetiza DNA a partir de um molde de RNA
- O DNA doador também mantém uma cópia do Tn



# Eventos de recombinação genética causados por transposons



Inversão

Deleção