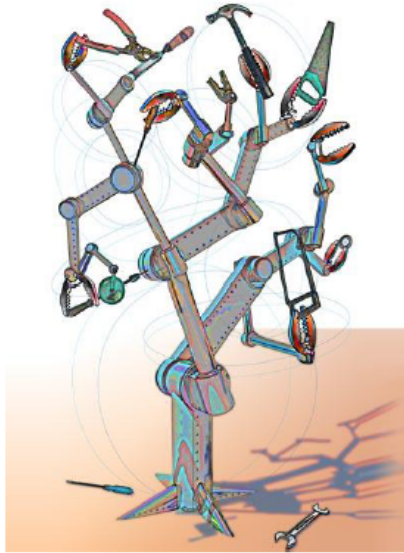


GENÉTICA DE MICRORGANISMOS



Aula 10

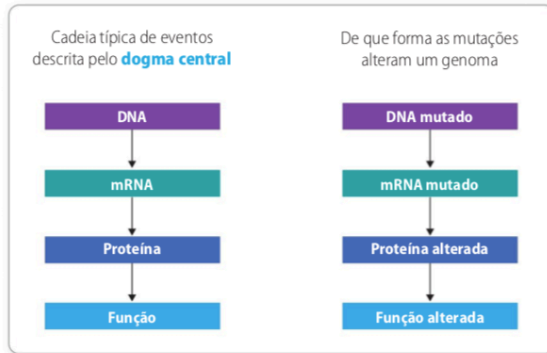
LGN0232 – Genética Molecular

Thalita Peixoto Basso
Departamento de Genética
tpbasso@usp.br

- ✓ **Módulo 1:** Revisão dogma central, replicação, transcrição e tradução
- ✓ **Módulo 2:** Regulação da expressão gênica bacteriana
- ✓ **Módulo 3:** Mutação e transferência genética
- ✓ **Módulo 4:** Produtos da engenharia genética na agricultura
- ✓ **Questionários e-disciplinas**

A genética é a ciência da hereditariedade

Inclui estudos dos genes: como são replicados, expressos e transferidos de uma geração a outra



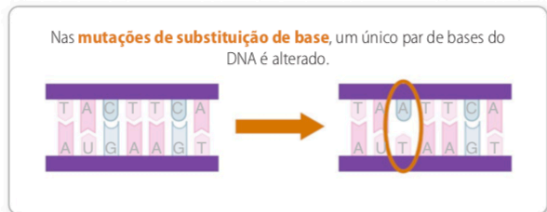
Dogma central descreve como o **DNA** é transcrito em **mRNA**, o qual, é traduzido em **proteínas** que realizam funções celulares vitais

As mutações introduzem alterações nesse processo, levando ao ganho ou à perda de funções

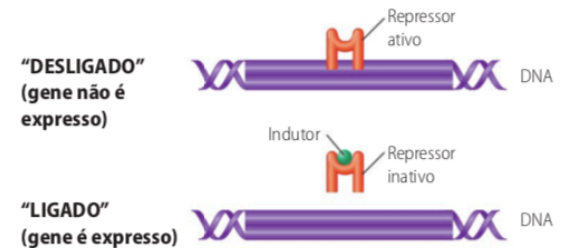
As mutações podem ser provocadas por **substituições de base** ou **mutações de troca de fase de leitura**

A expressão gênica bacteriana pode ser regulada por **óperons**, os quais podem ser **indutíveis** ou **repressíveis**

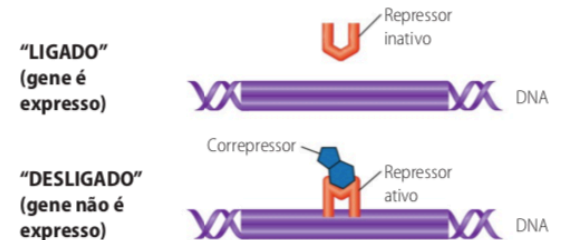
Um gene normalmente codifica uma molécula de mRNA que por fim, resulta na formação de uma proteína. Quando a molécula final que um gene codifica, p. ex., uma proteína foi produzida, dizemos que o gene foi **expresso**



Um **óperon indutível** inclui genes que estão no modo "desligado", com o repressor ligado ao DNA, sendo "ligado" através de um indutor ambiental.

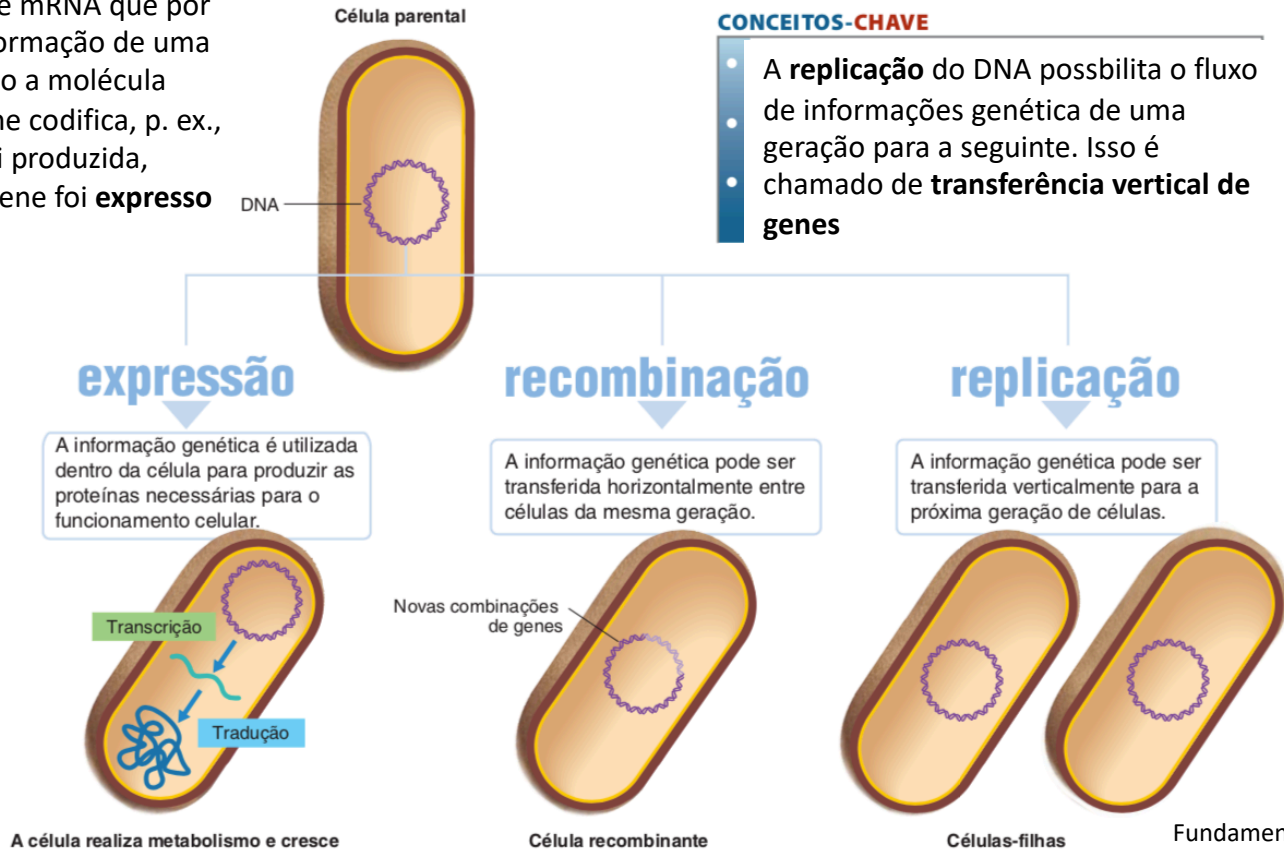


Um **óperon repressível** inclui genes que estão no modo "ligado", sem um repressor ligado ao DNA, sendo "desligado" através de um repressor e de um correpressor ambiental.



Fluxo da informação genética

Um gene normalmente codifica uma molécula de mRNA que por fim, resulta na formação de uma proteína. Quando a molécula final que um gene codifica, p. ex., uma proteína foi produzida, dizemos que o gene foi **expresso**

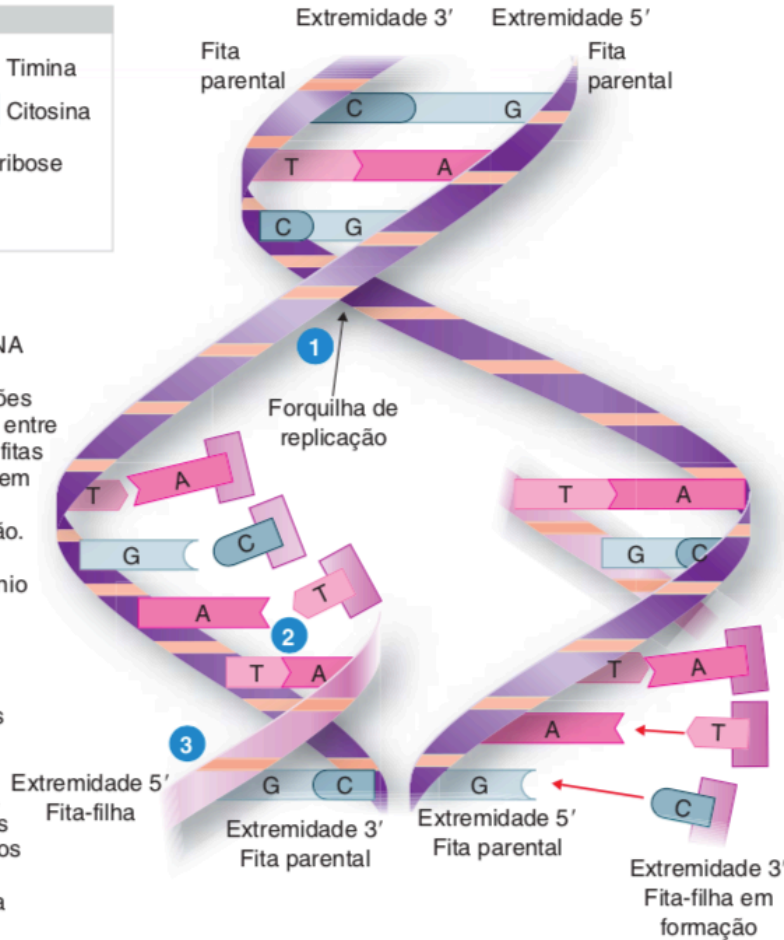


Replicação do DNA

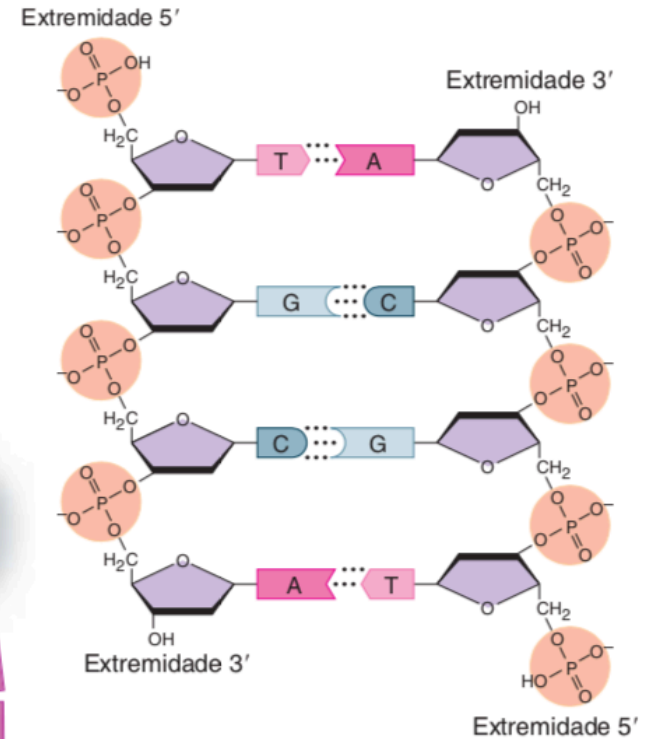
Uma molécula de DNA de dupla-fita é convertida em duas moléculas-filhas idênticas



- 1 A dupla-hélice do DNA parental se separa à medida que as ligações de hidrogênio fracas entre os nucleotídeos das fitas opostas se rompem em resposta à ação das enzimas de replicação.
- 2 Ligações de hidrogênio se formam entre os novos nucleotídeos complementares e cada fita do molde parental forma novos pares de bases.
- 3 Enzimas catalisam a formação de ligações açúcar-fosfato entre os nucleotídeos sequenciais em cada fita-filha resultante.



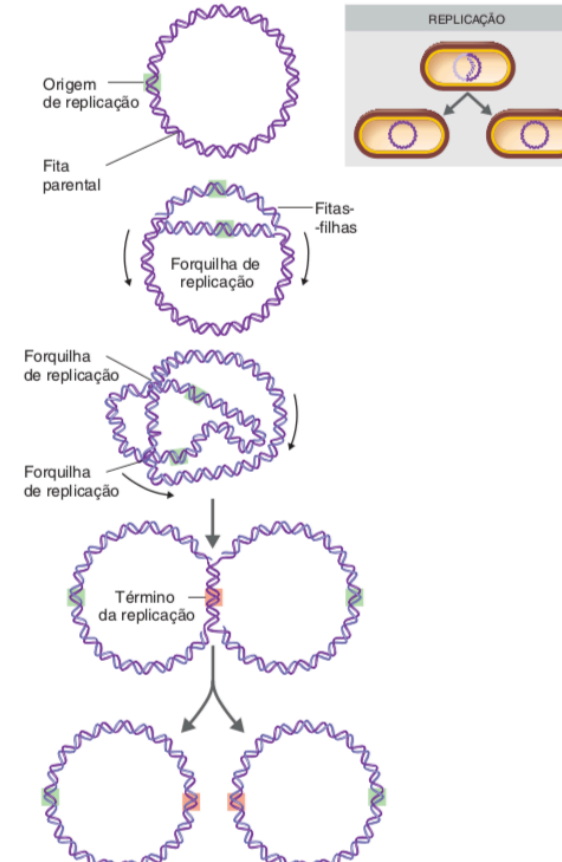
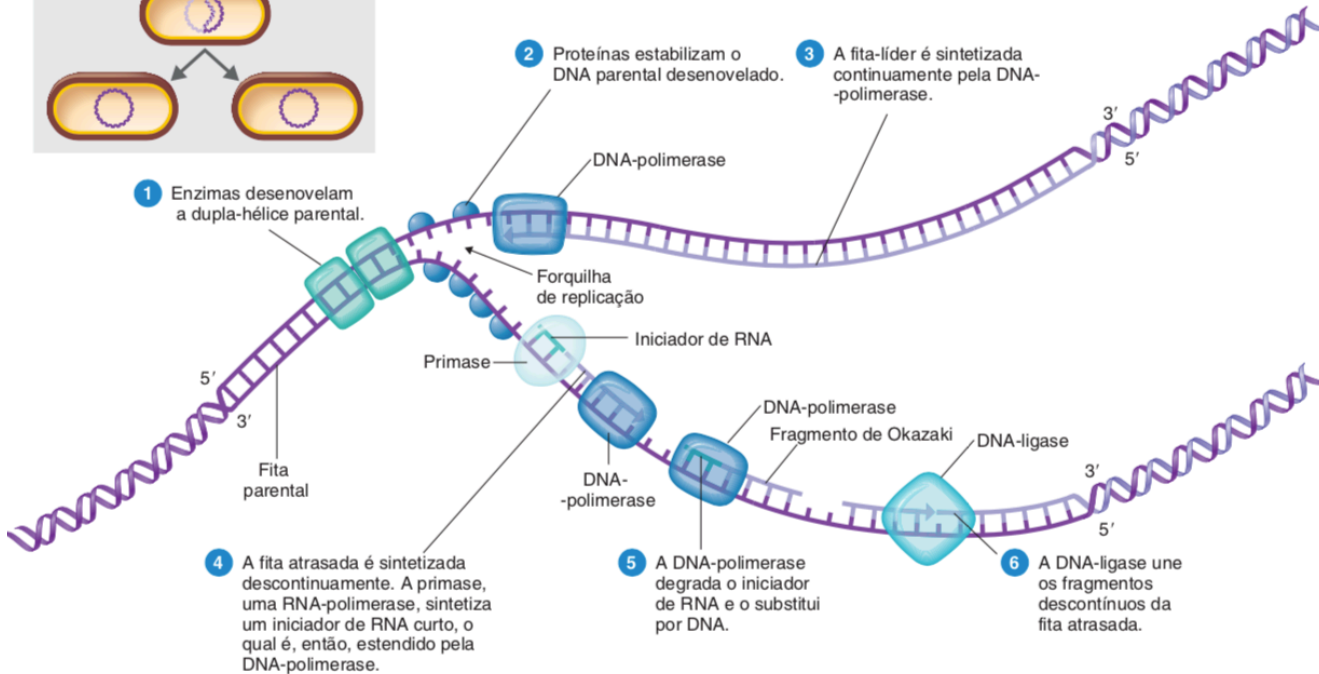
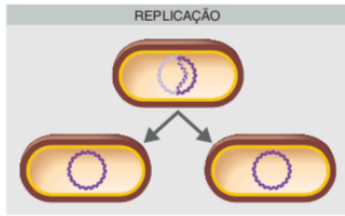
(a) A forquilha de replicação



(b) As duas fitas de DNA são antiparalelas. O arcabouço de açúcar-fosfato de uma fita está alinhado de cabeça para baixo em relação ao cabouço da outra fita. Vire o livro de cabeça para baixo para comprovar este fato.

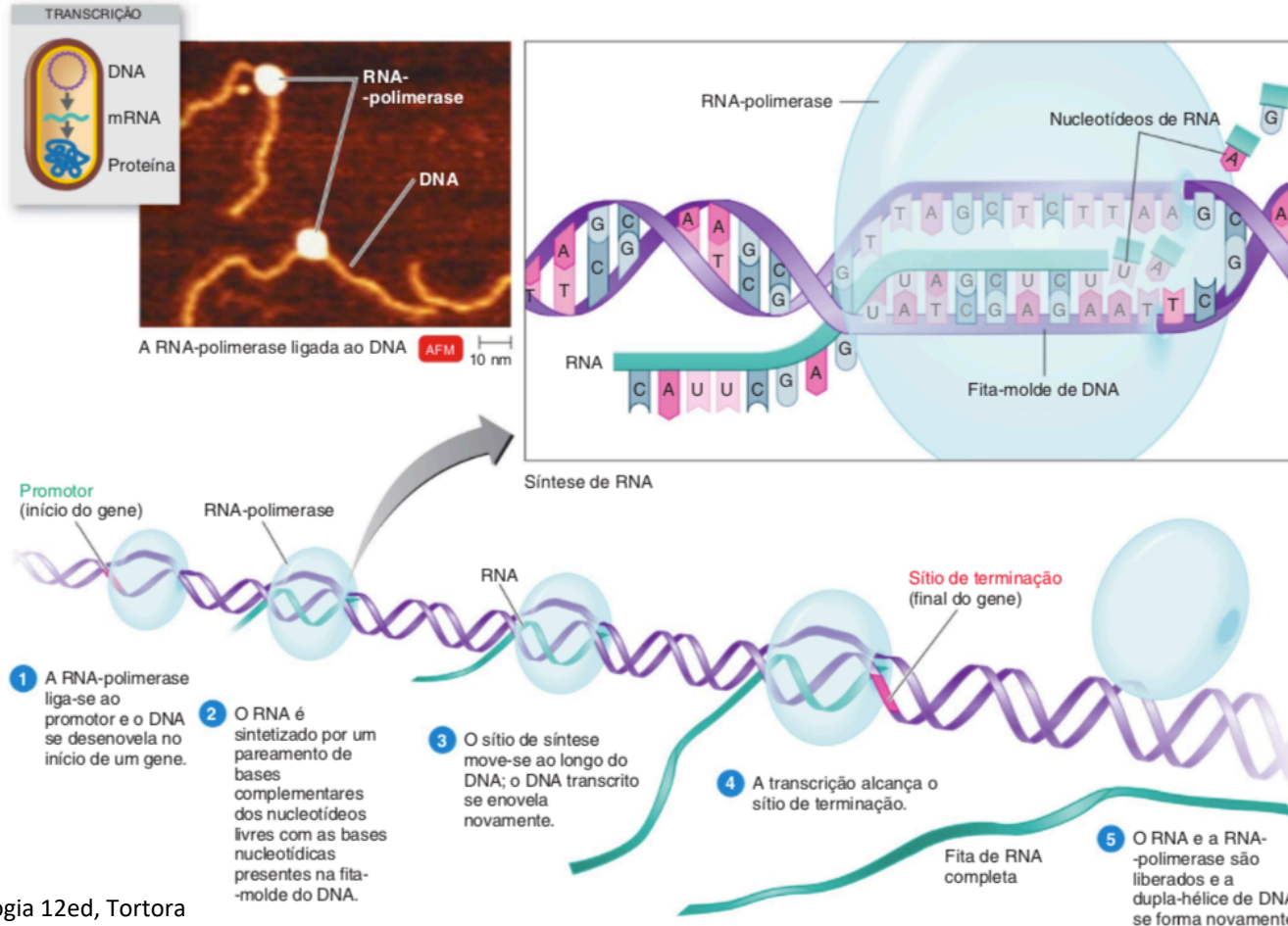
Replicação do DNA

Processo impressionantemente acurado, em geral, erros são cometidos em uma taxa de apenas 1 em cada 10 bilhões de bases incorporadas



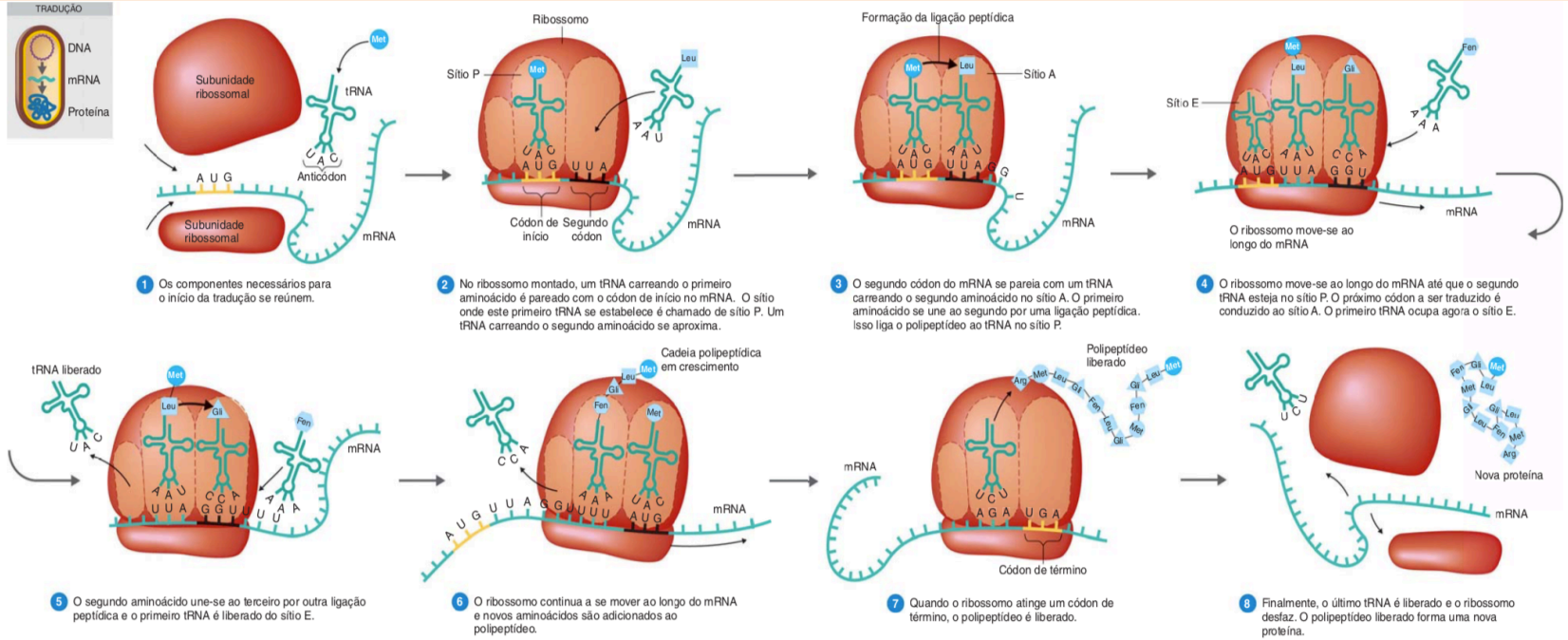
Transcrição

A informação genética contida no DNA é copiada, ou transcrita, em uma sequência de bases complementares de RNA



Tradução

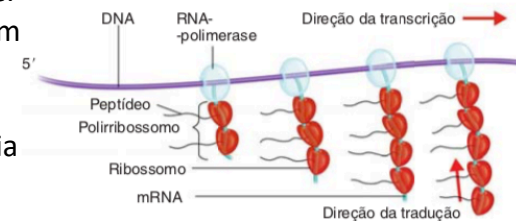
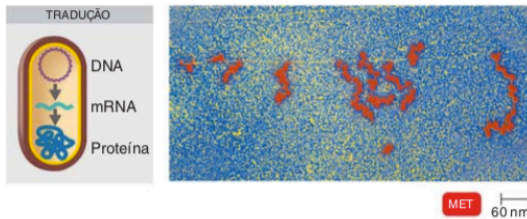
A síntese proteica



Transcrição e tradução simultâneas em bactérias

Muitas moléculas de mRNA são sintetizadas simultaneamente. As moléculas mais longas de mRNA foram as primeiras a serem transcritas no promotor.

Os ribossomos ligados ao mRNA recém-formado. A micrografia mostra um polirribossomo (muitos ribossomos) em um único gene bacterino.



O código genético

		Segunda posição				
		U	C	A	G	
Primeira posição	U	UUU } Fen	UCU } Ser	UAU } Tir	UGU } Cis	U
		UUC } Fen	UCC } Ser	UAC } Tir	UGC } Cis	C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA término	UGA término	A
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG término	UGG Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
	A	AUU } Ile	ACU } Tre	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC } Ile	ACC } Tre	AAC } Asn	AGC } Ser	C
		AUA } Ile	ACA } Tre	AAA } Lis	AGA } Arg	A
		AUG Met/início	ACG } Tre	AAG } Lis	AGG } Arg	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gli	U
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gli	C
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gli	A
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gli	G

Os códons são escritos em termos de sua sequência de bases no mRNA

Existem 64 códons possíveis, mas apenas 20 aminoácidos

Isso significa que a maioria dos aminoácidos é sinalizada por diversos códons alternativos, uma situação denominada **degeneração** do código

Por exemplo, a leucina tem seis códons e a alanina tem quatro

A degeneração permite uma determinada quantidade de leituras incorretas ou mutações no DNA, sem afetar a proteína final que será produzida

Regulação da expressão gênica bacteriana

Controle pré-transcricional

Repressão

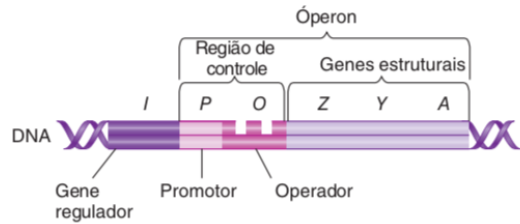
O mecanismo regulador que inibe a expressão gênica e diminui a síntese das enzimas é denominado **repressão**. A repressão normalmente é uma resposta à abundância de um produto final de uma via metabólica; ela causa uma redução na velocidade da síntese das enzimas que levam à formação daquele produto. A repressão é mediada por proteínas reguladoras, denominadas **repressoras**, que bloqueiam a capacidade da RNA-polimerase de iniciar a transcrição dos genes reprimidos. A condição-padrão de um gene reprimível é *ligado*

Indução

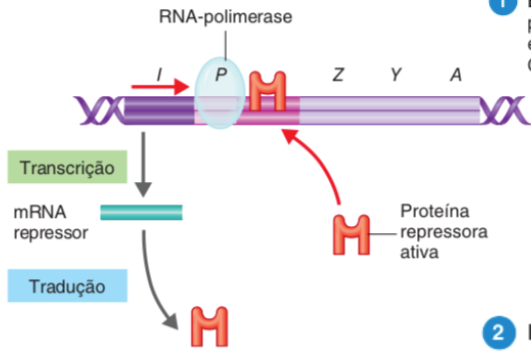
O processo que ativa a transcrição de um gene é a **indução**. Uma substância que inicia a transcrição de um gene é chamada de **indutor**, e as enzimas que são sintetizadas na presença de indutores são chamadas de *enzimas indutíveis*. A circunstância-padrão de um gene indutível é *desligado*

Ex. β -galactosidase

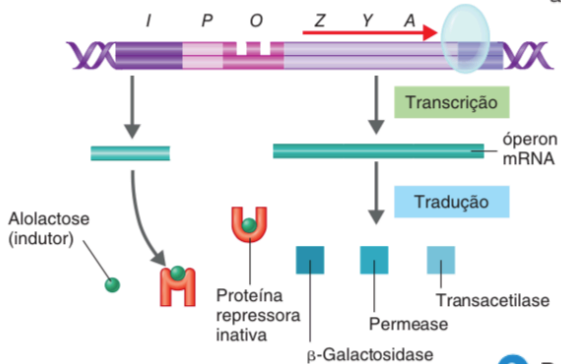
Regulação da expressão gênica bacteriana



1 Estrutura do operon. O operon consiste em um sítio promotor (P) e um sítio operador (O) e em genes estruturais que codificam para a proteína em questão. O operon é regulado pelo produto do gene regulador (I).



2 Repressor ativo, operon desligado. A proteína repressora liga-se ao operador, impedindo a transcrição do operon.



3 Repressor inativo, operon ligado. Quando o indutor alolactose se liga à proteína repressora, o repressor inativado não pode mais bloquear a transcrição. Os genes estruturais são transcritos, resultando na produção das enzimas necessárias para o catabolismo da lactose.

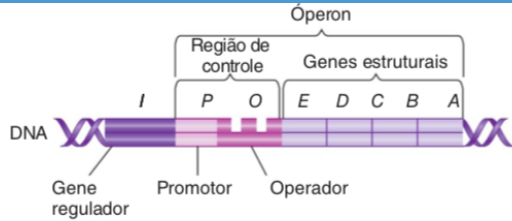
Óperon indutível

Na região de controle do operon *lac* há dois segmentos de DNA relativamente curtos. Um, o promotor. É o segmento onde a RNA-polimerase inicia a transcrição. O outro é o **operador**, que atua como um semáforo de trânsito, sinalizando para parar ou prosseguir com a transcrição dos genes estruturais. Um conjunto de sítios operadores e promotores e os genes estruturais que eles controlam definem um **operon**; portanto, a combinação dos três genes estruturais *lac* e as regiões de controle adjacentes é denominada operon *lac*.

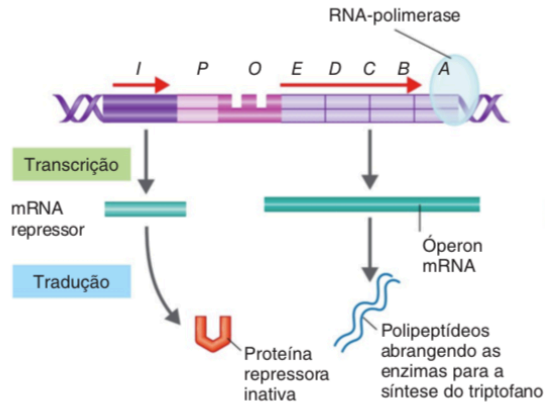
Um gene regulador, denominado *gene I*, codifica uma proteína repressora que liga ou desliga os operons indutíveis e repressíveis. O operon *lac* é um **operon indutível**.

Na ausência da lactose, a proteína repressora liga-se fortemente ao sítio do operador, prevenindo a transcrição. Se a lactose está presente, o repressor liga-se ao metabólito da lactose, em vez de se ligar ao sítio operador, e as enzimas que degradam a lactose são transcritas.

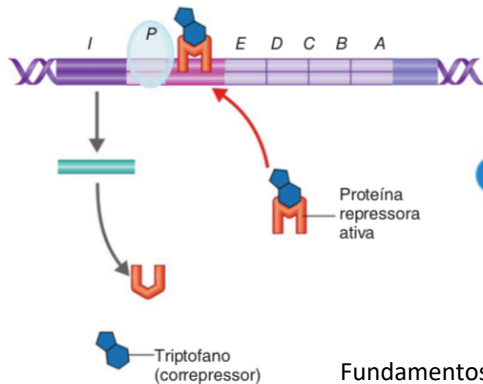
Regulação da expressão gênica bacteriana



- 1 Estrutura do operon.** O operon consiste em um sítio promotor (*P*) e um sítio operador (*O*) e em genes estruturais que codificam para a proteína em questão. O operon é regulado pelo produto do gene regulador (*I*).



- 2 Repressor inativo, operon ligado.** O repressor está inativo e a transcrição e a tradução prosseguem, levando à síntese do triptofano.



- 3 Repressor ativo, operon desligado.** Quando o correpresor triptofano liga-se à proteína repressora, o repressor ativado liga-se ao operador, impedindo a transcrição do operon.

Óperon repressível

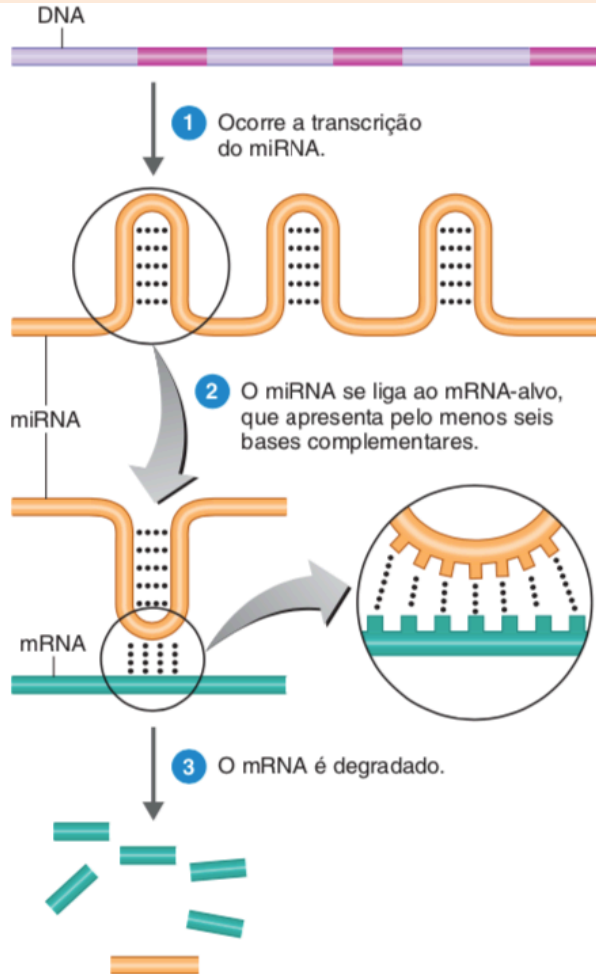
Nos óperons repressíveis, os genes estruturais são transcritos até que sejam desligados. Os genes para as enzimas envolvidas na síntese do triptofano são regulados desse modo

Os genes estruturais são transcritos e traduzidos, levando à síntese do triptofano. Quando um excesso de triptofano está presente, ele atua como um **correpresor**, ligando-se à proteína repressora

A proteína repressora pode, então, ligar-se ao operador, interrompendo a síntese adicional de triptofano

Regulação da expressão gênica bacteriana

Controle pós-transcricional



Os microRNAs controlam uma ampla variedade de atividades nas células

Alguns mecanismos reguladores interrompem a síntese proteica após a transcrição. Moléculas de RNA de fita (~ 22 nucleotídeos), chamadas de **microRNAs (miRNAs)**, inibem a produção de proteínas em células eucarióticas.

Em plantas, os miRNAs produzidos durante o desenvolvimento permitem que diferentes células produzam diferentes proteínas. As células das folhas e as células das raízes têm os mesmos genes, porém as células de cada órgão produzem diferentes proteínas, devido aos miRNAs produzidos em cada tipo de célula durante o desenvolvimento.

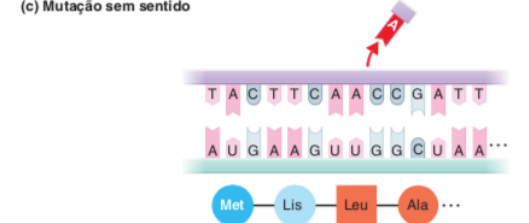
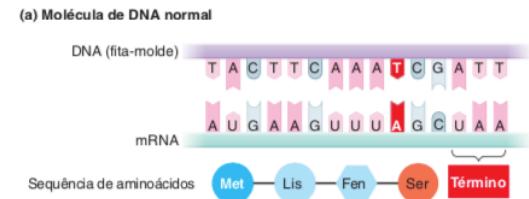
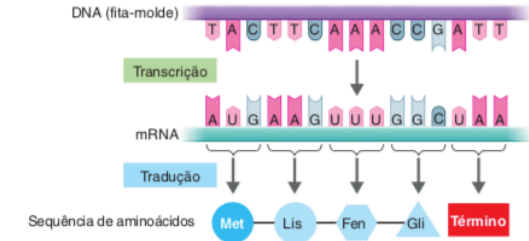
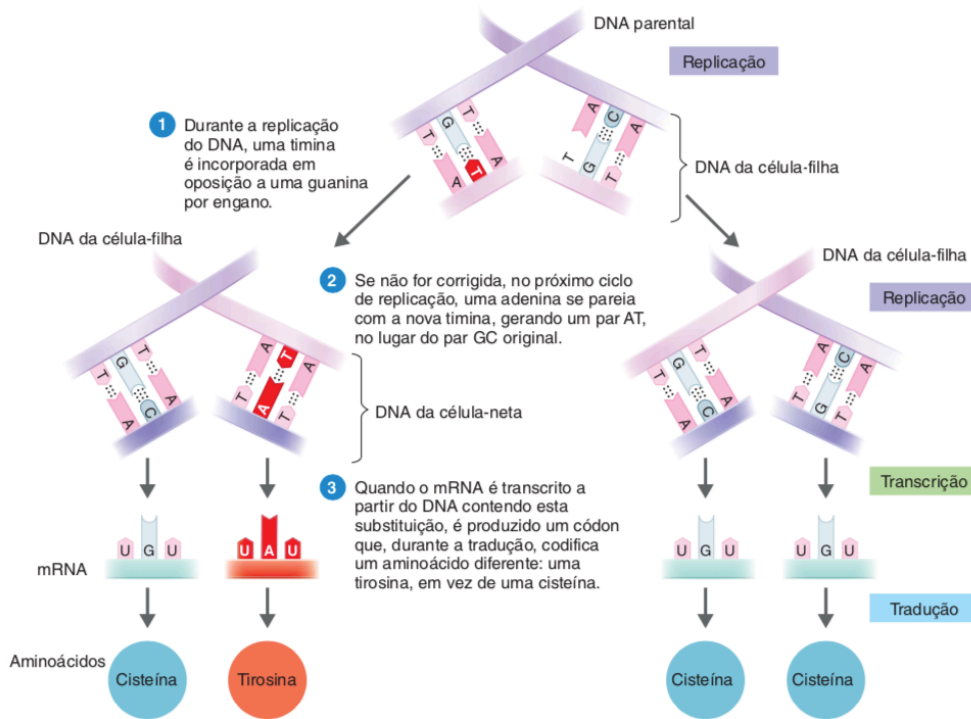
Um miRNA se pareia com um mRNA complementar, formando um RNA dupla-fita. Esse RNA dupla-fita é enzimaticamente degradado, de modo que a proteína codificada pelo mRNA não é produzida.

Alterações no material genético

Mutação

Substituição de bases, essa mutação leva à produção de uma proteína alterada em uma célula-neta - **mutação de troca de sentido**

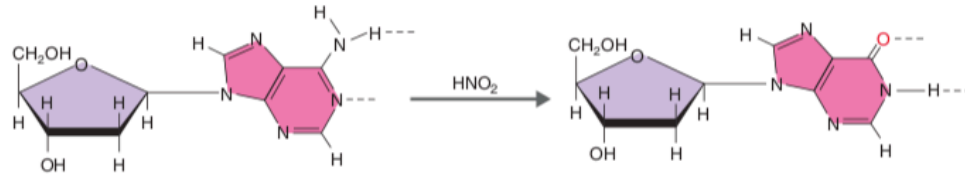
Tipos de mutação



Mutágenos

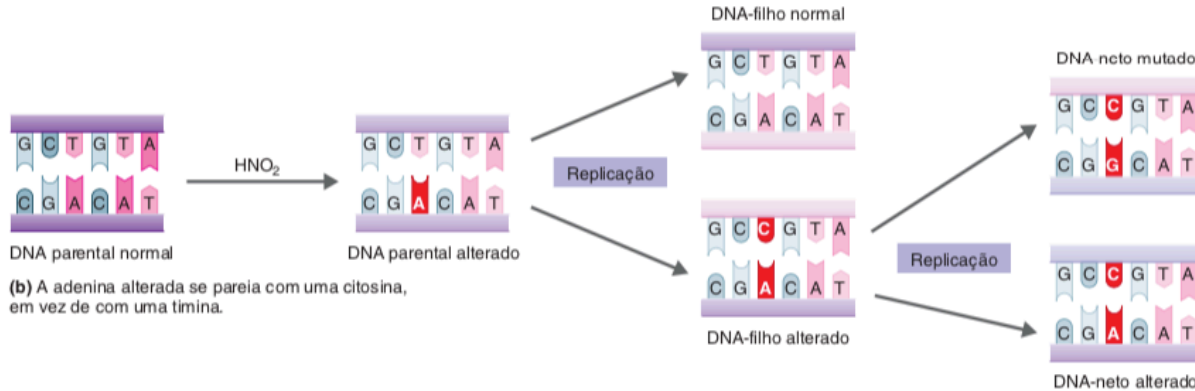
Mutágenos químicos

Ex.: ácido nitroso, emitido no ar pela queima de combustíveis fósseis oxida a adenina



(a) O nucleosídeo adenosina normalmente se pareia através de ligações de hidrogênio com um oxigênio e um hidrogênio de um nucleotídeo timina ou uracila.

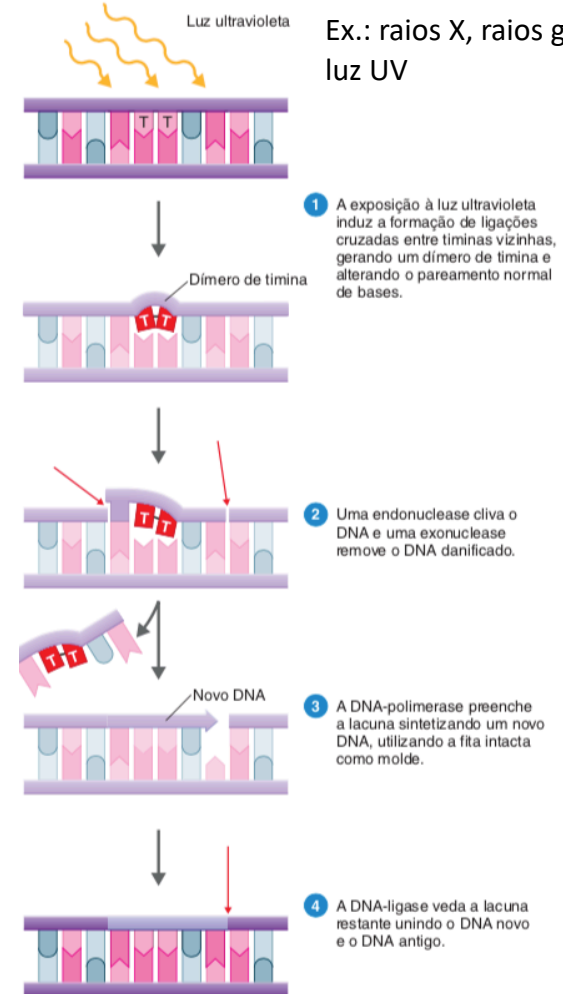
A adenina alterada realizará o pareamento com ligações de hidrogênio com um hidrogênio e um nitrogênio de um nucleotídeo citosina.



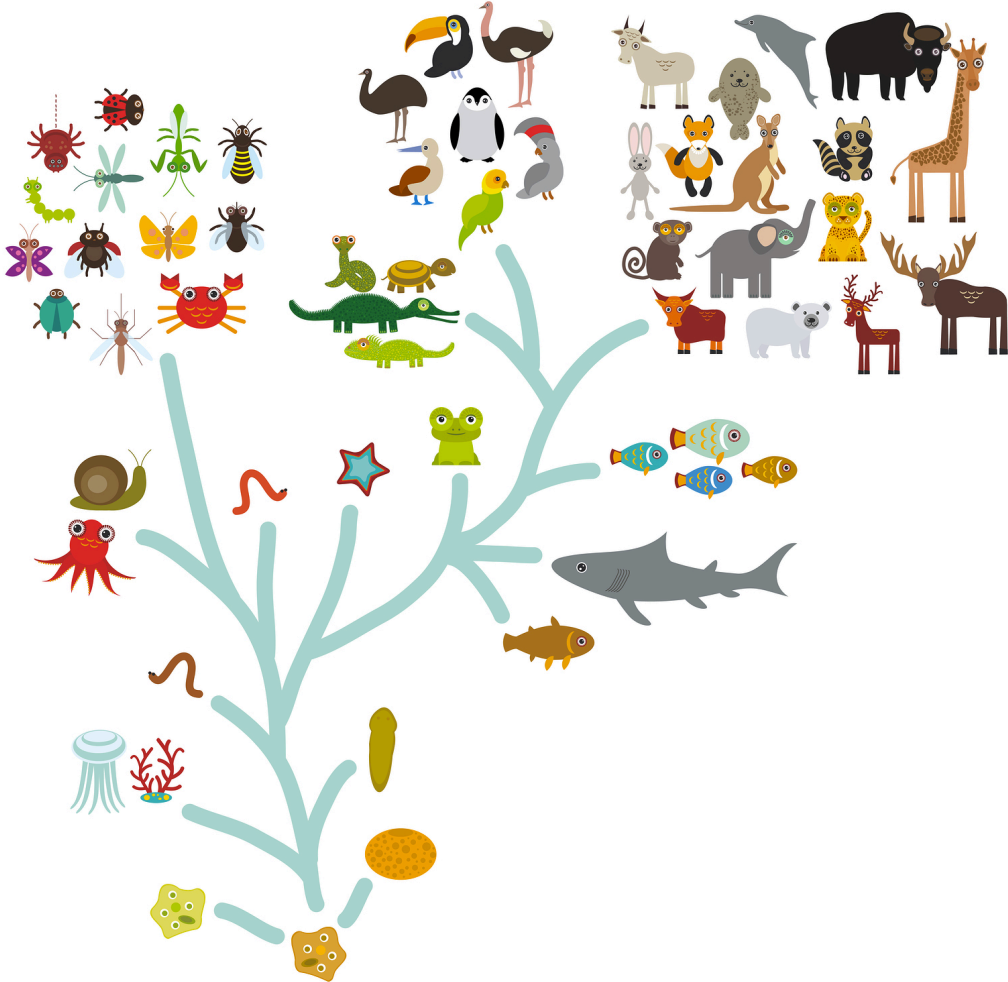
(b) A adenina alterada se pareia com uma citosina, em vez de com uma timina.

Radiação

Ex.: raios X, raios gama, luz UV



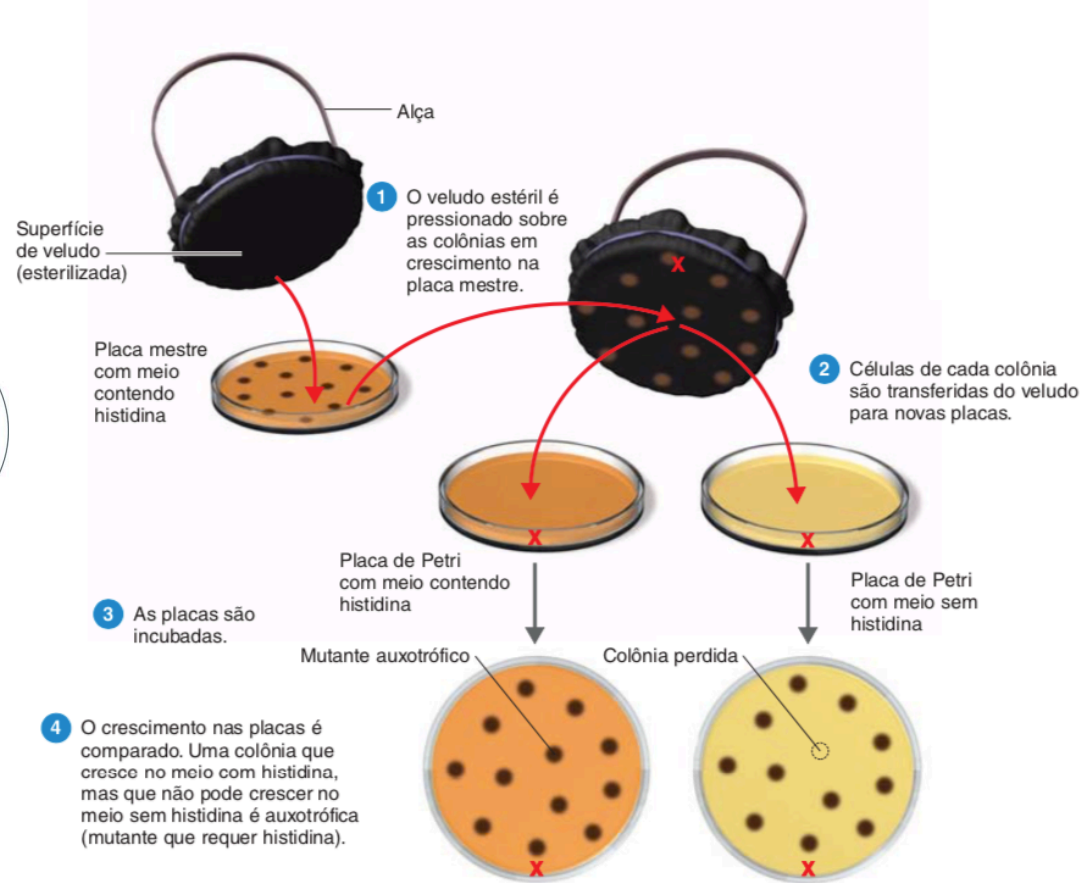
A importância da mutação aleatória na diversidade genética e evolução



Identificação de mutantes

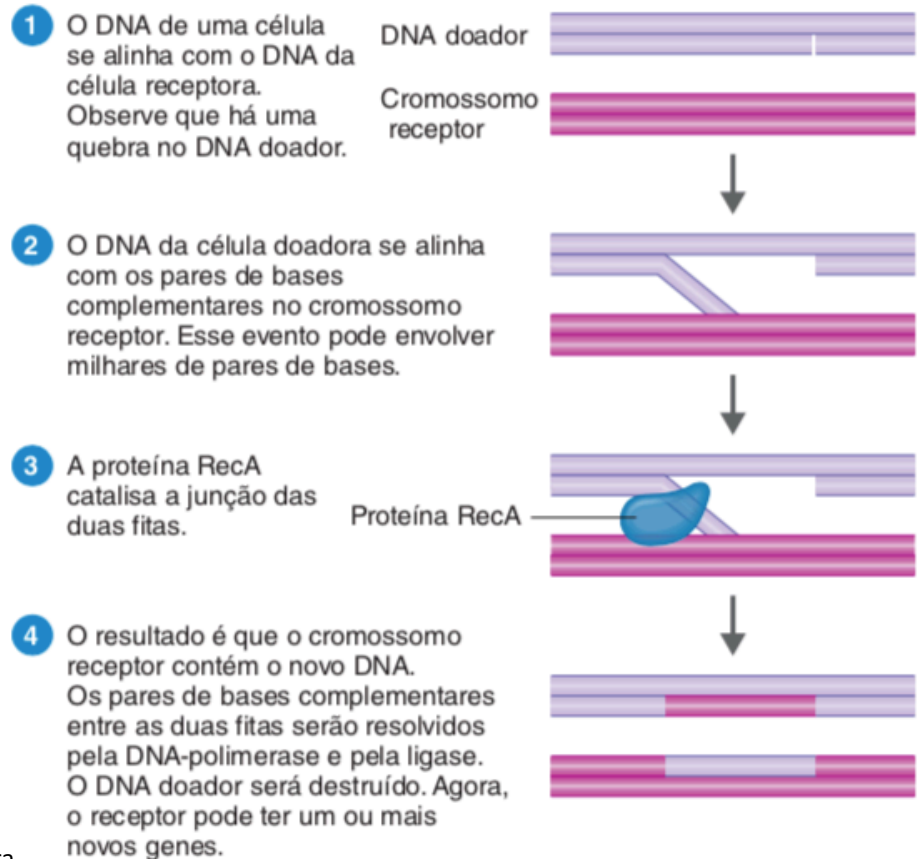
Seleção positiva (direta)

Seleção negativa (indireta)

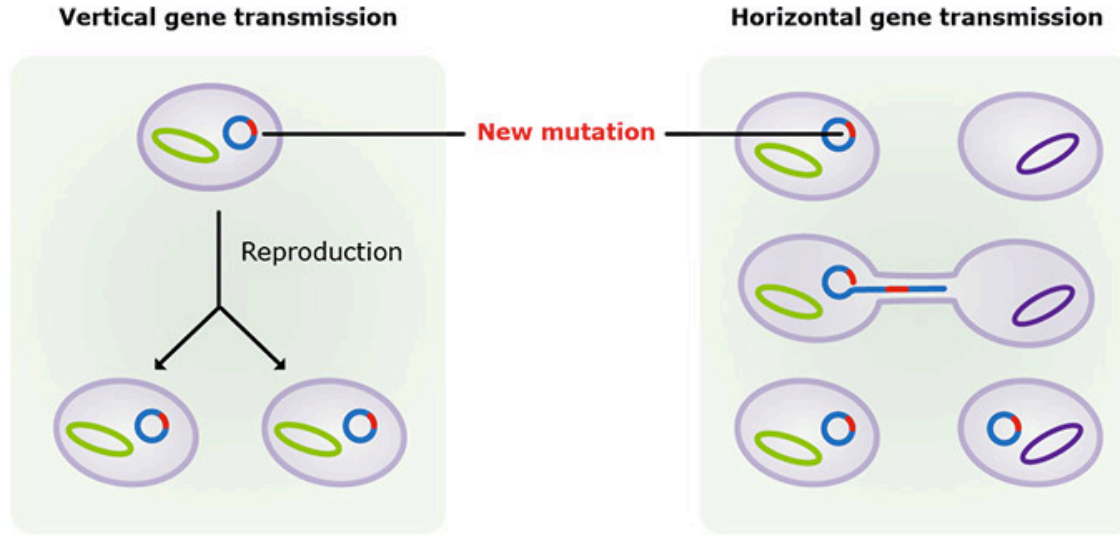


Recombinação genética

Refere-se à troca de genes entre duas moléculas de DNA para formar novas combinações de genes em um cromossomo



Transferência vertical *versus* horizontal de genes



- ✓ A **transferência vertical de genes** ocorre quando os genes são passados de um organismo para seus **descendentes**
- ✓ As plantas e os animais transmitem seus genes por essa forma de transmissão

- ✓ Na **transferência horizontal de genes** as bactérias também podem passar seus genes lateralmente, para outras bactérias da mesma geração
- ✓ A célula receptora que incorpora o DNA doador em seu próprio DNA é denominada *recombinante*

Transformação em bactérias é um tipo específico de transferência genética

Experimento de Griffith demonstrando uma transformação genética



- 1 Bactérias encapsuladas vivas foram injetadas em um camundongo.



- 2 O camundongo morreu.



- 3 Colônias de bactérias encapsuladas foram isoladas do camundongo morto.

(a)

- 1 Bactérias não encapsuladas vivas foram injetadas em um camundongo.



- 2 O camundongo permaneceu saudável.



- 3 Algumas colônias de bactérias não encapsuladas foram isoladas do camundongo; fagócitos destruíram as bactérias não encapsuladas.

(b)

- 1 Bactérias encapsuladas mortas pelo calor foram injetadas em um camundongo.



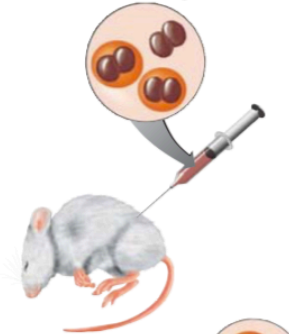
- 2 O camundongo permaneceu saudável.



- 3 Nenhuma colônia foi isolada do camundongo.

(c)

- 1 Bactérias não encapsuladas vivas e bactérias encapsuladas mortas pelo calor foram injetadas em um camundongo.



- 2 O camundongo morreu.

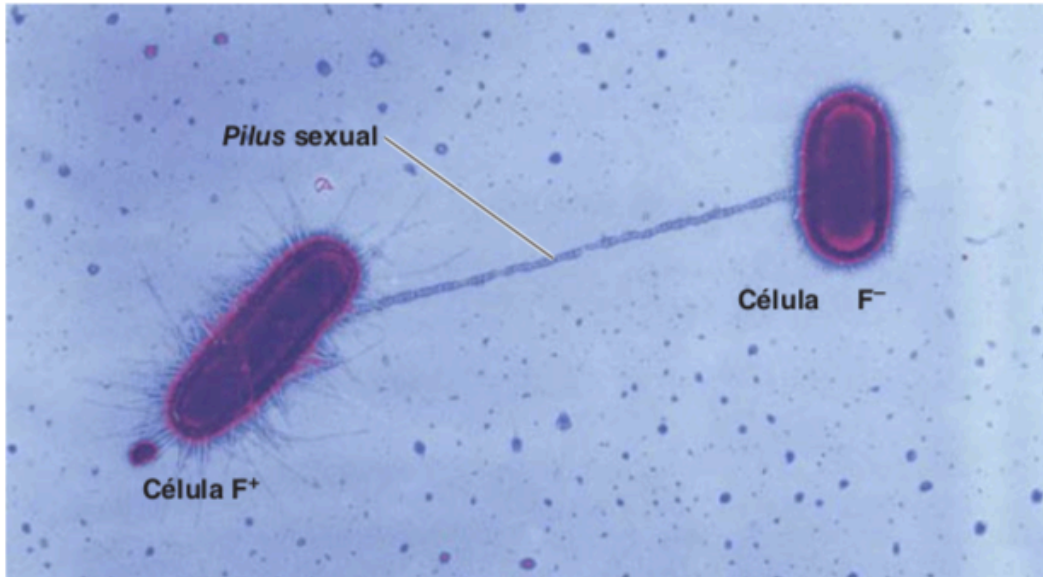


- 3 Colônias de bactérias encapsuladas foram isoladas do camundongo morto.

(d)

Conjugação em bactérias

- Requer o contato direto célula a célula
- As células em conjugação geralmente devem ser de tipos opostos de acasalamento



(a) Pilus sexual



(b) Ponte de conjugação

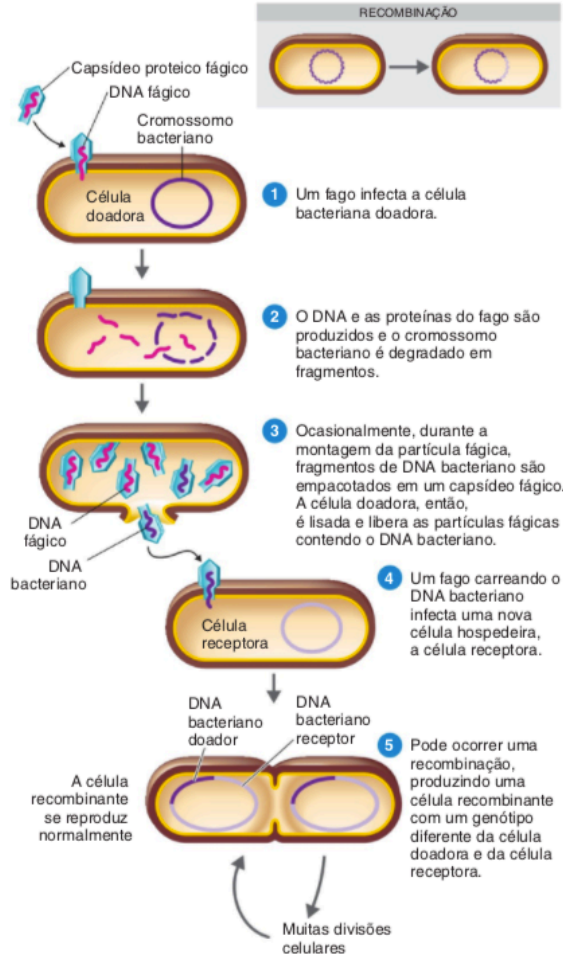


Bactérias **gram-negativas**: o plasmídeo transporta genes que codificam a síntese de *pili sexuais*, projeções da superfície da célula doadora que entram em contato com a receptora e auxiliam a unir as duas células em contato direto

Bactéria **gram-positivas**: produzem moléculas aderentes de superfície que fazem as células entrarem em contato direto umas com as outras, nos pontos de conjugação

Transdução em bactérias

Mecanismo de transferência genética entre bactérias



Nesse processo, o DNA bacteriano é transferido de uma célula doadora a uma célula receptora dentro de um vírus que infecta bactérias, denominado **bacteriófago**, ou **fago**

Transdução generalizada

Durante a reprodução dos fagos, o DNA fágico e as proteínas são sintetizadas pela célula bacteriana hospedeira

O DNA do fago deve ser empacotado dentro do capsídeo proteico que o recobre

O DNA bacteriano ou DNA plasmidial podem ser empacotado dentro de um capsídeo proteico fágico

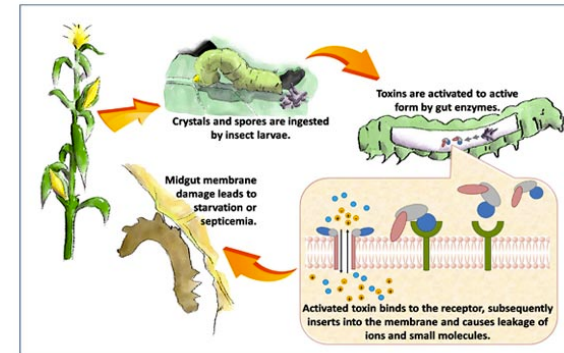
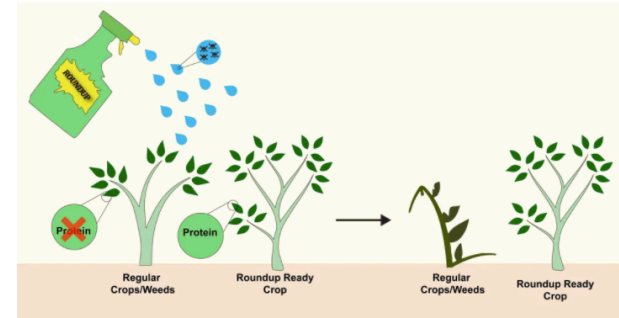
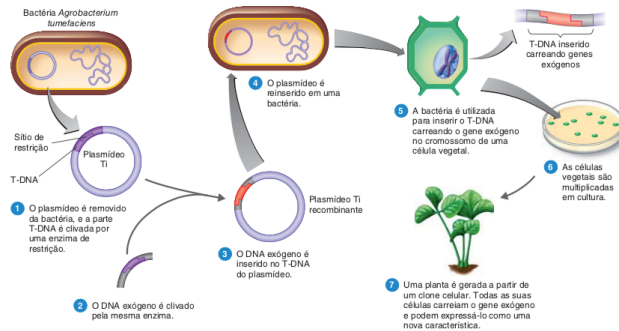
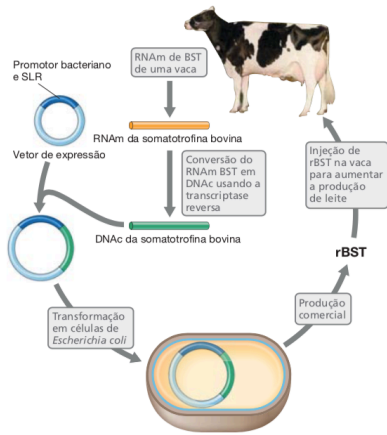
Enquanto na transdução generalizada todos os genes contidos dentro da bactéria infectada por um fago têm probabilidades iguais de serem empacotados e transferidos, na **transdução especializada** apenas determinados genes bacterianos são transferidos (p. ex.: genes que codificam toxinas)

Produtos da engenharia genética de microrganismos

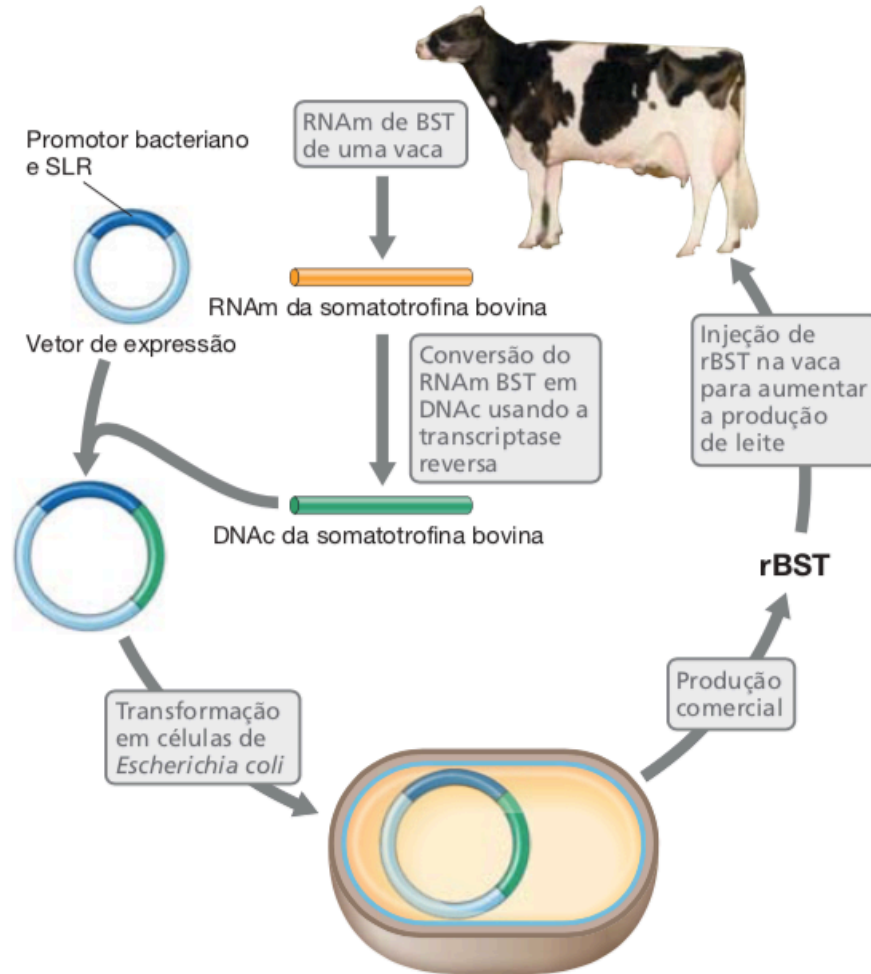
Organismos transgênicos na agricultura

Organismos transgênicos possuem gene de outro organismo

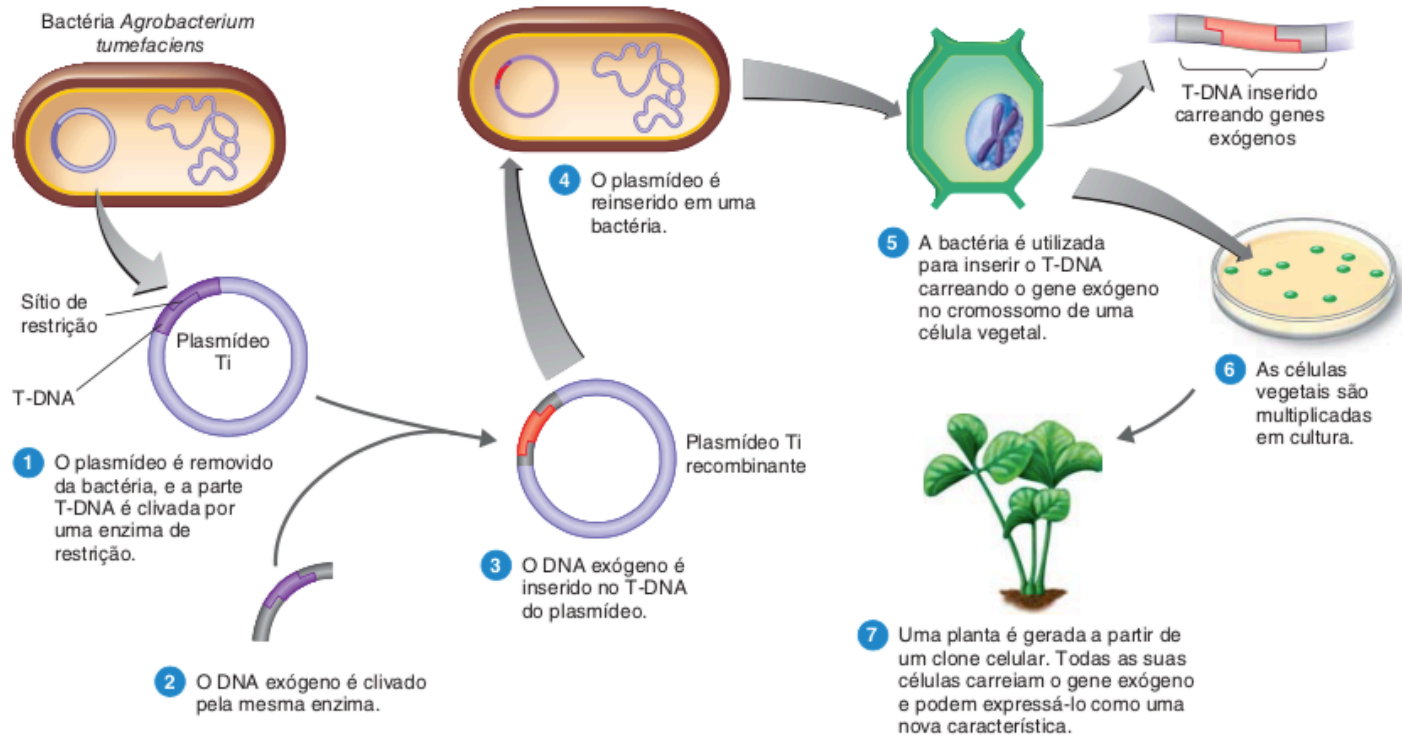
Organismos geneticamente modificados (OGMs) refere-se a qualquer organismo modificado por engenharia genética, contendo ou não DNA exógeno



Clonagem e expressão da somatotrofina bovina

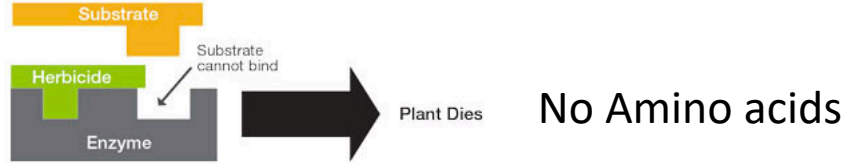
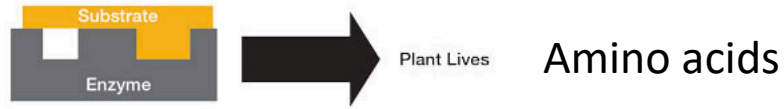


Plasmídeo Ti para fazer modificação genética em plantas

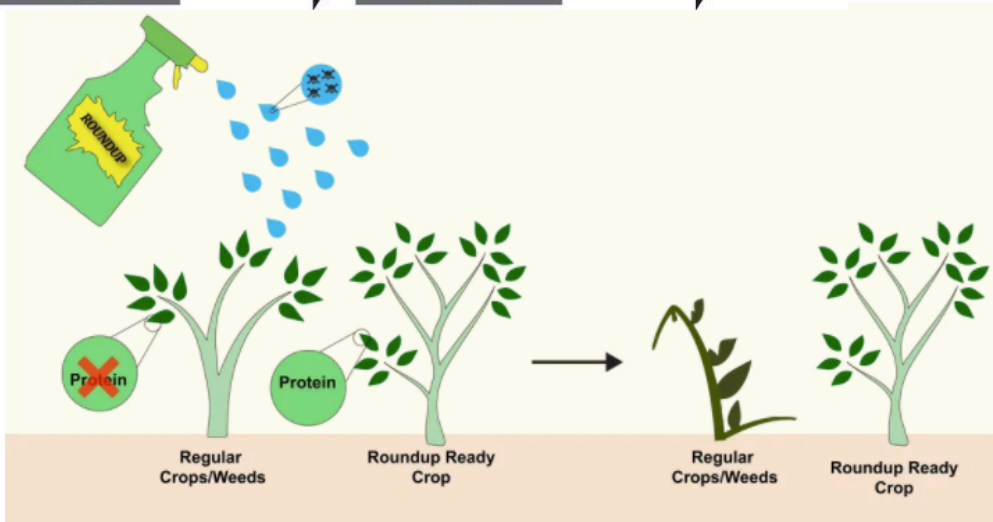


Planta resistente ao herbicida glifosato

NON-RESISTANT WEED

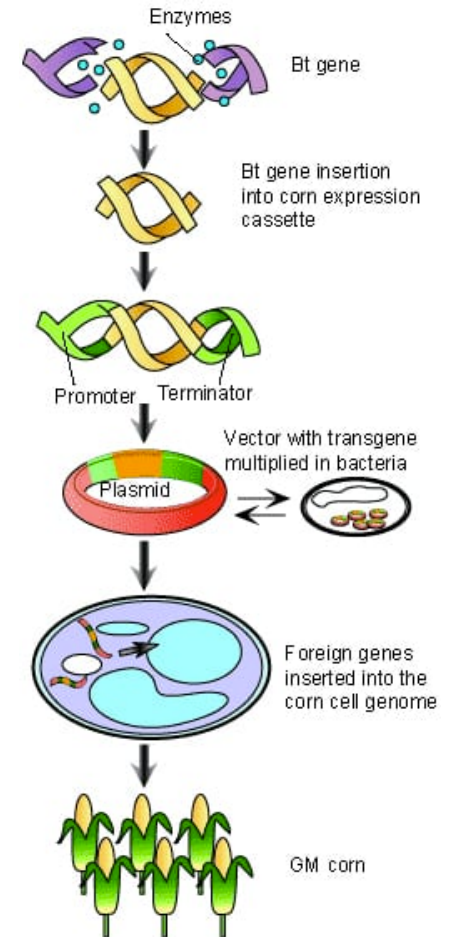
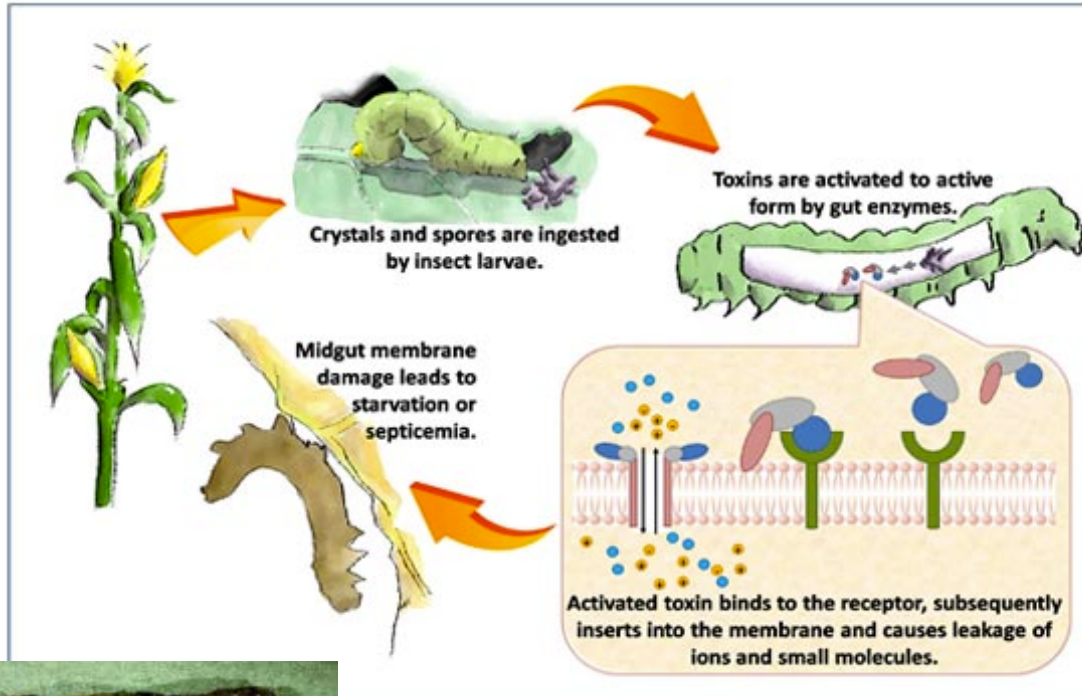


RESISTANT WEED



Stephen R. Padgett, Monsanto Company

Resistência a insetos: a toxina Bt



ESTUDO DIRIGIDO

1. Diversidade microbiana
2. Métodos de melhoramento genético
3. Aplicações de microrganismos melhorados geneticamente
4. Princípios da Biologia Sintética



SITES E VÍDEOS INTERESSANTES

THE SYNTHETIC BIOLOGY PROJECT <http://www.synbioproject.org/about/>

SYNBIOSAFE <http://www.synbiosafe.eu/>

JCVI <http://www.jcvi.org/cms/research/groups/synthetic-biology-bioenergy/>

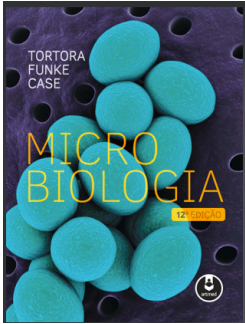
VIDA SINTÉTICA – CRAIG VENTER

<https://www.youtube.com/watch?v=UWXVgwHYtEM> (parte 1)

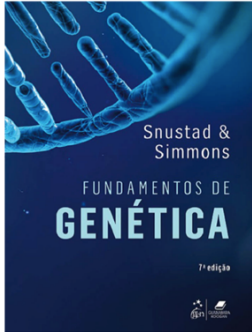
<https://www.youtube.com/watch?v=-gnTr7itDHc> (parte 2)

https://www.youtube.com/watch?v=1YIME6_VsXk (parte 3)

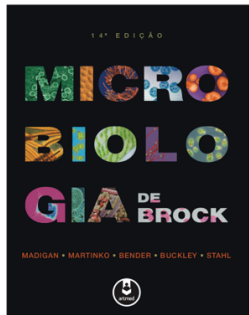
BIBLIOGRAFIA



Microbiologia, Tortora
Cap. 8 – Genética Microbiana



Fundamentos de Genética
Cap. 8 – Genética de Bactéria e Vírus



Microbiologia de Brocks
Cap. 4 – Microbiologia Molecular
Cap. 6 – Genômica Microbiana
Cap. 10 – Genética de Bactérias e Arquéias
Cap. 11 – Engenharia Genética e Biotecnologia