

PRINCÍPIOS DA GENÉTICA BACTERIANA

MUTAÇÃO E TRANSFERÊNCIA
LATERAL DE GENES

Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho



Pense

- Qual a diferença entre transferência horizontal e vertical de genes?
- Qual a relação entre os termos:
 - Homólogo
 - Parálogo
 - Heterólogos?
- É possível fazer manipulação genética in vitro?
Como? - Transgênico ???

O Que é uma *MUTAÇÃO*?

Como vc selecionaria uma mutação?

Mutação

- **Definição**

Mutações são alterações **hereditárias** nas sequências de DNA que compõem o **genoma** de um organismo ou **replicon**

- Mutação: **alteração hereditária** da sequência de DNA

- Não confundir com os **danos ao DNA**, provocados por agentes químicos e físicos. Danos são modificações químicas da molécula de DNA que não podem ser herdadas pois alteram o DNA de modo incompatível com a maquinaria de replicação da célula

- Mutações podem ser:

- Vantajosas
- Prejudiciais
- Silenciosas

- Recombinação

- Produz novas combinações de mutações (alelos) de diferentes genes

Vocabulário de genética bacteriana

Nomenclatura das mutações / mutantes

Tipo de informação	Exemplo	Categoria	Definição
Selvagem	wt	selvagem	referência
Fenotípicas	His ⁺	selvagem	Posso sintetizar minha própria histidina
	His ⁻	auxotrófico	Tenho que comer histidina pra viver
	Lac ⁺	selvagem	Posso comer lactose
	Lac ⁻		Não posso usar lactose como fonte de carbono
	Stp ^R		
Genotípicas	Stp ^S		
	Δ hisC1	auxotrófico	His ⁻ porque o gene hisC1 não funciona
	Δ hisC2	auxotrófico	His ⁻ porque o gene hisC2 não funciona

Isolamento de Mutantes

1- Mutações Seleccionáveis

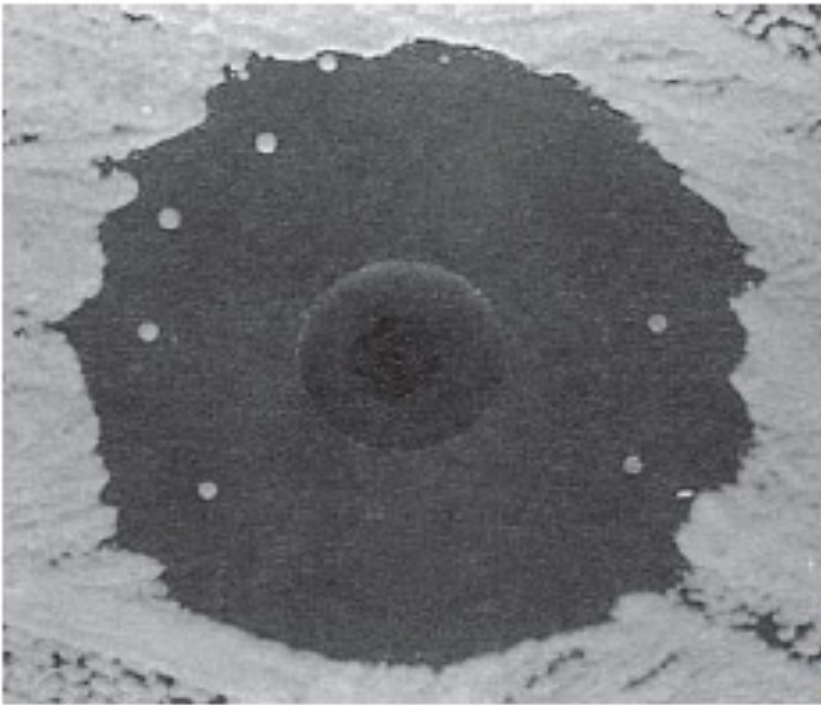
- Mutações que conferem algum tipo de vantagem – seleccionáveis
- Ex. Resistência a um fármaco

2- Mutações não Seleccionáveis - Técnica de Varredura

- Podem causar mudanças fenotípicas claras mas não uma vantagem.
- Não consegue isolá-los de forma direta
- Ex. Perda da coloração de um organismo pigmentado
- Detectadas pela **varredura** – observação visual

Isolamento de Mutantes

Mutante Seleccionável



Colônias resistêntes a um antibiótico

Mutante Não -Seleccionável



Fungos: pigmentação verde, amarela ou branca

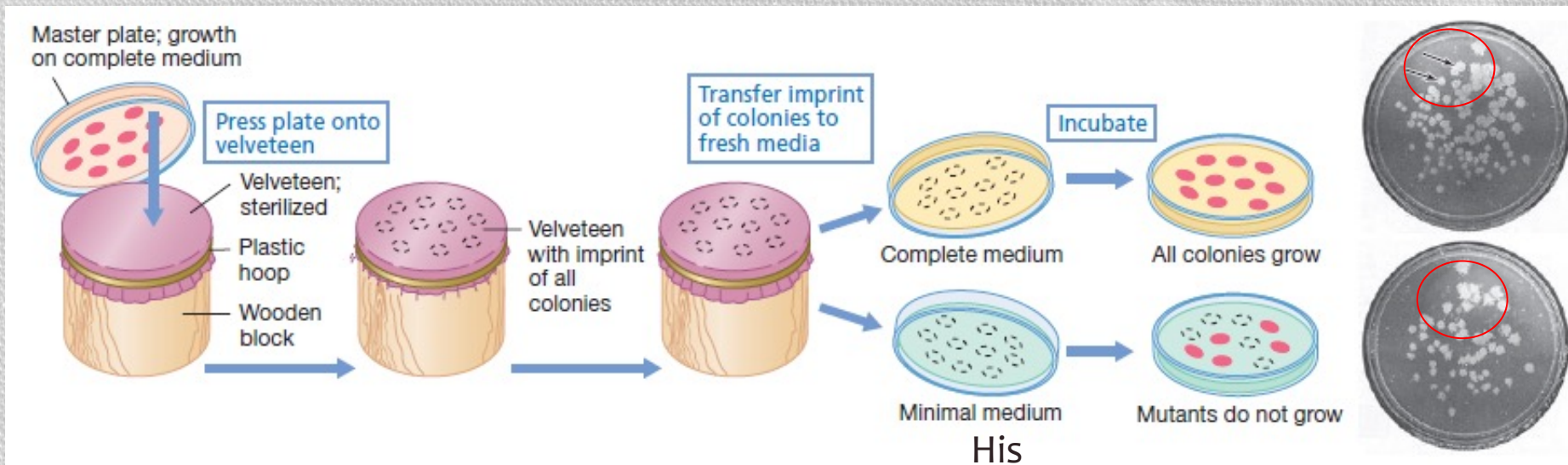
Classes Comuns de Mutantes

Table 10.1 *Kinds of mutants*

<i>Phenotype</i>	<i>Nature of change</i>	<i>Detection of mutant</i>
Auxotroph	Loss of enzyme in biosynthetic pathway	Inability to grow on medium lacking the nutrient
Temperature-sensitive	Alteration of an essential protein so it is more heat-sensitive	Inability to grow at a high temperature (for example, 40°C) that normally supports growth
Cold-sensitive	Alteration of an essential protein so it is inactivated at low temperature	Inability to grow at a low temperature (for example, 20°C) that normally supports growth
Drug-resistant	Detoxification of drug or alteration of drug target or permeability to drug	Growth on medium containing a normally inhibitory concentration of the drug
Rough colony	Loss or change in lipopolysaccharide layer	Granular, irregular colonies instead of smooth, glistening colonies
Nonencapsulated	Loss or modification of surface capsule	Small, rough colonies instead of larger, smooth colonies
Nonmotile	Loss of flagella or nonfunctional flagella	Compact instead of flat, spreading colonies
Pigmentless	Loss of enzyme in biosynthetic pathway leading to loss of one or more pigments	Presence of different color or lack of color
Sugar fermentation	Loss of enzyme in degradative pathway	Lack of color change on agar containing sugar and a pH indicator
Virus-resistant	Loss of virus receptor	Growth in presence of large amounts of virus

Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

Plaqueamento em Réplica



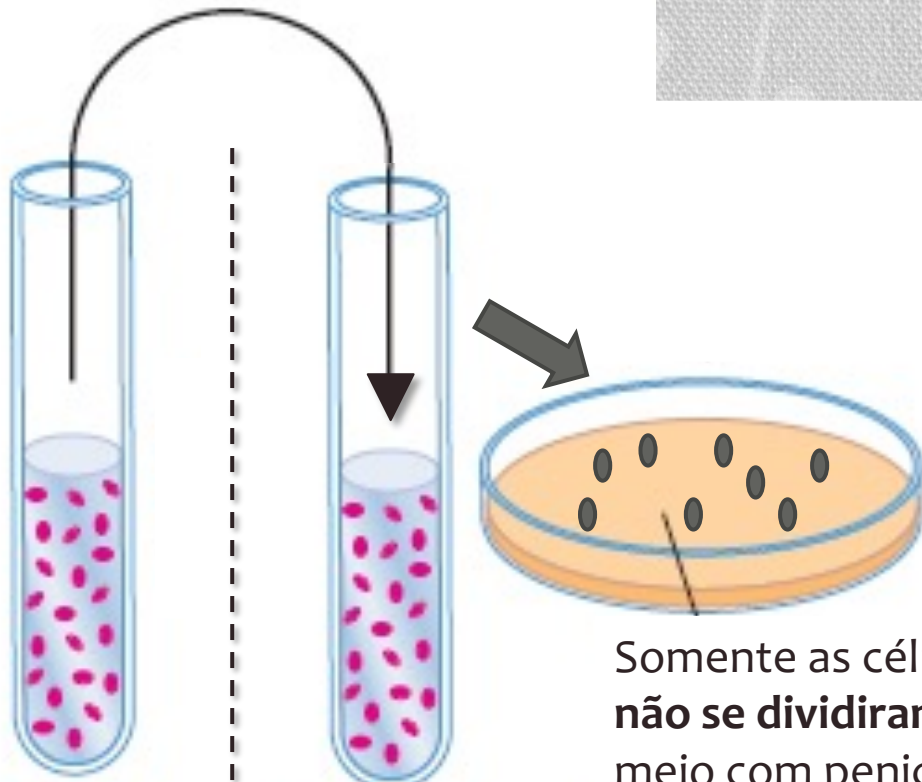
Processo de Varredura de Auxotróficos Nutricionais

A seleção por antibióticos permite a identificação de auxotróficos

A penicilina mata somente as células em **crescimento ativo** (divisão celular)

As **mutantes**, por precisarem da adição de um certo nutriente no meio, o qual são incapazes de sintetizar, **não irão se dividir**

Células selvagens são mortas



Células selvagens + mutantes
Meio sem o aa + penicilina

Mutantes
Meio com o aa

Somente as células que **não se dividiram** no meio com penicilina sobreviveram ao tratamento

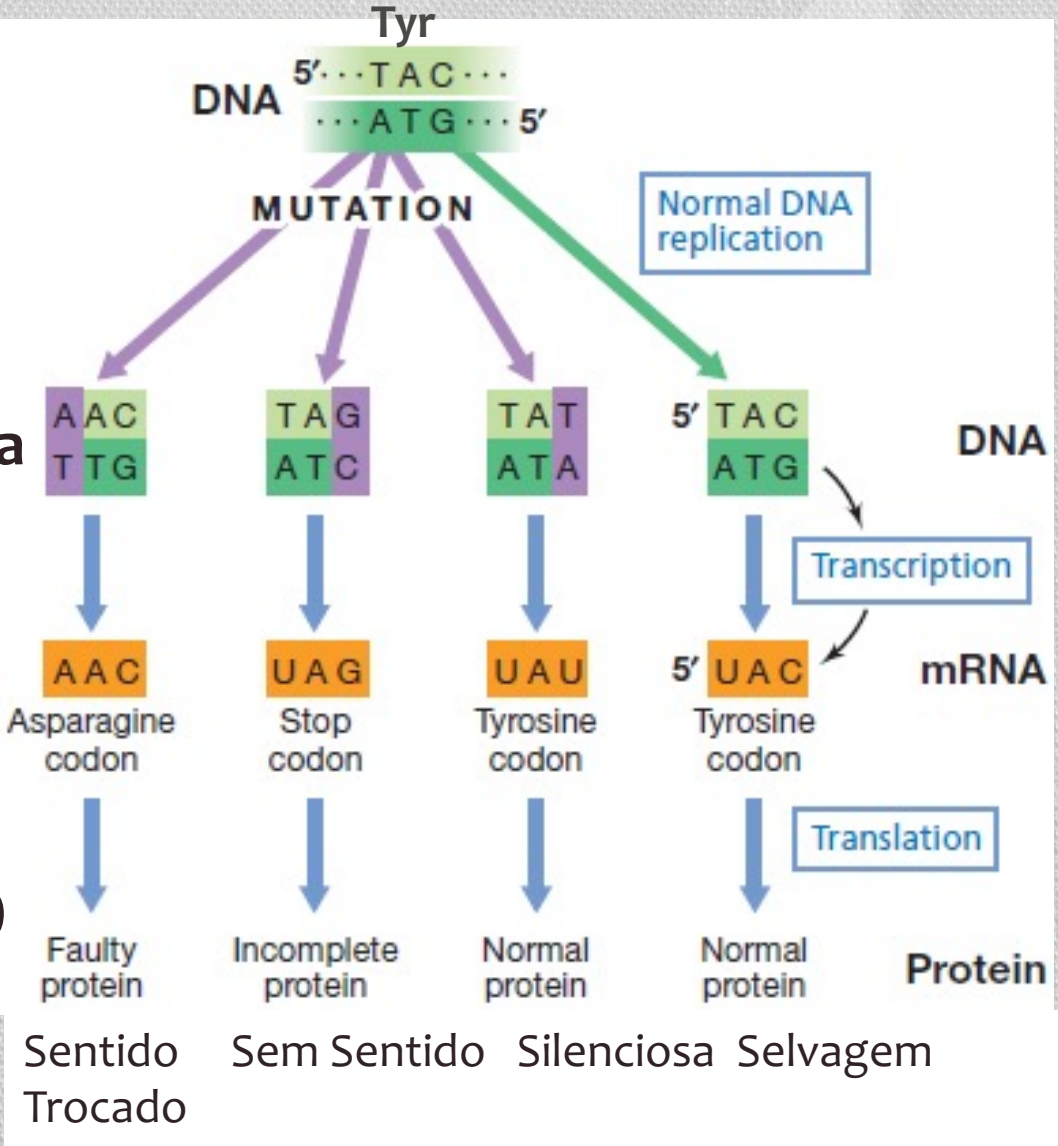
Mutações Pontuais

Mutações de uma única base

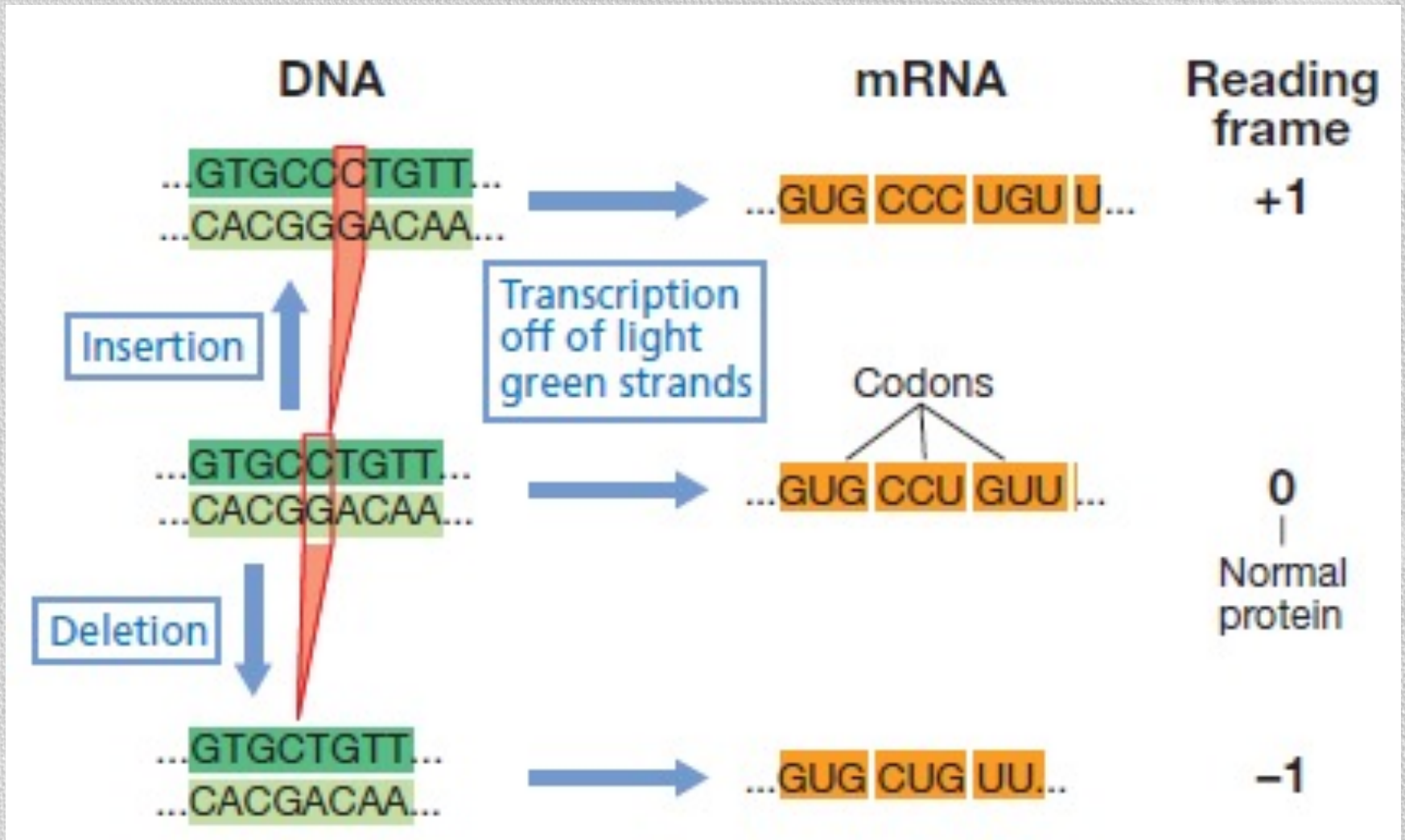
Troca de bases dentro de um códon, ou seja, **preservando a fase de leitura**

Tipo de Substituição

- 1. Transição
 - Purina – Purina (A ou G)
 - Pirimidina – Pirimidina (C ou T)
- 2. Transversão
 - Purina – Pirimidina
 - Pirimidina - Purina



Inserção ou Deleção de Uma ou mais bases



O Que são Elementos móveis?

DNA Móvel: elementos de transposição

Segmentos de DNA capazes de se mover como unidades, alterando sua localização com relação ao observado na molécula de DNA original

Características

- São encontrados em todos os organismos vivos
- Conseguem deslocar de um lugar para outro
- Não possuem origem de replicação
- A frequência de transposição desses elementos varia entre 1/1000 e de 1/10 000 000 movimentações por geração celular

Barbara McClintock (~1931-1955)

experimentos com milho

Nobel de Medicina de 1983

- ❖ “O cromossomo de milho não é estático e sim móvel”;
- ❖ “genes têm a capacidade de se inserirem dentro de outros genes e podem causar:
 - ❖ doenças;
 - ❖ Mudanças morfológicas como a cor
 - ❖

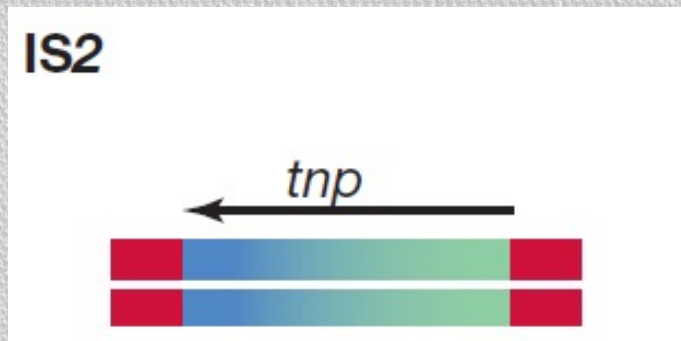


1- <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/noticia/2019/06/quem-foi-barbara-mcclintock-uma-das-maiores-geneticistas-da-historia.html>

2- <https://embryo.asu.edu/pages/barbara-mcclintocks-transposon-experiments-maize-1931-1951>

Exemplo de 2 Elementos Transponíveis

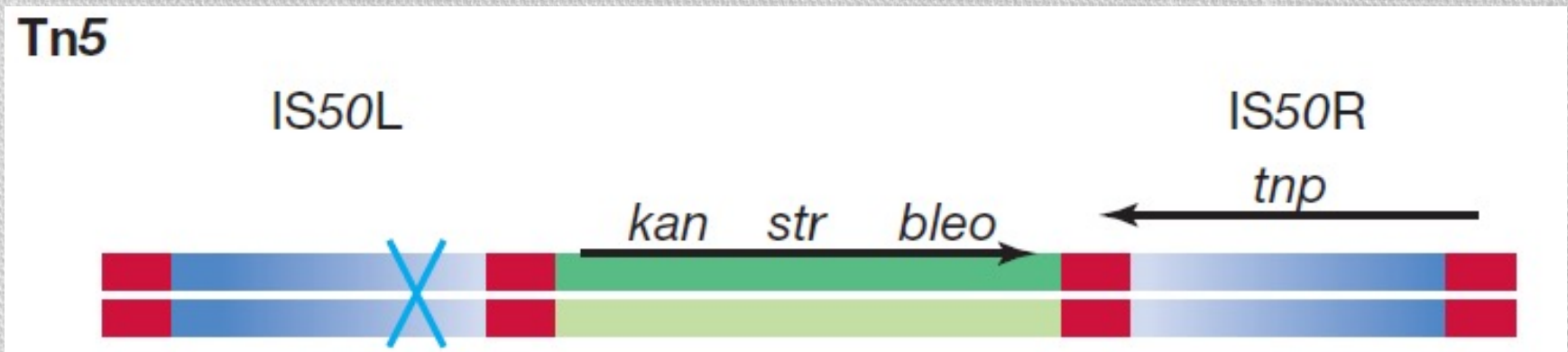
1. IS: Sequência de Inserção



Elemento transponível mais simples

- São curtos (cerca de 1000 pb)
- Repetições invertidas (IR) de 10-50pb
- Possui apenas um gene (transposase)

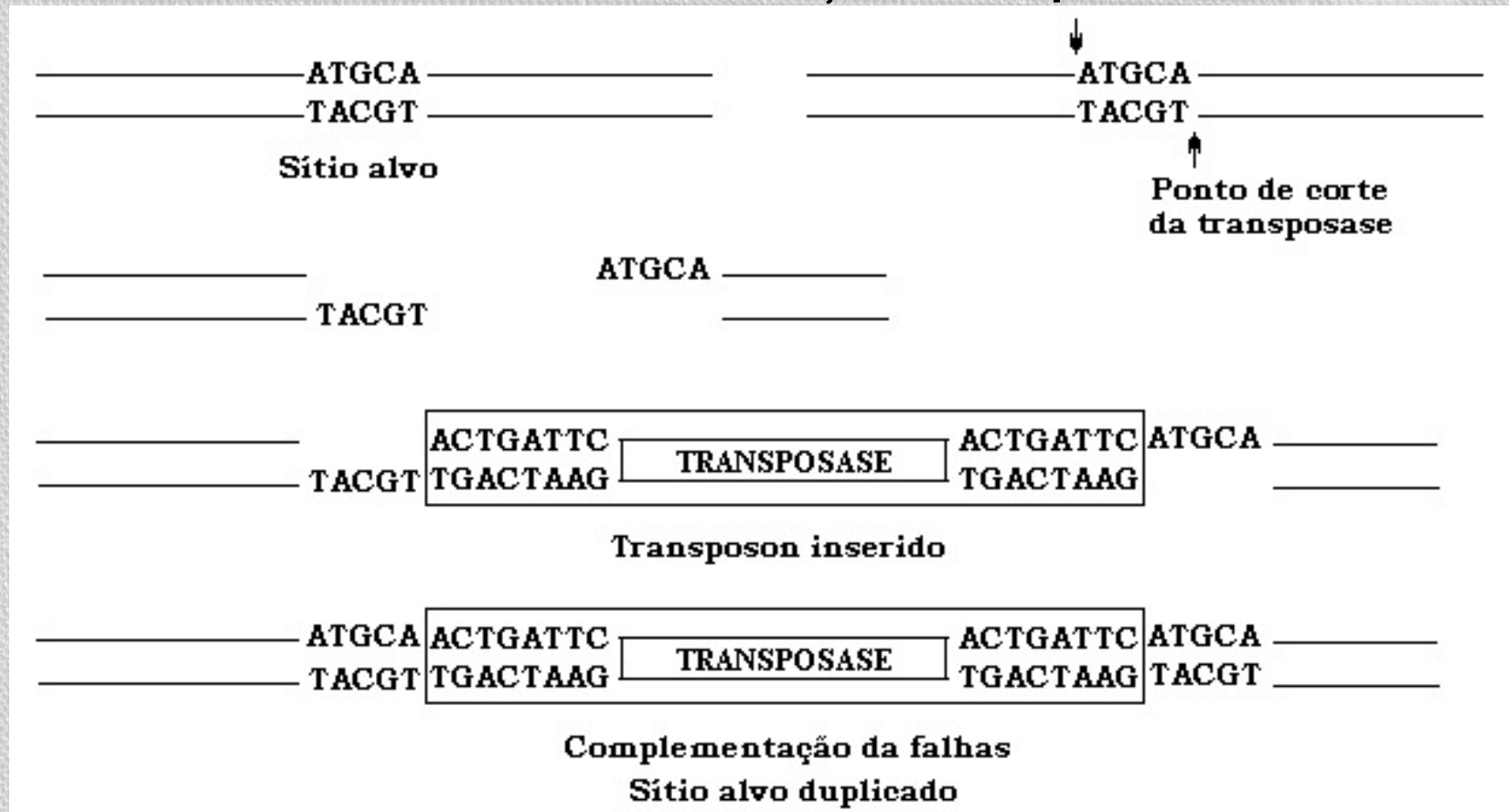
1. Transposição ou transpóson



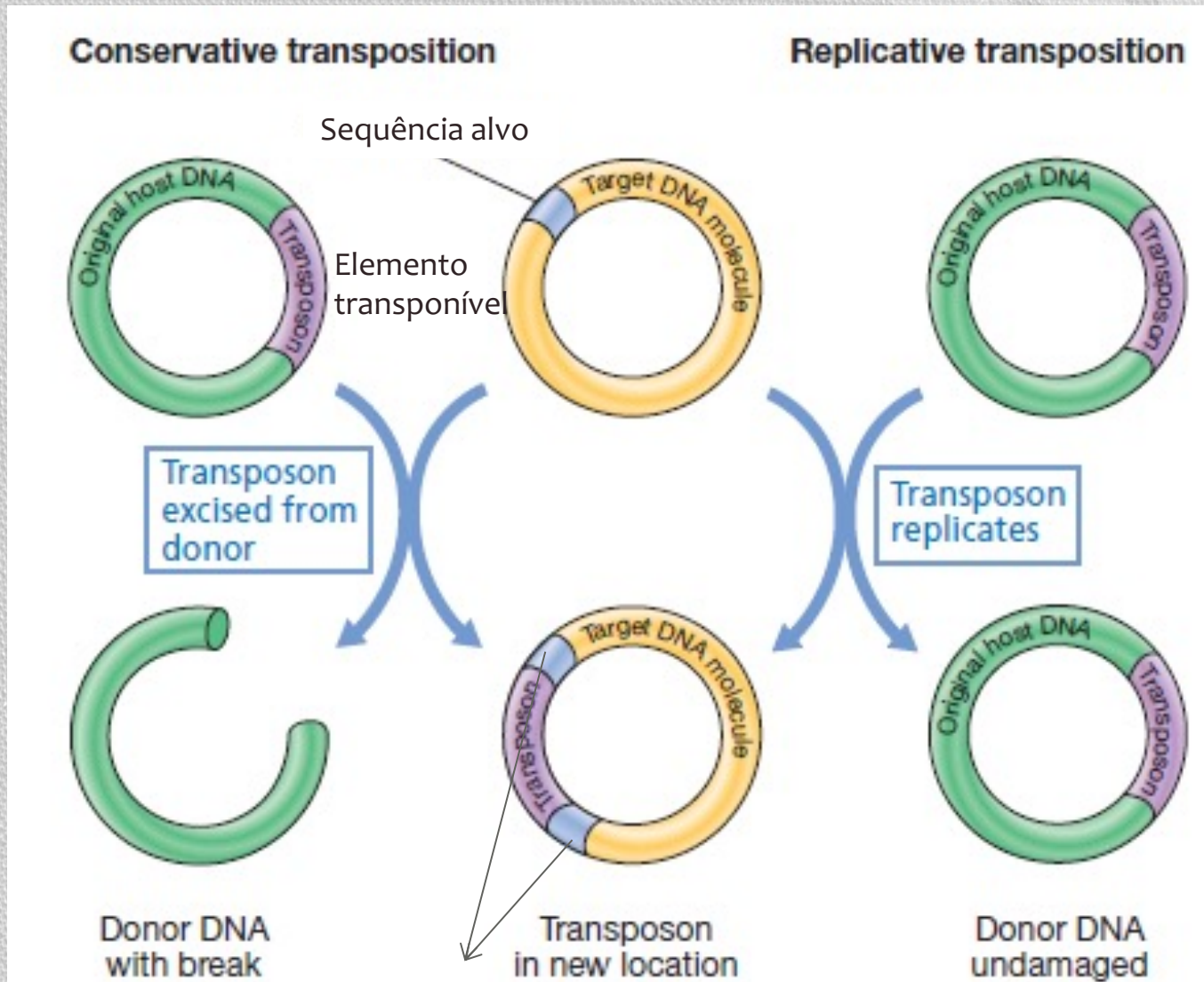
Neste exemplo, a mutação sem sentido na transposase do IS à esquerda (IS50L) faz com que este elemento não consiga fazer transposição sem a atividade da transposase do IS à direita (IS50R)

Mecanismo de transposição

Mecanismo de Recombinação Sítio Específico



Mecanismo de Transposição



Duplicação de uma pequena seq. de DNA, devido à clivagem de fitas simples

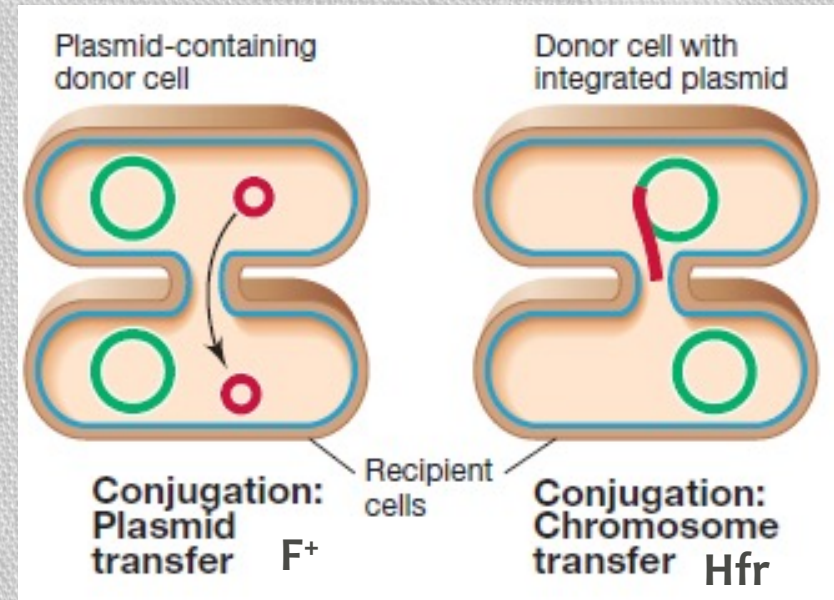
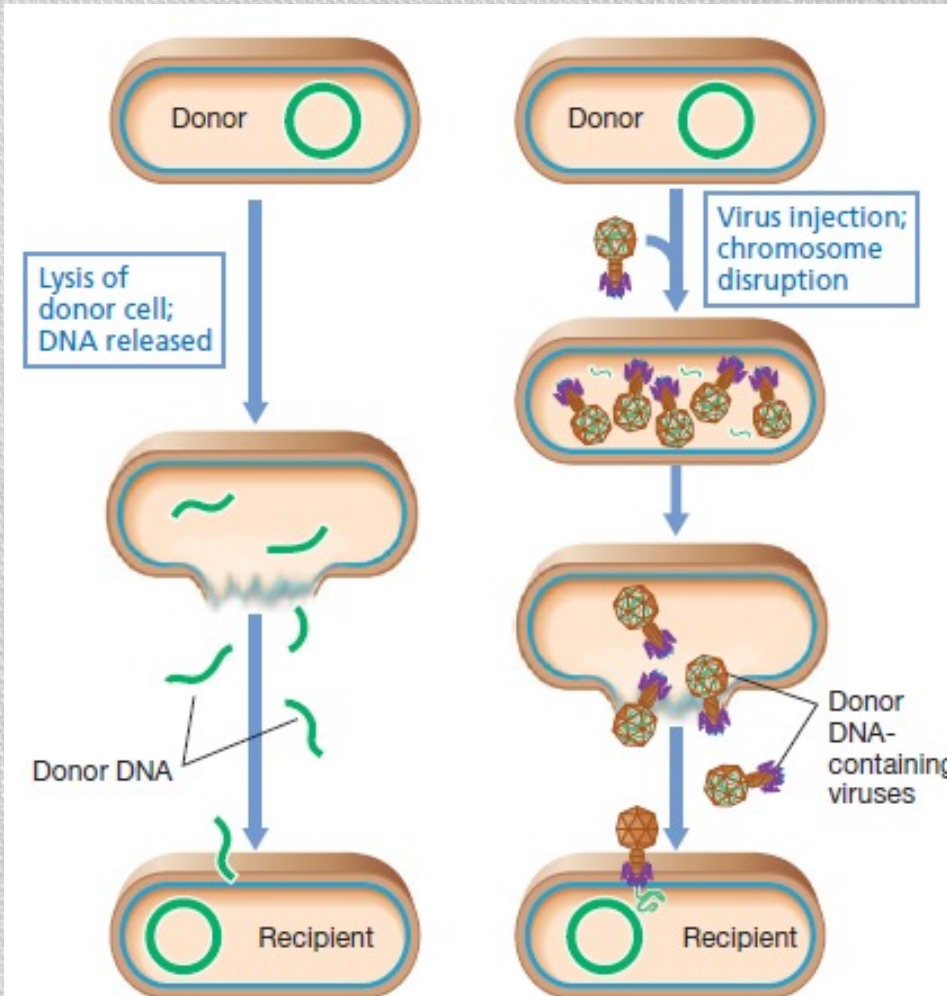
Quais são os mecanismos de Transferência lateral de genes?

Transferência Horizontal em Procariotos

1. Transformação

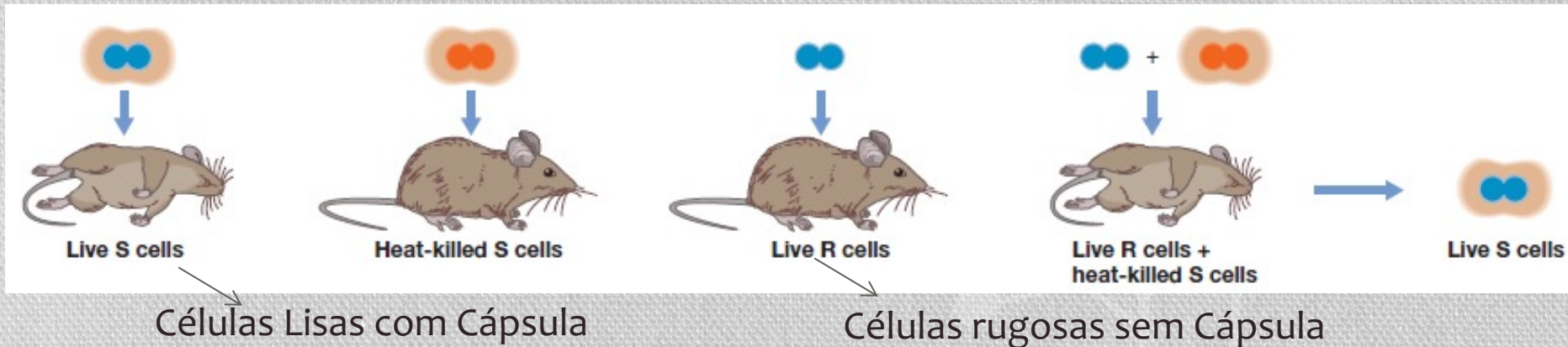
2. Transdução

3. Conjugação



Transformação

Experimento de Griffith com *Streptococcus pneumoniae*



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

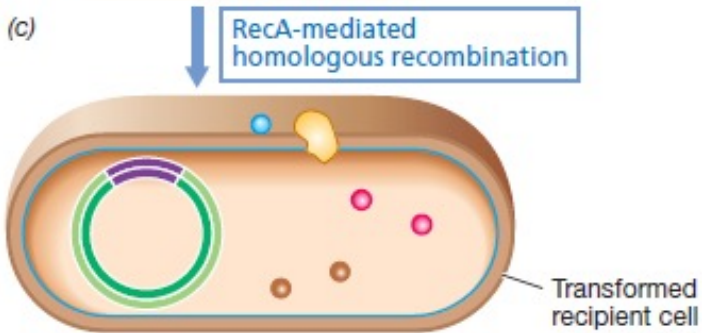
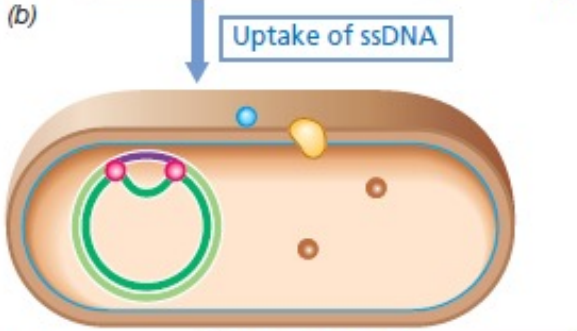
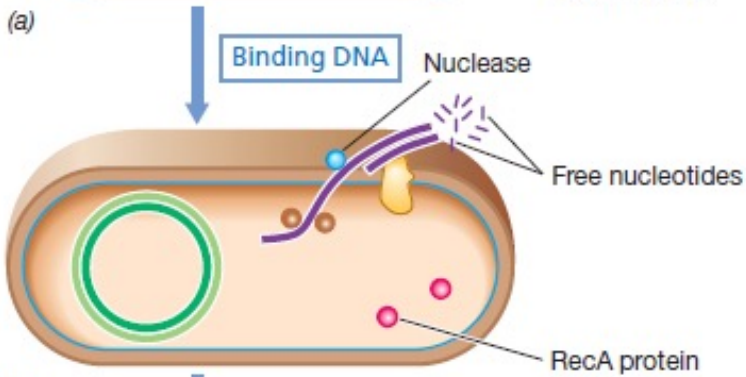
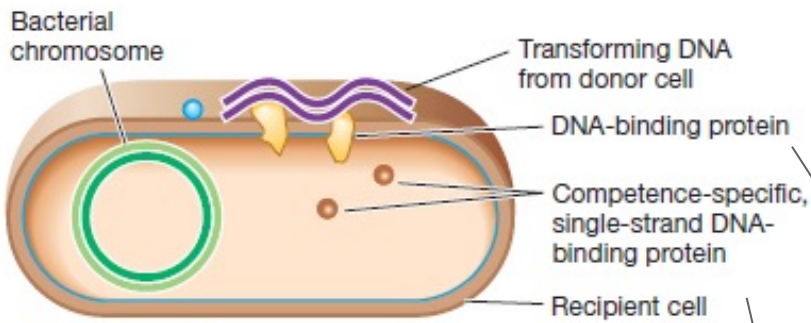
Competência na Transformação

Bactérias naturalmente transformáveis ou **competentes**

- *Bacillus* 20% tornam competentes e permanecem por por várias horas
- *Streptococcus*: durante o ciclo de crescimento 100% ficam competentes

Espécies não competentes podem se tornar competentes em condições de estresse tais como

- Altas concentrações de cloreto de Cálcio
- Eletroporação - aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem

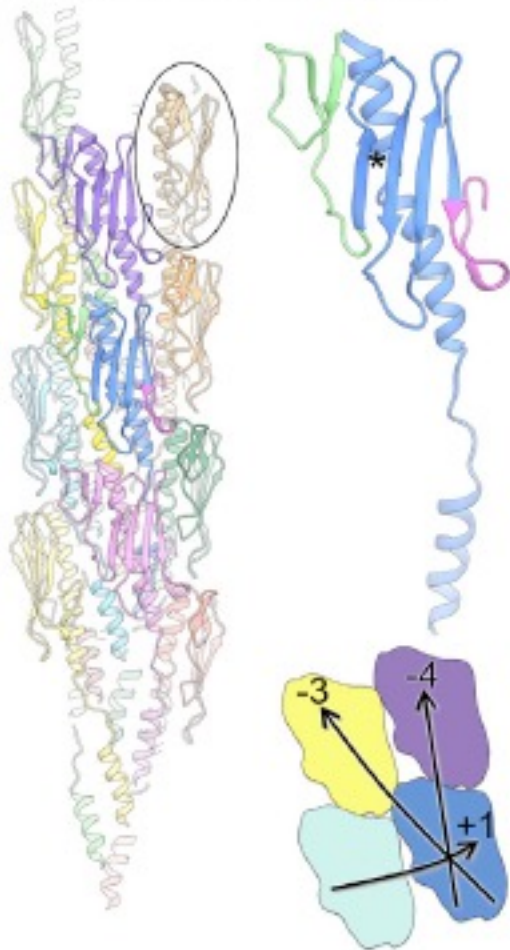


Auto-Transformação

- Em geral são pequenos Fragmentos de DNA
- Internalizar dsDNA ou ssDNA
- Protege o DNA de ser degradado

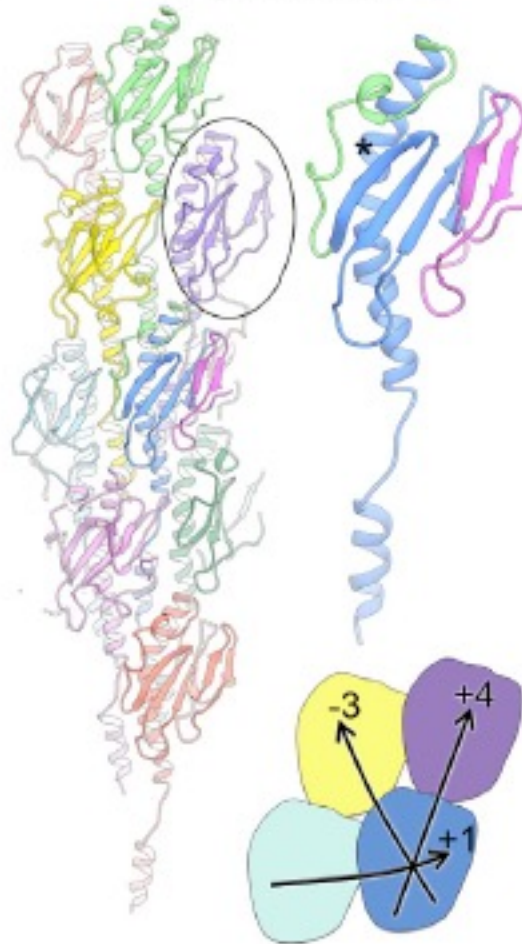
Dilustino IV está envolvido em movimento e

A *P. aeruginosa* strain K



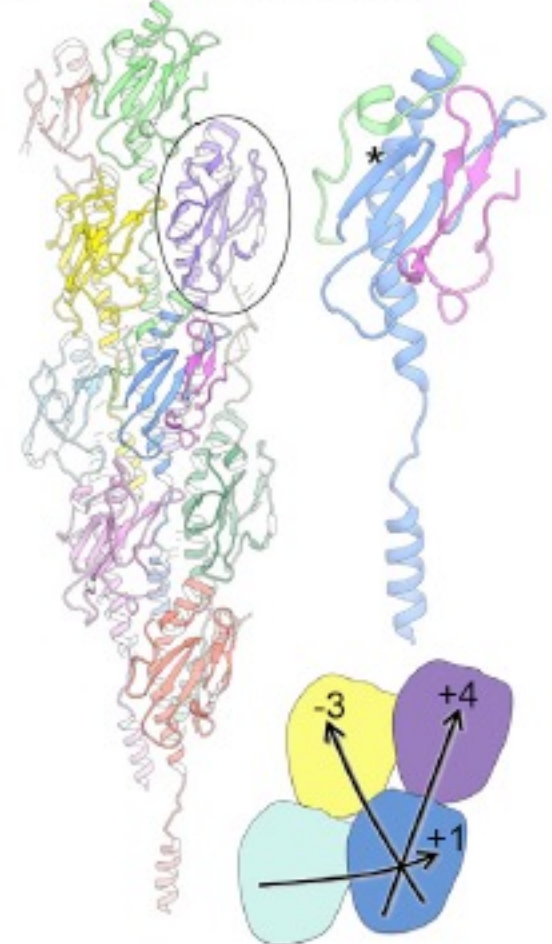
+1: 10.5 Å; 87.6°
-3: 31.5 Å; -98.1°
-4: 42 Å; -10.8°

B *N. gonorrhoeae*



+1: 10.1 Å; 100.8°
-3: 30.4 Å; -57.6°
+4: 40.5 Å; 43.2°

C *N. meningitidis*



+1: 10.3 Å; 100.8°
-3: 30.9 Å; -57.6°
+4: 41.2 Å; 43.2°

<https://www.youtube.com/watch?v=HGvnrWrudpA>

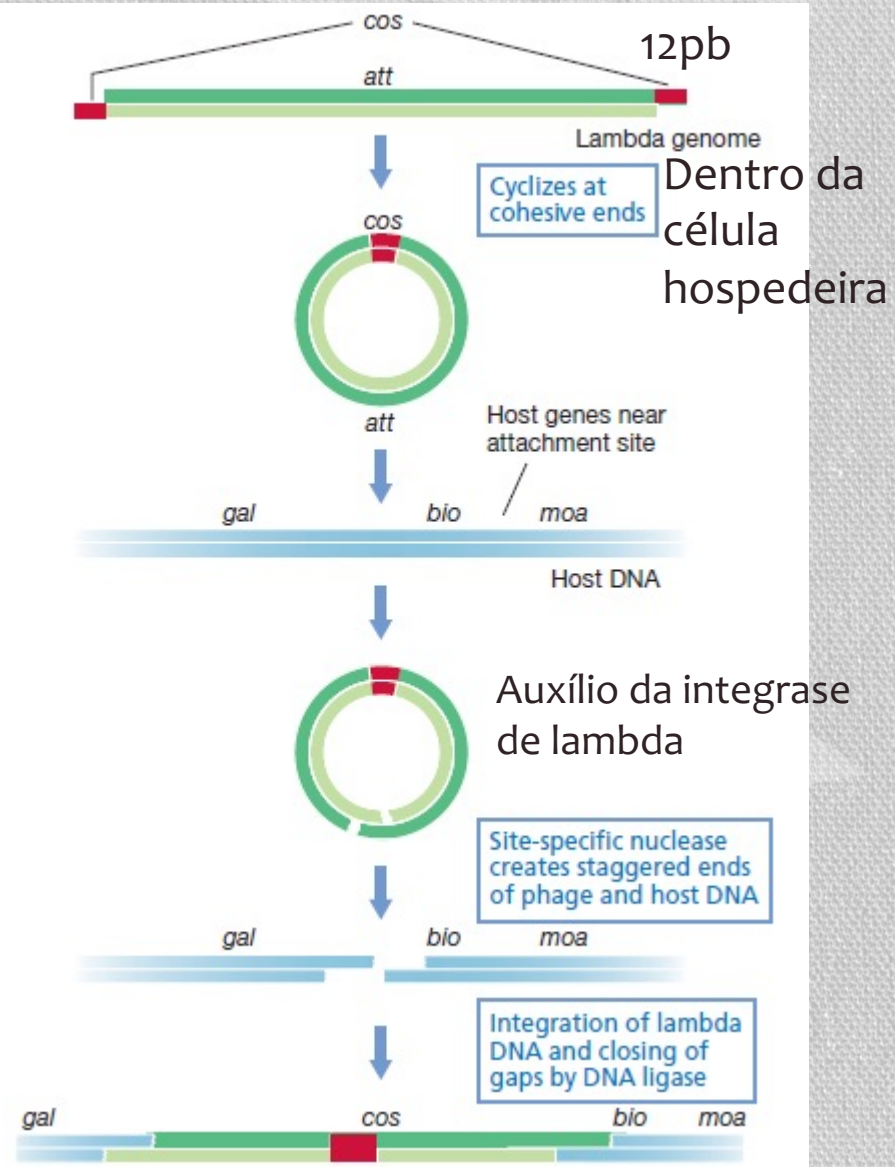
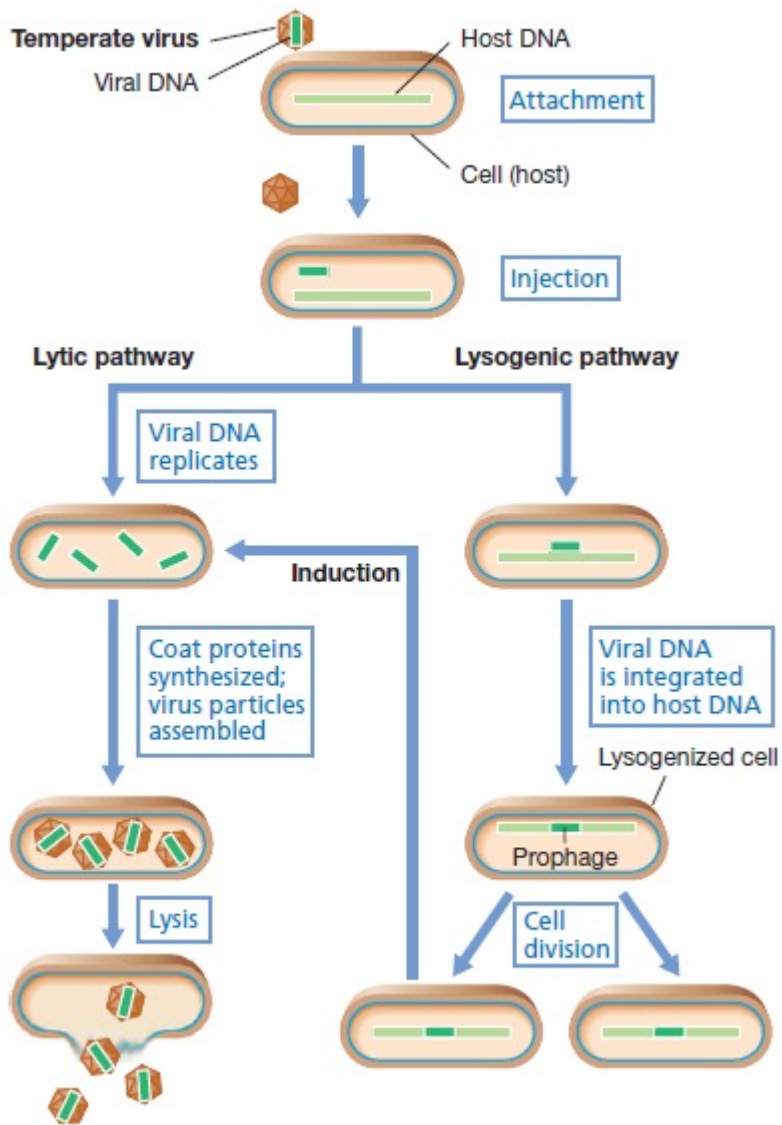
Transdução

1. Transdução Generalizada

1. Transdução Específica

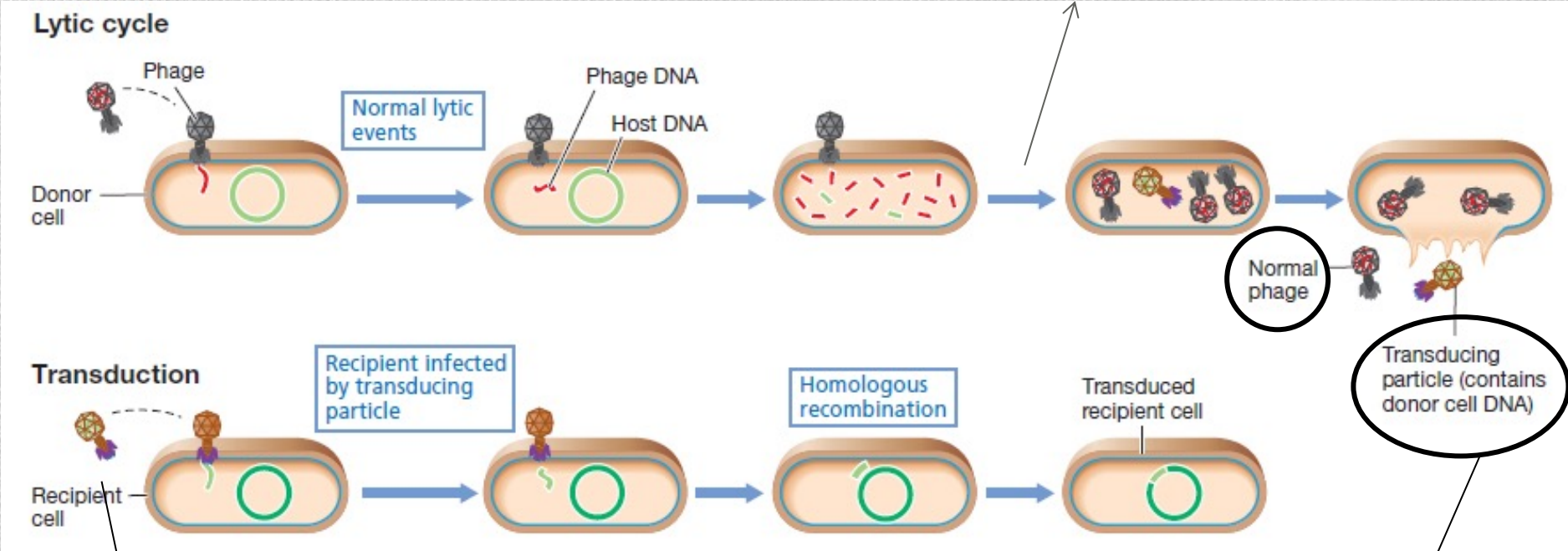


Ciclo Lítico e Via Lisogênico



Transdução Generalizada

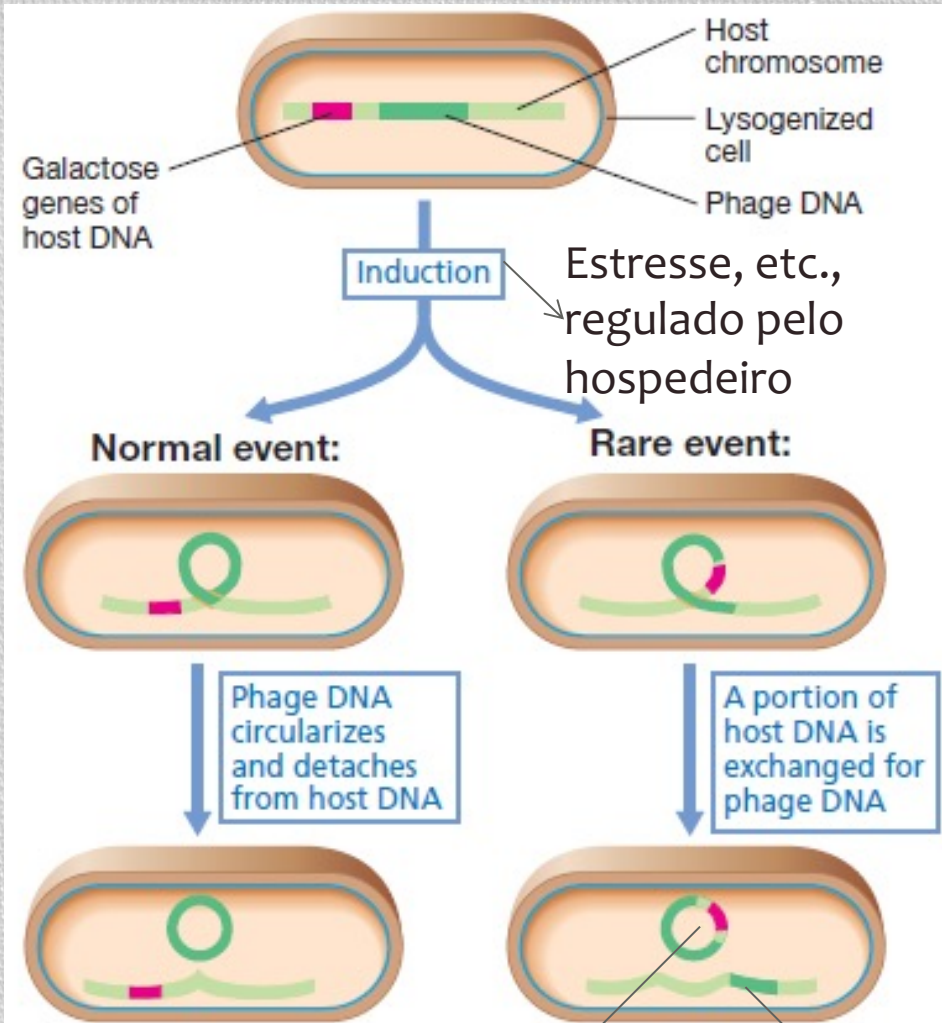
As enzimas envolvidas no empacotamento do DNA viral empacotam erroneamente o DNA hospedeiro



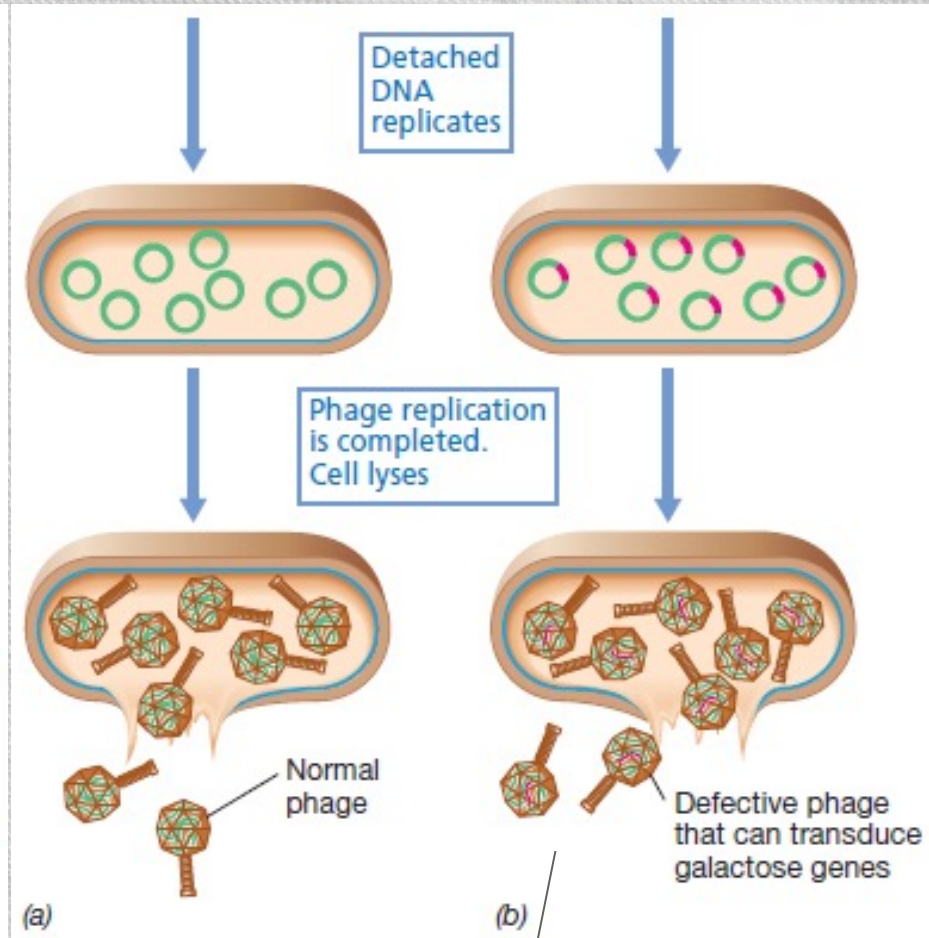
Partículas defeituosas- não promovem infecção viral

A parcela dos vírus que são partículas transfectoras carregam um fragmento do DNA genômico

Transdução Específica



Gene de galactose Parte do DNA viral fica



DNA viral suficiente para que forme o capsídeo, lise e lisogénia

Conjugação

Transferência genética entre duas células que envolve contato entre uma célula **doadora** e uma célula **receptora**

- Detalhes do mecanismo de transferência dependem do plasmídeo envolvido
- A maioria das bactérias Gram-negativas usam mecanismo semelhante ao do plasmídeo F de *Escherichia coli*
- O plasmídeo pode ser replicado e/ou integrado ao cromossomo da célula hospedeira
- A integração é frequentemente mediada por sequências de inserção (IS) que também são encontradas na célula do hospedeiro

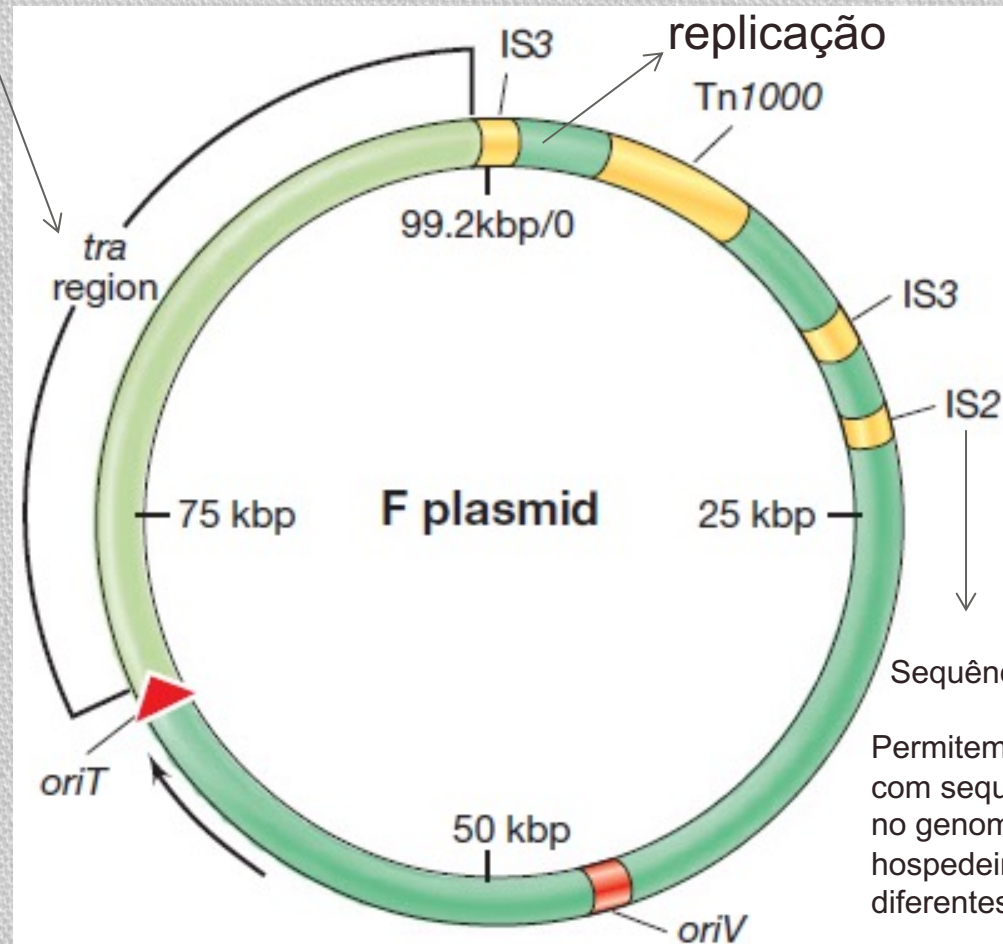
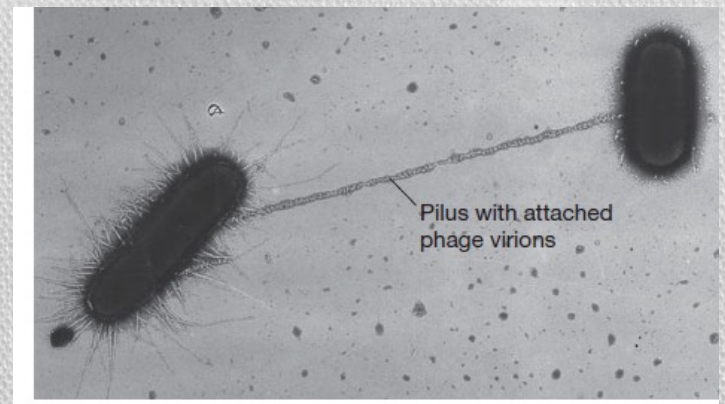
Plasmídeo F

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

Genes envolvidos na formação do par conjugante

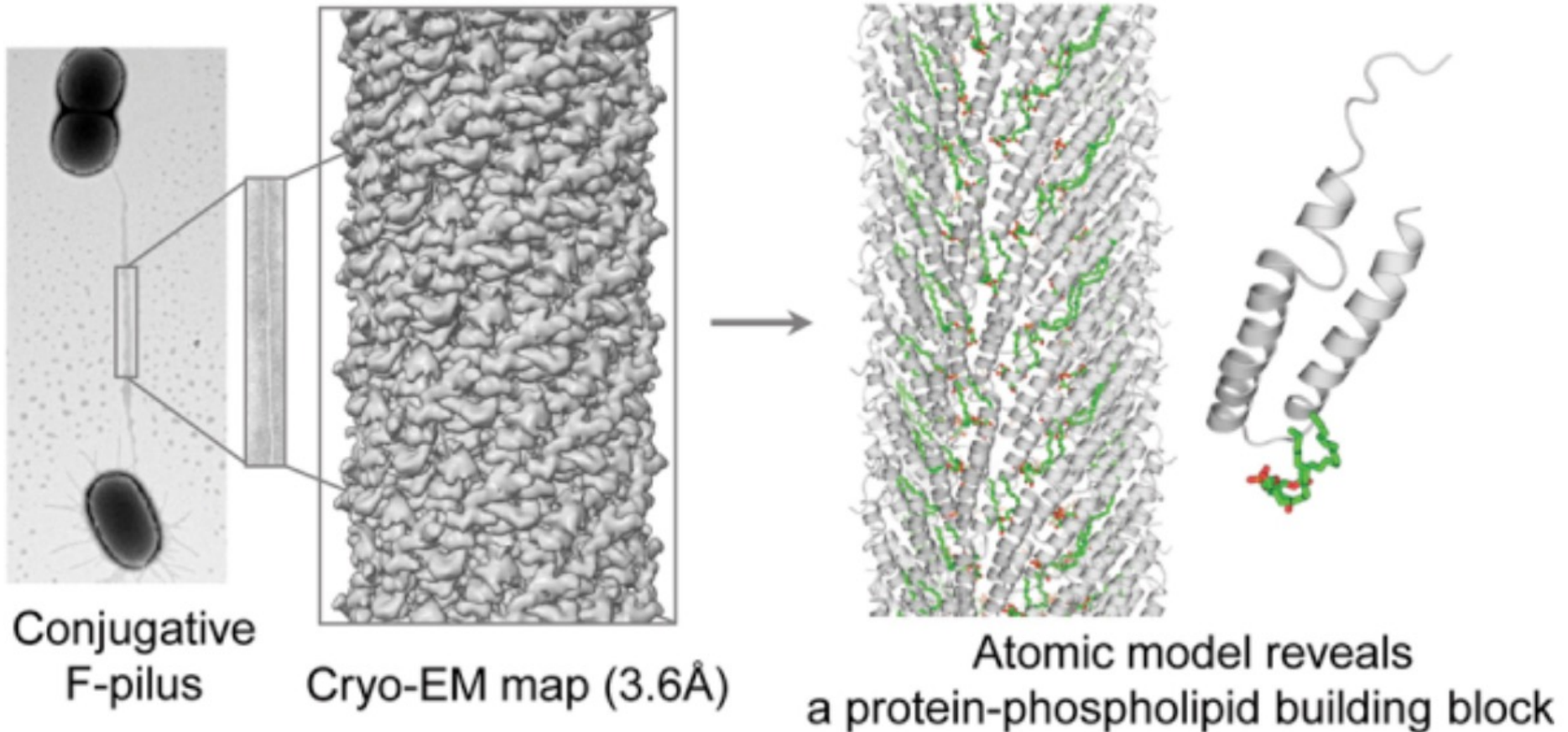
Os plasmídeos podem carregar genes para versões ligeiramente diferentes do pili

Origem de transferência



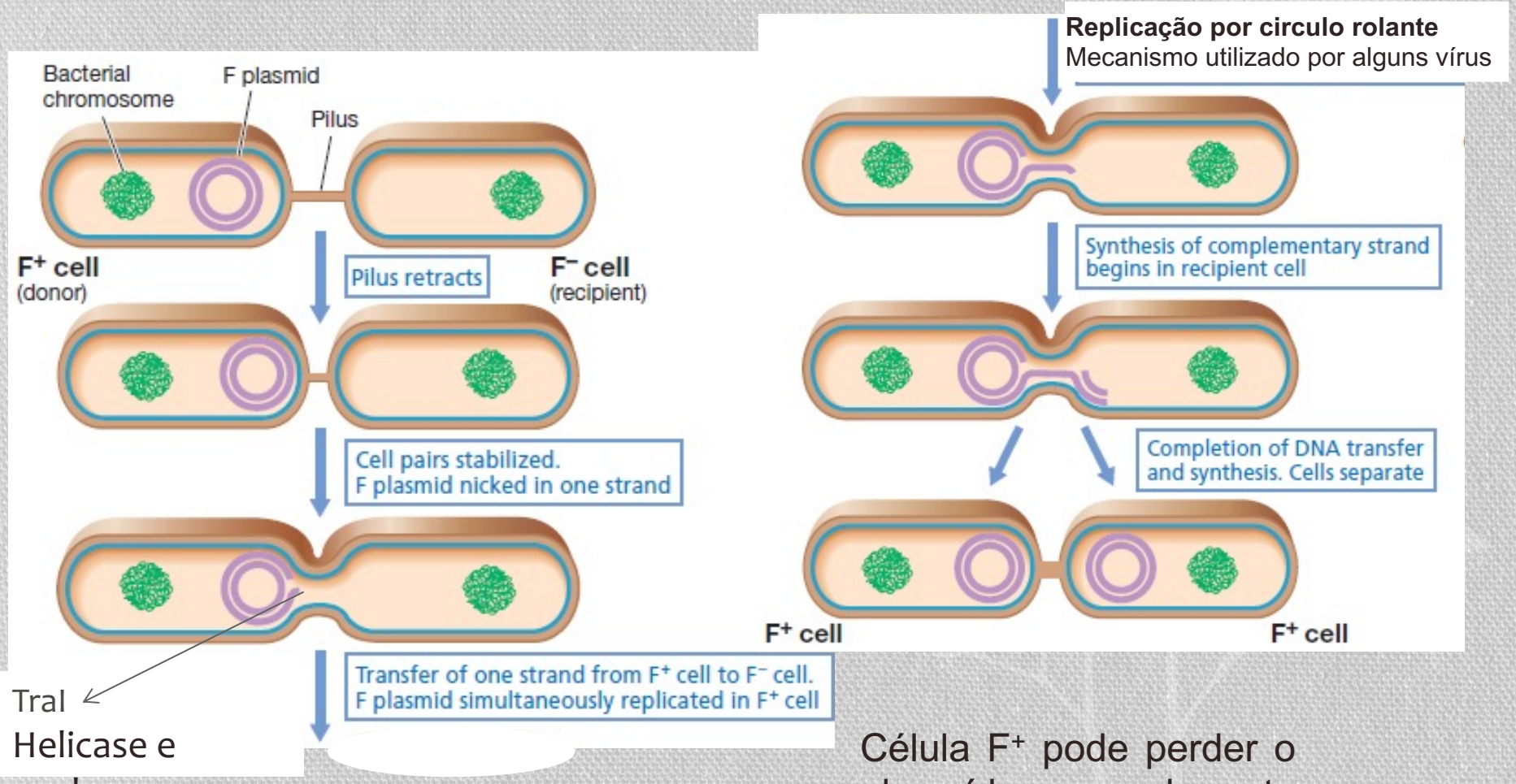
Sequências de inserção
Permitem a recombinação com sequências similares no genoma da célula hospedeira, gerando diferentes linhagens Hfr

Exemplo de aparato transferência do DNA



Transferência do DNA Plasmidial por Conjugação

- Processo que leva 5min (plasmídeo de 100 kp)
- Consegue se dissimular rapidamente: **agente infeccioso**

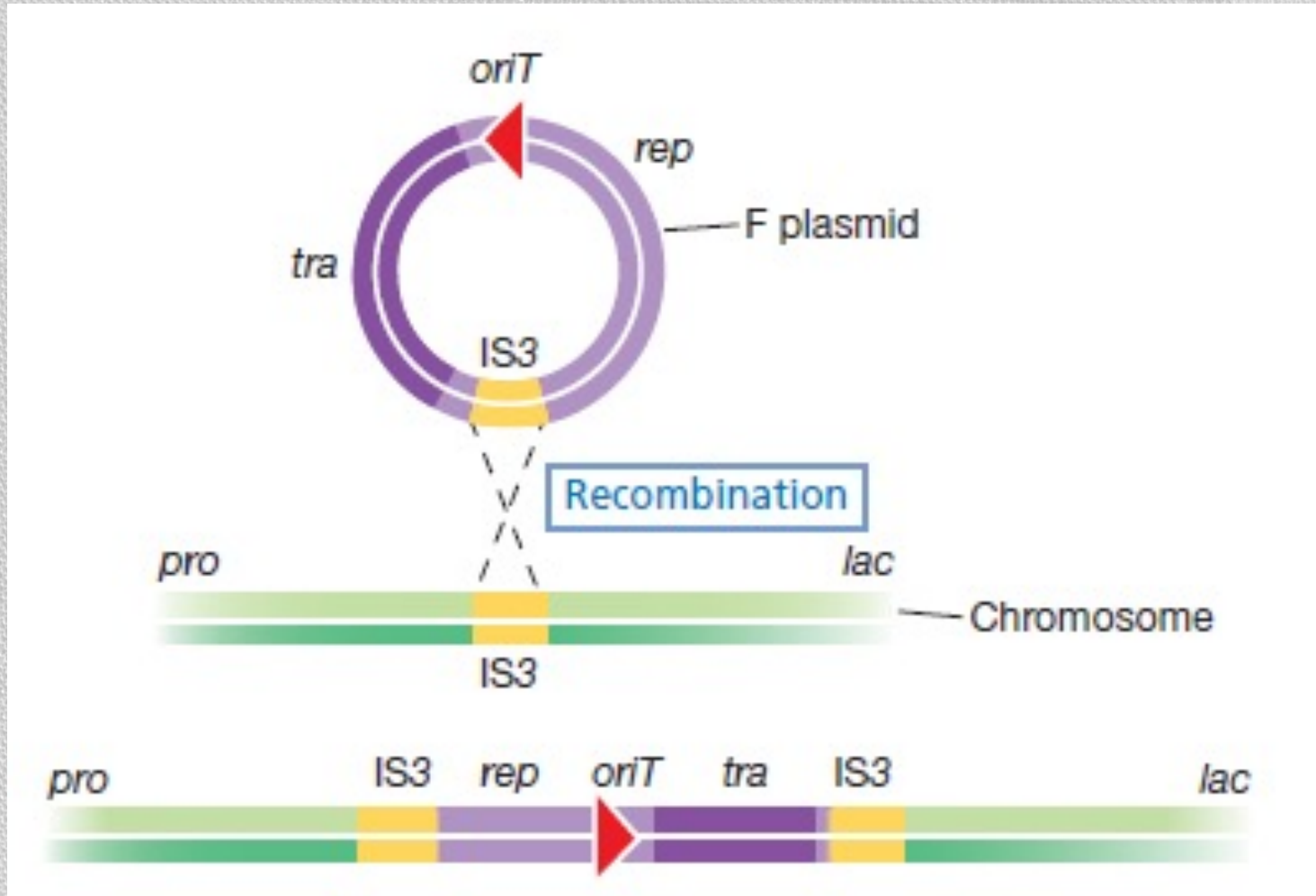


Tral
Helicase e
nuclease

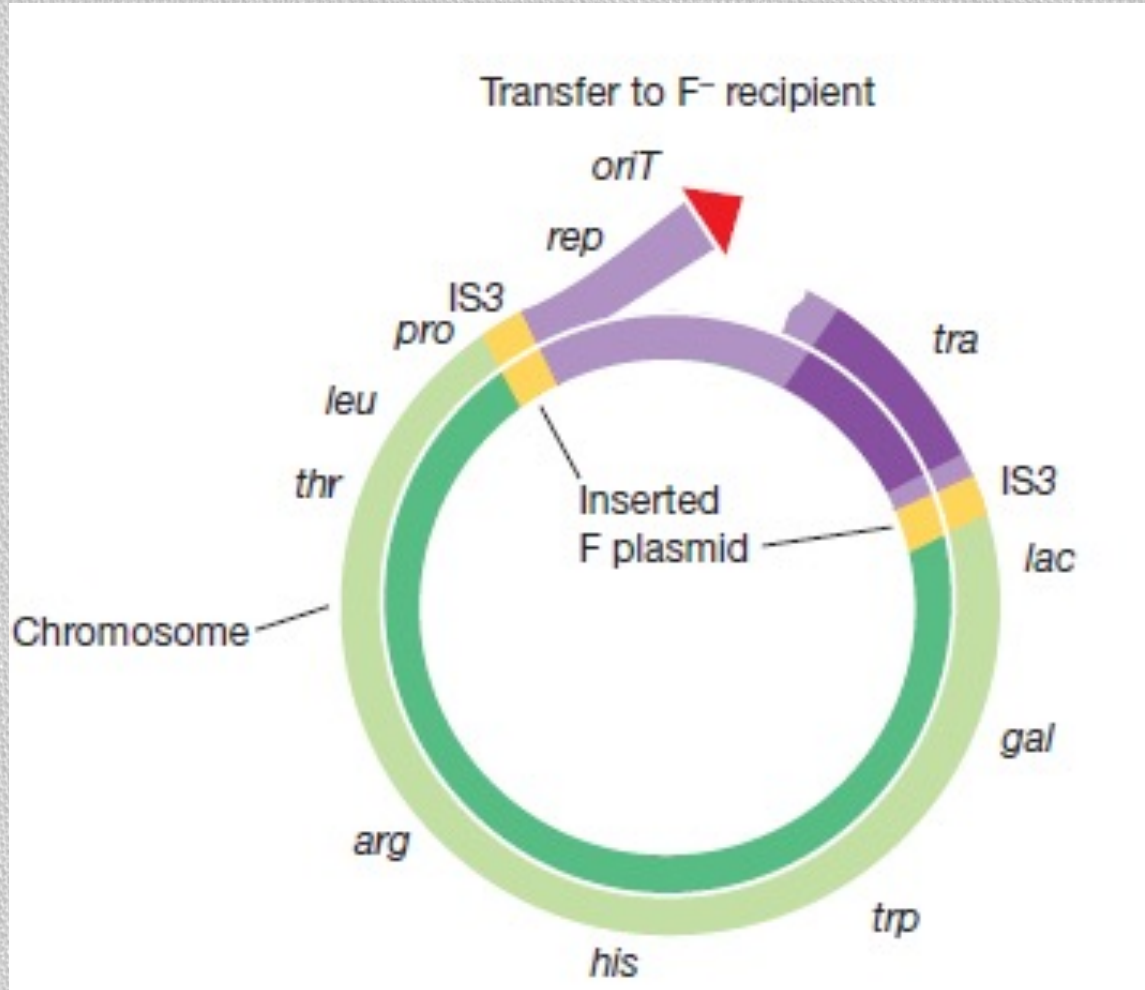
Célula F⁺ pode perder o plasmídeo quando este não é mais necessário

Processo de integração do plasmídeo F (Hfr)

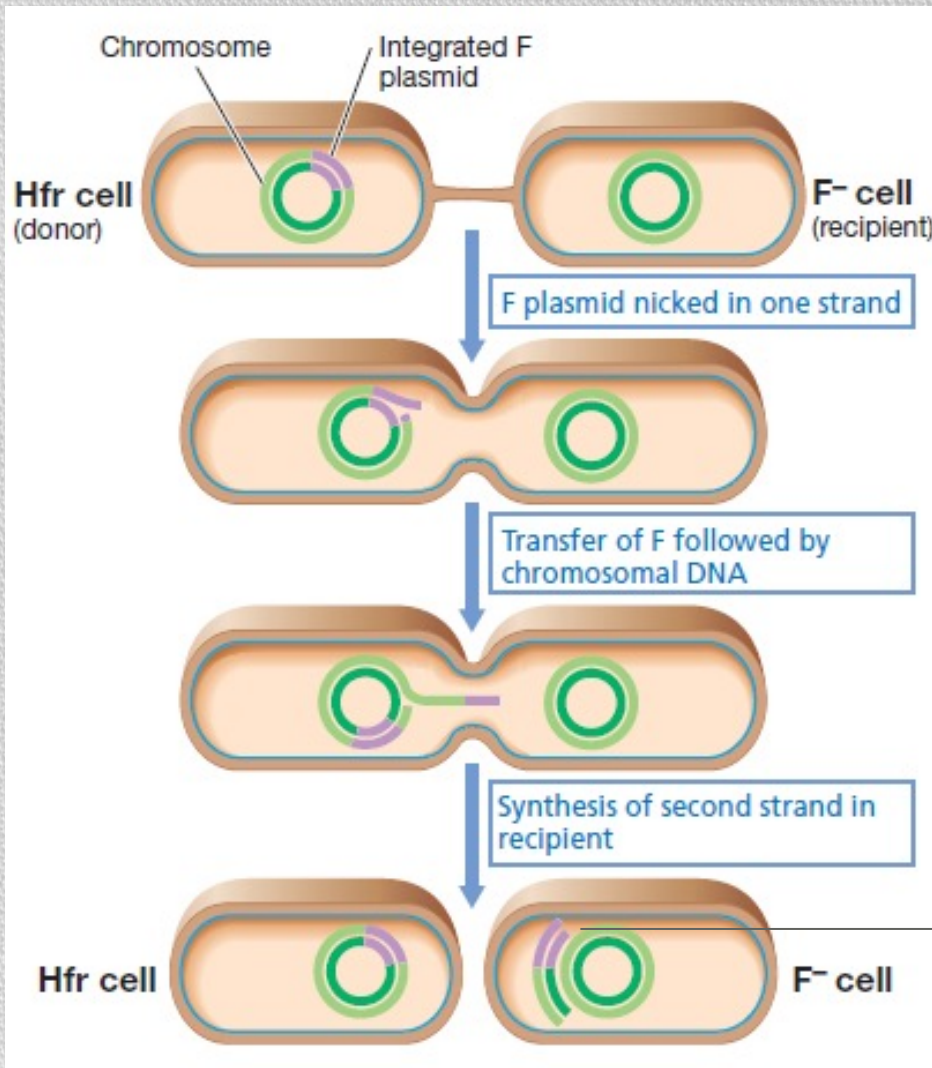
Mobilização Cromossomal: Recombinação Sítio específica



Transferência de genes cromossomais por uma linhagem Hfr



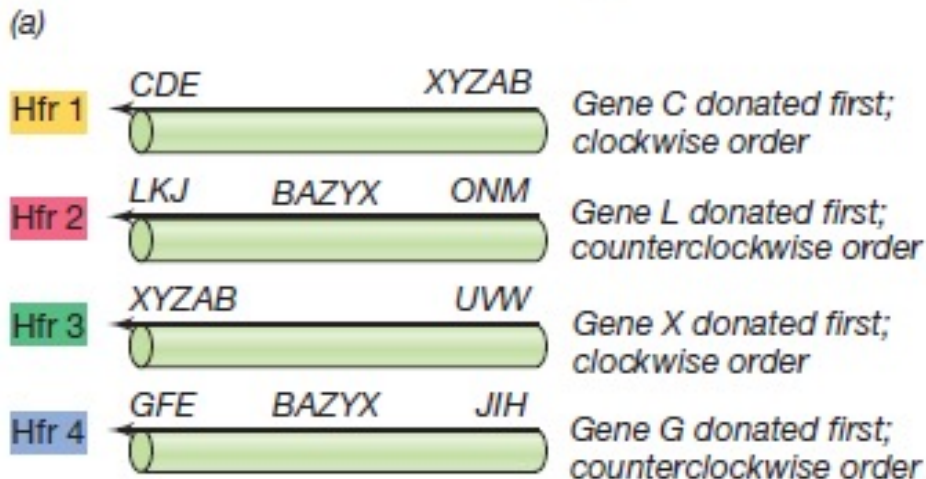
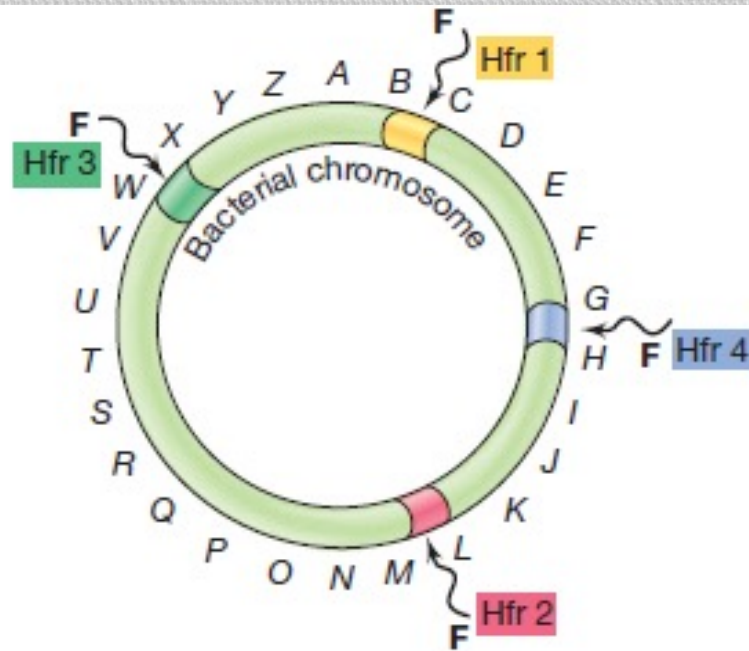
Transferência de alguns genes cromossomais por conjugação



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

→ Tem que ser integrado no cromossomo da célula

Formação de Diferentes Linhagens Hfr



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

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⁺ ou Hfr?
- Mutação de sentido trocado pode causar que tipo de 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. Porquê?

Perguntas

- Na transfecção específica, 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?

Referências

- Microbiologia de Brock (13a. Edição)
 - **Capítulo 10:** Genética de bactérias e arqueas
 - Unidade 3: Biologia Molecular e Expressão Gênica

