

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Medicina Veterinária
Disciplina de Microbiologia Fundamental

GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

Prof. Dr. Ricardo L. M. de Sousa

SUMÁRIO

1. Organização genômica
2. Expressão gênica
3. Mecanismos de transferência genética
4. Operon
5. Aplicações em Biotecnologia



ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

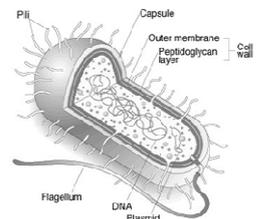
- A célula procariótica

- cromossomo único, circular, dupla fita, no nucleóide

- DNA extra-cromossomal ⇒ plasmídeos

- uso de quase todo genoma na codificação e regulação (ausência de seqüências redundantes)

- colinearidade ⇒ genes → produtos protéicos



ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Prokaryotic Chromosomes

- Many prokaryotes contain a single circular chromosome.
- Prokaryotic chromosomes are condensed in the nucleoid via DNA supercoiling and the binding of various proteins (HU, IHF).
- Because prokaryotic DNA can interact with the cytoplasm, transcription and translation occur simultaneously.
- Most prokaryotes contain only one copy of each gene (i.e., they are haploid).
- Nonessential prokaryotic genes are commonly encoded on extrachromosomal plasmids.
- Prokaryotic genomes are efficient and compact, containing little repetitive DNA.

Eukaryotic Chromosomes

- Eukaryotes contain multiple linear chromosomes.
- Eukaryotic chromosomes are condensed in a membrane-bound nucleus via histones.
- In eukaryotes, transcription occurs in the nucleus, and translation occurs in the cytoplasm.
- Most eukaryotes contain two copies of each gene (i.e., they are diploid).
- Some eukaryotic genomes are organized into operons, but most are not.
- Extrachromosomal plasmids are not commonly present in eukaryotes.
- Eukaryotes contain large amounts of noncoding and repetitive DNA.

Griswold, 2008

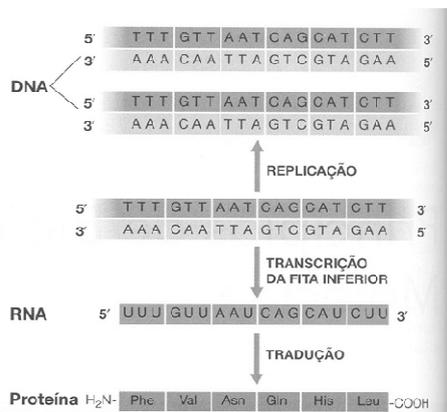
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Genome size comparison

Species	Chromosomes	Genes	Base pairs
 Human (<i>Homo sapiens</i>)	46 (23 pairs)	28-35,000	3.1 billion
 Mouse (<i>Mus musculus</i>)	40	22.5-30,000	2.7 billion
 Puffer fish (<i>Fugu rubripes</i>)	44	31,000	365 million
 Malaria mosquito (<i>Anopheles gambiae</i>)	6	14,000	289 million
 Fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	8	14,000	137 million
 Roundworm (<i>C. elegans</i>)	12	19,000	97 million
 Bacterium* (<i>E. coli</i>)	1	5,000	4.1 million

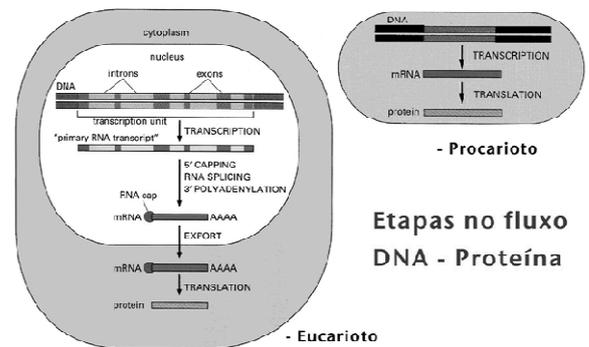
Blumberg, 2004

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA



Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA



- Procaríoto

Etapas no fluxo
DNA - Proteína

- Eucarioto

8

Garland Science, 2008

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

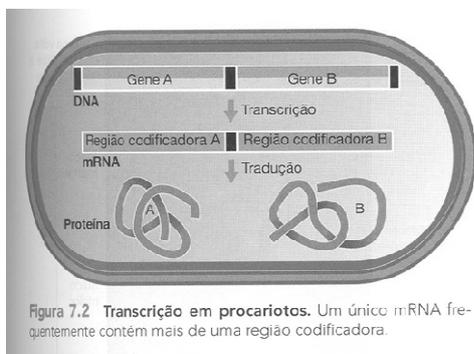
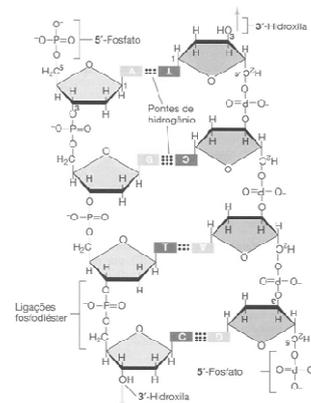


Figura 7.2 Transcrição em procariotos. Um único mRNA frequentemente contém mais de uma região codificadora.

9

Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

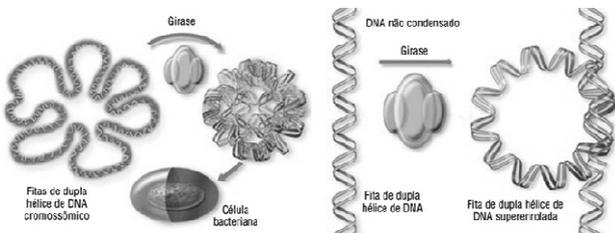


10

Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

- DNA superenovelado (supercoiled): DNA girase \Rightarrow $4,6 \times 10^6$ pb esticados em 1mm = 1000 vezes > célula, mas ocupa 10% do volume celular

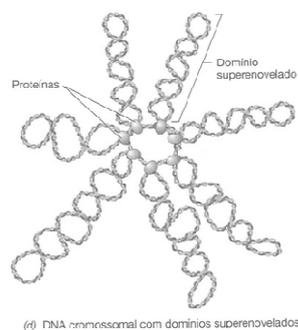


11

Griswold, 2008

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

- DNA girase (topoisomerase)



(r) Fita cromossômica com domínios superenovelados

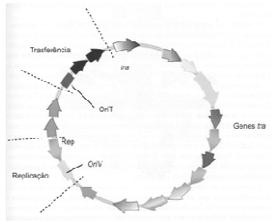
12

Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

• Plasmídeos

- alguns com genes de transferência (conjugativos) ⇨ conjugação → plasmídeo F ou plasmídeos tipo-F
- capacidade de integração ao cromossomo
- plasmídeos de resistência (R)



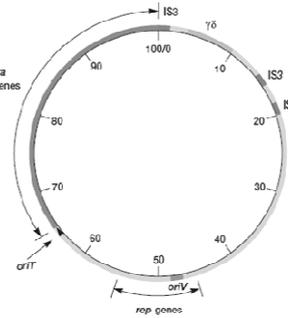
17

Tortora et al., 2005

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

• Plasmídeos F

- IS2 e IS3: seqüências de inserção
- $\gamma\delta$: transposon (Tn1000)
- tra genes: síntese de pilus e conjugação
- rep genes: replicação de DNA
- oriV: início de replicação para DNA circular
- oriT: início da replicação círculo-rolante e transferência gênica



18

Prescott, 2008

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

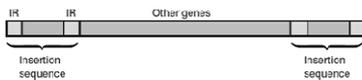
• Elementos transponíveis

Insertion sequence



- Seqüências de inserção: seqüências curtas (750 a 1600pb), transposase + repetições invertidas de bases

A composite transposon



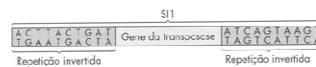
- Transposons compostos: genes: toxinas, resistência a antibióticos, transposase

19

Prescott, 2008

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

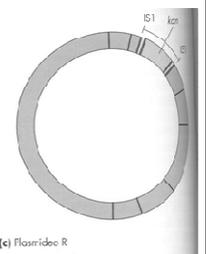
• Transposon



(a) Seqüência de inserção "IS1"



(b) Transposon complexo "Tn5"



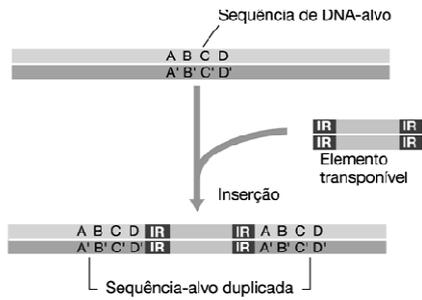
(c) Plasmídeo R

20

Tortora et al., 2005

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

• Transposon

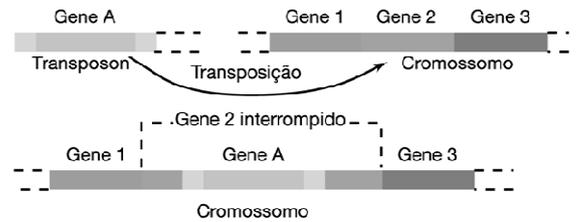


21

Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

• Transposon → Mutagênese



22

Madigan et al., 2010

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Table 13.2 The Properties of Selected Insertion Sequences

Insertion Sequence	Length (bp)	Inverted Repeat (Length in bp)	Target Site (Length in bp)	Number of Copies on <i>E. coli</i> Chromosome
IS1	768	23	9 or 8	6-10
IS2	1,527	41	5	4-13(1) ^a
IS3	1,406	38	3-4	5-4(2)
IS4	1,438	18	11 or 12	1-5
IS5	1,192	16	4	10-11

Table 13.3 The Properties of Selected Composite Transposons

Transposon	Length (bp)	Terminal Repeat Length	Terminal Module	Genetic Markers ^a
Tn2	4,997	38		Ap
Tn301	8,200	38		Hg
Tn331	16,209	Unknown		Lactose utilization
Tn5	5,730		IS50	Km
Tn6	2,500		IS1	Cm
Tn10	9,300		IS10	Tc
Tn603	3,100		IS603	Km
Tn1687	2,051		IS1	Heat-stable enterotoxin
Tn3917	11,000		IS7	Arginine biosynthesis

23

Prescott, 2008

EXPRESSÃO GÊNICA

TRANSCRIÇÃO

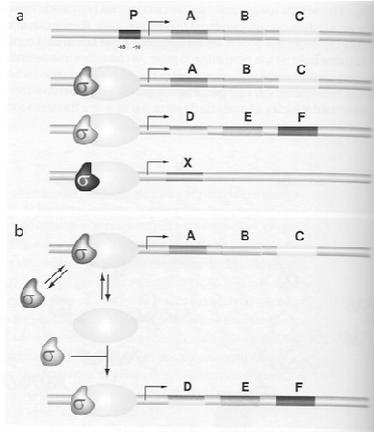
Tabela 7.3 Fatores sigma de *Escherichia coli*

Nome ^a	Sequência consenso de reconhecimento a montante ^b	Função
σ^{70} RpoD	TTGACA	Para a maioria dos genes, principal fator sigma durante o crescimento normal
σ^{54} RpoN	TTGGACA	Assimilação de nitrogênio
σ^{32} RpoH	TNTCNCTTGAA ^c	Principal fator sigma durante a fase estacionária, também para genes envolvidos em respostas oxidativas e osmóticas
σ^{24} RpoE	GAACIT	Resposta ao choque térmico
σ^{28} FliA	TAAA	Para genes envolvidos na síntese de flagelos
σ^{32} RpoE	GAACIT	Resposta a proteínas dobradas incorretamente no periplasma
σ^{24} FecI	AAGGAAAAT	Para certos genes envolvidos no transporte de ferro

Madigan et al., 2010

33

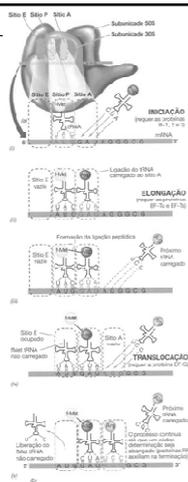
TRANSCRIÇÃO



Marques, 2012

34

TRADUÇÃO

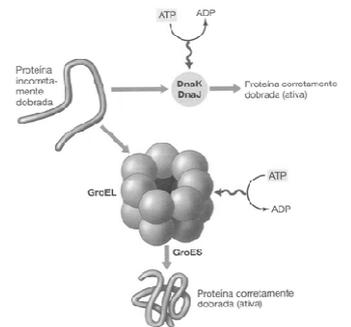


Madigan et al., 2010

35

DOBRAMENTO E SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

- chaperonas moleculares ou chaperoninas: dobramento correto
- maioria: dobramento espontâneo junto com a tradução

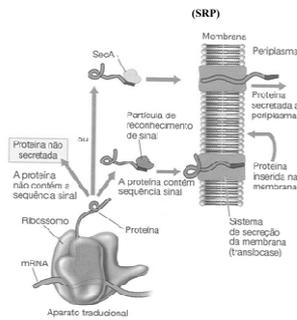


Madigan et al., 2010

36

DOBRAMENTO E SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

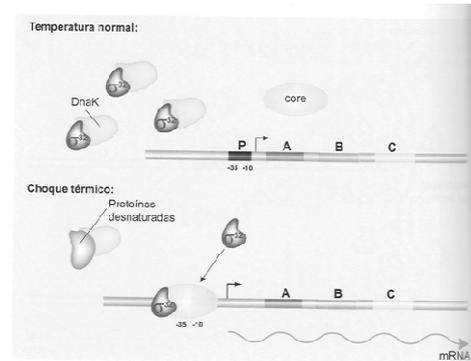
- seqüência sinal: 15 a 20 aa
 - proteína pronta para ser exportada
 - impede o dobramento completo



Madigan et al., 2010

REGULAÇÃO DO FATOR SIGMA 32

- resposta ao choque térmico: sigma 32 e chaperonas

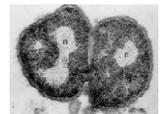


Marques, 2012

MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

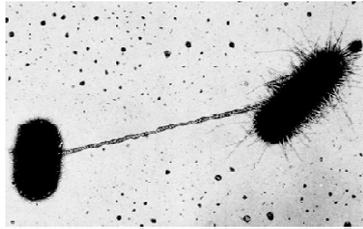
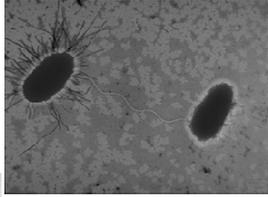
- Conjugação
 - transferência de DNA de uma bactéria para outra, envolvendo o contato entre as duas células: doadora (F+) e receptora (F-)
 - depende de genes localizados no operon *tra* plasmidial: síntese do pilus F (contato) e transferência do DNA plasmidial
 - plasmídeos podem ser integrados ao cromossomo → células *Hfr* (High Frequency of Recombination): 1 em cada 10^5 células



Madigan et al., 2010

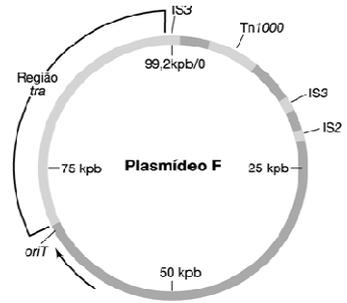
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

- Ponte de Conjugação (Pilus ou Fímbria sexual)



41

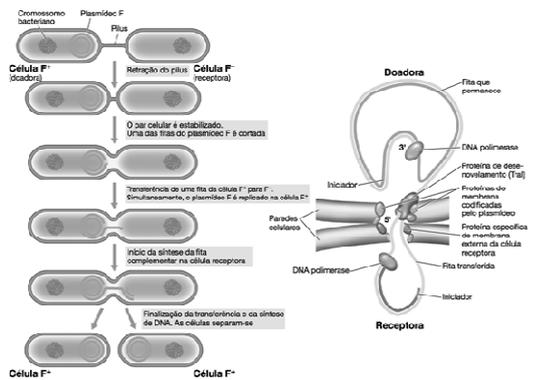
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



42

Madigan et al., 2010

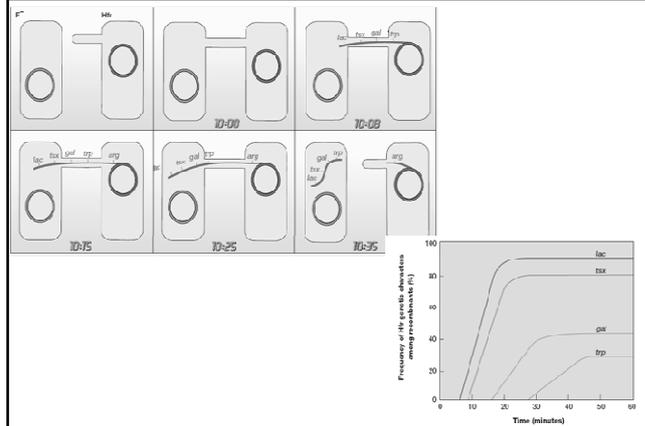
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



43

Madigan et al., 2010

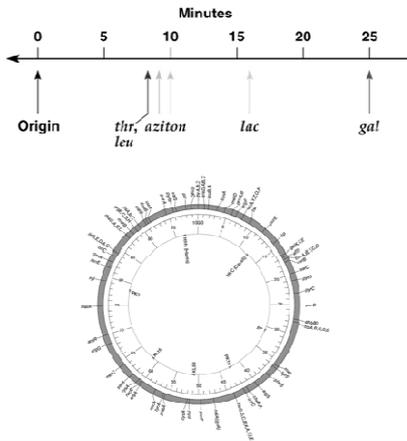
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



44

Prescott, 2008

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



45

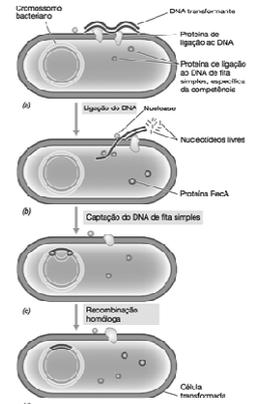
Tortora et al., 2005

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transformação

→ Captação de molécula de DNA ou fragmento do meio e incorporação no genoma da bactéria

→ DNA captado: fita simples (maioria)

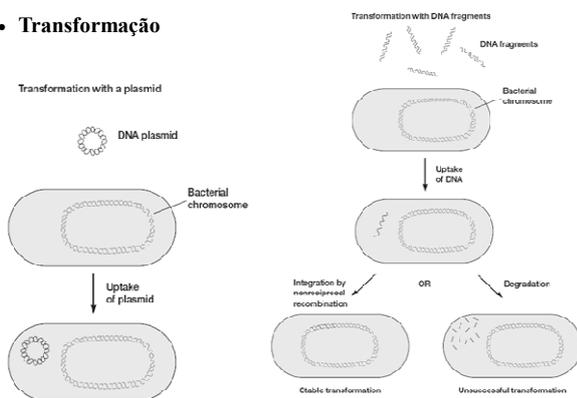


46

Madigan et al., 2010

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transformação

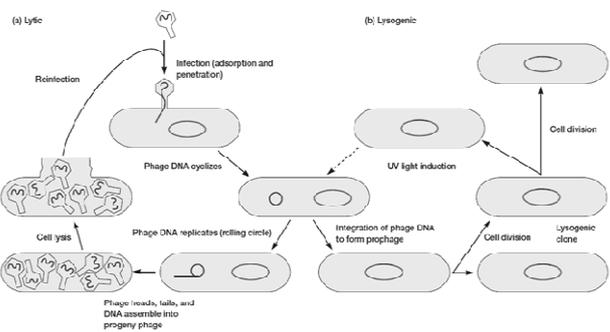


47

Prescott, 2008

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transdução (DNA viral)

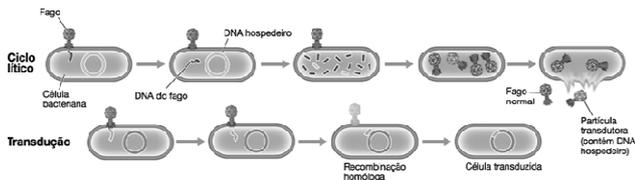


48

Prescott, 2008

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transdução



49

Madigan et al., 2010

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transferência Gênica Lateral ou Horizontal (TGL ou TGH)

- transferência de DNA de uma célula a outra na ausência de divisão celular
- incorporação do DNA no genoma da receptora de maneira que possa ser herdado
- 2 processos: movimentação física do DNA e incorporação no genoma da célula receptora

50

Stokes & Gillings., 2011

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

• Transferência Gênica Lateral ou Horizontal (TGL ou TGH)

Table 1. The collective forces that drive Lateral Gene Transfer

Mechanisms of transfer	Mechanisms of incorporation	Mobile elements*
Conjugation	1 – Autonomous replication	Plasmids ¹ (1)
Transformation	2 – Transposition	Transposons (2)
Transduction	3 – Site-specific recombination	Insertion sequence common regions (2)
	4 – Homologous recombination	Integrative and conjugative elements ¹ (3)
		Gene cassettes (3)
		Integrans ¹

51

Stokes & Gillings., 2011

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

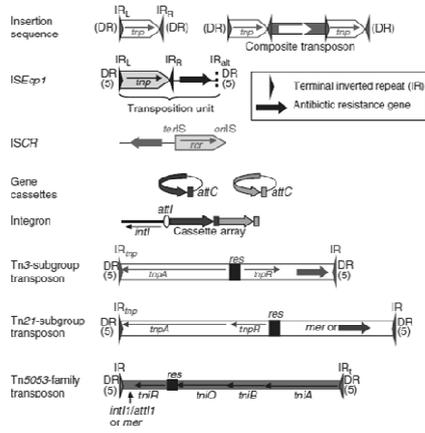
• Transferência Gênica Lateral ou Horizontal (TGL ou TGH)

- **Elemento conjugativo integrante:** elemento integrado que pode se excisar para formar um intermediário de transferência circular replicante; carrega genes para transferência via conjugação de DNA
- **Integron:** segmento de DNA integrado contendo: integrase, um promotor e um sítio de integração para cassetes gênicos
- **Cassetes gênicos:** segmento de DNA não replicante, circular, contendo somente ORFs, faz parte de integrons

52

Stokes & Gillings., 2011

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



53

Partridge., 2011

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA

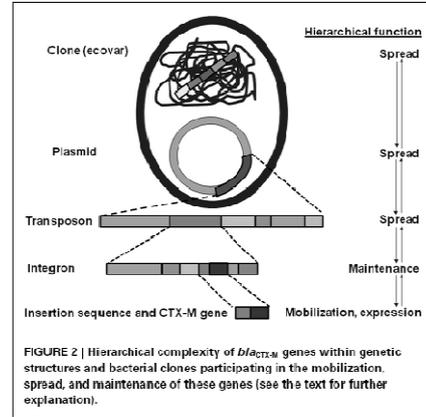
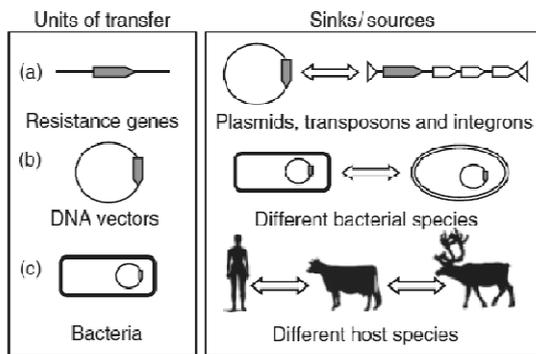


FIGURE 2 | Hierarchical complexity of *bla*_{CTX-M} genes within genetic structures and bacterial clones participating in the mobilization, spread, and maintenance of these genes (see the text for further explanation).

54

Cantón et al., 2012

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA



55

Stokes & Gillings., 2011

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

OPERON

• Expressão gênica

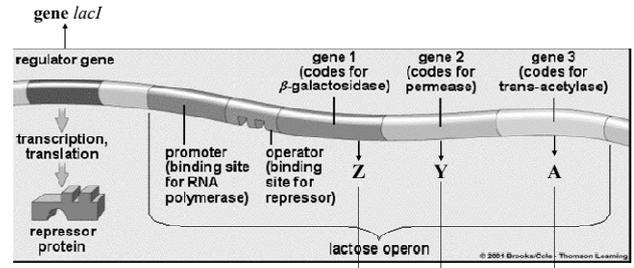
→ Operon: grupo de genes relacionados, transcritos em conjunto → unidade de expressão gênica (genes estruturais + elementos que controlam a expressão). Composto por 3 partes:

- **Promotor:** sítio de ligação da RNA-polimerase
- **Operador:** sítio de ligação de proteínas regulatórias
- **Genes estruturais contíguos**

→ Operon é transcrito em um único mRNA policitrônico (codifica mais de uma cadeia polipeptídica)

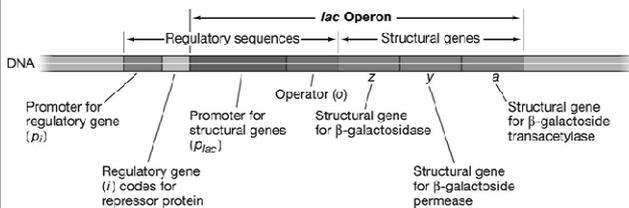
OPERON

• Operon lac ⇒ codifica enzimas utilizadas no catabolismo da lactose (galactose + glicose). Lactose = indutor

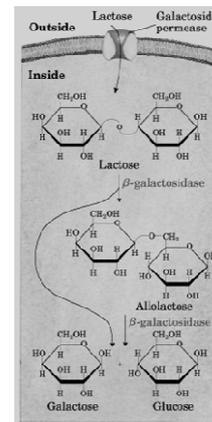


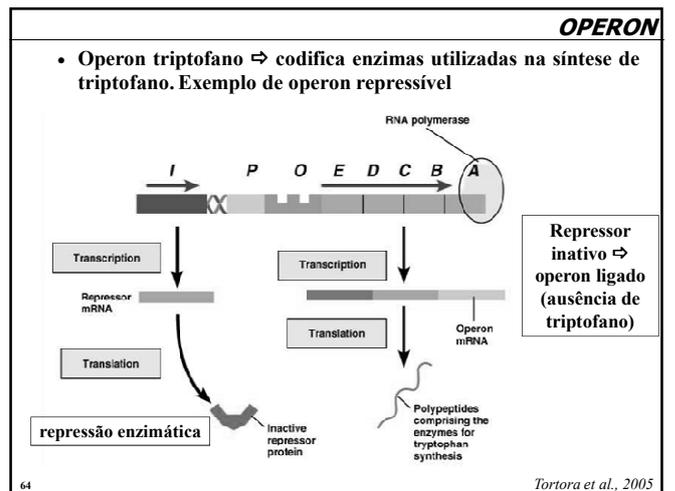
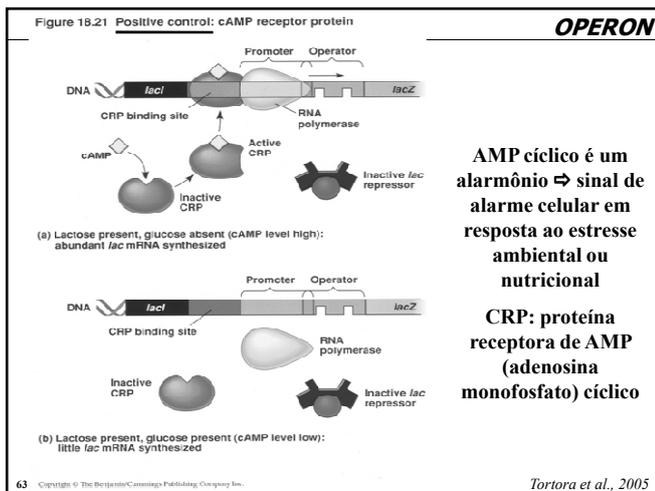
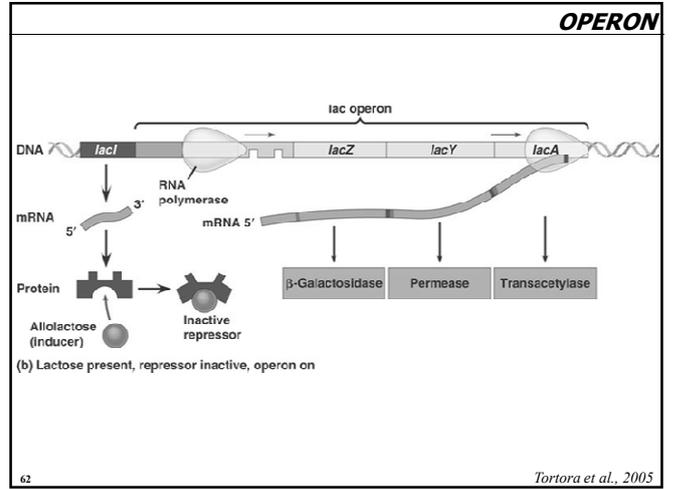
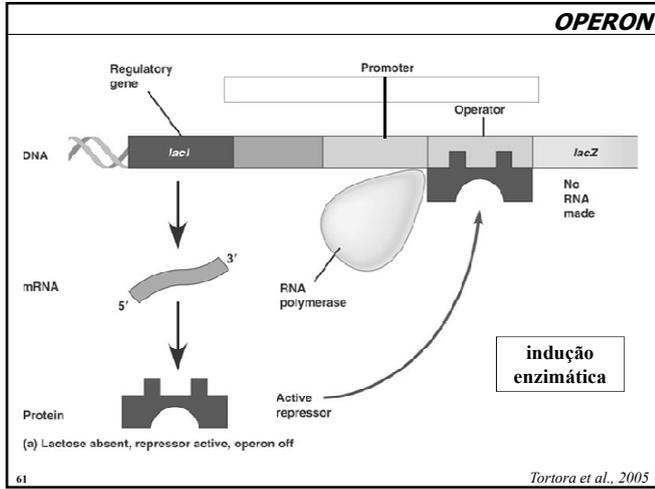
OPERON

• Operon lac ⇒ codifica enzimas utilizadas no catabolismo da lactose (galactose + glicose). Lactose = indutor (operon indutível)



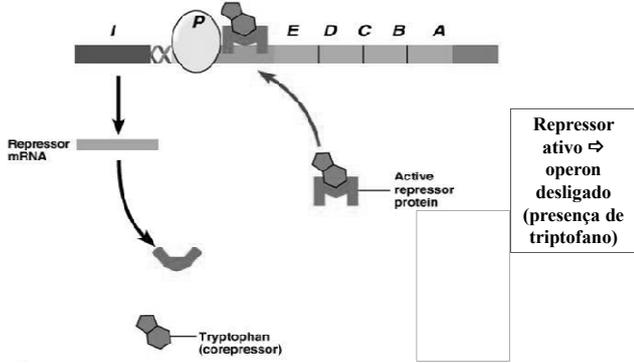
OPERON





OPERON

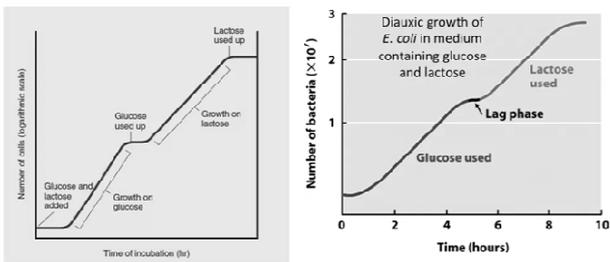
• Operon triptofano



OPERON

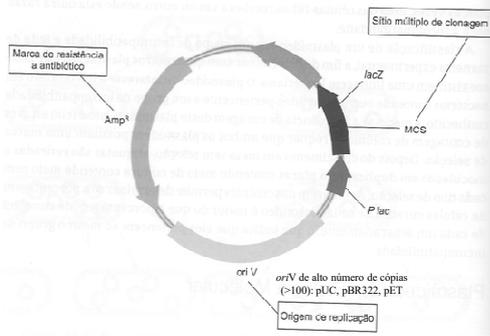
- Repressão enzimática ⇒ afeta enzimas biossintéticas (anabólicas). Ex.: operon triptofano, operon arginina
- Indução enzimática ⇒ afeta as enzimas degradativas (catabólicas). Ex.: operon lac

OPERON

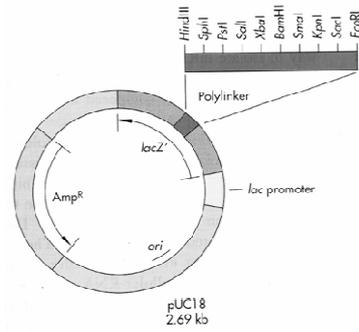


APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

• Aplicação de plasmídeos em tecnologia do DNA recombinante



• Aplicação de plasmídeos em tecnologia do DNA recombinante



• Aplicação de plasmídeos em tecnologia do DNA recombinante

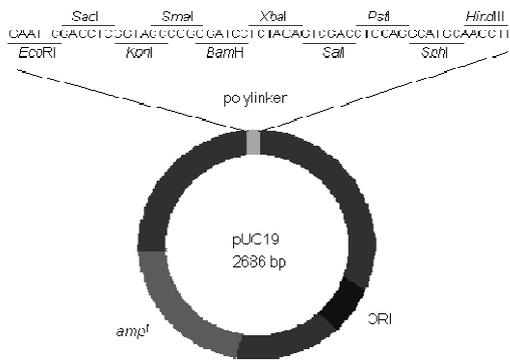
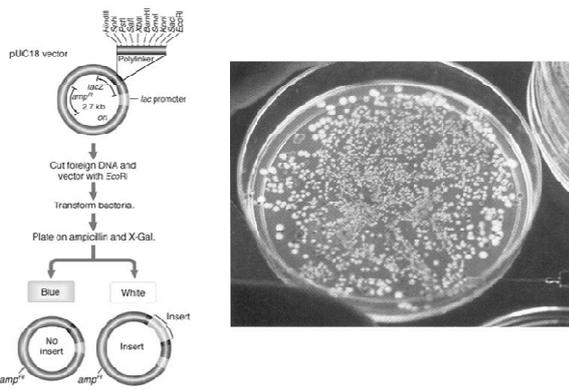
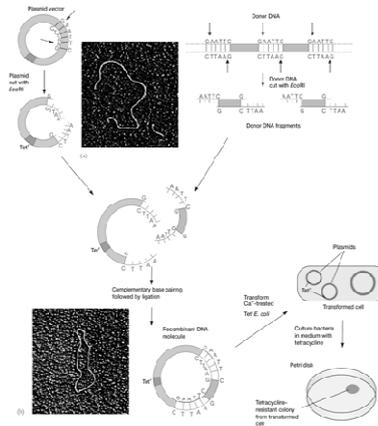
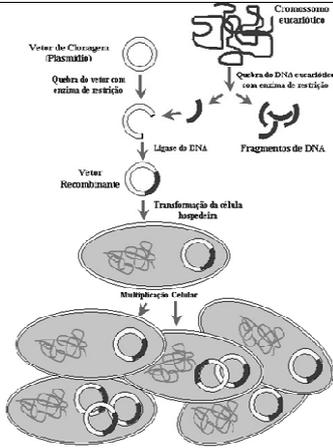
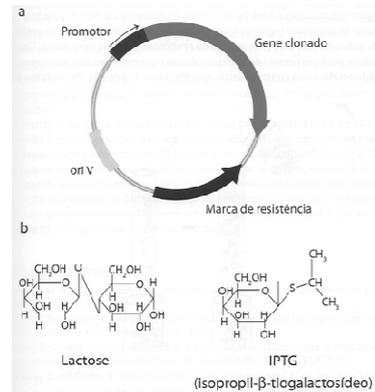


Table 14.2 Some Type II Restriction Endonucleases and Their Recognition Sequences

Enzyme	Microbial Source	Recognition Sequence ^a	End Product ^b
<i>Aat</i> I	<i>Aerobacter</i> <i>faustus</i>	5'-A-G↓C-T-3' 3'-T-C-G-A-5'	C-T-3' G-A-5'
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G↓G-A-T-C-C-3' 3'-C-C-T-A-G-G-5'	G-A-T-C-C-3' G-5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'-G↓A-T-T-C-3' 3'-C-T-T-A-A-G-5'	A-A-T-T-C-3' G-5'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'-G-G↓C-C-3' 3'-C-C-G-G-5'	C-C-3' G-G-5'
<i>Hin</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> b	5'-A↓A-G-C-T-T-3' 3'-T-T-C-G-A-A-5'	A-G-C-T-T-3' A-5'
<i>Not</i> I	<i>Neisseria otitidis-carrierum</i>	5'-G-C↓G-C-C-G-C-3' 3'-C-G-C-C-G-G-C-G-5'	G-C-C-G-C-3' C-C-5'
<i>Pst</i> I	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5'-C-T-G-C-A↓G-3' 3'-G-A-C-G-T-C-5'	C-3' A-C-G-T-C-5'
<i>Sac</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	5'-G↓T-C-G-A-C-3' 3'-C-A-G-C-T-D-5'	T-C-G-A-C-3' C-5'



• Vetor de Expressão



PLASMÍDEOS

• Aplicação de proteínas recombinantes

Table 14.4 Some Human Peptides and Proteins Synthesized by Genetic Engineering

Peptide or Protein	Potential Use
α_1 -antitrypsin	Treatment of emphysema
α -, β -, and γ -interferons	As antiviral, antitumor, and anti-inflammatory agents
Blood-clotting factor VIII	Treatment of hemophilia
Calcitonin	Treatment of osteomalacia
Epidermal growth factor	Treatment of wounds
Erythropoietin	Treatment of anemia
Growth hormone	Growth promotion
Insulin	Treatment of diabetes
Interleukins-1, 2, and 3	Treatment of immune disorders and tumors
Macrophage colony stimulating factor	Cancer treatment
Relaxin	Aid to childbirth
Serum albumin	Plasma replacement
Somatostatin	Treatment of acromegaly
Streptokinase	Anticoagulant
Tissue plasminogen activator	Anticoagulant
Tumor necrosis factor	Cancer treatment

Prescott, 2008

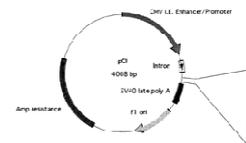
VACINAS DE DNA

• Mecanismo de ação

→ composição ⇨ DNA de interesse inserido em plasmídeo bacteriano com promotor forte (citomegalovírus humano)

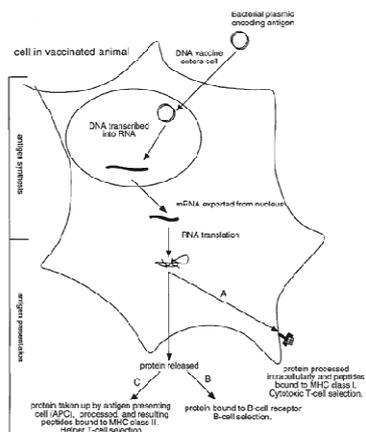
→ injeção no músculo, intra-dérmica, endovenoso, intranasal, subcutânea

→ administração: biobalística (gene gun) ⇨ DNA + partículas de ouro



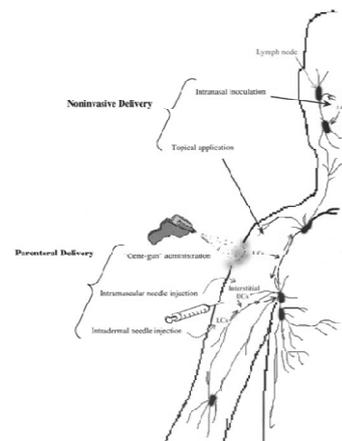
Koide et al., 2000

VACINAS DE DNA



Beard & Mason, 1998

VACINAS DE DNA



Sheelock & Heiner, 2000

VACINAS DE DNA



VACINAS DE DNA

Table 2. Human trials of DNA vaccines

Vaccines against	Proteins encoded by DNA vaccines	Results	
		antibodies	CTL
HIV	Envelope and regulatory proteins, or core proteins and enzyme involved in HIV replication	ND	+
Hepatitis B virus	HBs	+	+
Herpes simplex virus	Herpes glycoprotein	UE	UE
Influenza virus	HA	UE	UE
Malaria (<i>Plasmodium sp</i>)	CSF, Spt66	ND	+
Adenocarcinoma (colon and breast)	CEA	ND	+
B cell lymphoma	Immunoglobulin	+	ND
Cutaneous T cell lymphoma	T cell receptor	UE	UE
Prostate cancer	Prostate-specific membrane antigen	UE	UE

ND, not determined; UE, under examination.