

FIGURA 8.5 Integração da molécula de DNA do fago lambda ao cromossomo de *E. coli*.



PONTOS ESSENCIAIS

- Os vírus são parasitas obrigatórios que só conseguem se reproduzir ao infectarem células hospedeiras vivas
- Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias
- O bacteriófago T4 é lítico e infecta *E. coli*, reproduzindo-se e lisando a célula hospedeira
- O bacteriófago lambda (λ) pode entrar em uma via lítica, como o fago T4, ou em uma via lisogênica, na qual seu cromossomo é inserido no cromossomo da bactéria
- Em seu estado integrado, o cromossomo do fago λ é denominado prófago, e seus genes líticos mantêm-se inativos.

Genética das bactérias

As bactérias contêm genes que sofrem mutação e produzem fenótipos alterados. A transferência gênica em bactérias é unidirecional – das células doadoras para as receptoras.

As informações genéticas da maioria das bactérias estão armazenadas em um único cromossomo principal, carreador de alguns milhares de genes. Ao contrário dos cromossomos eucarióticos, os cromossomos bacterianos são circulares. Eles consistem em alguns milhões de pares de bases de DNA bifilamentar. As células bacterianas também contêm um número variável de “minicromossomos” chamados plasmídios e episossomos. Os plasmídios são moléculas de DNA circulares de replicação autônoma que têm de três a várias centenas de genes. Algumas bactérias contêm até 11 diferentes plasmídios além do cromossomo principal. Os episossomos são semelhantes aos plasmídios, mas a replicação dos episossomos pode ser autônoma ou ocorrer como parte do cromossomo principal – em um estado integrado como o prófago λ .

A reprodução das bactérias é assexuada por fissão simples, e cada célula-filha recebe uma cópia do cromossomo. Elas são monoploides, mas “multinucleadas”, ou seja, a célula geralmente contém duas ou mais cópias idênticas do cromossomo. Os cromossomos de bactérias não passam pelos ciclos de condensação mitótica e meiótica que ocorrem durante a divisão celular e a gametogênese em eucariotos. Portanto, os processos de recombinação – distribuição independente e *crossing over* meiótico – que ocorrem durante a reprodução sexuada em eucariotos não ocorrem em bactérias.

Todavia, a recombinação foi tão importante na evolução de bactérias quanto na evolução de eucariotos. Na verdade, processos semelhantes à reprodução sexuada – processos *parassexuados* – ocorrem em bactérias. Abordaremos esses

processos depois de analisar alguns tipos de mutantes usados em genética bacteriana e a natureza unidirecional da transferência de genes entre bactérias.

GENES MUTANTES EM BACTÉRIAS

As bactérias crescem em meio líquido, com frequência exigindo aeração, ou na superfície de um meio semissólido contendo ágar. Se for cultivada em meio semissólido, cada bactéria divide-se e cresce de maneira exponencial, produzindo uma colônia visível na superfície do meio de cultura. O número de colônias surgidas em uma placa de cultura pode ser usado para estimar o número de bactérias existentes originalmente na suspensão aplicada à placa.

Cada espécie bacteriana produz colônias com cor e morfologia específicas. *Serratia marcescens*, por exemplo, produz um pigmento vermelho, com formação de colônias vermelhas distintas (Figura 8.6). Mutações nos genes das bactérias podem modificar tanto a cor quanto a morfologia da colônia. Além disso, qualquer mutação que reduza a velocidade de multiplicação da bactéria leva à produção de colônias pequenas ou *petites*. Algumas mutações alteram a morfologia da bactéria sem modificar a morfologia da colônia. Além desses mutantes para cor e morfologia da colônia, outros tipos de mutantes foram úteis em estudos genéticos de bactérias.

Mutantes com bloqueio da capacidade de utilizar fontes específicas de energia

E. coli de tipo selvagem consegue usar praticamente qualquer açúcar como fonte de energia. No entanto, alguns mutantes não conseguem crescer no açúcar do leite, a lactose. Outros mutantes não conseguem metabolizar galactose e outros, a arabinose. A nomenclatura-padrão para descrever esses e outros tipos de bactérias mutantes usa abreviaturas de três letras com sobrescritos correspondentes. Nos fenótipos, a primeira letra é maiúscula; nos genótipos, as três letras são minúsculas e em itálico. Portanto, *E. coli* de tipo selvagem é fenotipicamente Lac⁺ (capaz de usar lactose como fonte de energia) e genotipicamente *lac*⁺. Os mutantes incapazes de usar lactose como fonte de energia são fenotipicamente Lac⁻ e genotipicamente *lac*⁻ (às vezes, apenas *lac*).



MN Tremblay/Flickr/Getty Images, Inc.

FIGURA 8.6 Colônias bacterianas. Fotografia mostra colônias da bactéria *Serratia marcescens* que cresce em meio contendo ágar. A cor que distingue as colônias é consequência do pigmento vermelho produzido por essa espécie.

Mutantes incapazes de sintetizar um metabólito essencial

E. coli de tipo selvagem consegue crescer em meio (meio mínimo) contendo uma fonte de energia e alguns sais inorgânicos. Essas bactérias conseguem sintetizar todos os metabólitos necessários – aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas etc. – a partir dessas substâncias. As bactérias de tipo selvagem são denominadas **prototróficas**. Quando ocorre uma mutação em um gene que codifica uma enzima necessária para a síntese de um metabólito essencial, a bactéria mutante passa a ter uma nova exigência para se multiplicar. Ela se desenvolve se o metabólito for acrescentado ao meio de cultura, mas não se multiplica na ausência dele. Esses mutantes são denominados **auxotróficos**; necessitam de nutrientes auxiliares para seu crescimento. Como exemplo, *E. coli* de tipo selvagem é capaz sintetizar triptofano *de novo*; essas bactérias são fenotipicamente Trp⁺ e genotipicamente *trp*⁺. Os auxotróficos para triptofano são Trp⁻ e *trp*⁻.

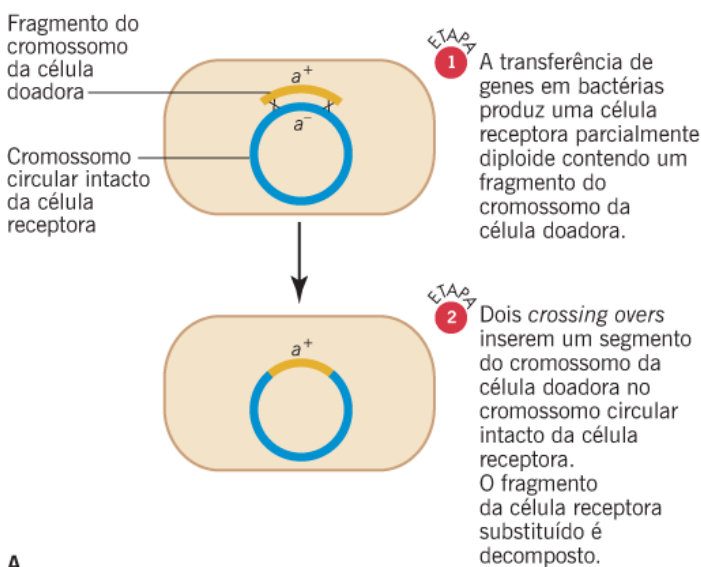
Mutantes resistentes a fármacos e antibióticos

E. coli de tipo selvagem são destruídas por antibióticos como ampicilina e tetraciclina. Fenotipicamente são Amp^s e Tet^s. Os alelos mutantes que tornam *E. coli* resistente a esses antibióticos são designados *amp*^r e *tet*^r, respectivamente. As bactérias que têm esses alelos mutantes conseguem crescer em meio contendo os antibióticos, mas as bactérias de tipo selvagem, não. Assim, os antibióticos podem ser usados para selecionar bactérias carreadoras de genes para resistência. Os genes de resistência atuam como marcadores selecionáveis dominantes.

TRANSFERÊNCIA GÊNICA UNIDIRECIONAL EM BACTÉRIAS

Os processos de recombinação em bactérias implicam a transferência de genes de uma bactéria para outra, e não as trocas recíprocas de genes que ocorrem durante a meiose em eucariotos. Assim, a transferência gênica é *unidirecional*. A recombinação em bactérias geralmente ocorre entre um fragmento de um cromossomo (da **célula doadora**) e um cromossomo completo (na **célula receptora**), e não entre dois cromossomos completos como em eucariotos. Com raras exceções, as células receptoras tornam-se diploides parciais, contendo um trecho linear do cromossomo da doadora e um cromossomo circular completo da receptora. Desse modo, *os crossing overs têm de ocorrer em número par* e inserir um segmento do cromossomo da célula doadora no cromossomo da receptora (**Figura 8.7 A**). Um *crossing over* único (ou qualquer número ímpar de *crossing overs*) destruirá a integridade do cromossomo da célula receptora, produzindo uma molécula de DNA linear inviável (**Figura 8.7 B**).

Dois crossing overs



Um crossing over

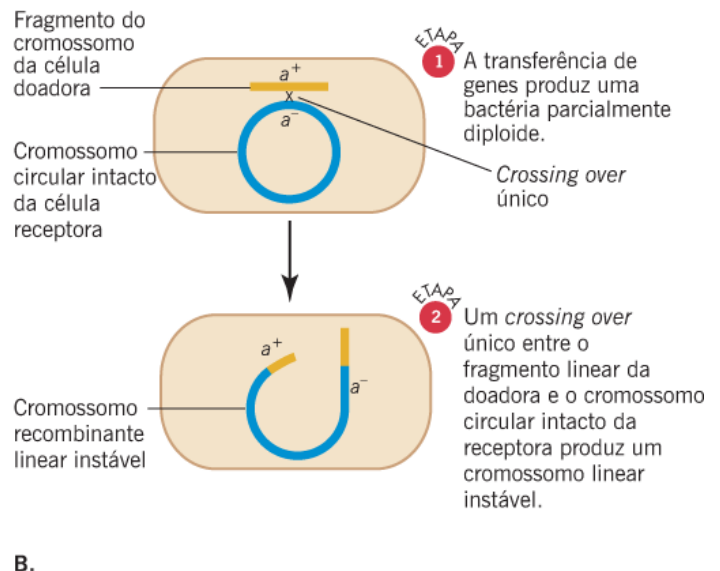


FIGURA 8.7 Recombinação em bactérias. Os processos parassexuais que ocorrem em bactérias produzem diploides parciais que contêm fragmentos lineares do cromossomo das células doadoras e cromossomos circulares intactos das células receptoras. **A.** Para manter a integridade dos cromossomos circulares, os *crossing overs* têm de ocorrer em número par, inserindo segmentos dos cromossomos da célula doadora nos cromossomos da receptora. **B.** Um único *crossing over* entre um fragmento de um cromossomo da célula doadora e um cromossomo circular da receptora destrói a integridade do cromossomo circular, produzindo uma molécula de DNA linear incapaz de se replicar, que, depois, é decomposta.

PONTOS ESSENCIAIS

- As bactérias geralmente contêm um cromossomo principal
- As bactérias de tipo selvagem são prototróficas; conseguem sintetizar tudo de que necessitam para se multiplicar e se reproduzir quando têm uma fonte de energia e algumas moléculas inorgânicas
- As bactérias mutantes auxotróficas necessitam de outros metabólitos para seu desenvolvimento
- A transferência gênica em bactérias é unidirecional – das células doadoras para as receptoras, sem transferência das receptoras para as doadoras.

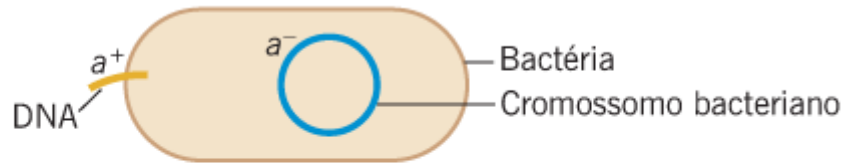
Mecanismos de troca genética em bactérias

As bactérias trocam material genético por três processos parassexuais diferentes.

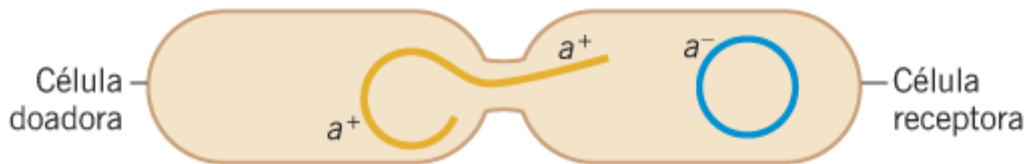
Três processos parassexuados ocorrem em bactérias. Eles diferem no modo como o DNA é transferido de uma bactéria para outra (**Figura 8.8**). A **transformação** é a captação de moléculas livres de DNA liberadas de uma bactéria (a célula doadora) por outra bactéria (a célula receptora). A **conjugação** é a transferência direta de DNA de uma célula doadora para uma célula receptora. A **transdução** envolve a transferência de genes de uma célula doadora bacteriana para uma receptora com o auxílio de um bacteriófago; os genes transferidos são carreados pelo fago.

Os três processos parassexuados de transferência gênica – transformação, conjugação e transdução – em bactérias podem ser distinguidos por dois critérios simples (**Tabela 8.1**). (1) O processo é sensível à desoxirribonuclease (DNase), enzima que degrada DNA? (2) O processo requer contato celular? O teste experimental desses dois critérios é muito fácil. A sensibilidade à DNase é determinada pelo simples acréscimo da enzima ao meio de crescimento das bactérias. Se não houver mais transferência de genes, o processo é a transformação. As cápsulas proteicas dos bacteriófagos e as paredes e membranas das bactérias protegem o DNA do doador contra a degradação por DNase durante a transdução e a conjugação, respectivamente.

Transformação: captação de DNA livre.



Conjugação: transferência direta de DNA de uma bactéria para outra.



Transdução: transferência de DNA bacteriano por um bacteriófago.

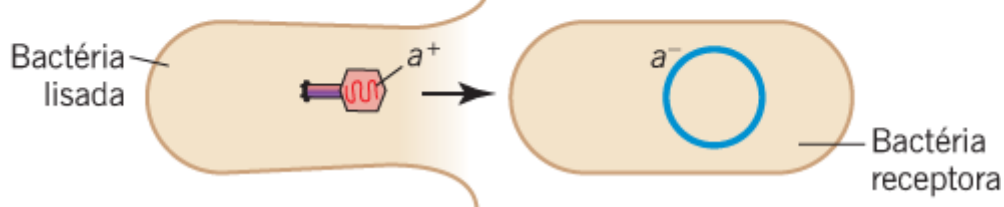



FIGURA 8.8 Os três tipos de transferência gênica em bactérias.

Um experimento simples pode determinar se o contato celular é ou não necessário para a transferência gênica bacteriana. Nesse experimento, bactérias com diferentes genótipos são postas em braços opostos de um tubo de cultura em U (**Figura 8.9**). Os dois braços são separados por um filtro de vidro que tem poros suficientemente grandes para permitir a passagem de moléculas de DNA e vírus, mas não de bactérias. Se houver transferência gênica entre as bactérias cultivadas em braços opostos do tubo U, o processo não pode ser a conjugação, que requer contato direto entre células doadoras e receptoras. Se a transferência gênica observada ocorrer na presença de DNase e na ausência de contato celular, o processo é de transdução.

Os três processos parassexuados não ocorrem em todas as espécies de bactérias; na verdade, a transdução provavelmente é o único que ocorre em todas as bactérias. A ocorrência ou não de transformação ou conjugação em uma espécie depende do surgimento dos genes necessários e do mecanismo metabólico nessa espécie. *E. coli*, por exemplo, não contém genes codificadores das proteínas necessárias para captar o DNA livre. Assim, não há transformação em *E. coli* em condições naturais. Apenas a conjugação e a transdução ocorrem nas células de *E. coli* em habitats naturais. Entretanto, cientistas descobriram como tornar *E. coli* suscetível à transformação em laboratório. No Capítulo 14, discutiremos sobre o uso de métodos de transformação para “clonar” (produzir muitas cópias de) genes estranhos em *E. coli*.

	Tabela 8.1
Distinção entre os três processos parassexuados em bactérias.	

Processo de recombinação	Critério	
	Necessidade de contato celular?	Sensível à DNase?
Transformação	Não	Sim
Conjugação	Sim	Não
Transdução	Não	Não

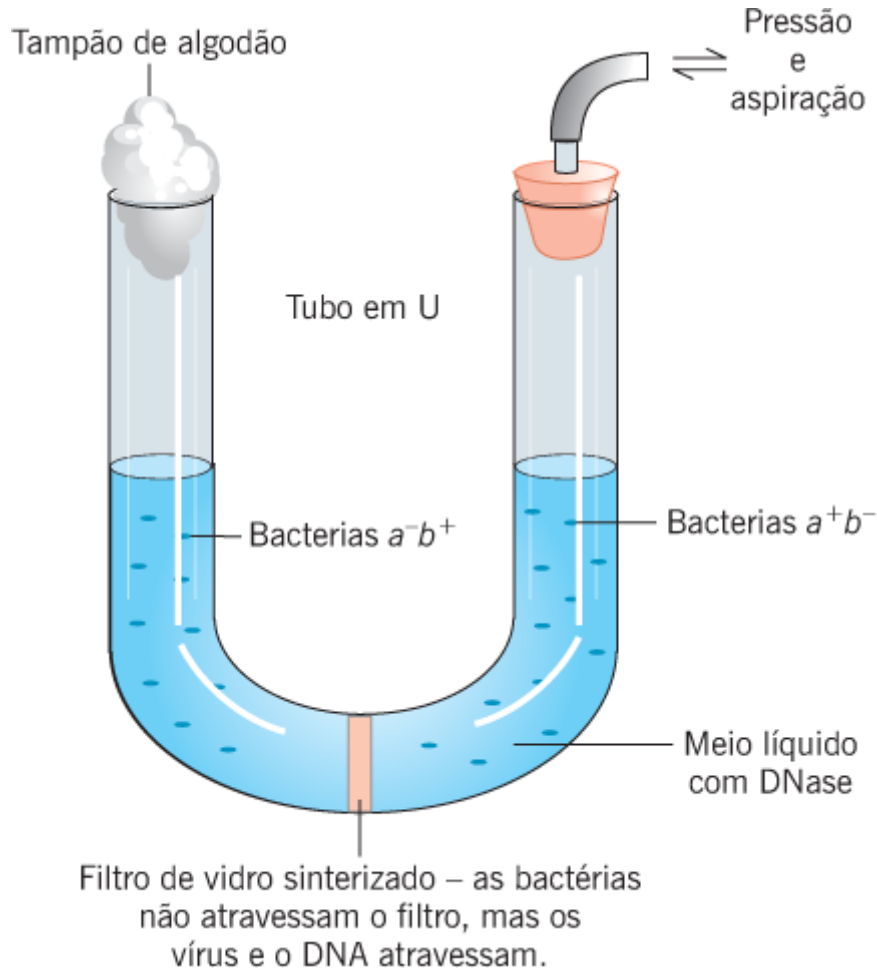


FIGURA 8.9 O experimento com tubo em U com bactérias. O tubo em U é usado para verificar se a recombinação exige ou não contato celular. Bactérias de diferentes genótipos são colocadas em cada ramo do tubo, separadas por um filtro de vidro que impede o contato entre elas. Se houver recombinação, não pode ser consequente a conjugação.

TRANSFORMAÇÃO

Frederick Griffith descobriu a transformação em *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) em 1928. Os pneumococos, como todos os outros seres vivos, exibem variabilidade genética que pode ser reconhecida pela existência de diferentes fenótipos (Tabela 8.2). As duas características fenotípicas importantes na demonstração da transformação por Griffith são (1) a existência ou não de uma cápsula polissacarídica (polímero de açúcar complexo) ao redor das células bacterianas e (2) o tipo de cápsula, ou seja, a composição molecular específica dos polissacarídeos existentes na cápsula. Quando cultivados em ágar-sangue em placas de Petri, pneumococos com cápsulas formam grandes colônias lisas (Figura 8.10) e são designados tipo S (do inglês, *smooth*, liso). Os pneumococos encapsulados são virulentos (patogênicos), causando pneumonia em mamíferos como camundongos e seres humanos. Os pneumococos do tipo S virulentos sofrem mutação para uma forma avirulenta (não patogênica), sem cápsula polissacarídica, com frequência aproximada de 1 por 10^7 células. Quando cultivados em meio ágar-sangue, esses pneumococos avirulentos e não encapsulados produzem pequenas colônias de superfície rugosa (Figura 8.10) e são, portanto, designados tipo R (do inglês, *rough*, rugoso). A cápsula polissacarídica é necessária para a virulência, porque protege a bactéria contra a destruição por leucócitos. Quando existente, a cápsula pode ser de vários tipos antigênicos diferentes (tipo I, II, III etc.), o que depende da composição molecular específica dos polissacarídeos e, é claro, em última análise, do genótipo da célula.

Os diferentes tipos de cápsula podem ser identificados imunologicamente. A injeção de células do tipo II na corrente sanguínea de coelhos leva o sistema imune dos coelhos a produzir anticorpos que reagem especificamente com as células do tipo II. Esses anticorpos do tipo II aglutinam os pneumococos do tipo II, mas não os do tipo I nem do tipo III.

A descoberta inesperada de Griffith foi que, se ele injetasse em camundongos pneumococos do tipo IIR destruídos pelo calor (virulentos quando vivos) mais pneumococos do tipo IIS vivos (avirulentos), muitos dos camundongos sucumbiriam à pneumonia, e seriam encontradas células do tipo IIIS vivas nos corpos (Figura 8.11). Quando se injetavam apenas pneumococos do tipo IIIS destruídos pelo calor, nenhum dos camundongos morria. Portanto, a virulência observada não era causada por alguns pneumococos do tipo IIIS que sobreviveram ao tratamento pelo calor. Os pneumococos patogênicos vivos isolados dos corpos tinham cápsulas polissacarídicas do tipo III. Esse resultado é importante porque os pneumococos do tipo R não encapsulados podem sofrer mutação de volta ao tipo S encapsulado. Contudo, quando essa mutação ocorre em pneumococos do tipo IIR, os pneumococos resultantes tornam-se IIS, em vez de IIIS. Assim, a transformação de pneumococos do tipo IIR avirulentos em pneumococos do tipo IIIS virulentos não pode ser explicada por mutação. Na verdade, alguns componentes dos pneumococos do tipo IIIS mortos (o “princípio transformador”) converteram pneumococos do tipo IIR vivos em pneumococos do tipo IIIS.

Tabela 8.2

Características de cepas de *Streptococcus pneumoniae* quando cultivadas em meio ágar-sangue.

Tipo	Morfologia da colônia		Cápsula	Virulência	Reação com antissoro preparado contra	
	Aspecto	Tamanho			Tipo IIS	Tipo IIIS
IIRa	Rugosa	Pequeno	Ausente	Não virulento	Não	Não
IIS	Lisa	Grande	Presente	Virulento	Aglutinação	Não
IIIRa	Rugosa	Pequeno	Ausente	Não virulento	Não	Não
IIIS	Lisa	Grande	Presente	Virulento	Não	Aglutinação

Embora os pneumococos do tipo R não sejam encapsulados, carregam apenas genes que direcionam a síntese de um tipo específico (tipos antigênicos II e III) de cápsula se não houver bloqueio na formação de cápsula. Quando os pneumococos do tipo R sofrem mutação retrógrada e tornam-se encapsulados do tipo S, o tipo da cápsula (II ou III) é determinado por esses genes. Assim, pneumococos R derivados do tipo IIS são denominados tipo IIR. Quando esses pneumococos do tipo IIR sofrem mutação e tornam-se pneumococos encapsulados do tipo S, as cápsulas são do tipo II.

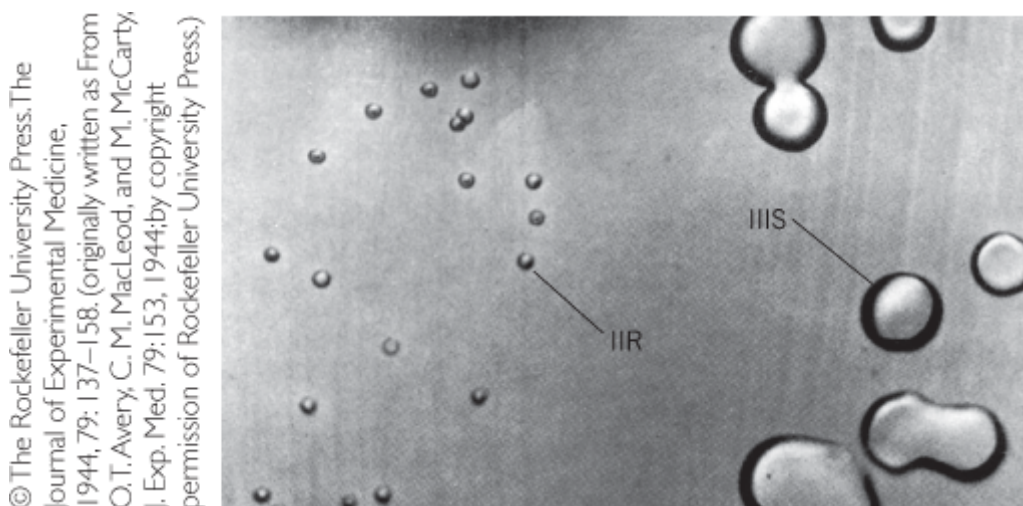


FIGURA 8.10 Fenótipos de colônias das duas cepas de *Streptococcus pneumoniae* estudadas por Griffith em 1928.

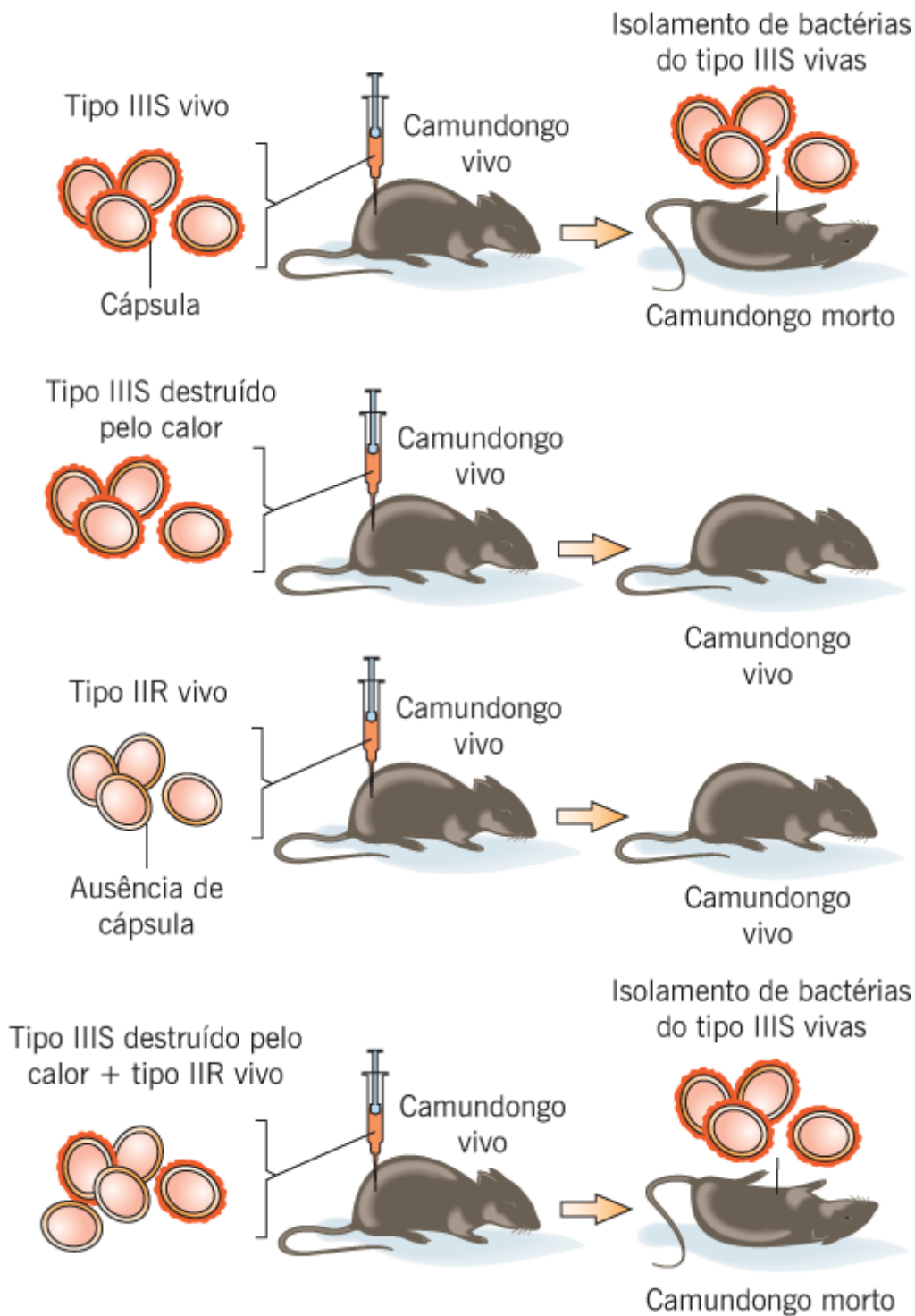


FIGURA 8.11 Descoberta da transformação em *Streptococcus pneumoniae* por Griffith.

Em 1931, experimentos subsequentes realizados por Richard Sia e Martin Dawson mostraram que o fenômeno descrito por Griffith, agora denominado transformação, não era mediado por um hospedeiro vivo. O mesmo fenômeno ocorreu em tubo de cultura quando se cultivaram pneumococos do tipo IIR vivos na presença de pneumococos do tipo IIIS destruídos pelo calor. Como os experimentos de Griffith mostraram que o fenótipo do tipo IIIS dos pneumococos transformados era transmitido para a progênie – ou seja, era causado por alteração hereditária permanente no genótipo dos pneumococos – a demonstração de transformação preparou o terreno para determinar a base química da hereditariedade em pneumococos. Na verdade, a primeira comprovação de que as informações genéticas são armazenadas no DNA, e não nas proteínas, foi a demonstração, em 1944, por Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, de que o DNA era responsável pela transformação em pneumococos. Em vista de seu papel imprescindível no estabelecimento do DNA como o material genético, comentaremos essa demonstração no Capítulos 9.

O mecanismo de transformação foi estudado em muitos detalhes em *S. pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. O processo básico é semelhante nas quatro espécies; no entanto, há variações de mecanismo em cada uma. *S. pneumoniae* e *B. subtilis* captam DNA de qualquer origem, enquanto *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae* captam apenas seu próprio DNA ou o DNA de espécies bastante próximas. *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae*

só captam o DNA que contém uma sequência curta especial de pares de nucleotídeos (11 pares de bases em *Haemophilus*; 10 em *Neisseria*) existente em cerca de 600 cópias em seus respectivos genomas.

MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO

Mesmo nas espécies bacterianas que têm a capacidade de captar DNA do ambiente, nem todas as bactérias conseguem fazê-lo. Na verdade, somente aquelas que expressam os genes codificadores das proteínas necessárias ao processo são capazes de captar DNA. Essas bactérias são ditas **competentes**, e as proteínas que medeiam o processo de transformação são **proteínas de competência (Com)**. As bactérias desenvolvem competência na fase avançada de seu ciclo de crescimento – quando a densidade celular é alta, mas antes de terminar a divisão celular. O processo pelo qual as bactérias se tornam competentes é mais bem-compreendido em *B. subtilis*, pequenos peptídios denominados feromônios de competência são secretados pelas bactérias e se acumulam em alta densidade celular. Altas concentrações dos feromônios induzem a expressão dos genes codificadores de proteínas necessárias à transformação.

Concentremo-nos no mecanismo de transformação em *B. subtilis* (Figura 8.12). Os genes de competência estão localizados em grupos, e cada grupo é designado por uma letra – por exemplo, *A*, *B*, *C*. O primeiro gene em cada grupo é designado *A*, o segundo, *B*, e assim por diante. Desse modo, a proteína codificada pelo primeiro gene do quinto grupo é designada ComEA. As proteínas ComEA e ComG ligam o DNA bifilamentar às superfícies de células competentes. Quando o DNA ligado é puxado para o interior da célula pela DNA translocase ComFA (enzima que move ou “transloca” o DNA), um filamento de DNA é decomposto por uma desoxirribonuclease (enzima que degrada o DNA), e o outro filamento é protegido contra a degradação por um revestimento de proteína de ligação ao DNA unifilamentar e proteína RecA (proteína necessária para recombinação). Com o auxílio da RecA e de outras proteínas mediadoras da recombinação, o filamento único de DNA transformador invade o cromossomo da célula receptora, pareando-se com o filamento complementar de DNA e substituindo o filamento equivalente. Em seguida, o filamento substituído da célula receptora é decomposto. Se as células doadora e receptora tiverem alelos diferentes de um gene, a dupla-hélice recombinante formada terá um alelo em um filamento e outro alelo no segundo filamento. Uma dupla-hélice de DNA desse tipo é denominada **heterodúplex** (uma dupla-hélice “heterozigota”); é dividida em dois homodúplex ao se replicar.

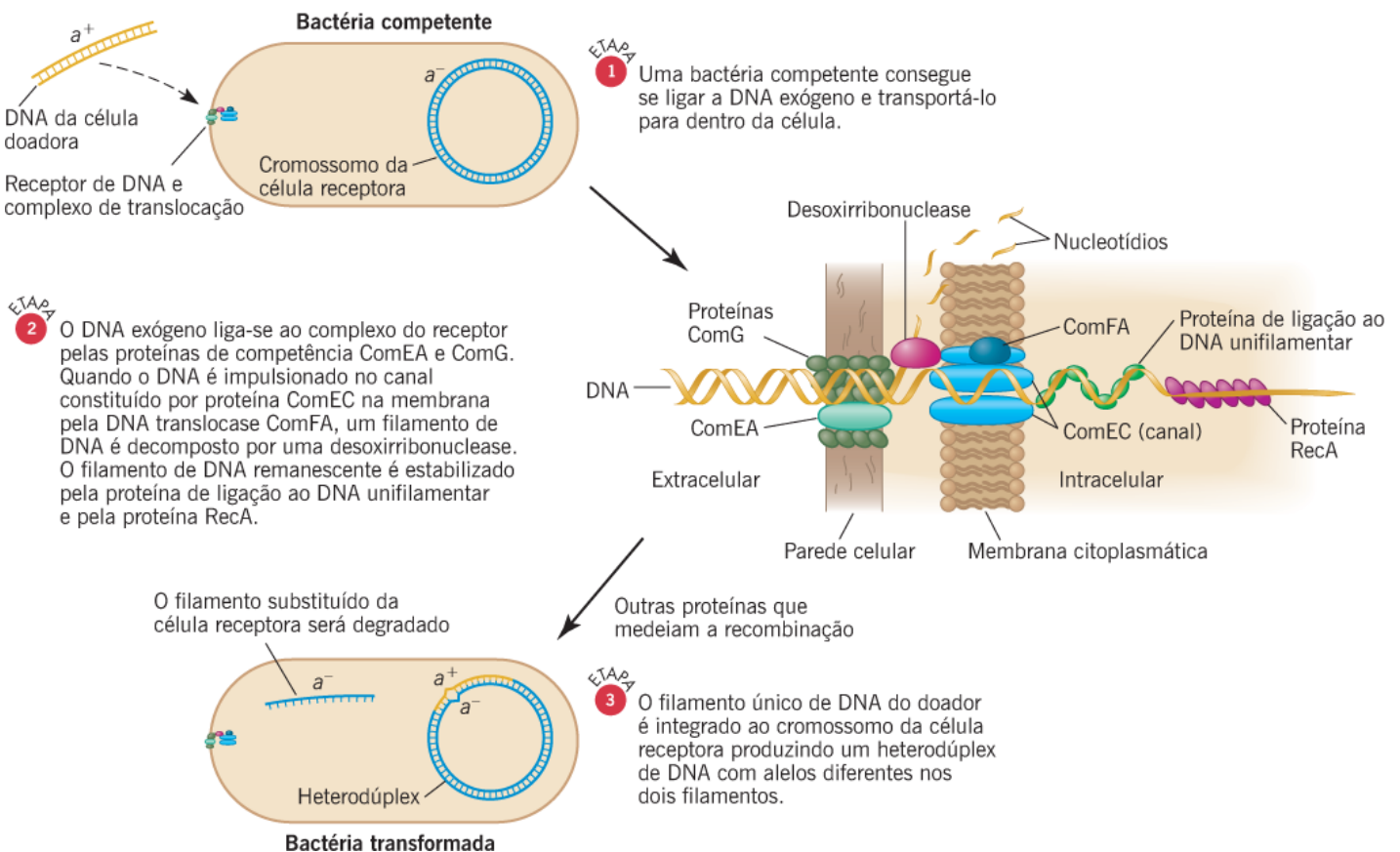


FIGURA 8.12 Mecanismo de transformação em *Bacillus subtilis*. Uma bactéria competente contém um receptor de DNA/complexo de translocação que consegue se ligar ao DNA exógeno e transporta-o para dentro da célula, onde consegue se recombinar com o DNA cromossômico da célula receptora. ComEA, EC, FA e G são proteínas de competência; só são sintetizadas em células competentes. Ver outros detalhes no texto.

As moléculas de DNA captadas por células competentes durante a transformação geralmente correspondem a apenas 0,2 a 0,5% do cromossomo completo. Portanto, exceto se dois genes estiverem muito próximos, nunca estarão na mesma molécula do DNA transformador. Os transformantes duplos para dois genes (p. ex., a em a^+ e b em b^+ , usando uma célula doadora $a^+ b^+$ e uma receptora $a^- b^-$) necessitarão de dois eventos independentes de transformação (captação e integração de uma molécula de DNA com a^+ e de outra molécula com b^+). A probabilidade de que esses dois eventos independentes ocorram juntos é igual ao produto da probabilidade de cada evento isolado. Por outro lado, dois genes próximos podem estar na mesma molécula de DNA transformador, com o surgimento de transformantes duplos com alta frequência. Portanto, pode-se usar a frequência de cotransformação de dois marcadores genéticos para estimar a distância entre eles no cromossomo do hospedeiro.

CONJUGAÇÃO

A transformação não ocorre em *E. coli* – a espécie bacteriana mais estudada – em condições naturais. Assim, poderíamos perguntar se existe algum tipo de transferência gênica entre células de *E. coli*. A resposta a essa pergunta é “sim”. Em 1946, Joshua Lederberg e Edward Tatum descobriram que *E. coli* transferem genes por conjugação. Essa importante descoberta é aprofundada em Marcos da genética | Conjugação em *Escherichia coli*, disponível *on-line*. A conjugação mostrou-se um importante método de mapeamento genético nas espécies de bactérias em que ocorre, e é inestimável em pesquisa genética.

Durante a conjugação, o DNA é transferido de uma célula doadora para uma célula receptora através de um canal de conjugação intracelular especializado que se forma entre elas (**Figura 8.13**). Observe que há contato direto entre as células doadoras e receptoras durante a conjugação; a separação observada na **Figura 8.13** foi provocada por forças de estiramento durante o preparo para microscopia.

As bactérias doadoras têm apêndices em sua superfície chamados *pili* F (singular, *pilus* F). A síntese dos *pili* F é controlada por genes encontrados em uma pequena molécula circular de DNA chamada **fator F** (*fator de fertilidade*). A maioria dos fatores F tem aproximadamente 10^5 pares de nucleotídeos (**Figura 8.20**). As bactérias que contêm um fator F conseguem transferir genes para outras bactérias. Os *pili* F de uma bactéria doadora fazem contato com uma bactéria receptora que não tem fator F e se ligam à mesma, de maneira que as duas bactérias são postas em contato íntimo. Os *pili* F só participam do estabelecimento de contato, não da transferência de DNA. Depois que os *pili* aproximam a bactéria doadora da receptora, forma-se um canal de conjugação entre as mesmas, e o DNA é transferido da bactéria doadora para a bactéria receptora através dele.

O fator F existe em dois estados: (1) o *estado autônomo*, no qual sua replicação é independente do cromossomo bacteriano, e (2) o *estado integrado*, no qual é inserido de maneira covalente no cromossomo bacteriano e replica-se como qualquer outro segmento desse cromossomo (**Figura 8.14**). Os elementos genéticos com essas propriedades são denominados epissomos (ver Plasmídios e epissomos, adiante neste capítulo). Uma célula doadora que tem fator F autônomo é denominada célula F^+ . Uma célula doadora que tem fator F integrado é denominada **célula F^+** . Quando uma célula F^+ se conjuga (ou “cruza”) com uma célula receptora F^- , somente o fator F é transferido. As duas células (doadora e receptora) tornam-se células F^+ porque o fator F é replicado durante a transferência, e cada célula recebe uma cópia. Assim, se uma população de células F^+ for misturada a uma população de células F^- , praticamente todas as células adquirem um fator F.

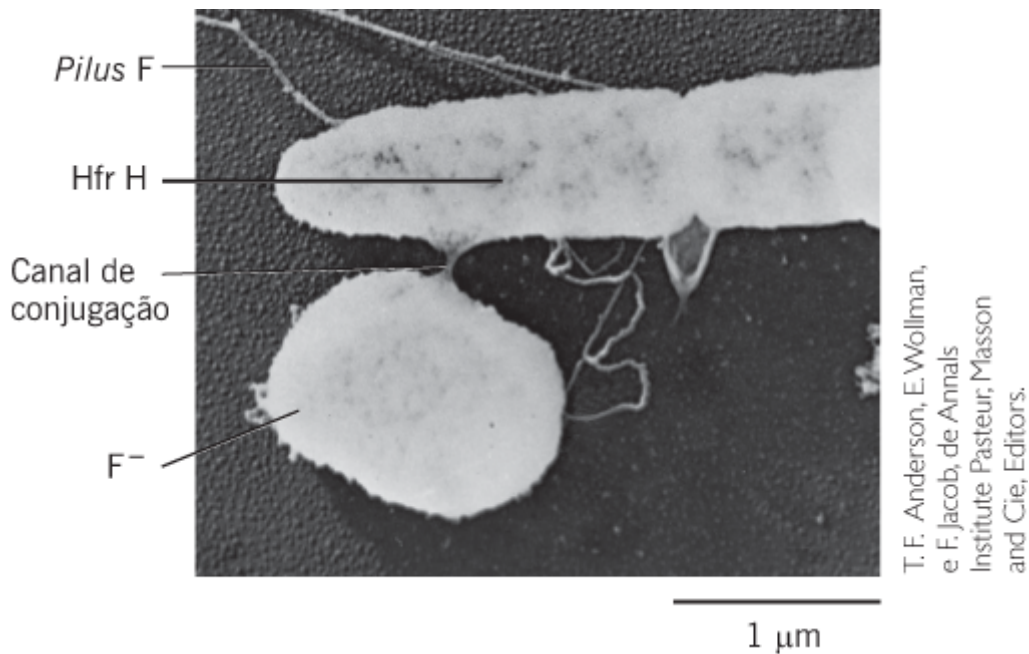


FIGURA 8.13 Conjugação em *E. coli*. Essa microfotografia eletrônica realizada por Thomas F. Anderson mostra a conjugação entre uma *E. coli* Hfr H e uma *E. coli* F⁻. Na verdade, há justaposição próxima das células doadora e receptora durante a conjugação. O canal de conjugação mostrado foi distendido durante o preparo para microscopia.

O fator F pode integrar-se ao cromossomo bacteriano por eventos de recombinação local-específicos (Figura 8.15). A integração do fator F é mediada por sequências curtas de DNA que estão presentes em múltiplas cópias tanto no fator F quanto no cromossomo bacteriano. Assim, um fator F pode integrar-se a muitos locais diferentes no cromossomo bacteriano. Uma célula com um fator F integrado é denominada **célula Hfr** (*high-frequency recombination*, recombinação de alta frequência). No estado integrado, o fator F medeia a transferência do cromossomo da célula Hfr para uma célula receptora (F⁻) durante a conjugação (cruzamento Hfr × F⁻). Em geral, as células se separam antes que a transferência do cromossomo esteja completa; assim, raramente há transferência de um cromossomo inteiro de uma célula Hfr para uma célula receptora.

O mecanismo de transferência de DNA de uma célula doadora para uma célula receptora durante a conjugação parece ser o mesmo se for transferido apenas o fator F, como nos cruzamentos F⁺ × F⁻, ou se for transferido o cromossomo bacteriano, como nos cruzamentos Hfr × F⁻. A transferência é iniciada em um local especial denominado *oriT* – a origem da transferência –, um dos três locais no fator F em que a replicação do DNA pode ser iniciada. Os outros dois locais – *oriV* e *oriS* – são usados para iniciar a replicação durante a divisão celular, não durante a conjugação. *oriV* é a origem de replicação primária durante a divisão celular; *oriS* é uma origem secundária que realiza essa função quando *oriV* está ausente ou inativo.

Durante a conjugação, um filamento da molécula circular de DNA é cortado em *oriT* por uma enzima, e uma extremidade é transferida para a célula receptora através do canal que se forma entre as células em conjugação (Figura 8.16). O fator F, ou o cromossomo Hfr que contém o fator F, replica-se durante a transferência por um mecanismo chamado de *replicação por círculo rolante*, porque a molécula circular de DNA “rola” durante a replicação (Capítulos 10). Durante a conjugação, há síntese de uma cópia do cromossomo na célula doadora, e o filamento de DNA da célula doadora transferido é replicado na célula receptora.

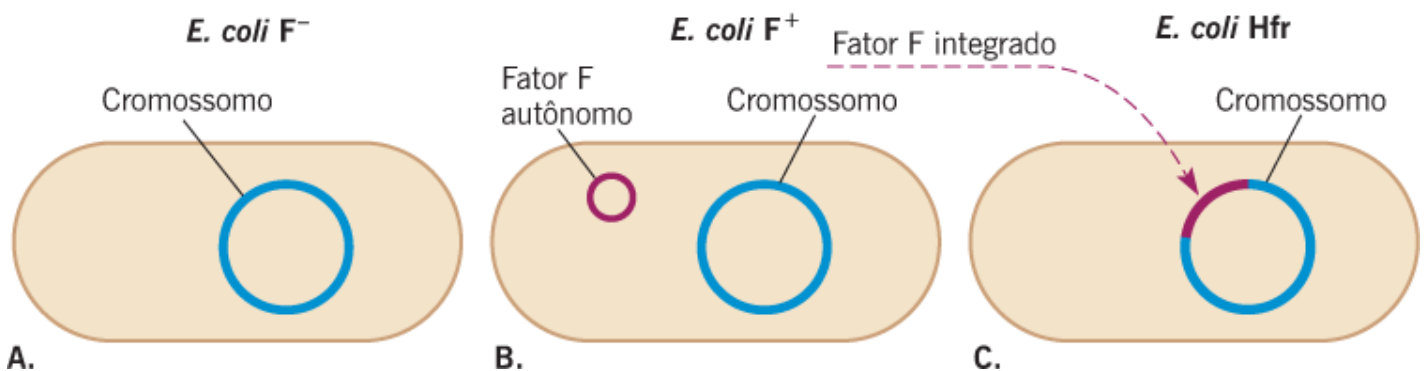


FIGURA 8.14 Fator F em *E. coli*: *E. coli* F⁻, F⁺ e Hfr. **A.** *E. coli* F⁻ não tem fator F. **B.** *E. coli* F⁺ tem um fator F cuja replicação é independente do cromossomo. **C.** *E. coli* Hfr tem um fator F que é integrado ao cromossomo (inserido de maneira covalente).

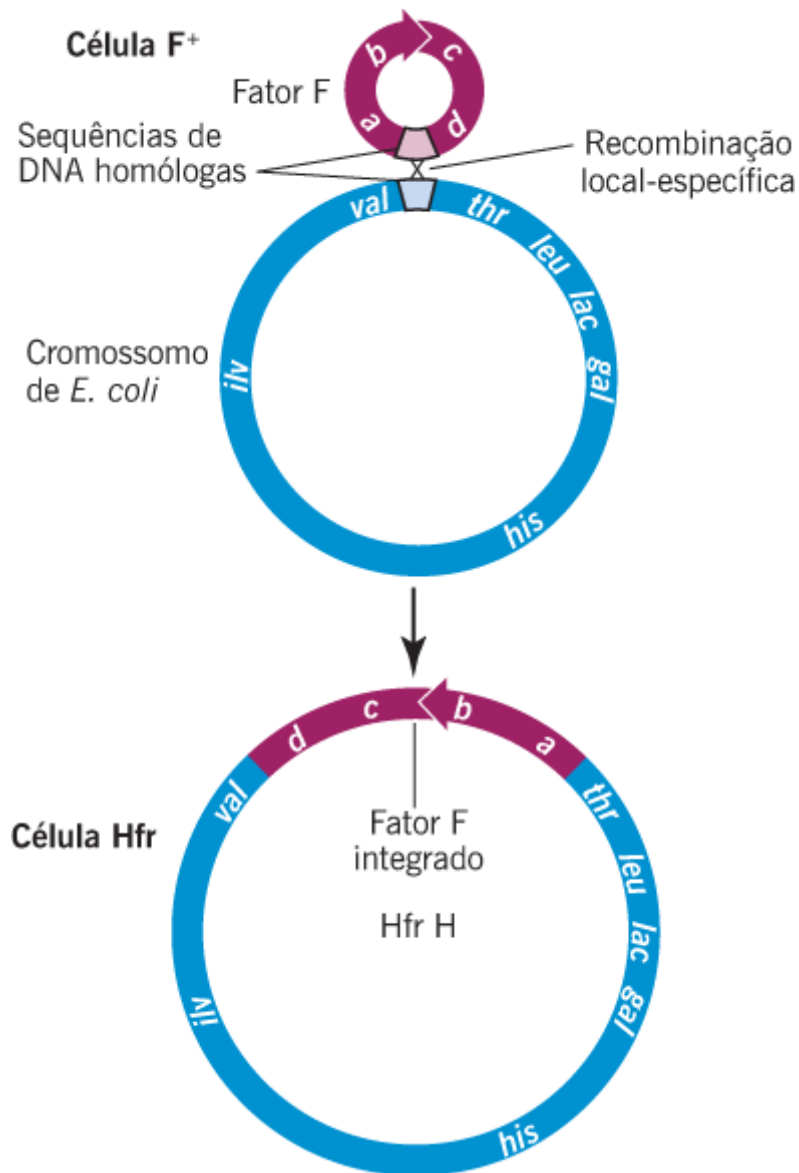


FIGURA 8.15 A formação de uma célula Hfr pela integração de um fator F autônomo. O fator F é inserido de maneira covalente no cromossomo por recombinação local-específica entre sequências de DNA homólogas no fator F e no cromossomo.

Como a transferência é iniciada no fator F integrado, parte do fator F é transferida antes da transferência de genes cromossômicos em conjugações Hfr \times F⁻. O restante do fator F é transferido depois dos genes cromossômicos. Assim, a célula receptora adquire um fator F completo e só é convertida em célula Hfr em casos raros, quando há transferência de um cromossomo Hfr inteiro.

UTILIZAÇÃO DA CONJUGAÇÃO NO MAPEAMENTO DE GENES DE E. COLI

A conjugação entre células Hfr e F⁻ é utilizada para mapear os genes do cromossomo de *E. coli*. Para compreendermos como isso é possível, examinemos um experimento clássico usando uma cepa específica de Hfr denominada Hfr H (em homenagem a William Hayes, geneticista microbiano inglês, que a isolou). Nessa cepa, o fator F é integrado perto dos *loci* *thr* (treonina) e *leu* (leucina), como mostra a **Figura 8.15**. Em 1957, Elie Wollman e François Jacob, trabalhando no Instituto Pasteur, em Paris, trouxeram uma nova perspectiva ao processo de conjugação por cruzamento de células Hfr H de genótipo *thr*⁺ *leu*⁺ *azi*^s *ton*^s *lac*⁺ *gal*⁺ *str*^s com células F⁻ de genótipo *thr*⁻ *leu*⁻ *azi*^r *ton*^r *lac*⁻ *gal*⁻ *str*^r. O gene *thr* e o gene *leu* são responsáveis pela síntese dos aminoácidos treonina e leucina, respectivamente. Os pares de alelos *azi*^s/*azi*^r, *ton*^s/*ton*^r e *str*^s/*str*^r controlam a sensibilidade (*s*) ou a resistência (*r*) à azida de sódio, ao bacteriófago T1 e à estreptomicina, respectivamente. Os alelos *lac*⁺ e *lac*⁻ e os alelos *gal*⁺ e *gal*⁻ determinam a capacidade (+) ou incapacidade (-) de usar lactose e galactose, respectivamente, como fontes de energia.

Em momentos diferentes depois que as células Hfr H e F⁻ foram misturadas para iniciar o cruzamento, as amostras foram retiradas e agitadas vigorosamente em agitador para quebrar as pontes de conjugação e separar as células em conjugação. Essas células, cujo cruzamento havia sido interrompido com tanta indelicadeza, foram plaqueadas em meio que continha o antibiótico estreptomicina, mas não tinha os aminoácidos treonina e leucina. Apenas as células

recombinantes que têm os genes *thr*⁺ e *leu*⁺ do genitor Hfr H e o gene *str*^r do genitor F⁻ poderiam crescer nesse *meio seletivo*. As células doadoras Hfr H seriam destruídas pela estreptomicina, e as células receptoras F⁻ não cresceriam sem treonina e leucina.

As colônias produzidas pelos recombinantes *thr*⁺ *leu*⁺ *str*^r foram transferidas para uma série de placas contendo diferentes meios seletivos para determinar quais dos outros marcadores da célula doadora estavam presentes. A série de placas incluía meios contendo suplementos específicos que possibilitaram a Wollman e Jacob determinar se os recombinantes tinham alelos da célula doadora ou receptora de cada gene. O meio contendo azida de sódio foi usado para distinguir células *azi*^s e *azi*^r. O meio contendo o bacteriófago T1 foi usado para classificar bactérias recombinantes como *ton*^s ou *ton*^r. O meio contendo lactose como única fonte de carbono foi usado para determinar se os recombinantes eram *lac*⁺ ou *lac*⁻, e o meio contendo galactose como única fonte de carbono foi usado para identificar recombinantes *gal*⁺ e *gal*⁻.

Quando a conjugação foi interrompida antes de 8 minutos após a mistura das células Hfr H e F⁻, não foram detectados recombinantes *thr*⁺ *leu*⁺ *str*^r. Os recombinantes (*thr*⁺ *leu*⁺ *str*^r) surgiram cerca de 8,5 minutos depois da mistura de células Hfr H e F⁻ e acumularam-se até alcançar uma frequência máxima em alguns minutos. Quando se analisou a presença dos marcadores da célula doadora em intervalos variados depois da mistura de células doadoras e receptoras, os alelos das doadoras foram transferidos para células receptoras em uma sequência temporal específica (Figura 8.17). O gene *azi*^s de Hfr H surgiu pela primeira vez em recombinantes cerca de 9 minutos depois da mistura das bactérias Hfr e F⁻. Os marcadores *ton*^s, *lac*⁺ e *gal*⁺ surgiram pela primeira vez depois de 11, 18 e 25 minutos de cruzamento, respectivamente. Esses resultados indicaram que os genes de Hfr H estavam sendo transferidos para as células F⁻ em uma ordem temporal específica, refletindo a ordem dos genes no cromossomo (Figura 8.18).

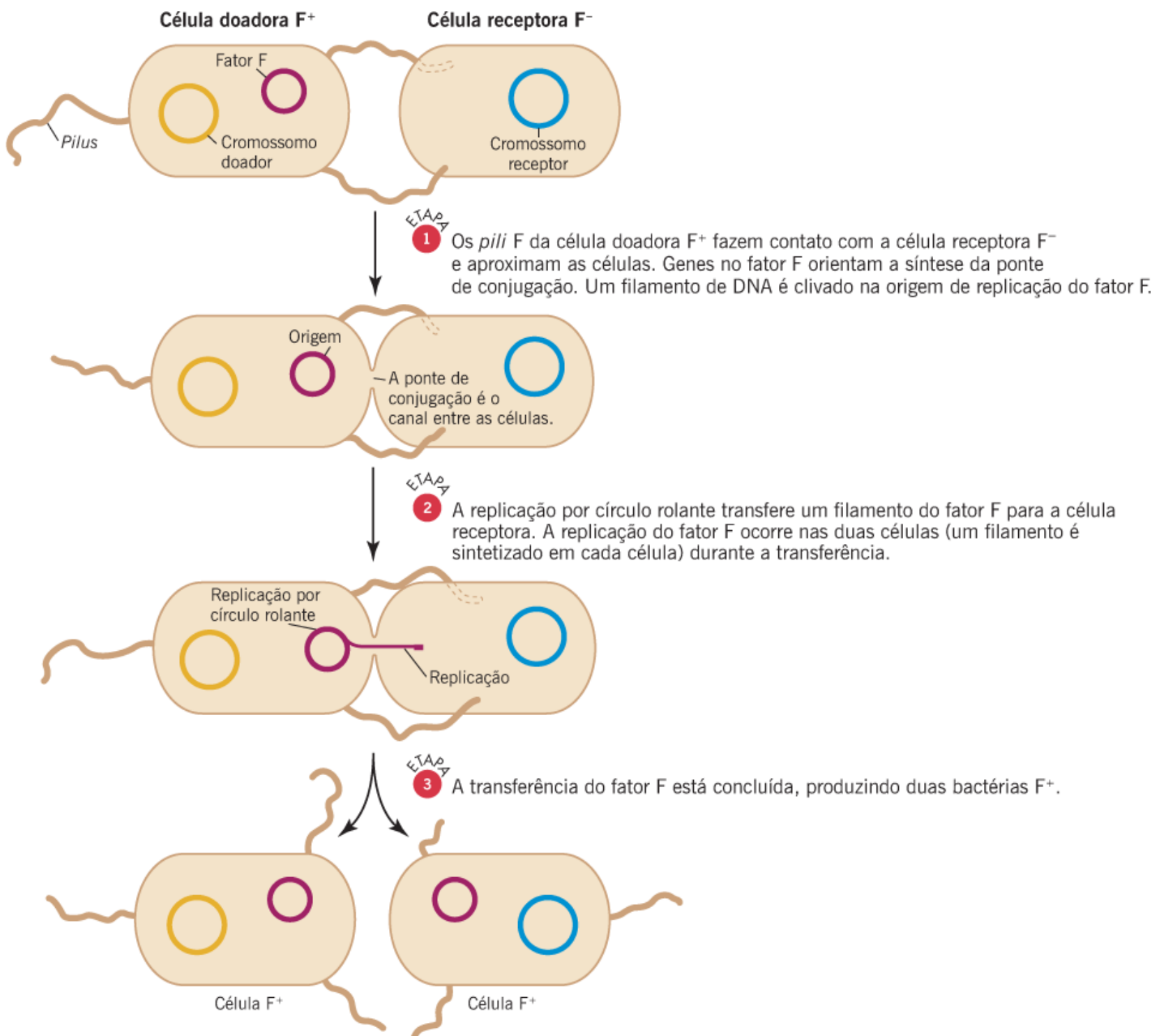
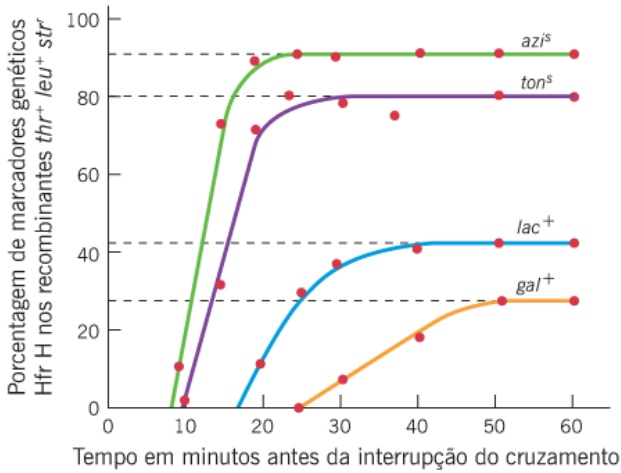


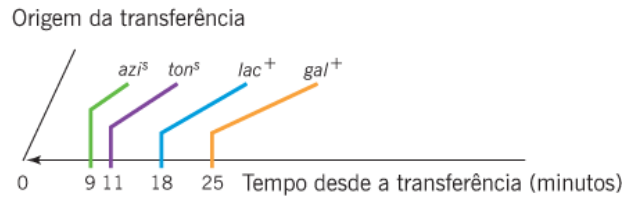
FIGURA 8.16 Cruzamento entre células F^+ e F^- . O fator F da célula doadora é replicado durante a transferência de uma célula F^+ para uma célula F^- . Quando o processo termina, cada célula tem uma cópia do fator F.

Resumo dos resultados



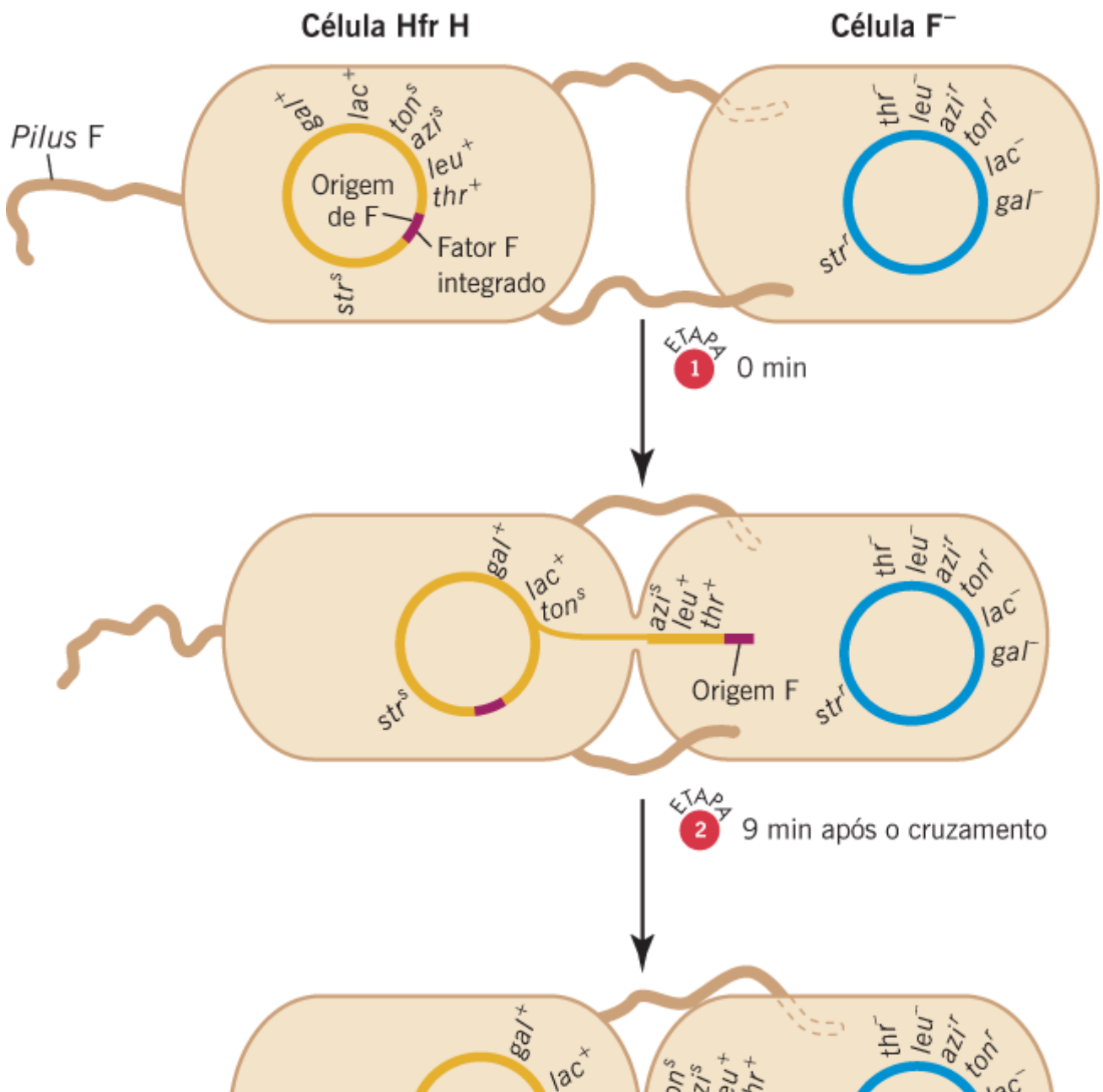
A.

Interpretação dos resultados



B.

FIGURA 8.17 Experimento de cruzamento interrompido clássico de Wollman e Jacob. **A.** As frequências dos alelos da célula doadora não selecionados encontrados em recombinantes $thr^+ leu^+ str^r$ são apresentadas em função do momento em que foi interrompido o cruzamento. **B.** Interpretação dos resultados com base na transferência linear de genes da célula Hfr para a célula F^- . A transferência é iniciada na origem no fator F, e o momento em que um gene é transferido para a célula F^- depende da distância entre ele e o fator F. A seta indica o sentido e a ordem de transferência dos genes do cromossomo doador para a célula receptora.



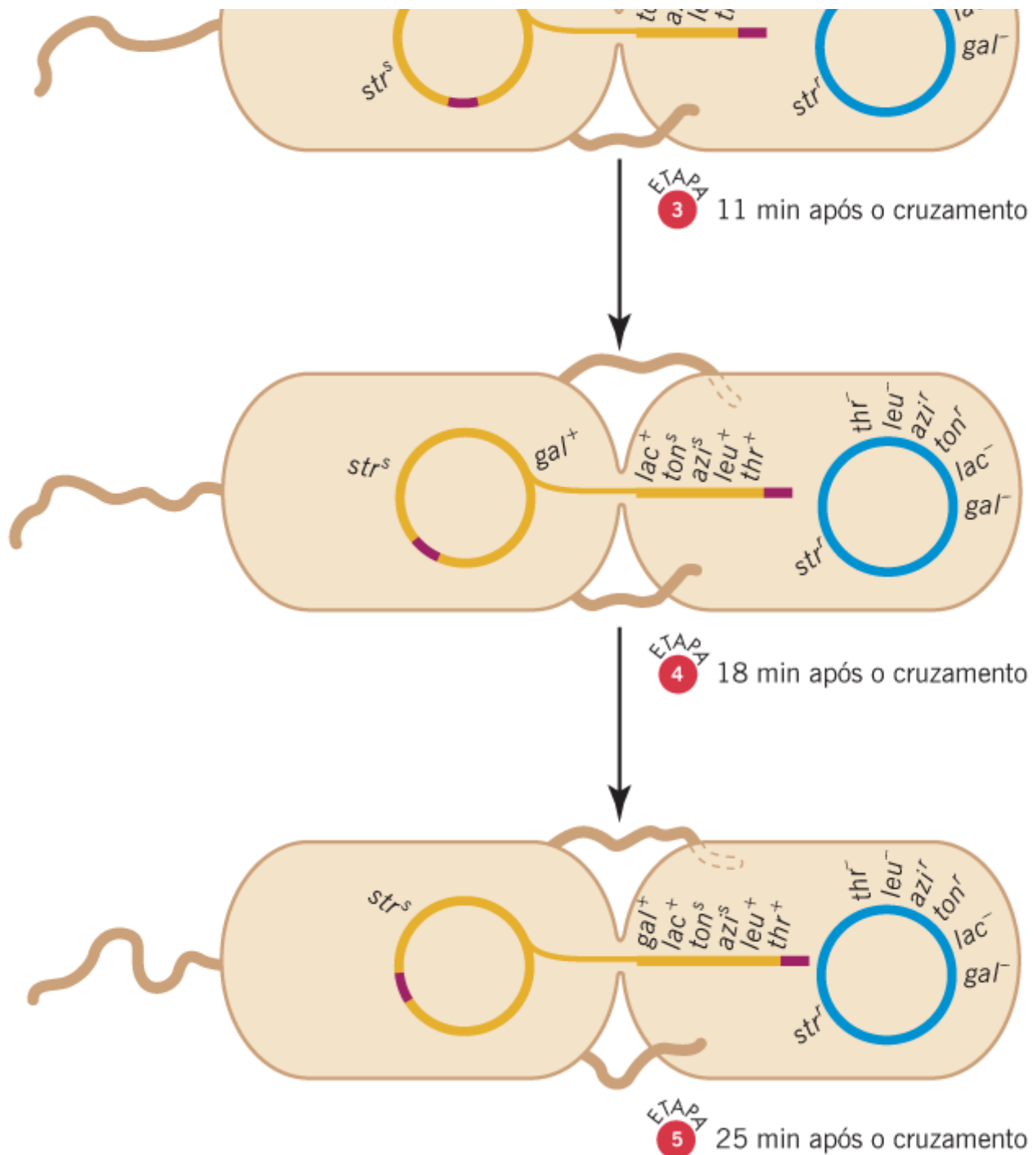


FIGURA 8.18 Interpretação do experimento de cruzamento interrompido de Wollman e Jacob. Há transferência linear de genes da célula doadora (Hfr H) para a célula receptora (F⁻). A transferência começa na origem da replicação no fator F integrado e prossegue com a transferência sequencial de genes de acordo com sua localização no cromossomo. O cromossomo replica-se durante o processo de transferência, de maneira que as células Hfr e F⁻ terminam com uma cópia do DNA transferido.

Estudos subsequentes com diferentes cepas de Hfr mostraram que a transferência gênica poderia ser iniciada em diferentes locais no cromossomo. Agora sabemos que o fator F pode integrar-se a muitos locais diferentes no cromossomo da *E. coli* e que o local de integração determina onde é iniciada a transferência gênica em cada cepa de Hfr. Além disso, a orientação da integração do fator F⁻ – seja *d c b a* em sentido horário, seja *a b c d* em sentido horário (Figura 8.15) – determina se a transferência de genes ocorre em sentido horário em relação ao mapa de ligação de *E. coli* ou em sentido anti-horário (Figura 8.19).

A transferência de um cromossomo completo de uma célula Hfr para uma célula F⁻ leva cerca de 100 minutos, e a velocidade da transferência parece ser razoavelmente constante. Assim, o tempo necessário para a transferência de genes durante a conjugação pode ser usado para mapear genes em cromossomos bacterianos. A distância de mapa de 1 minuto corresponde à extensão de um segmento cromossômico transferido em 1 minuto de conjugação em condições padronizadas. Portanto, o mapa de ligação de *E. coli* é dividido em 100 intervalos de 1 minuto (Figura 8.19). A coordenada zero desse mapa circular foi arbitrariamente definida no gene *thrA*. Quando se identifica uma nova mutação em *E. coli*, sua localização no cromossomo é determinada primeiro por mapeamento de conjugação. Em seguida, pode-se usar a transformação ou a transdução para fazer o mapeamento mais preciso. Para testar seu conhecimento sobre o mapeamento

da conjugação, deduza as localizações cromossômicas dos genes analisados no Problema resolvido | Mapeamento de genes com o auxílio de dados de conjugação.

PLASMÍDIOS E EPISSOMOS

Como já citado, o material genético de uma bactéria está em um cromossomo principal e em uma a várias moléculas de DNA extracromossômico chamadas plasmídios. Por definição, um **plasmídio** é um elemento genético com capacidade de replicação independente do cromossomo principal em um estado extracromossômico. A maioria dos plasmídios é dispensável ao hospedeiro; ou seja, não é necessária para a sobrevivência da célula em que residem. No entanto, em determinadas condições ambientais, como na presença de um antibiótico, eles podem ser essenciais se tiverem um gene para resistência ao antibiótico.

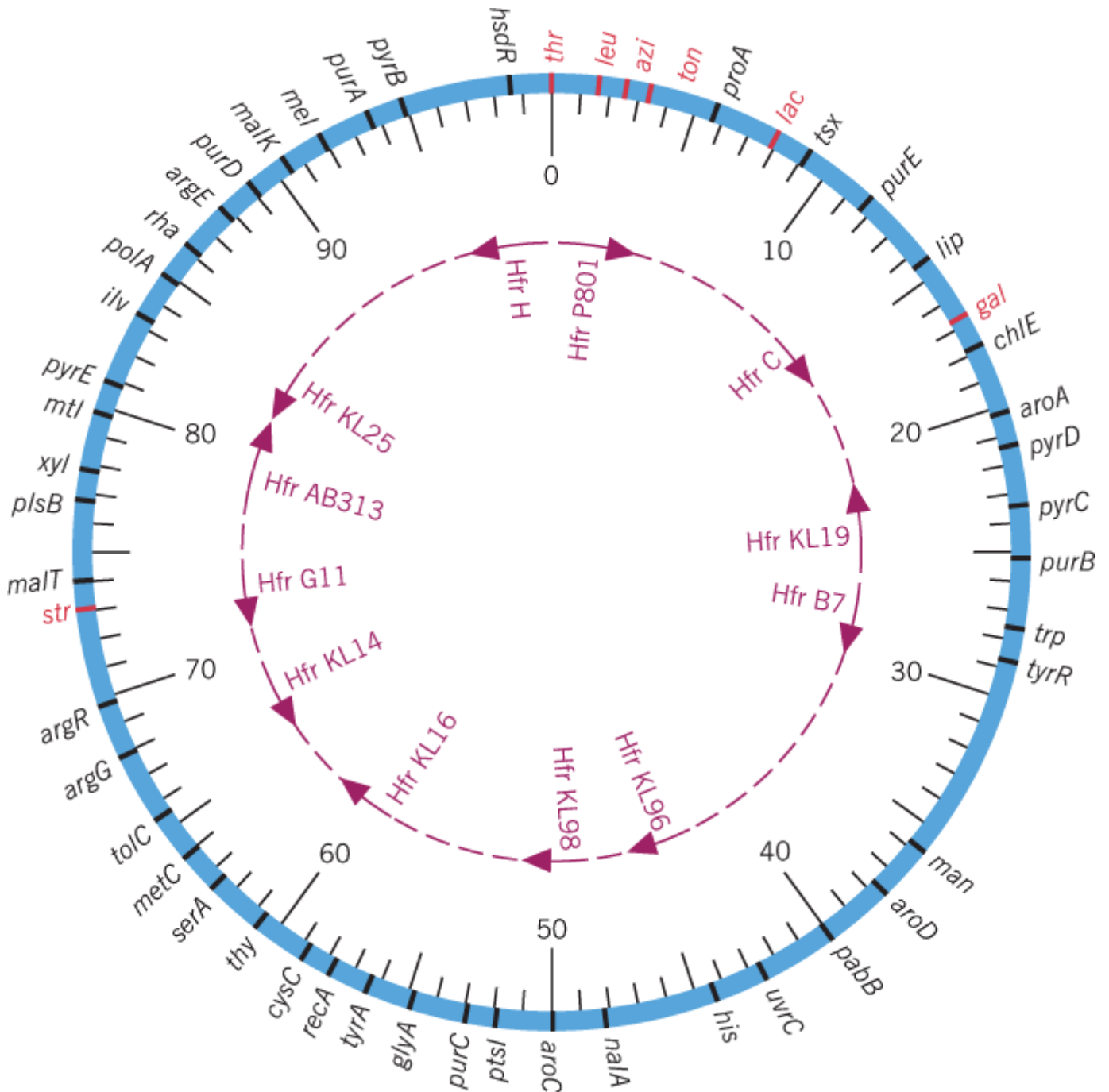


FIGURA 8.19 Mapa circular de ligação de *E. coli*. O círculo interno mostra os locais de integração do fator F em cepas Hfr selecionadas. As setas indicam se a transferência pela Hfr é horária ou anti-horária. O círculo externo mostra a posição de genes selecionados. O mapa é dividido em 100 unidades, em que cada unidade é o comprimento de DNA transferido durante 1 minuto de conjugação. Os genes mostrados em vermelho foram usados no famoso experimento de cruzamento interrompido de Wollman e Jacob (ver Figuras 8.17 e 8.18).



Mapeamento de genes com o auxílio de dados de conjugação

PROBLEMA

Você identificou uma cepa mutante de *E. coli* que não sintetiza o aminoácido triptofano (Trp^-). Com o objetivo de determinar a localização da mutação trp^- no cromossomo da *E. coli*, fez experimentos de cruzamento interrompido com quatro cepas diferentes de Hfr. Em todos os casos, as cepas de Hfr tinham os alelos selvagens dominantes dos genes marcadores, e a cepa F^- tinha os alelos mutantes recessivos desses genes. O diagrama a seguir mostra o momento de entrada em minutos (entre parênteses) dos alelos selvagens dos genes marcadores na cepa Trp^- de F^- . Os genes marcadores são thr^+ , aro^+ , his^+ , tyr^+ , met^+ , arg^+ e ilv^+ (que codificam enzimas necessárias para a síntese dos aminoácidos treonina, dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, histidina, tirosina, metionina, arginina e isoleucina mais valina, respectivamente) e man^+ , gal^+ , lac^+ e xyl^+ (necessários para a capacidade de catabolizar os açúcares manose, galactose, lactose e xilose, respectivamente, e usá-los como fontes de energia).

Hfr A – man^+ (1) trp^+ (9) aro^+ (17) gal^+ (20) lac^+ (29) thr^+ (37)

Hfr B – trp^+ (6) man^+ (14) his^+ (22) tyr^+ (34) met^+ (42) arg^+ (48)

Hfr C – thr^+ (3) ilv^+ (20) xyl^+ (25) arg^+ (33) met^+ (39) tyr^+ (47)

Hfr D – met^+ (2) arg^+ (8) xyl^+ (16) ilv^+ (21) thr^+ (38) lac^+ (46)

No mapa do cromossomo da *E. coli* circular apresentado, indique (1) a localização relativa de cada gene, (2) a posição em que o fator F é integrado a cada uma das quatro células Hfr e (3) a direção da transferência de cromossomo para cada Hfr (sentido horário ou anti-horário; indique a direção com uma seta).



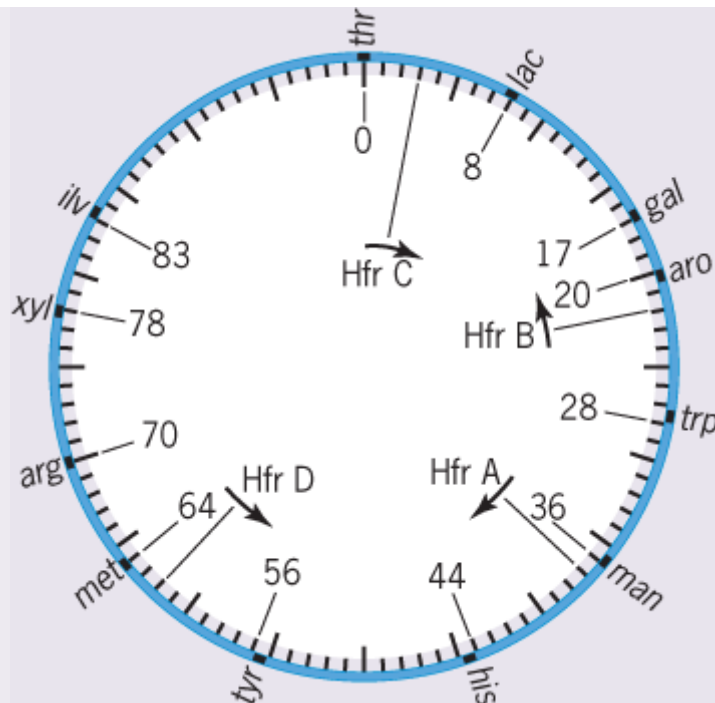
FATOS E CONCEITOS

1. O cromossomo da *E. coli* contém uma molécula circular de DNA.
2. O DNA cromossômico é transferido de células doadoras Hfr para células receptoras F^- por replicação por círculo rolante.
3. A replicação por círculo rolante e, portanto, a transferência de genes cromossômicos, inicia-se na origem de replicação no fator F integrado.
4. A direção da transferência (horária ou anti-horária) depende da orientação do fator F no cromossomo de Hfr.
5. O fator F consegue integrar-se a muitos locais diferentes no cromossomo da *E. coli* e em qualquer orientação (horária ou anti-horária).
6. O mapa genético do cromossomo da *E. coli* é dividido em minutos, e 1 minuto é o comprimento do DNA transferido de uma cepa de Hfr para uma cepa de F^- durante 1 minuto de conjugação.
7. A transferência de todo o cromossomo de uma célula Hfr para uma célula F^- leva 100 minutos; portanto, o mapa de ligação gênica do cromossomo circular completo tem 100 minutos.
8. Atribuiu-se arbitrariamente ao locus *thr* a posição "0" no mapa do cromossomo de *E. coli*, com aumento da distância de ligação de 0 a 100 minutos em sentido horário a partir de *thr*.

ANÁLISE E SOLUÇÃO

Se examinarmos a sequência de transferência dos genes de cada cepa de Hfr para a cepa de F^- , observaremos uma sequência linear em todos os casos.

Observe também que, seja qual for a sequência de transferência dos genes por diferentes cepas de Hfr, a distância entre genes adjacentes continua igual. A distância entre *man* e *trp* é de 8 minutos, por exemplo, sem levar em conta o uso da cepa A ou B de Hfr no experimento. Na verdade, se combinarmos os resultados obtidos usando as quatro cepas de Hfr e pusermos *thr* na posição 0, os dados produzirão o mapa genético circular a seguir. O mapa circular é um resultado satisfatório já que sabemos que o DNA cromossômico da *E. coli* também é circular.



Há três tipos principais de plasmídios em *E. coli*: os fatores F, os plasmídios R e os plasmídios Col. Os fatores de fertilidade (F) foram discutidos anteriormente (ver Conjugação). Os plasmídios R (plasmídios de resistência) têm genes que tornam as células hospedeiras resistentes aos antibióticos e a outros fármacos antibacterianos. Os plasmídios Col (antes denominados fatores colicinogênicos) codificam proteínas que destroem *E. coli* sensíveis. Existem muitos plasmídios Col diferentes, mas eles não serão discutidos com mais detalhes aqui.

Alguns plasmídios conferem às células hospedeiras a capacidade de conjugação. Todos os plasmídios F⁺, muitos plasmídios R e alguns plasmídios Col têm essa propriedade; são os chamados plasmídios conjugativos. Outros plasmídios R e Col não conferem às células a capacidade de conjugação; dizemos que são não conjugativos. A natureza conjugativa de muitos plasmídios R é importante na rápida disseminação de genes de resistência a antibióticos e fármacos nas populações de bactérias patogênicas. A evolução de plasmídios R que tornam as bactérias hospedeiras resistentes a múltiplos antibióticos tornou-se um problema médico grave, e o uso de antibióticos para fins não terapêuticos contribuiu para o rápido desenvolvimento de bactérias multidrogarresistentes (ver Em foco | Bactérias resistentes a antibióticos, disponível *on-line*).

Em 1958, François Jacob e Elie Wollman reconheceram que o fator F e alguns outros elementos genéticos tinham propriedades únicas. Eles chamaram essa classe de elementos de epissomos. Segundo Jacob e Wollman, um **epissomo** é um elemento genético não essencial para o hospedeiro, cuja replicação pode ser autônoma ou integrada (por inserção covalente) ao cromossomo da bactéria hospedeira. Os termos *plasmídio* e *epissomo* não são sinônimos. Muitos plasmídios não existem em estados integrados e, portanto, não são epissomos. Da mesma maneira, muitos cromossomos de fagos lisogênicos, como o genoma do fago λ, são epissomos, mas não plasmídios.

A capacidade dos epissomos de se inserirem nos cromossomos depende da existência de sequências curtas de DNA chamadas sequências de inserção (ou elementos IS [*insertion sequences*]). Os elementos IS são encontrados tanto nos epissomos quanto nos cromossomos bacterianos. Essas sequências curtas (cujo comprimento varia de cerca de 800 a 1.400 pares de nucleotídeos) são transponíveis; ou seja, podem passar de um cromossomo para outro (ver Capítulos 21, disponível *on-line*). Além disso, os elementos IS medeiam a recombinação entre elementos genéticos não homólogos no tocante aos demais aspectos. O papel dos elementos IS na mediação da integração de epissomos é bem-documentado no caso do fator F em *E. coli*. O *crossing over* entre elementos IS no fator F e o cromossomo bacteriano produz Hfr com diferentes origens e direções de transferência durante a conjugação (Figura 8.20).

FATORES F⁺ E SEXODUÇÃO

Como discutido na seção anterior, uma cepa Hfr é produzida pela integração de um fator F ao cromossomo por recombinação entre elementos IS no cromossomo e elementos IS no fator F (Figura 8.20). Você acredita que esse processo de recombinação possa ser reversível? Na verdade, há raras células F⁺ em culturas de Hfr, indicando que há excisão do fator F (por um processo que é basicamente o inverso do evento de integração mostrado na Figura 8.20 B). Além disso,

eventos anômalos de excisão como o mostrado na **Figura 8.21** produzem fatores F autônomos carreadores de genes do cromossomo bacteriano. Esses fatores F modificados, denominados F' ("F linha"), foram identificados pela primeira vez por Edward Adelberg e Sarah Burns em 1959. O tamanho dos fatores F' varia de um gene bacteriano até metade do cromossomo bacteriano (**Figura 8.22**).

A transferência de fatores F' para as células receptoras (F⁻) é chamada sexdução; ela ocorre por meio do mesmo mecanismo da transferência do fator F em cruzamentos F⁺ × F⁻ (ver **Figura 8.16**) – com uma importante diferença: genes bacterianos incorporados aos fatores F' são transferidos para células receptoras com uma frequência muito maior. Os fatores F' são ferramentas valiosas para os estudos genéticos; podem ser utilizados para produzir diploides parciais que carregem duas cópias de qualquer gene ou conjunto de genes ligados. Portanto, a sexdução pode ser usada para determinar as relações de dominância entre alelos e fazer outros testes genéticos que exigem duas cópias de um gene na mesma célula.

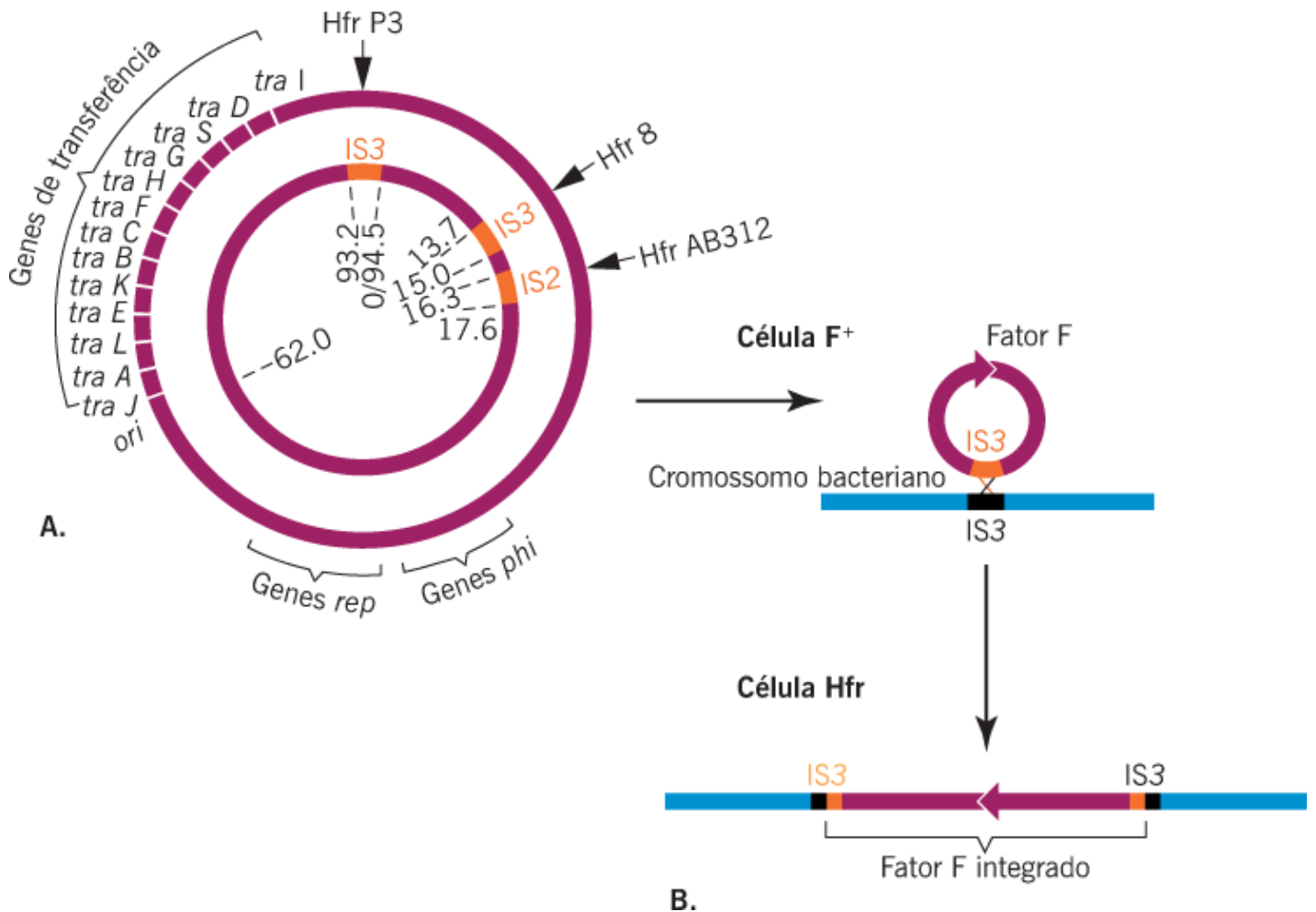
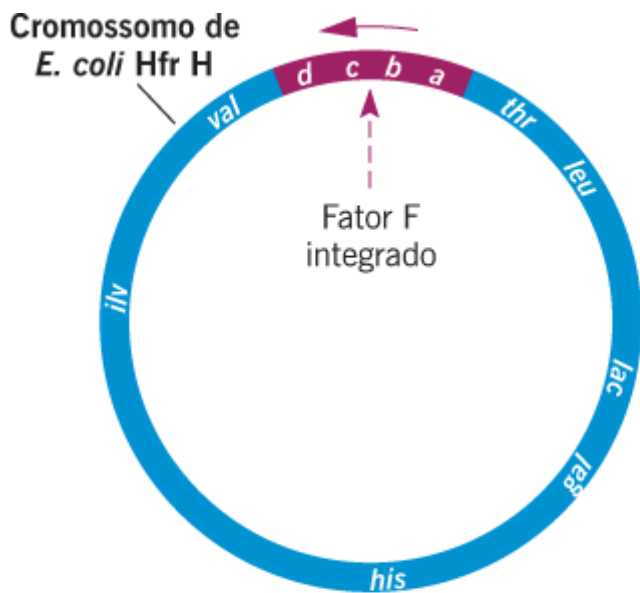
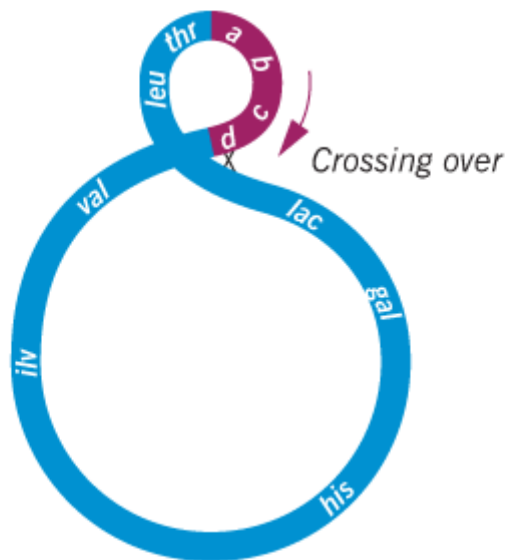


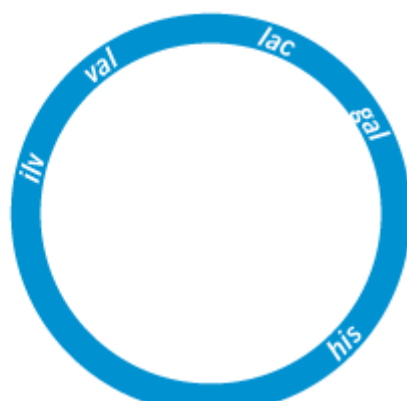
FIGURA 8.20 Elementos IS medeiam o fago de integração do fator F. **A.** Mapa abreviado da estrutura do fator F em cepa K12 de *E. coli*, com distâncias em quilobases (1.000 pares de nucleotídios). As localizações dos genes necessários para transferência conjugada (genes *tra*), replicação (genes *rep*) e inibição do crescimento do fago (genes *phi*) são mostradas junto com as posições de três elementos IS. As setas indicam o elemento IS específico que mediu a integração do fator F durante a formação das cepas Hfr indicadas. **B.** A recombinação entre elementos IS insere o fator F no cromossomo bacteriano, produzindo uma célula Hfr.



ETAPA 1
 O fator F faz uma alça externa ao cromossomo com os genes *thr* e *leu* na alça.



ETAPA 2
 Um *crossing over* excisa o fator F que tem os genes *thr* e *leu*, produzindo F' *thr leu*.



Cromossomo da *E. coli* com uma deleção dos genes *thr* e *leu*.

FIGURA 8.21 Formação de um F'. A excisão anômala do fator F de um cromossomo Hfr produz um fator F' *thr* *leu*, que carrega os genes cromossômicos *thr* e *leu*.

Considere um fator F' *thr*⁺ *leu*⁺ gerado por excisão anômala do fator F de Hfr H, como mostra a **Figura 8.21**. Os cruzamentos entre células doadoras F' *thr*⁺ *leu*⁺ e células receptoras *thr*⁻ *leu*⁻ produzem diploides parciais *thr*⁻ *leu*⁻/F' *thr*⁺ *leu*⁺. Esses diploides parciais são instáveis porque o fator F' pode ser perdido, produzindo haploides *thr*⁻ *leu*⁻, ou pode haver recombinação entre o cromossomo e o F', produzindo recombinantes *thr*⁺ *leu*⁺ estáveis. Para analisar com mais detalhes o uso de diploides parciais em mapeamento genético, leia Resolva | Como mapear genes próximos usando diploides parciais?

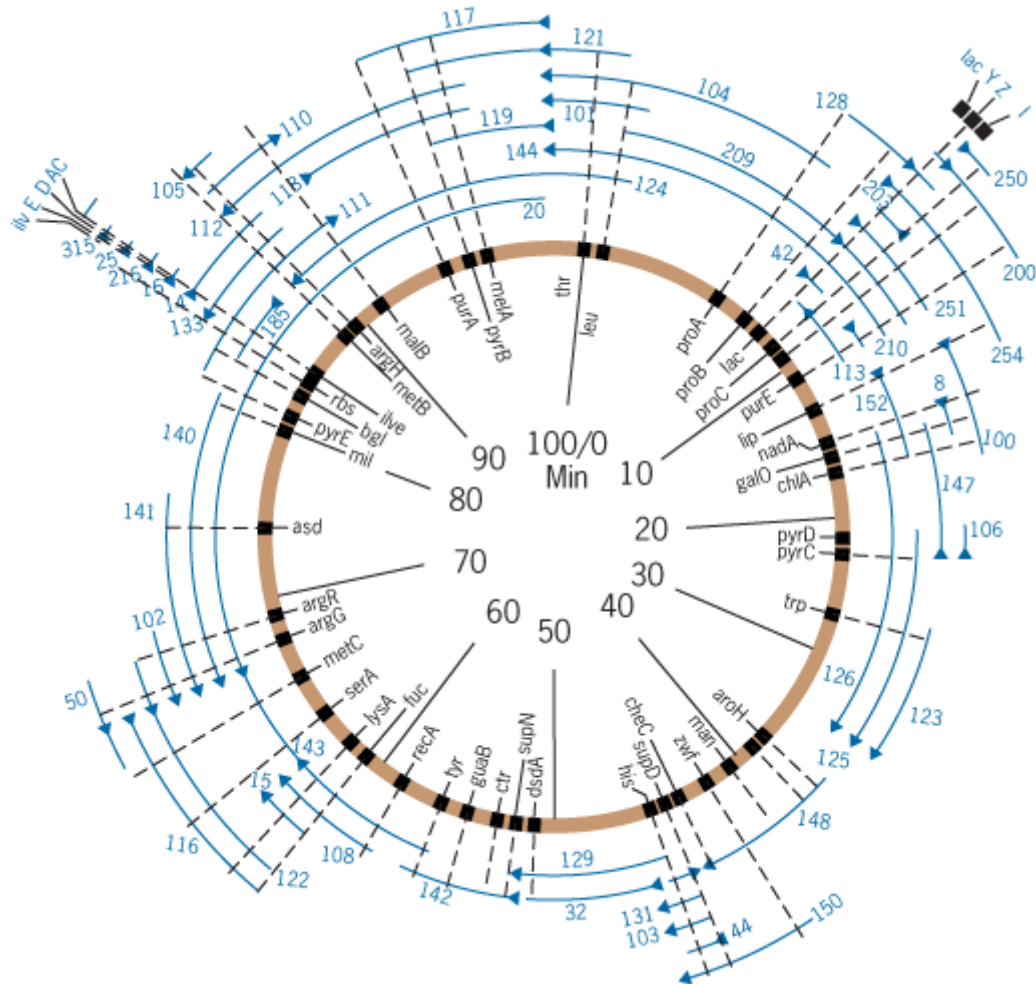


FIGURA 8.22 Fator F' em *E. coli*. Mapa do cromossomo de *E. coli* K12 mostrando os genes encontrados em F' representativos. Os fatores F' são desenhados como estruturas lineares para alinhá-los com os segmentos cromossômicos que contêm. Na realidade, são moléculas circulares de DNA – as estruturas formadas pela união das duas extremidades de cada fator F'.

TRANSDUÇÃO

A transdução – outro mecanismo de transferência gênica em bactérias – foi descoberta por Norton Zinder e Joshua Lederberg em 1952. Zinder e Lederberg estudaram cepas auxotróficas de *Salmonella typhimurium* cujo desenvolvimento exigia suplementos de aminoácidos. Uma cepa necessitava de fenilalanina, triptofano e tirosina, enquanto a outra necessitava de metionina e histidina. Nenhuma cepa conseguia se desenvolver em meio de cultura mínimo sem esses aminoácidos. No entanto, quando Zinder e Lederberg cultivaram as cepas juntas, foram produzidas raras bactérias prototróficas. Além disso, quando cultivaram as cepas em meio contendo DNase, mas as separaram nos dois ramos do tubo em U (**Figura 8.9**), ainda foram produzidos recombinantes prototróficos. A insensibilidade à DNase exclui a transformação como mecanismo subjacente, e o fato de que o contato celular era dispensável para o surgimento dos prototróficos excluiu a conjugação. Experimentos subsequentes mostraram que uma das cepas foi infectada por um vírus denominado bacteriófago P22 e que esse vírus levava genes de uma célula (doadora) para outra (receptora). Portanto, os raros prototróficos detectados por Zinder e Lederberg foram produzidos por recombinação entre o DNA bacteriano levado pelo vírus e o DNA no cromossomo da célula receptora.

Estudos posteriores mostraram que existem dois tipos muito diferentes de transdução. Na **transdução generalizada**, há na cabeça do fago um fragmento aleatório ou quase aleatório do DNA bacteriano em vez do cromossomo do fago. Na

transdução especializada, há uma recombinação entre o cromossomo do hospedeiro e o cromossomo do fago, produzindo um cromossomo do fago que contém um trecho de DNA bacteriano. As partículas do fago que contém DNA bacteriano são denominadas *partículas transdutoras*. As partículas transdutoras generalizadas contêm apenas DNA bacteriano. As partículas transdutoras especializadas sempre contêm DNA do fago e da bactéria.

Transdução generalizada

Fagos transdutores generalizados são capazes de transportar qualquer gene de uma bactéria para outra – daí o nome transdução generalizada. Os fagos transdutores generalizados mais conhecidos são P22 em *S. typhimurium* e P1 em *E. coli*. Apenas 1 a 2% das partículas de fago produzidas por bactérias infectadas por P22 ou P1 contêm DNA bacteriano, e apenas 1 a 2% do DNA transferido são incorporados ao cromossomo da célula receptora por recombinação. Assim, o processo é bastante ineficiente; a frequência de transdução de qualquer gene bacteriano é de aproximadamente 1 por 10^6 partículas de fago.

Transdução especializada

A transdução especializada é característica de vírus que transferem apenas determinados genes entre bactérias. O bacteriófago lambda (λ) é o fago especializado em transdução mais bem-conhecido; o fago λ só consegue carrear dois conjuntos de genes de uma bactéria *E. coli* para outra: os genes *gal*, necessários para a utilização da galactose como fonte de energia, ou os genes *bio*, essenciais para a síntese da biotina. Já comentamos neste capítulo a inserção local-específica do cromossomo do fago λ no cromossomo da *E. coli* para criar um estado lisogênico (ver Bacteriófago lambda). O local de inserção está entre os genes *gal* e *bio* no cromossomo da *E. coli* (Figura 8.5). A proximidade que esses genes têm do local de inserção do fago λ explica por que eles podem ser carreados de uma bactéria para outra por meio de um bacteriófago λ .

O cromossomo de fago λ integrado – o prófago λ – em uma célula lisogênica sofre excisão espontânea raramente (cerca de uma em cada 10^5 divisões celulares), que causa sua entrada na via lítica. A excisão do prófago também pode ser induzida, por exemplo, por irradiação de células lisogênicas com luz ultravioleta. A excisão normal é basicamente o inverso do processo de integração local-específico e produz cromossomos circulares do fago e de bactérias intactos (Figura 8.23 A). Às vezes, a excisão é anômala, com ocorrência de *crossing over* em outro local que não o local de ligação original. Quando isso acontece, uma parte do cromossomo bacteriano é excisada com o DNA do fago e uma parte do cromossomo do fago é mantida no cromossomo do hospedeiro (Figura 8.23 B). Essas excisões do prófago anômalo produzem fago transdutor especializado que carrega os genes *gal* ou *bio* do hospedeiro. Os fagos de transdução são chamados λ_{dgal} (do inglês, *lambda defective phage carrying gal genes*; fago λ defeituoso carreador de genes *gal*) e λ_{dbio} (do inglês, *lambda defective phage carrying bio genes*; fago λ defeituoso carreador de genes *bio*), respectivamente. Eles são partículas de fago defeituosas porque um ou mais genes necessários para a reprodução lítica ou lisogênica permaneceram no cromossomo do hospedeiro.

Em vista do tamanho pequeno da cabeça do fago, apenas genes bacterianos situados próximos do prófago podem ser excisados com o DNA do fago e acondicionados na cabeça dos fagos. Outro fago transdutor especializado, $\Phi 80$, integra-se perto dos genes *trp* de *E. coli* (necessários para a síntese do aminoácido triptofano); esse fago transduz marcadores *trp*. Caso sejam formadas partículas transdutoras especializadas durante a excisão do prófago, como mostra a Figura 8.23 B, elas só devem ser produzidas quando células lisogênicas entrarem na via lítica. Na verdade, não há partículas transdutoras em lisados produzidos a partir de infecções líticas primárias. A frequência de partículas transdutoras em lisados produzidos por indução de células lisogênicas é de aproximadamente 1 em cada 10^6 partículas da prole; portanto, esses lisados são denominados *Lft* (do inglês, *low-frequency transduction*, transdução de baixa frequência).



Resolva!

Como mapear genes próximos usando diploides parciais?

Suponha que se queira determinar a ordem de dois genes (*y* e *z*) em um *locus* em relação a um marcador (*x*) em um *locus* próximo. Fazem-se os seguintes cruzamentos recíprocos:

1. célula doadora $x^+ y^+ z^- \times$ célula receptora $x^- y^- z^+$ e

2. célula doadora $x^- y^- z^+$ × célula receptora $x^+ y^+ z^-$.

Observe que a ordem dos três genes (x , y e z) é desconhecida; eles são escritos arbitrariamente em ordem alfabética. Suponha que todos os mutantes sejam auxotróficos e que se possam preparar meios seletivos nos quais cresçam apenas recombinantes prototróficos ($x^+ y^+ z^+$). Quando quantidades iguais de prole são plaqueadas em meio seletivo, observam-se cerca de 200 recombinantes prototróficos no cruzamento 1, enquanto se detectam mais de 4.000 no cruzamento 2. Qual é a ordem dos três genes no cromossomo?

► Leia a resposta do problema no material disponível on-line.

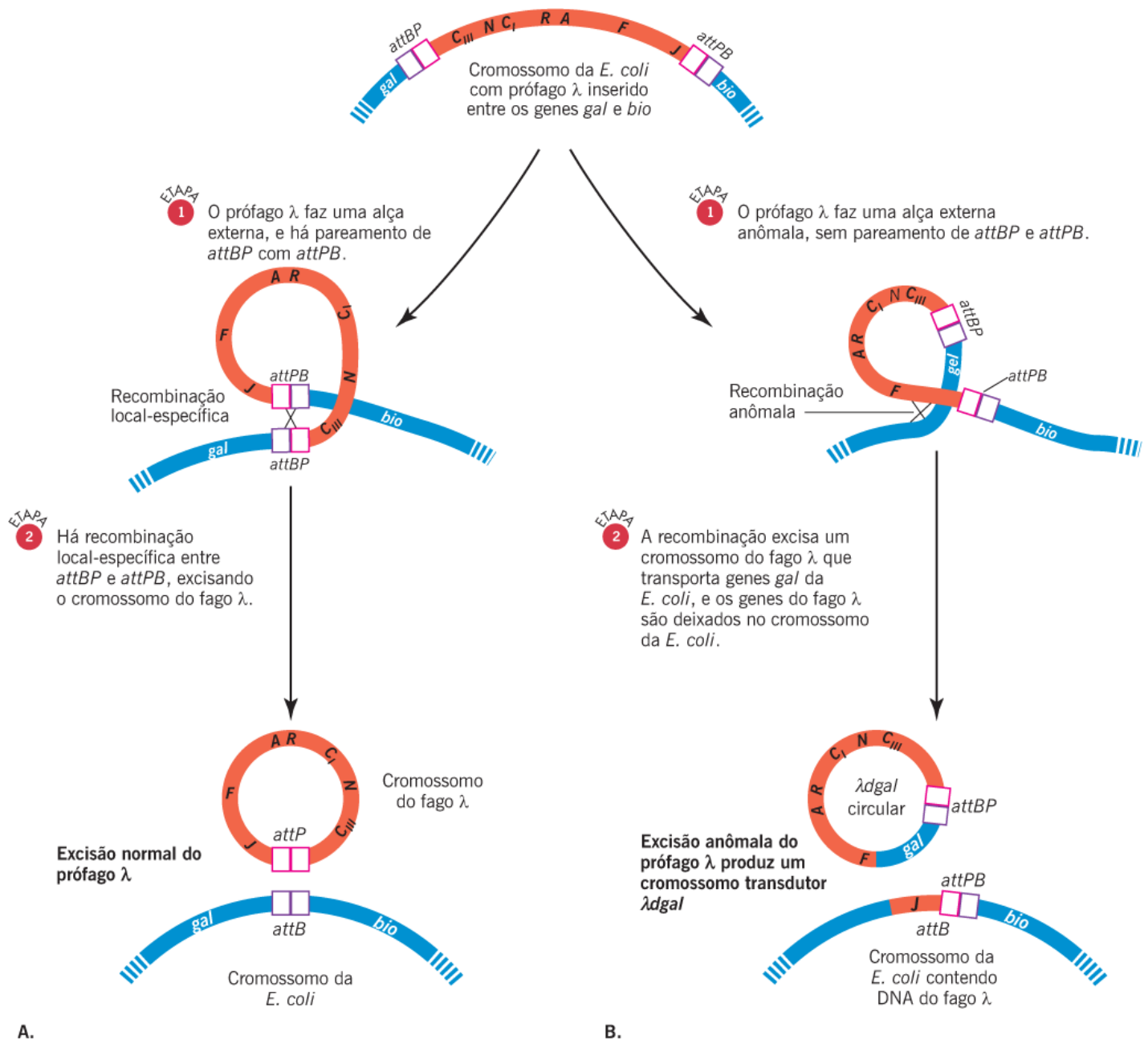


FIGURA 8.23 Excisão de prófago lambda. Comparação entre excisão normal do prófago λ (A) e excisão anômala com produção de cromossomos transdutores $\lambda dgal$ (B).

O destino das moléculas de DNA $\lambda dgal$ e l_{bio} depois da injeção em novas células hospedeiras depende de qual gene do fago λ não está presente. Se não houver genes para crescimento lítico, mas houver um local att e um gene int (integrase), os cromossomos defeituosos conseguirão se integrar ao cromossomo do hospedeiro. Entretanto, eles não serão capazes de se reproduzir liticamente a menos que exista um fago λ de tipo selvagem, funcionando como fago auxiliar. Se não houver o gene int , o cromossomo do fago defeituoso só será capaz de se integrar na presença de um auxiliar de tipo selvagem. Se um fago $\lambda dgal^+$ infectar uma célula receptora gal^- , a integração de $\lambda dgal^+$ produzirá um diploide parcial instável gal^+/gal^- (Figura 8.24 A), enquanto raros eventos de recombinação entre gal^+ no DNA passando por transdução e gal^- no cromossomo receptor produzirão transdutantes gal^+ estáveis (Figura 8.24 B).

Se a razão fagos/bactérias for alta, as células receptoras serão infectadas tanto pelo fago λ de tipo selvagem quanto por $\lambda dgal^+$; portanto, essas células serão lisogênicos duplos que transportam um prófago λ de tipo selvagem e um prófago