



Snustad &
Simmons

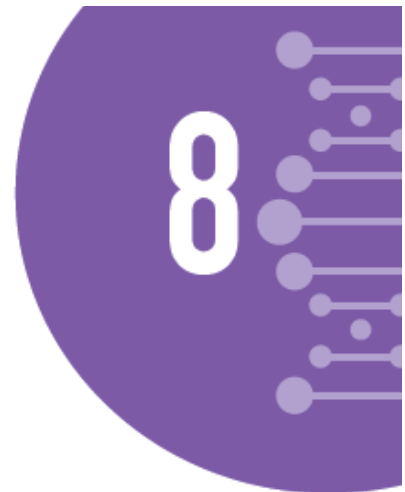
FUNDAMENTOS DE
GENÉTICA

7ª edição



QUANABARA
KOOGAN

Genética de Bactérias e seus Vírus



PANORAMA

- ▶ Vírus e bactérias em genética
- ▶ Genética dos vírus
- ▶ Genética das bactérias
- ▶ Mecanismos de troca genética em bactérias

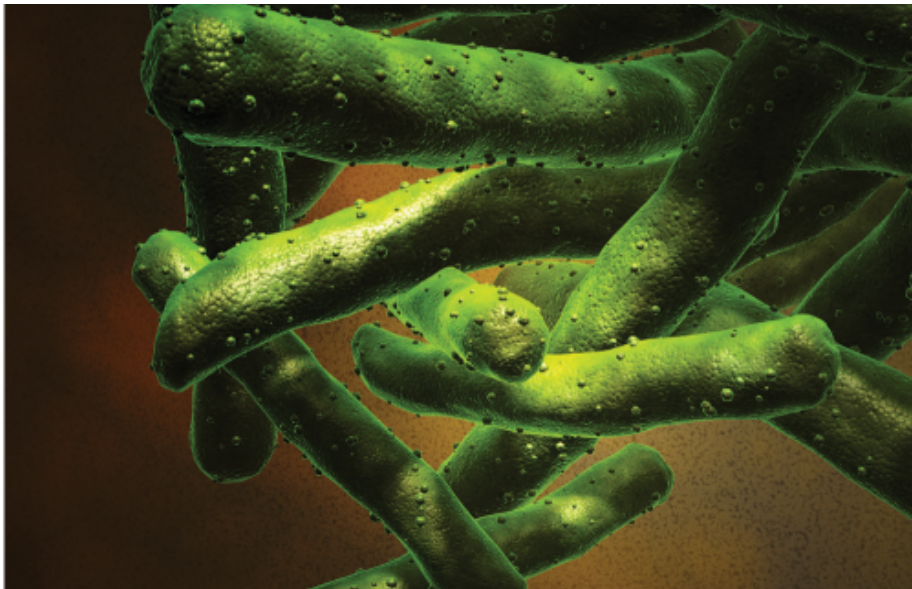
Bactérias multidrogarresistentes (MDR) | Uma bomba-relógio?

Oscar Peterson, filho de noruegueses que imigraram para a fronteira de Minnesota no fim do século 19, era uma criança feliz. Mas essa infância feliz durou pouco. Logo, sua mãe adoeceu, com tosse incessante, dor torácica e febre alta. Sua mãe tinha tuberculose (TB), uma doença temida, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. A TB é altamente contagiosa porque o *M. tuberculosis* é transmitido por gotículas em aerossol produzidas quando uma pessoa infectada tosse ou espirra. Muitas vezes era fatal, porque não existia tratamento eficaz na época. Prescrevia-se ar fresco e, por isso, a família Peterson dormia com as janelas abertas, mesmo durante os meses de inverno. A mãe de Oscar morreu quando ele tinha 14 anos, e sua vida imediatamente mudou. Ele abandonou a escola para cuidar dos irmãos mais novos enquanto o pai trabalhava.

Milhares de famílias pioneiras como os Petersons lutaram para sobreviver ao flagelo da tuberculose na primeira parte do século 20. Depois, antibióticos foram descobertos e houve uma revolução no tratamento das doenças bacterianas. Durante as décadas de 1940 e 1950, os cientistas descobriram um arsenal de antibióticos muito efetivos e a incidência de TB caiu substancialmente. Na verdade, muitos médicos acreditavam que a TB poderia ser totalmente erradicada. Infelizmente, estavam errados!

Hoje, muitas cepas de *M. tuberculosis* são resistentes a inúmeros fármacos e antibióticos. Essas cepas resistentes são de dois tipos: cepas multidrogarresistentes (MDR), que resistem à maioria dos antibióticos habitualmente prescritos, e cepas extremamente resistentes (XDR), resistentes também aos antibióticos usados no tratamento da TB MDR. As cepas MDR e XDR do *M. tuberculosis* são encontradas no mundo inteiro.

Qual é a gravidade da ameaça que o surgimento de bactérias MDR e XDR representa para a saúde humana? Dr. Lee Reichman, um dos grandes especialistas mundiais em tuberculose, definiu *M. tuberculosis* MDR como uma “bomba-relógio”. Talvez devamos começar a tomar providências no tocante a combater a crise da tuberculose MDR e XDR agora – antes que a “bomba” exploda.



Medical RF/Phototake.

Mycobacterium tuberculosis, a bactéria causadora da tuberculose em seres humanos.

Vírus e bactérias em genética

Bactérias e vírus fizeram contribuições importantes para a ciência da genética.

Vivemos em um mundo com incontáveis bactérias e vírus. Algumas bactérias, como *M. tuberculosis*, são prejudiciais; outras, como as que usamos para produzir iogurte, são úteis. As bactérias são importantes nos ecossistemas do planeta. Elas erodem as rochas, capturam energia das substâncias no ambiente, fixam o nitrogênio atmosférico em substâncias que podem ser usadas por outros organismos e decompõem o corpo de organismos mortos. Se as bactérias não desempenhassem essas funções, não existiria vida como a conhecemos. Esses microrganismos possibilitam a sobrevivência de grandes organismos multicelulares como nós.

Os geneticistas começaram a estudar as bactérias e seus vírus em meados do século 20, anos depois da consolidação dos princípios de Mendel e da teoria cromossômica da hereditariedade. Para os primeiros geneticistas bacterianos e virais, esses microrganismos pareciam oferecer a possibilidade de ampliar a análise genética até um nível bioquímico mais profundo – na verdade, até as moléculas que constituem os genes e os cromossomos. Como veremos neste capítulo e nos subsequentes, essa perspectiva empolgante foi concretizada. A análise genética de bactérias e vírus possibilitou que pesquisadores sondassem a natureza química dos genes e seus produtos. Tudo que agora chamamos de biologia molecular se baseia no estudo de bactérias e vírus.

Para um pesquisador, as bactérias e os vírus têm diversas vantagens em comparação com organismos como milho ou *Drosophila*. A primeira é que são pequenos, reproduzem-se com rapidez e formam grandes populações em questão de dias. Um estudioso consegue cultivar 10^{10} bactérias em um pequeno tubo de cultura; 10^{10} *Drosophila*, por sua vez, encheriam um cômodo de 4,3 m × 4,3 m × 4,3 m. A segunda vantagem é que bactérias e vírus conseguem crescer em meios de cultura bioquimicamente definidos. Como os constituintes do meio de cultura podem ser modificados à vontade, um pesquisador é capaz de identificar as necessidades químicas do organismo e investigar como ele processa essas substâncias durante seu metabolismo. Também é possível acrescentar fármacos como antibióticos ao meio para destruir as bactérias seletivamente. Esse tipo de tratamento possibilita ao pesquisador identificar cepas resistentes e sensíveis de uma espécie de bactérias – por exemplo, para verificar se *M. tuberculosis* cultivado em material colhido de um paciente é resistente a determinado antibiótico. A terceira vantagem é que bactérias e vírus têm estruturas e fisiologia relativamente simples. Portanto, são ideais para o estudo de processos biológicos fundamentais. Por fim, é fácil detectar a variabilidade genética entre esses microrganismos. Ao examinarmos bactérias ou vírus, quase sempre constatamos que têm fenótipos diversos e que essas diferenças são herdáveis. Por exemplo, algumas cepas de uma espécie bacteriana conseguem crescer em um meio definido bioquimicamente cuja única fonte de energia é a lactose, mas outras não. As cepas que não conseguem crescer

proteica e a divisão celular em nível molecular.

Os avanços da biologia molecular durante as últimas décadas garantiram muitas informações sobre os genomas de muitos vírus e bactérias. Hoje, conhecemos as sequências nucleotídicas completas dos genomas de numerosos vírus e bactérias. Essas sequências oferecem informações detalhadas sobre o controle genético do metabolismo em diversas espécies de micróbios e, principalmente, sobre suas relações evolutivas. Examinaremos algumas dessas informações no Capítulo 15.

Neste capítulo nos concentraremos em alguns vírus e bactérias que tiveram participações importantes na análise genética. Esses microrganismos incluem a bactéria *Escherichia coli* e dois vírus que a infectam. Iniciaremos tratando dos vírus.



PONTOS ESSENCIAIS

- O tamanho pequeno, o tempo de geração curto e as estruturas simples tornaram bactérias e vírus sistemas-modelo úteis para estudos genéticos
- Muitos conceitos básicos de genética são oriundos de estudos de bactérias e vírus.

Genética dos vírus

Os vírus só conseguem se reproduzir ao infectarem células hospedeiras vivas. Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias. Vários conceitos genéticos importantes foram descobertos graças aos estudos de bacteriófagos.

Os vírus situam-se na fronteira entre seres vivos e não vivos. Considere, por exemplo, um vírus que produz manchas nas folhas do tabaco, uma condição denominada doença do mosaico do tabaco. O vírus do mosaico do tabaco (TMV) pode ser cristalizado e armazenado durante anos. Nesse estado, não apresenta as propriedades normalmente associadas aos sistemas vivos: não se reproduz, não cresce nem se desenvolve; não usa energia e não responde a estímulos ambientais. No entanto, se uma suspensão líquida contendo o TMV for esfregada em uma folha do tabaco, os vírus em suspensão infectarão as células, se reproduzirão, usarão a energia fornecida pelas células vegetais e responderão a sinais celulares. Sem dúvida, eles apresentam propriedades de sistemas vivos.

Na verdade, é a simplicidade dos vírus que os torna recursos de pesquisa ideais para análise genética. Muitas questões difíceis de responder quando se usavam sistemas eucarióticos mais complexos foram resolvidas pelo uso de vírus. No Capítulo 9, discutiremos experimentos que usaram vírus para mostrar que as informações genéticas são armazenadas no DNA e no RNA. Nos Capítulos 10, 11 e 12 discutiremos experimentos com uso de vírus para esclarecer os mecanismos de duplicação, transcrição e tradução do DNA. Neste capítulo, focaremos nos vírus que infectam bactérias. Serão descritos a organização genômica de tais vírus e os métodos de análise elaborados pelos geneticistas.

Os vírus que infectam bactérias são denominados **bacteriófagos** (do grego, “comer bactérias”). Essa palavra é, com frequência, encurtada para *fagos*. Em laboratório, os fagos são propagados em culturas de bactérias suscetíveis a infecções. Essas bactérias podem ser cultivadas em tubos de cultura que contenham um meio líquido nutriente, chamado caldo, ou na superfície de um meio semissólido em placas de Petri. Quando um grande número de bactérias é aplicado à superfície desse meio, elas crescerão até finalmente cobri-la inteiramente, e ocorrer confluência das colônias. Suspensões de fagos nessa confluência de células bacterianas resultam em infecção e produção de progênie, que, por sua vez, infectará as bactérias próximas, e assim por diante, até a morte de todas as bactérias na vizinhança. Essa destruição localizada cria um “orifício” na camada confluenta de bactérias, chamado *placa*. Bacteriófagos podem ser isolados das placas ou do caldo de cultura nos tubos de ensaio.

Entre os muitos bacteriófagos identificados, dois tiveram papéis especialmente importantes na elucidação de conceitos genéticos. Ambos infectam o bacilo colônico, *Escherichia coli*, sendo, por consequência, chamados colífagos. Os bacteriófagos são classificados em dois tipos – virulentos e temperados – de acordo com o estilo de vida nas células infectadas. O bacteriófago T4 (fago T4) é do tipo virulento; usa o maquinário metabólico da célula hospedeira para se multiplicar e destrói a célula durante esse processo. O bacteriófago lambda (λ), do tipo temperado, pode destruir a célula hospedeira ou fazer uma associação especial com o hospedeiro e replicar seu genoma junto com o genoma da célula hospedeira a cada duplicação celular. Os resultados de estudos realizados com bacteriófagos T4 e lambda estabeleceram

BACTERÍOFAGO T4

O bacteriófago T4 é um vírus grande cujas informações genéticas são armazenadas em uma molécula de DNA bifilamentar acondicionada em um capsídeo, ou cabeça proteica (**Figura 8.1 A**). Esse vírus é composto quase inteiramente de proteína e DNA – cerca de 50% de cada por peso (**Figura 8.1 B**). O cromossomo do fago T4 tem aproximadamente 168.800 pares de bases e contém cerca de 150 genes caracterizados e um número igual de sequências não caracterizadas que supostamente são genes. A cauda do vírus tem vários componentes importantes. Seu cerne oco é um canal usado para injetar o DNA do fago na bactéria. A bainha contrátil da cauda atua como um pequeno músculo que se contrai e impele o cerne da cauda através da parede da bactéria. As seis fibras da cauda são usadas para localizar receptores na célula hospedeira, e as espículas da cauda na placa basal ligam-se com firmeza a esses receptores. O funcionamento correto de todos esses componentes é imprescindível à infecção bem-sucedida de *E. coli* pelo fago.

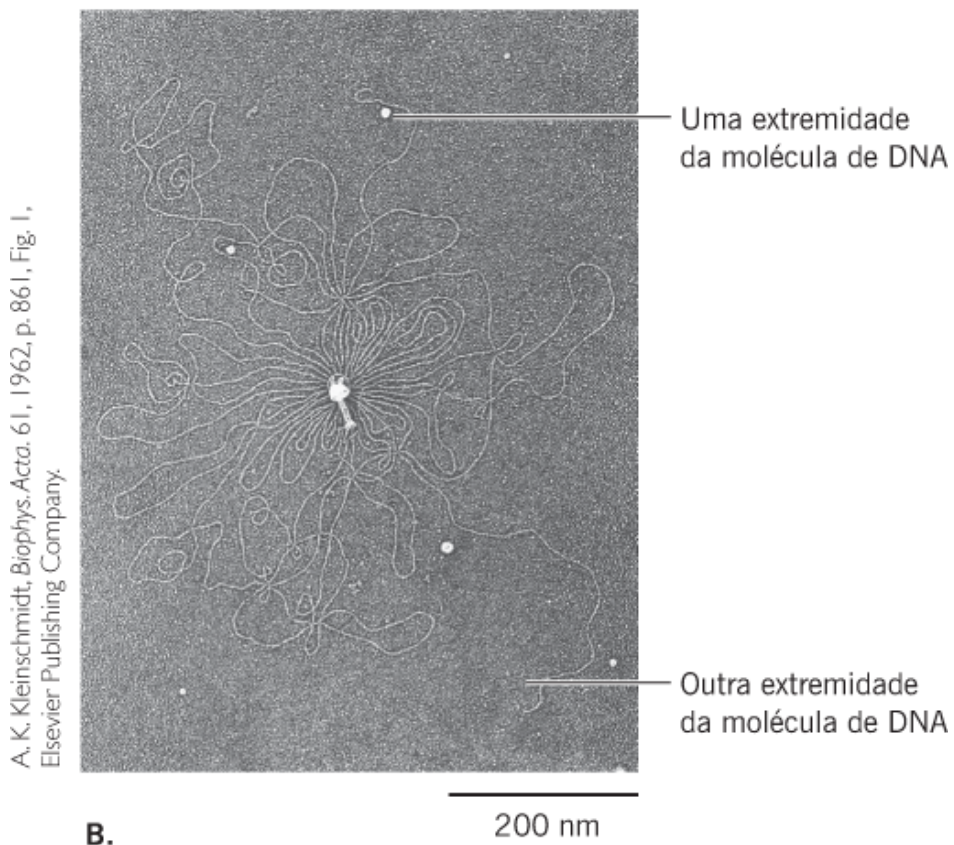
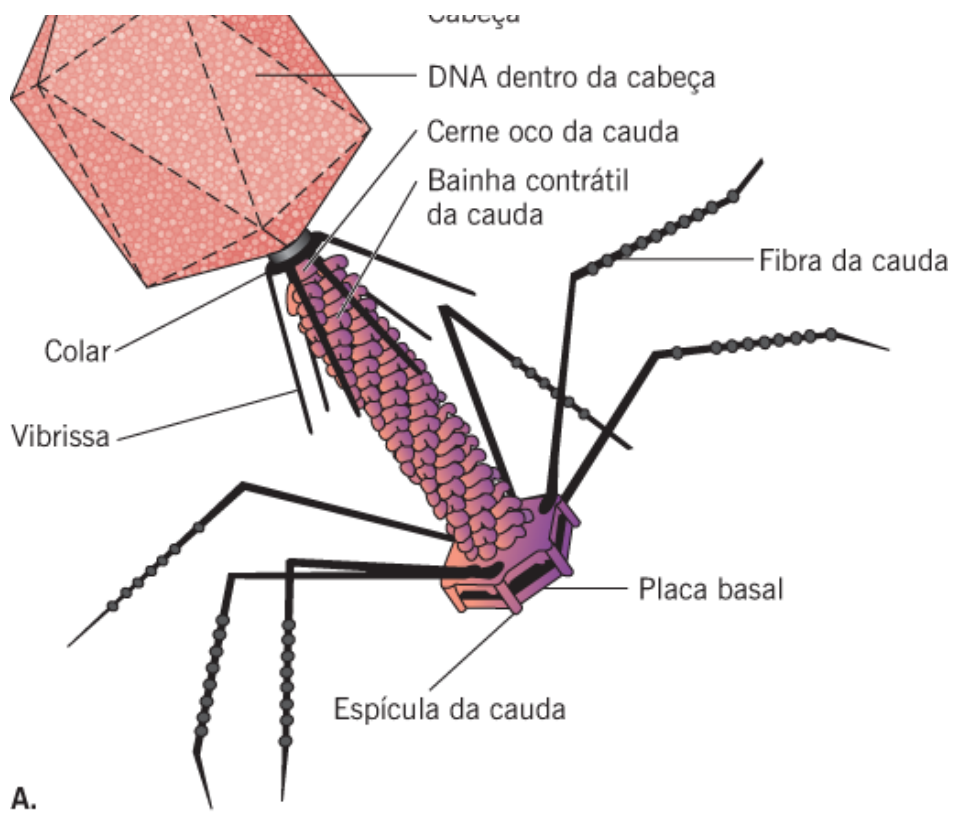


FIGURA 8.1 Bacteriófago T4. **A.** Diagrama mostrando a estrutura do bacteriófago T4. **B.** Microfotografia eletrônica de um bacteriófago T4 (*centro*) cujo DNA foi liberado por choque osmótico. É possível ver as duas extremidades da molécula linear de DNA.

com rapidez (dentro de 2 minutos) a síntese de proteínas que bloqueiam a transcrição, a tradução e a replicação de genes bacterianos, permitindo que o vírus assuma o controle do maquinário metabólico do hospedeiro. Alguns genes do fago codificam enzimas denominadas nucleases que decompõem o DNA do hospedeiro. Outras proteínas do fago iniciam a replicação do DNA do fago. Um pouco mais tarde, são expressos os genes que codificam os componentes estruturais do vírus. Em seguida, começa a montagem da prole viral; a prole infecciosa começa a se acumular na célula hospedeira aproximadamente 17 minutos após a infecção. Por volta de 25 minutos depois da infecção, uma enzima codificada pelo fago, denominada *lisozima*, decompõe a parede celular bacteriana e rompe a bactéria hospedeira, liberando cerca de 300 fagos por célula infectada.

Como já mencionado, o fago T4 codifica nucleases que degradam o DNA do hospedeiro. Os produtos dessa degradação são usados na síntese de DNA do fago. Mas como essas enzimas degradam o DNA do hospedeiro sem destruir o DNA do vírus? A resposta é que o DNA de T4 tem uma base incomum – 5-hidroximetilcitosina (HMC; citosina com um grupo $-CH_2OH$ ligado a um dos átomos na molécula de citosina) – em vez de citosina. Além disso, existem derivados das moléculas de glicose ligados à HMC. Essas modificações protegem o DNA do fago T4 da decomposição pelas nucleases que decompõem o DNA da célula hospedeira.

Existem muitos tipos diferentes de alelos mutantes no fago T4. As mutações termosensíveis (*ts*) estão entre as mais úteis. O fago T4 de tipo selvagem consegue crescer em temperaturas que variam de aproximadamente 25°C a 42°C, enquanto os mutantes termosensíveis crescem a 25°C, mas não a 42°C. Assim, é possível distinguir os mutantes *ts* do fago de tipo selvagem por cultura do fago em baixa e alta temperaturas. Outros tipos de mutações alteram o tamanho e o formato das placas formadas pelos fagos na camada confluenta de *E. coli*. As placas podem ser grandes ou pequenas, podem ter bordas bem- ou maldefinidas, e assim por diante.

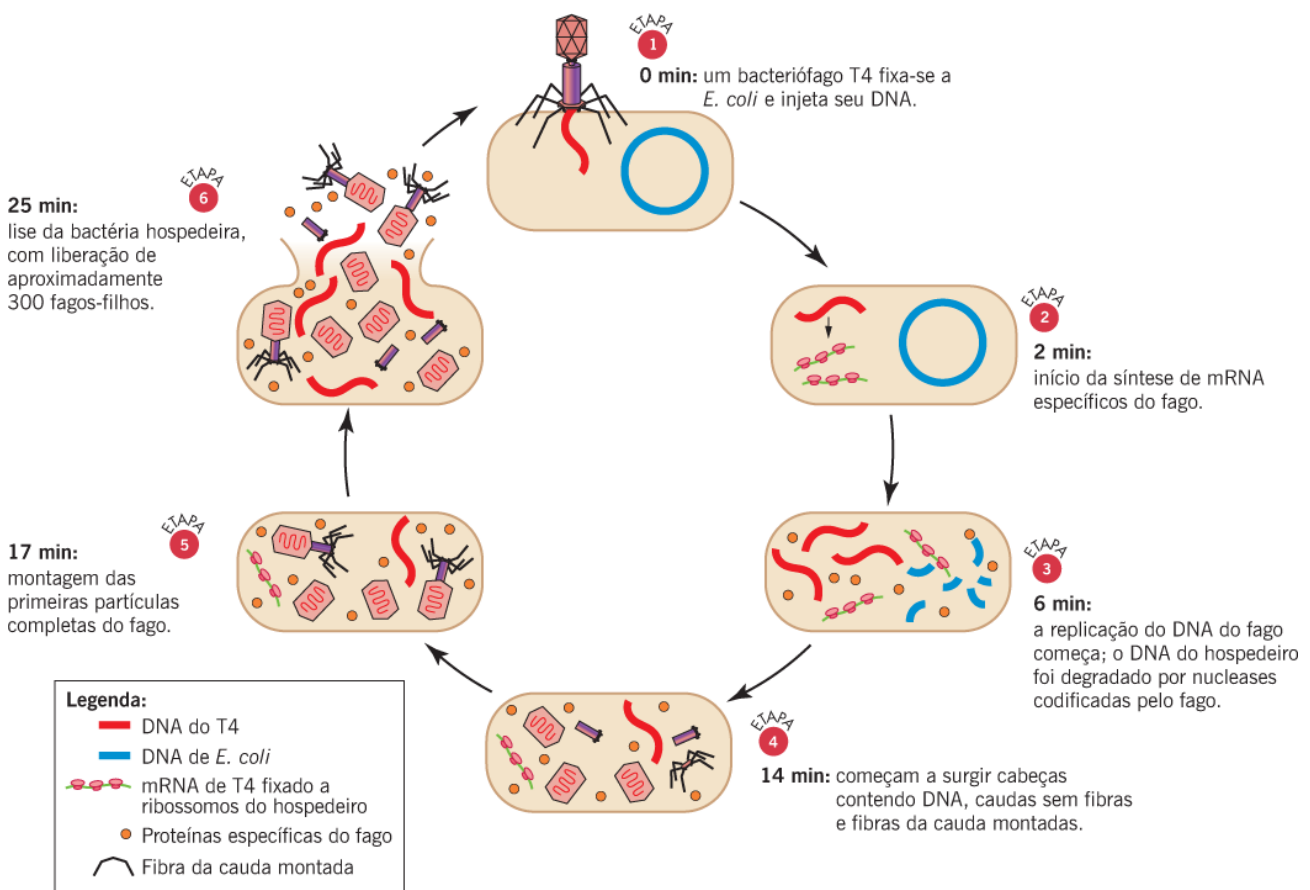


FIGURA 8.2 O ciclo de vida do bacteriófago T4.

Duas cepas diferentes de bacteriófagos podem ser “cruzadas” por meio de infecção simultânea de *E. coli*. Nessas infecções mistas, os cromossomos replicados dos dois tipos de fagos se recombinam e produzem novos genótipos. Por exemplo, se um dos fagos inserido tiver o genótipo $a^+ b^-$ e outro tiver o genótipo $a^- b^+$, a recombinação consegue produzir os genótipos $a^- b^-$ e $a^+ b^+$. Experiências com infecções mistas vêm permitindo aos pesquisadores o mapeamento de genes

BACTERIÓFAGO LAMBDA

O bacteriófago lambda (λ) é outro colífago que fez grandes contribuições à genética. Ele é menor que o fago T4; mas seu ciclo de vida é mais complexo. O genoma do fago lambda contém cerca de 50 genes em uma molécula de DNA bifilamentar com 48.502 pares de bases de comprimento. Essa molécula linear de DNA está acondicionada na cabeça do fago λ (Figura 8.3). Logo após ser injetado em *E. coli*, o DNA do fago λ é convertido em uma forma circular, que participa de todos os eventos intracelulares posteriores.

Dentro da célula, o cromossomo circular do fago λ pode seguir por duas vias (Figura 8.4). Pode entrar em um ciclo lítico, durante o qual se reproduz e codifica enzimas que lisam a célula hospedeira, assim como o fago T4. Ou pode entrar em uma via **lisogênica**, na qual é inserido no cromossomo da bactéria hospedeira e, depois, é replicado junto com esse cromossomo. Nesse estado integrado, o cromossomo do fago λ é denominado **prófago**. Para que esse estado persista, é crucial que os genes do prófago que codificam produtos participantes da via lítica – por exemplo, enzimas que participam da replicação do DNA do fago, proteínas estruturais necessárias para a morfogênese do fago e a lisozima que catalisa a lise celular – não sejam expressos.

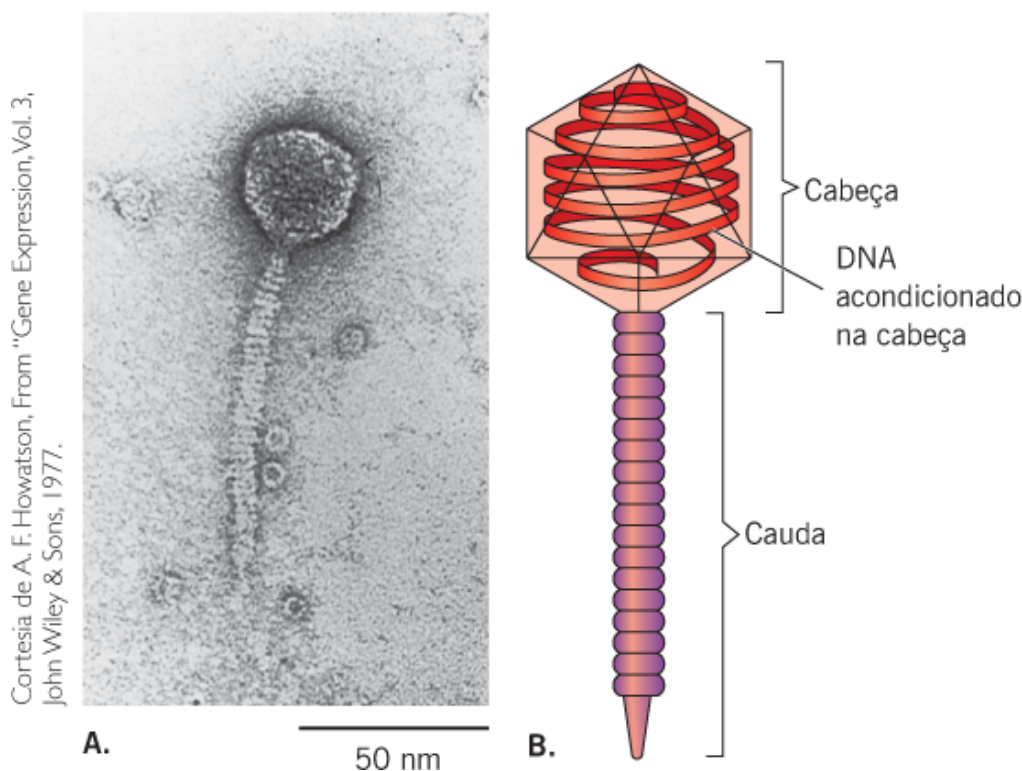


FIGURA 8.3 Bacteriófago T4. Microfotografia eletrônica (A) e diagrama (B) mostrando a estrutura do bacteriófago λ . Baseada em *A Genetic Switch 2e*. Cell and BSP Press. Blackwell.

A integração do cromossomo do fago λ ocorre por um evento de recombinação local-específico entre o DNA circular do fago λ e o cromossomo circular de *E. coli* (Figura 8.5). Essa recombinação ocorre em locais de ligação específicos – *attP* no cromossomo do fago λ e *attB* no cromossomo bacteriano – e é mediada pelo produto do gene *int* do fago λ , a integrase do fago λ . A integrase faz a inserção covalente do DNA do fago λ no cromossomo da célula hospedeira. Essa proteína insere de modo covalente o DNA do fago λ no cromossomo da célula hospedeira. A recombinação local-específica ocorre na região central dos locais de ligação, onde *attP* e *attB* têm a mesma sequência de 15 pares de nucleotídeos:

```
GCTTTTTTATACTAA  
CGAAAAAATATGATT
```

Com exceção dessa sequência central, *attP* e *attB* têm sequências muito diferentes. Como a recombinação ocorre nessa sequência central durante a integração, os locais *attB/P* e *attP/B* resultantes que flanqueiam o prófago integrado

Cerca de uma vez em cada 10^5 divisões celulares, o prófago λ é excisado espontaneamente do cromossomo do hospedeiro e entra na via lítica. Esse fenômeno explica por que se diz que o prófago está em estado *lisogênico*, ou seja, capaz de causar lise, ainda que com baixa frequência. A excisão do prófago λ também pode ser induzida, por exemplo, por irradiação com luz ultravioleta. O processo de excisão geralmente é preciso, com recombinação local-específica entre as sequências centrais em *attB/P* e *attP/B*. Produz um cromossomo do fago λ autônomo que tem a forma pré-integração original. A excisão exige λ integrase e o produto do gene *xis* do fago I, uma proteína chamada λ excisase. Essas duas enzimas medeiam um evento de recombinação local-específico que é essencialmente o reverso do evento de integração. Às vezes, a excisão é anômala e o DNA bacteriano é excisado junto com o DNA do fago. Quando isso ocorre, o vírus resultante consegue transferir genes bacterianos de uma bactéria hospedeira para outra. Discutiremos esse processo adiante (ver Mecanismos de troca genética em bactérias).

Estudos com o fago λ contribuíram muito para nosso conhecimento sobre os fenômenos genéticos. Analisaremos a replicação do cromossomo do λ no Capítulo 9. A descoberta do prófago λ (graças à qual André Lwoff foi um dos laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1965) criou o paradigma para os estados provirais do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Capítulos 21, disponível *on-line*) e de vários vírus tumorais de RNA de vertebrados (Capítulos 23, disponível *on-line*).

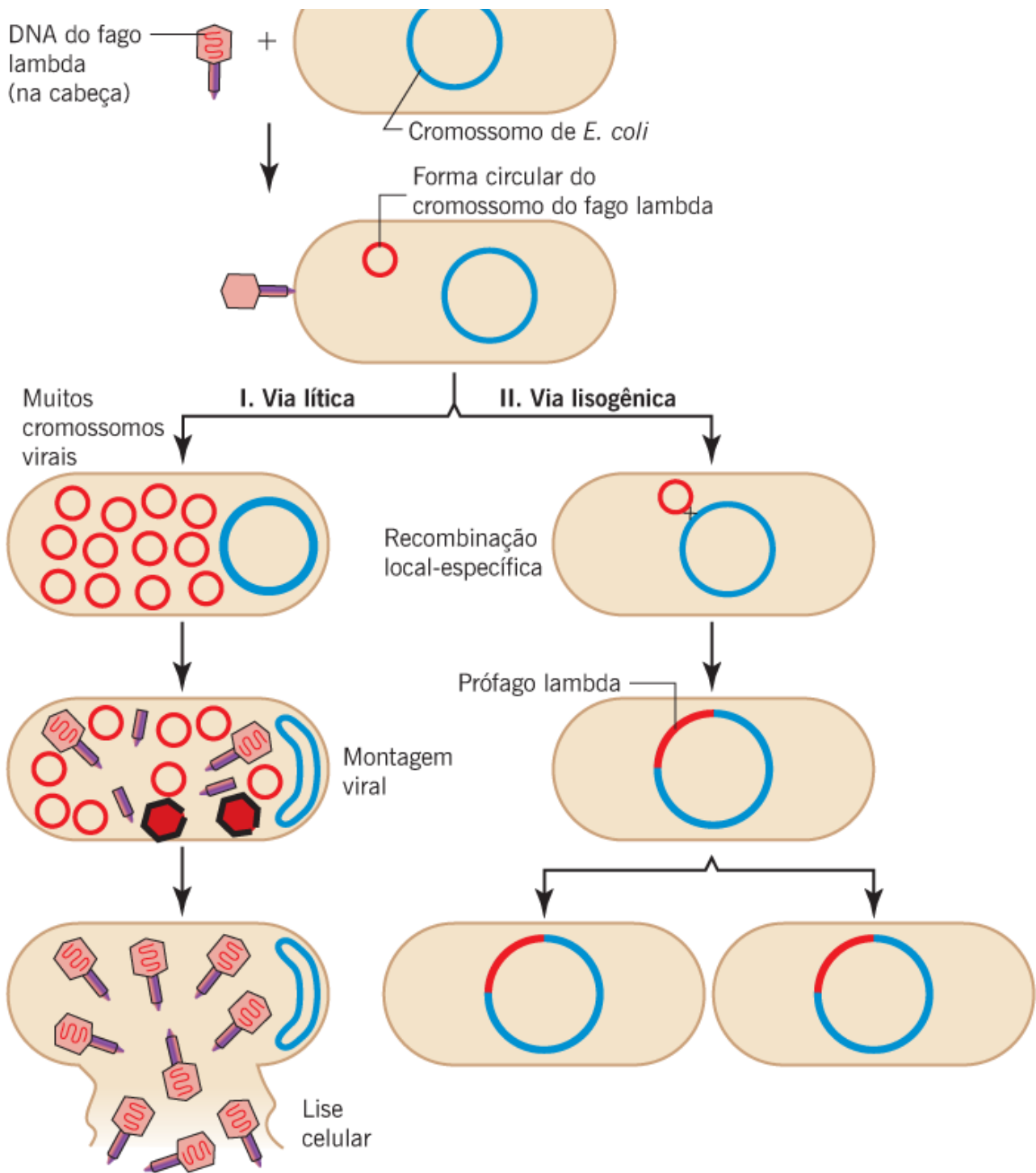


FIGURA 8.4 O ciclo de vida do bacteriófago T4. Duas etapas intracelulares do bacteriófago lambda: crescimento lítico e lisogenia.

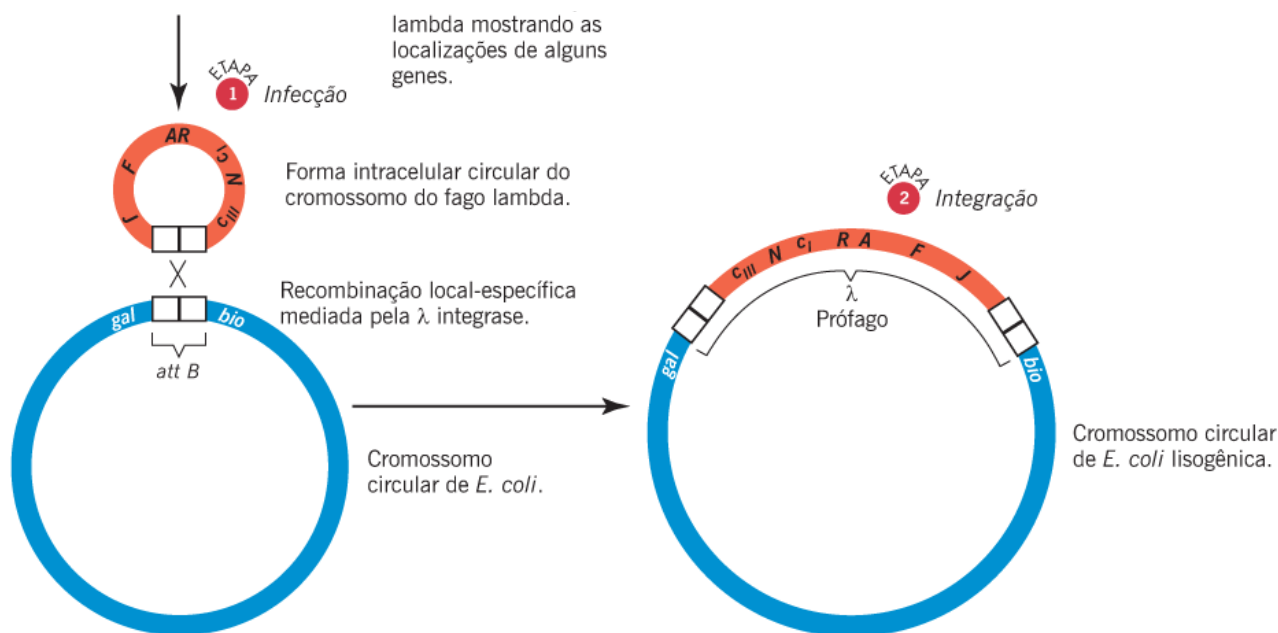


FIGURA 8.5 Integração da molécula de DNA do fago lambda ao cromossomo de *E. coli*.



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

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*⁻.

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, *o 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**).

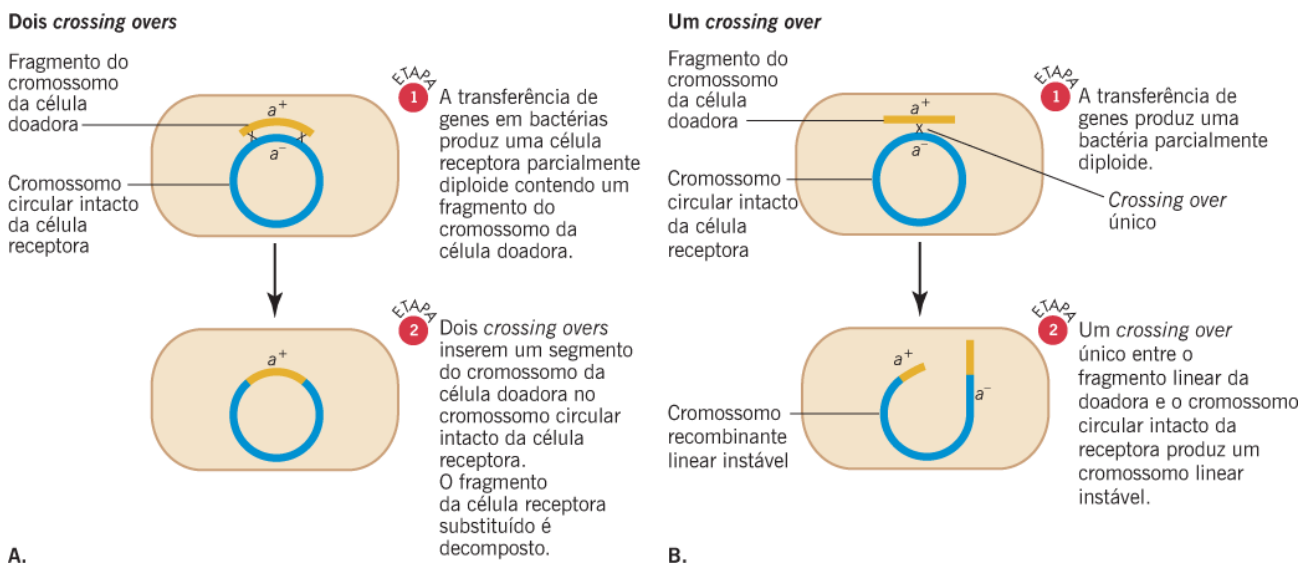


FIGURA 8.7 Recombinação em bactérias. Os processos parassexuados que ocorrem em bactérias produzem diploides parciais que contêm fragmentos lineares do cromossomo das células doadoras e cromossomos circulares intactos das células receptoras. **A.** Para manter a integridade dos cromossomos circulares, 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.

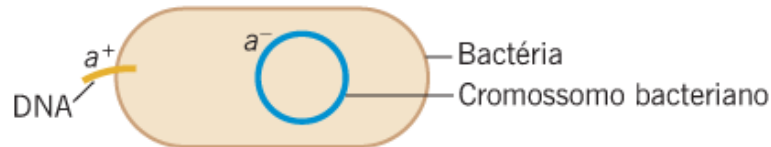
Mecanismos de troca genética em bactérias

As bactérias trocam material genético por três processos parassexuados diferentes.

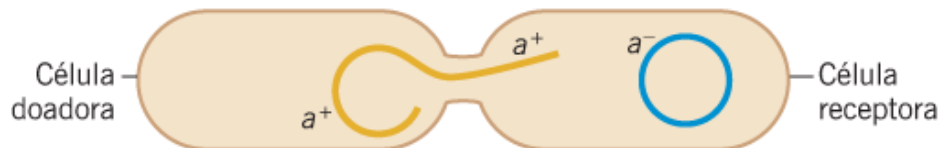
doadora) por outra bactéria (a célula receptora). A **conjugação** é a transferência direta de DNA de uma célula doadora para uma célula receptora. A **transdução** envolve a transferência de genes de uma célula doadora bacteriana para uma receptora com o auxílio de um bacteriófago; os genes transferidos 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.

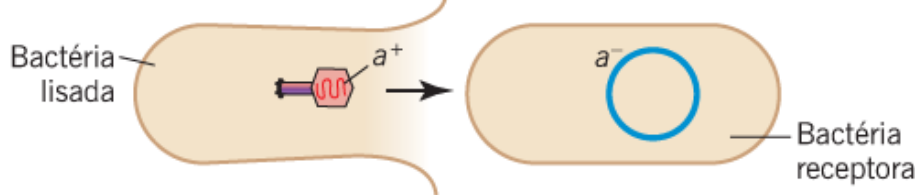


FIGURA 8.8 Os três tipos de transferência gênica em bactérias.

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	Necessidade de contato celular:	Sensível a DNase:
Transformação	Não	Sim
Conjugação	Sim	Não
Transdução	Não	Não

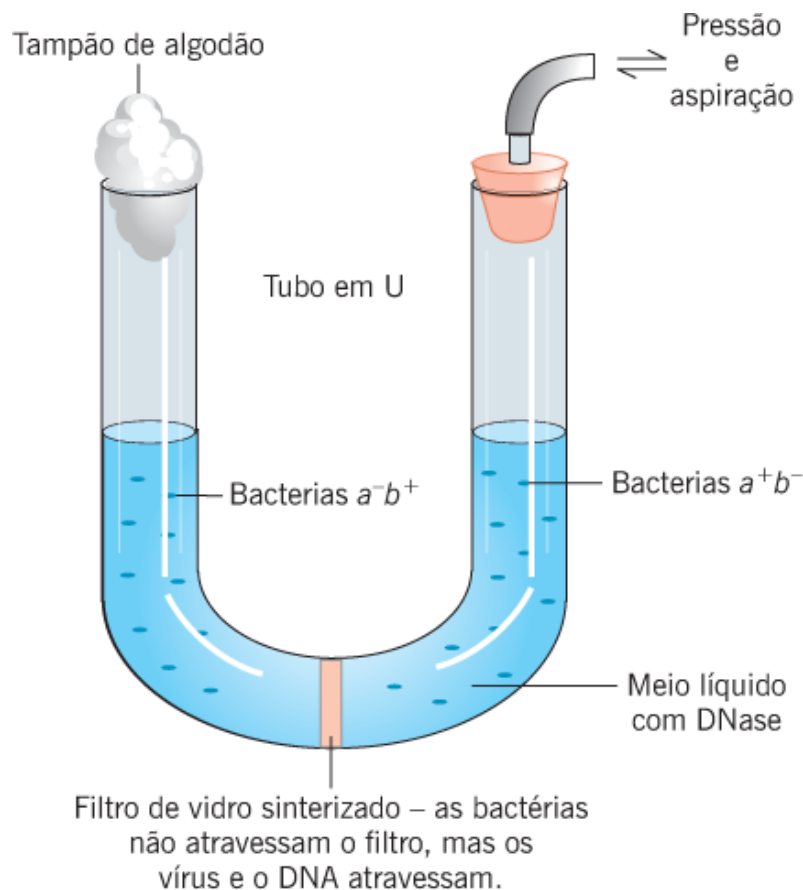


FIGURA 8.9 O experimento com tubo em U com bactérias. O tubo em U é usado para verificar se a recombinação exige ou não contato celular. Bactérias de diferentes genótipos são colocadas em cada ramo do tubo, separadas por um filtro de vidro que impede o contato entre elas. Se houver recombinação, não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

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 IIIS destruídos pelo calor (virulentos quando vivos) mais pneumococos do tipo IIR 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	Agglutinação	Não
IIIRa	Rugosa	Pequeno	Ausente	Não virulento	Não	Não
IIIS	Lisa	Grande	Presente	Virulento	Não	Agglutinação

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.

© The Rockefeller University Press. The Journal of Experimental Medicine, 1944, 79: 137–158. (originally written as From O.T. Avery, C. M. MacLeod, and M. McCarty, J. Exp. Med. 79: 153, 1944; by copyright permission of Rockefeller University Press.)

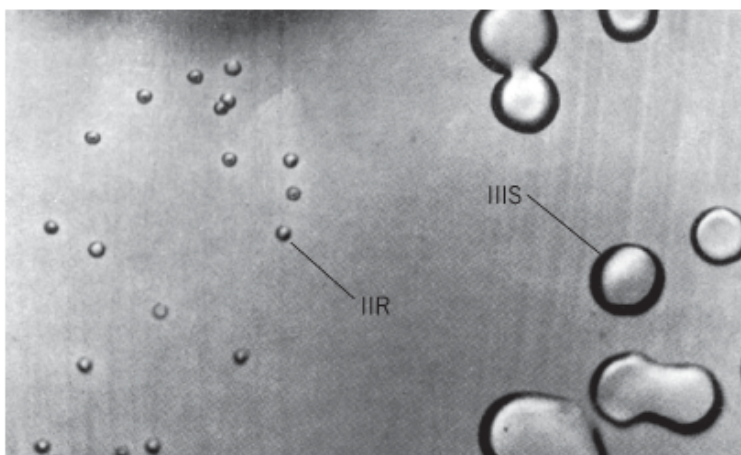


FIGURA 8.10 Fenótipos de colônias das duas cepas de *Streptococcus pneumoniae* estudadas por Griffith em 1928.

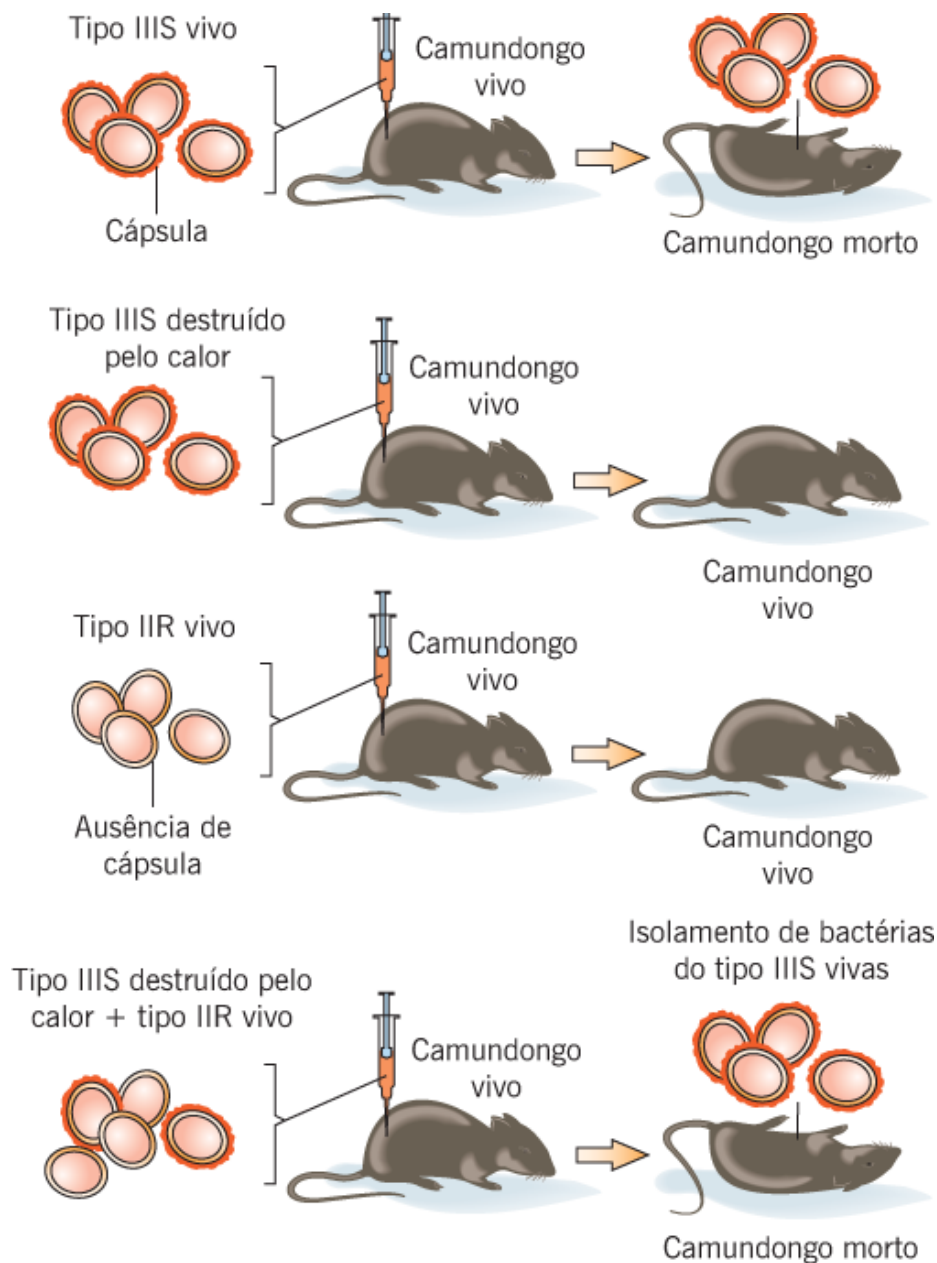


FIGURA 8.11 Descoberta da transformação em *Streptococcus pneumoniae* por Griffith.

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*

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.

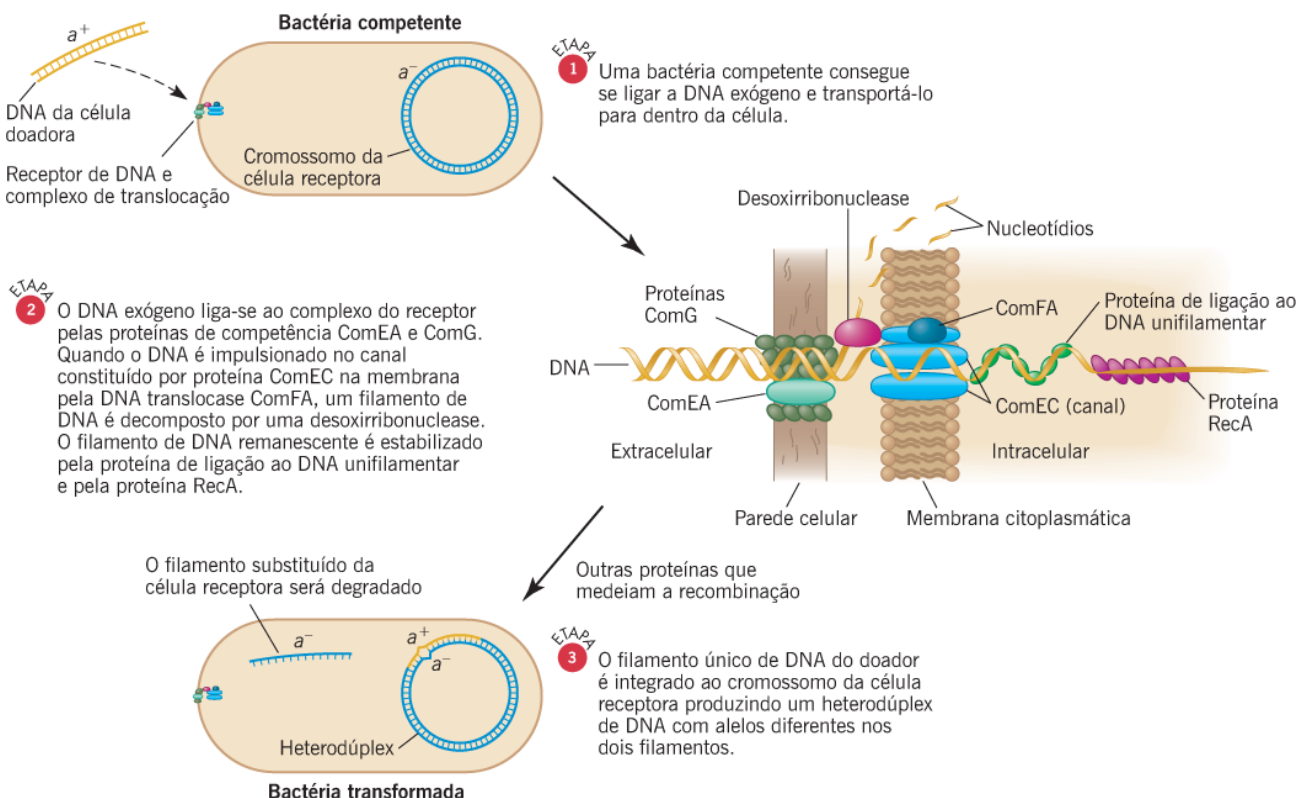


FIGURA 8.12 Mecanismo de transformação em *Bacillus subtilis*. Uma bactéria competente contém um receptor de DNA/complexo de translocação que consegue se ligar ao DNA exógeno e transporta-o para dentro da célula, onde consegue se recombinar com o DNA cromossômico da célula receptora. ComEA, EC, FA e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

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 autônomo 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.

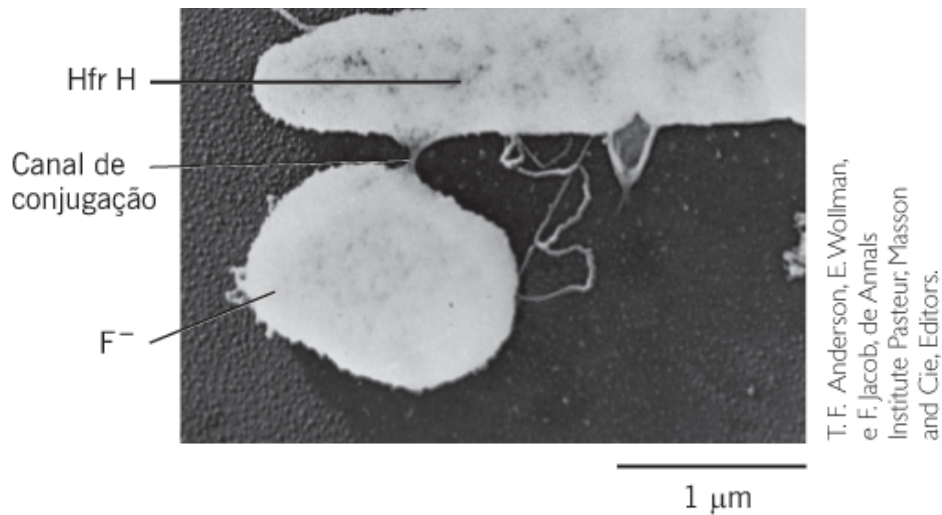


FIGURA 8.13 Conjugação em *E. coli*. Essa microfotografia eletrônica realizada por Thomas F. Anderson mostra a conjugação entre uma *E. coli* Hfr H e uma *E. coli* F⁻. Na verdade, há justaposição próxima das células doadora e receptora durante a conjugação. O canal de conjugação mostrado foi distendido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

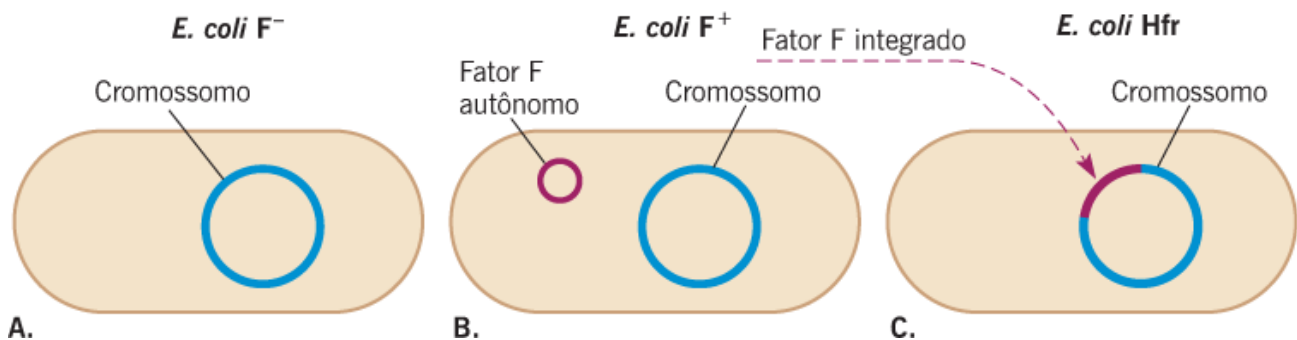


FIGURA 8.14 Fator F em *E. coli*: *E. coli* F⁻, F⁺ e Hfr. **A.** *E. coli* F⁻ não tem fator F. **B.** *E. coli* F⁺ tem um fator F cuja replicação é independente do cromossomo. **C.** *E. coli* Hfr tem um fator F que é integrado ao cromossomo (inserido de maneira covalente).

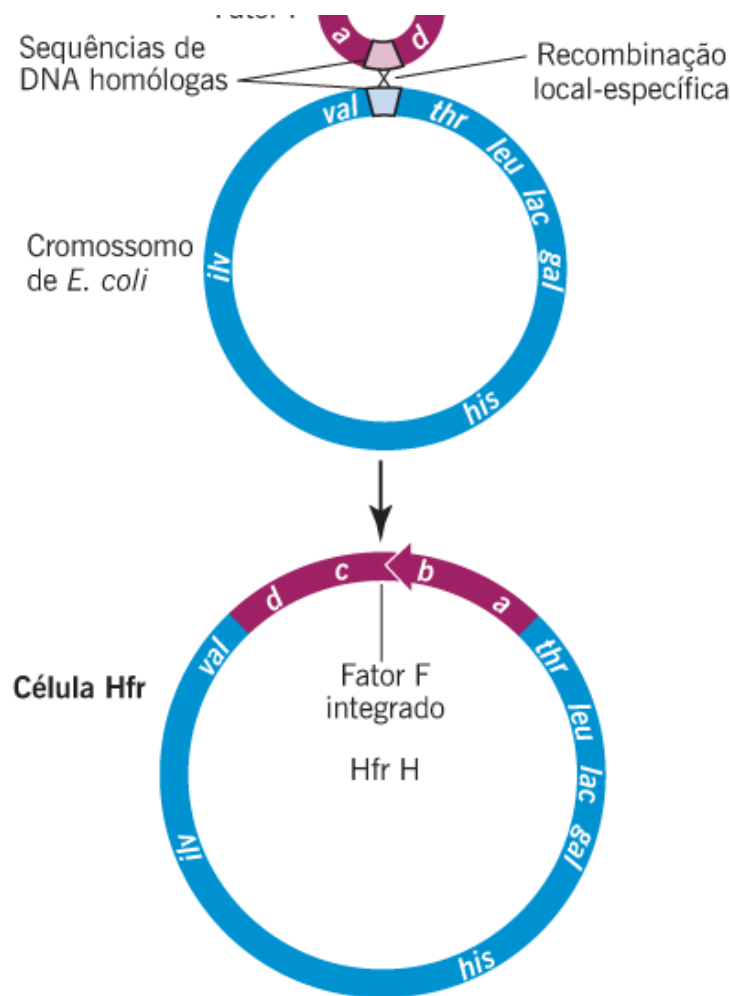


FIGURA 8.15 A formação de uma célula Hfr pela integração de um fator F autônomo. O fator F é inserido de maneira covalente no cromossomo por recombinação local-específica entre sequências de DNA homólogas no fator F e no cromossomo.

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

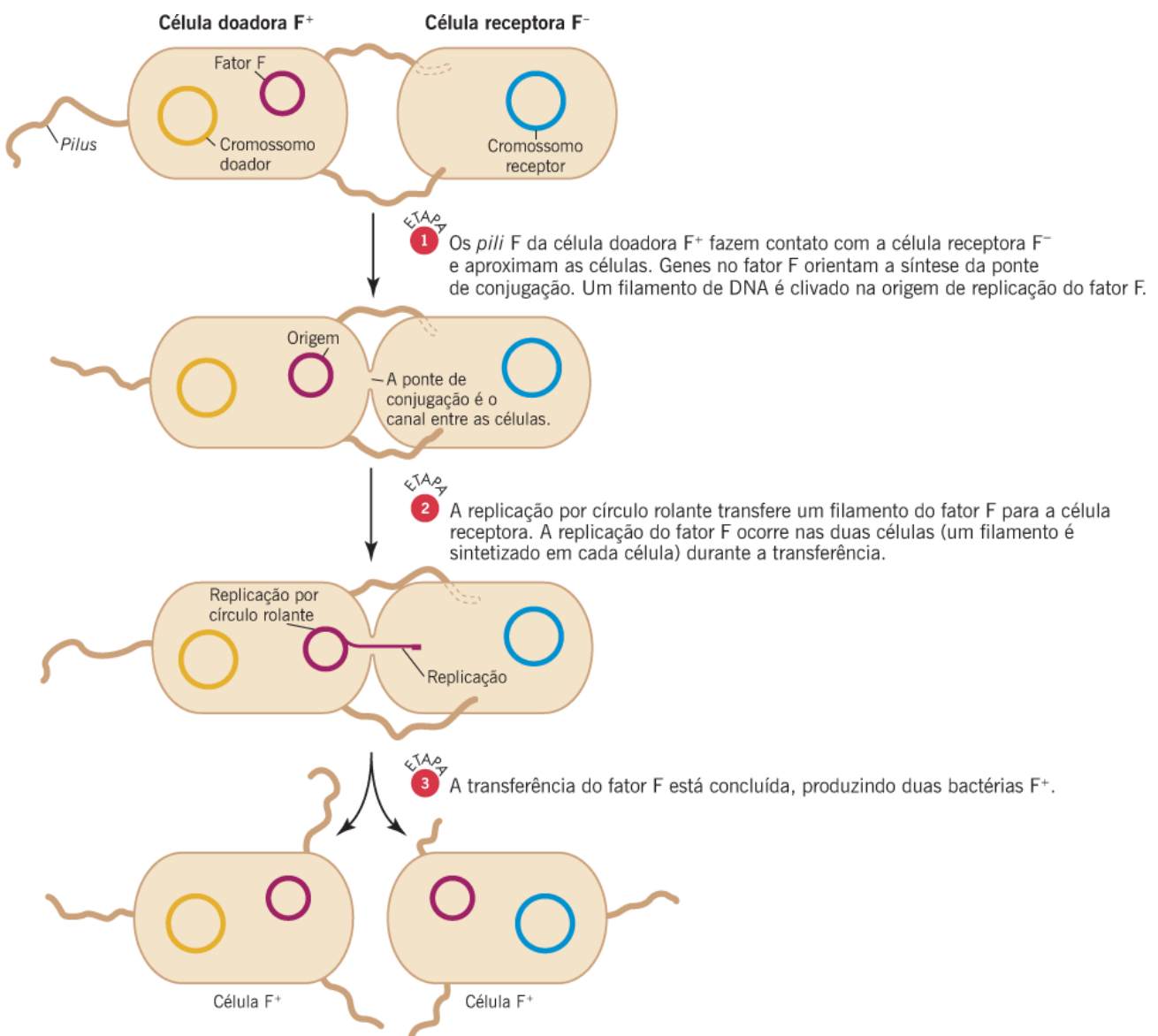
A conjugação entre células Hfr e F⁻ é utilizada para mapear os genes do cromossomo de *E. coli*. Para compreendermos como isso é possível, examinemos um experimento clássico usando uma cepa específica de Hfr denominada Hfr H (em homenagem a William Hayes, geneticista microbiano inglês, que a isolou). 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

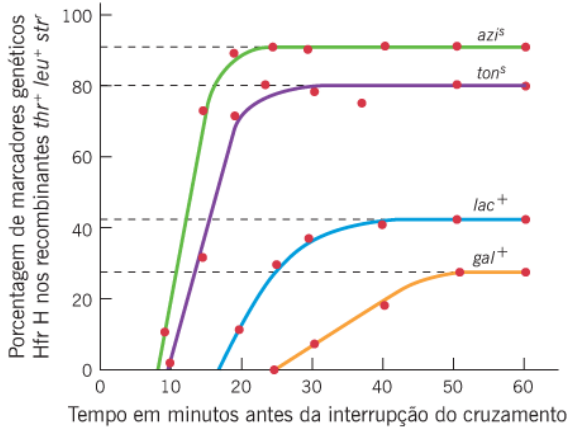
treonina e leucina.

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).

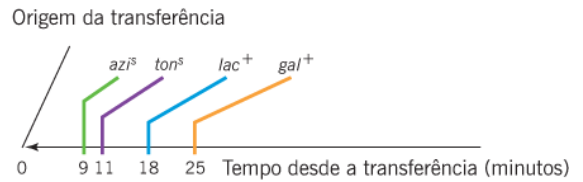


Resumo dos resultados



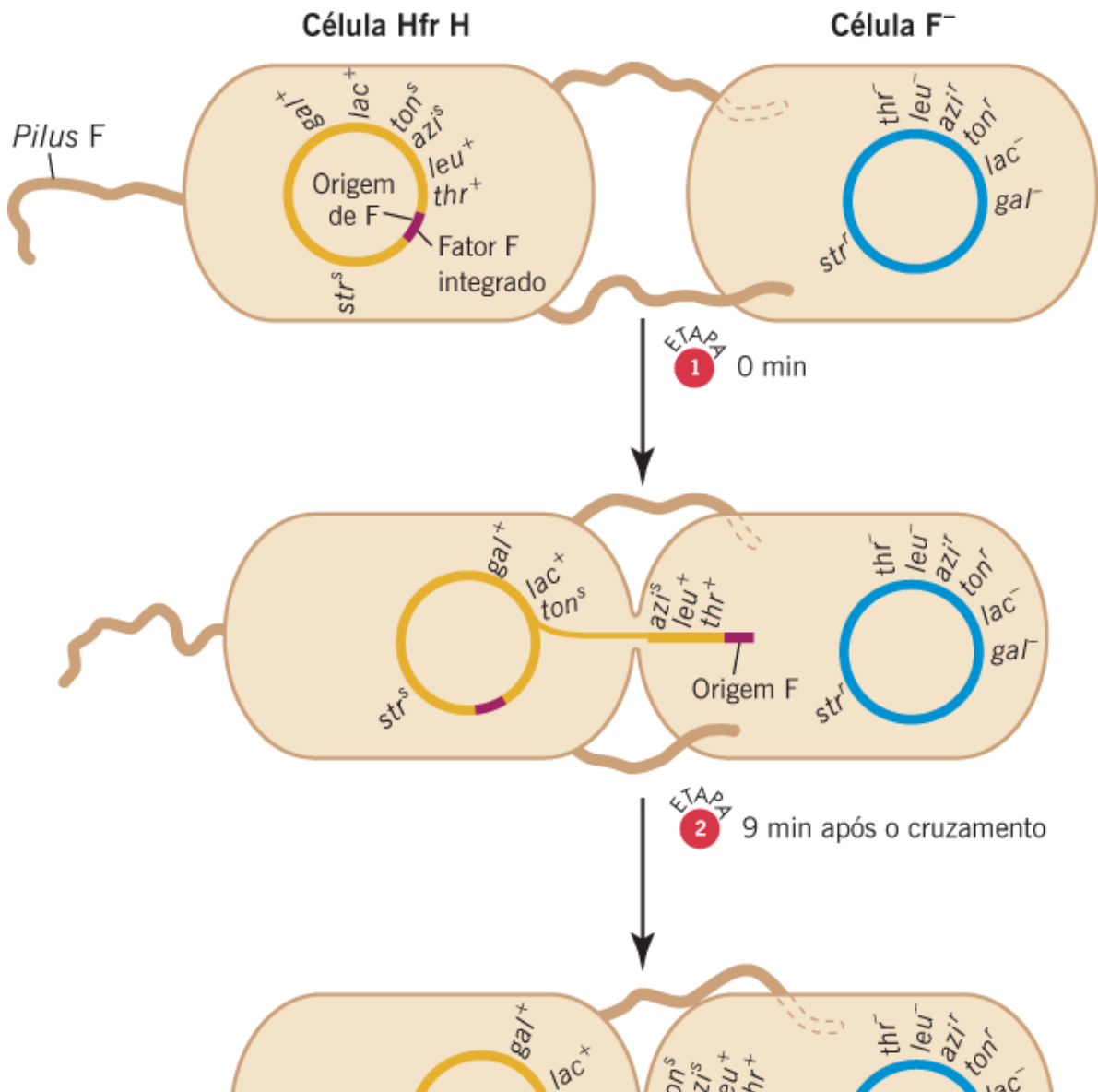
A.

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⁻* 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.



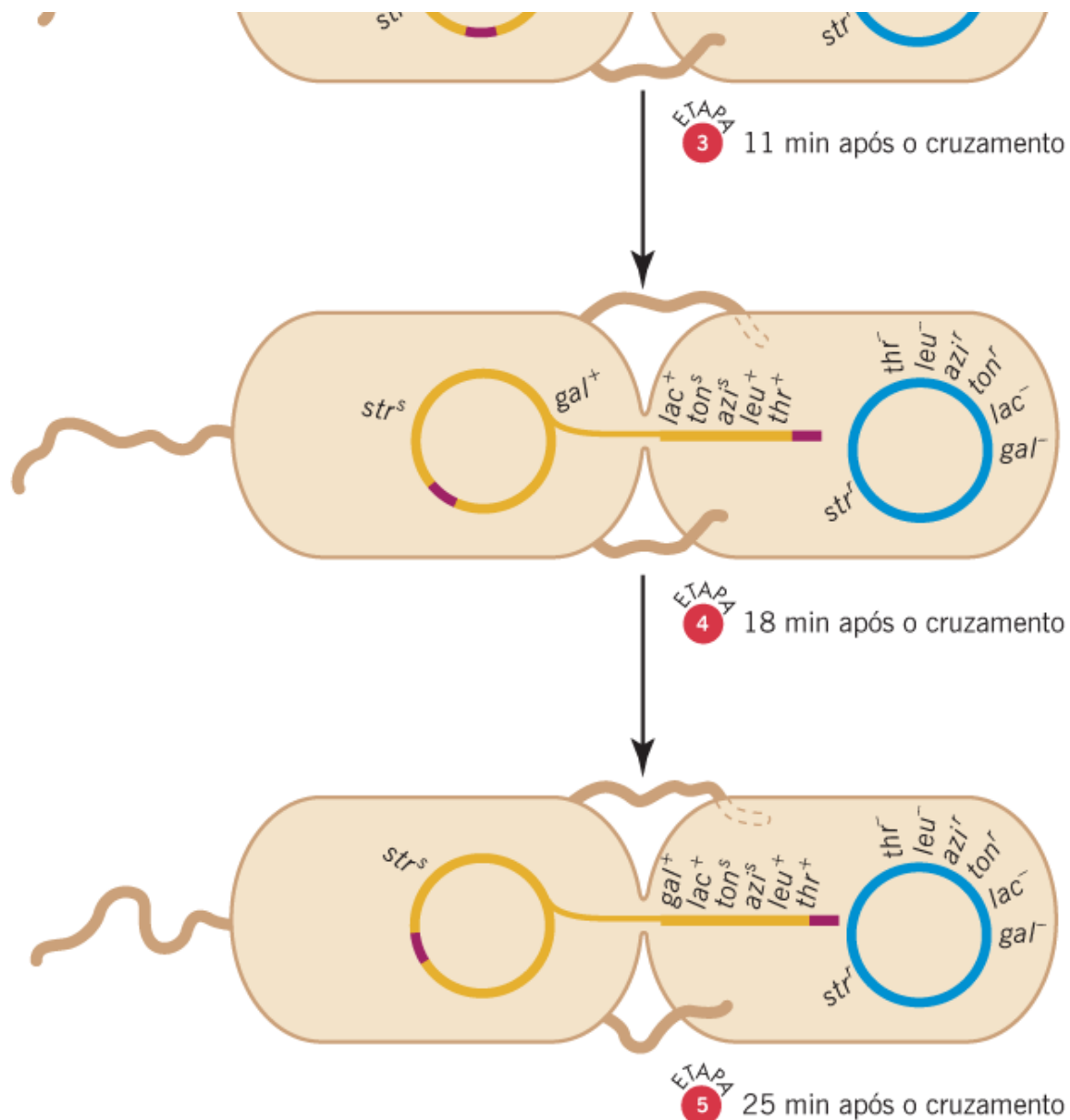


FIGURA 8.18 Interpretação do experimento de cruzamento interrompido de Wollman e Jacob. Há transferência linear de genes da célula doadora (Hfr H) para a célula receptora (F^-). A transferência começa na origem da replicação no fator F integrado e prossegue com a transferência sequencial de genes de 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

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.

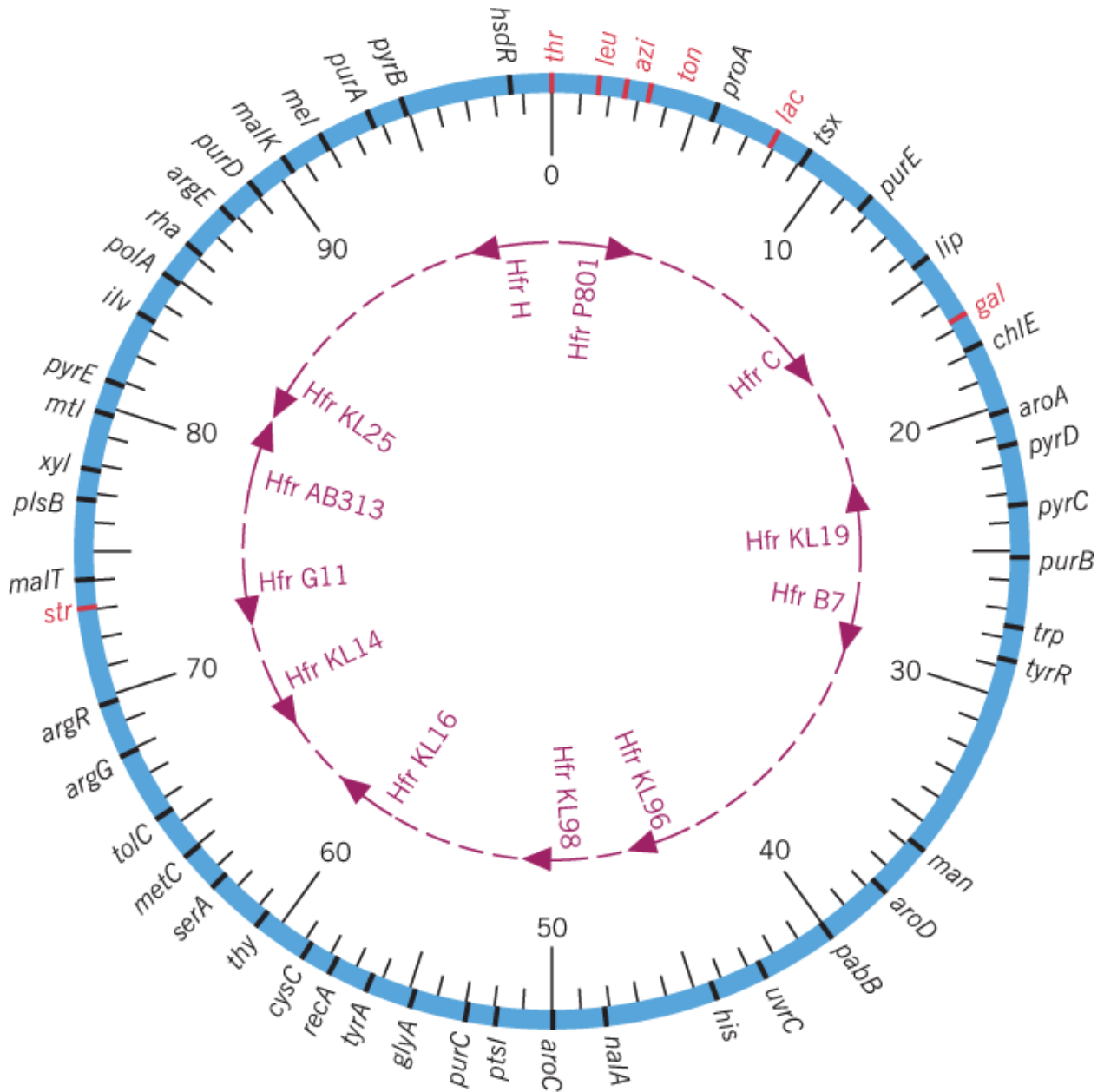


FIGURA 8.19 Mapa circular de ligação de *E. coli*. O círculo interno mostra os locais de integração do fator F em cepas Hfr selecionadas. As setas indicam se a transferência pela Hfr é horária ou anti-horária. O círculo externo mostra a posição de genes selecionados. O mapa é dividido em 100 unidades, 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).



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).



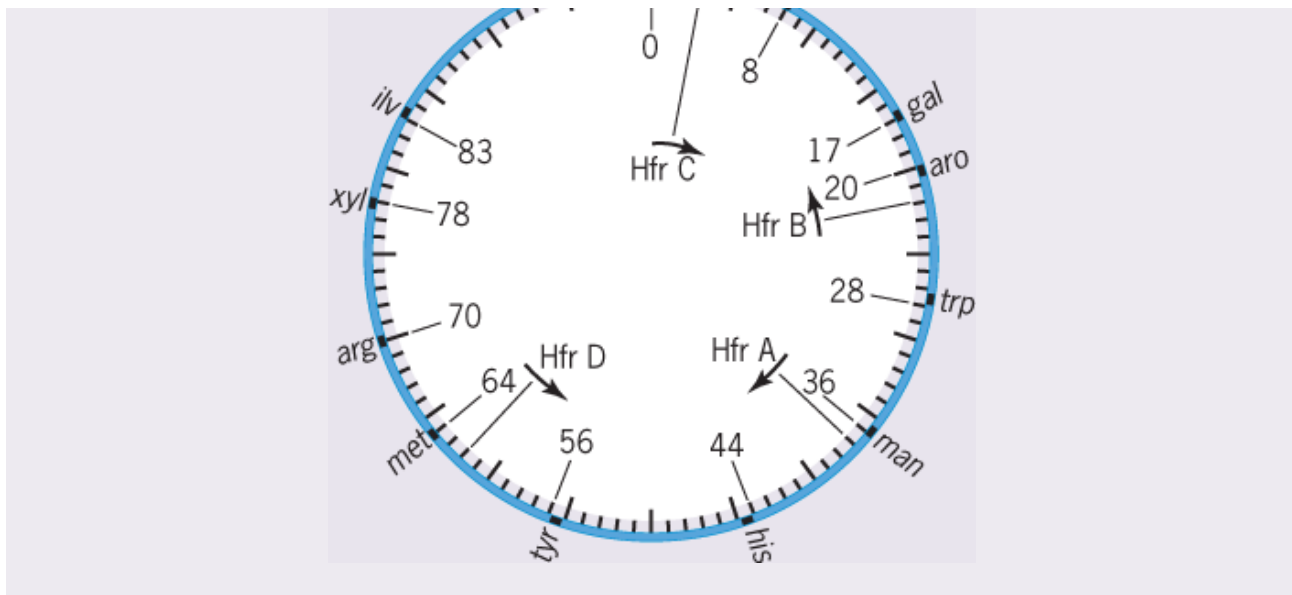
FATOS E CONCEITOS

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 multidrogaresistentes (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,

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 sexodução; 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 sexodução 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.

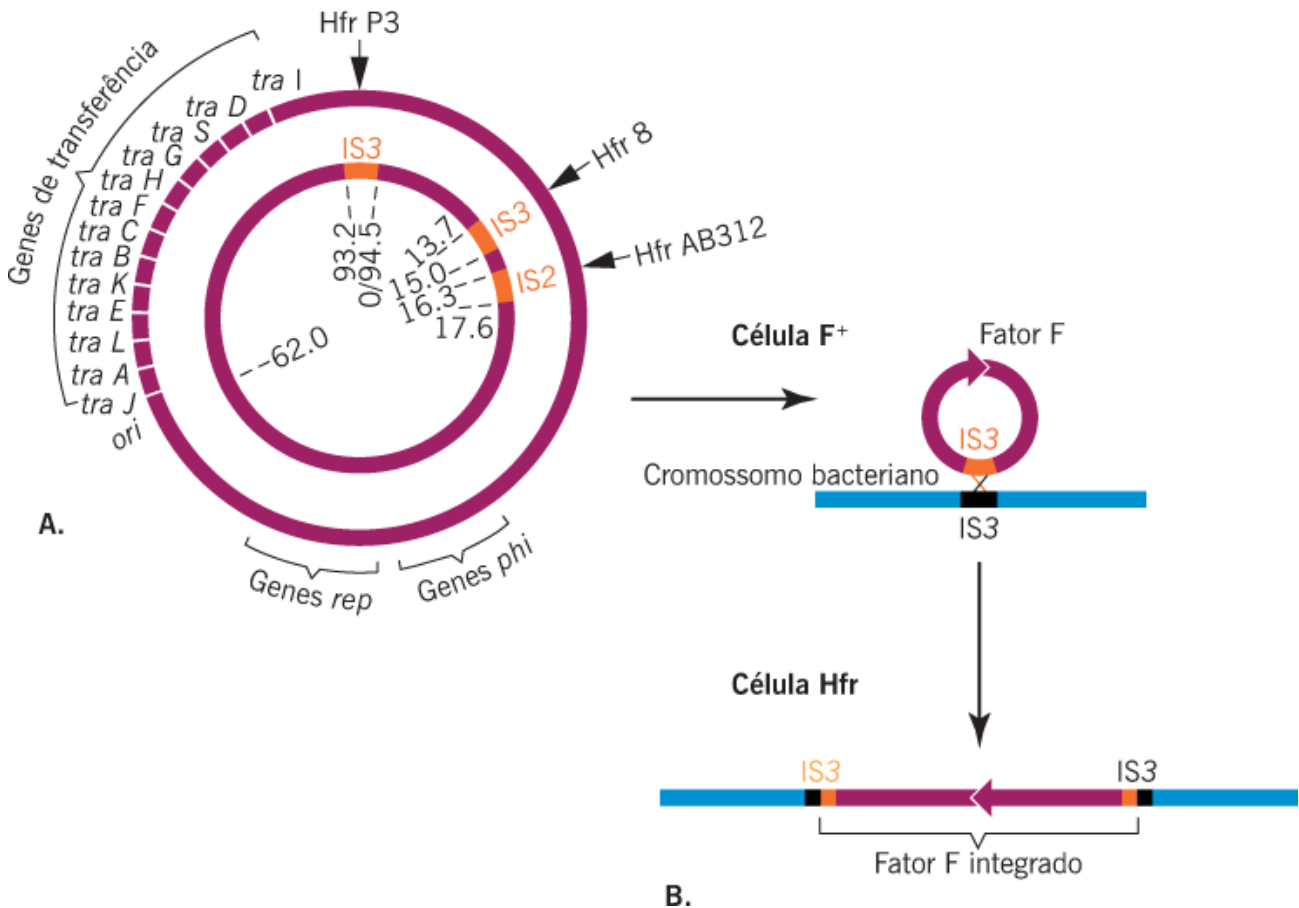
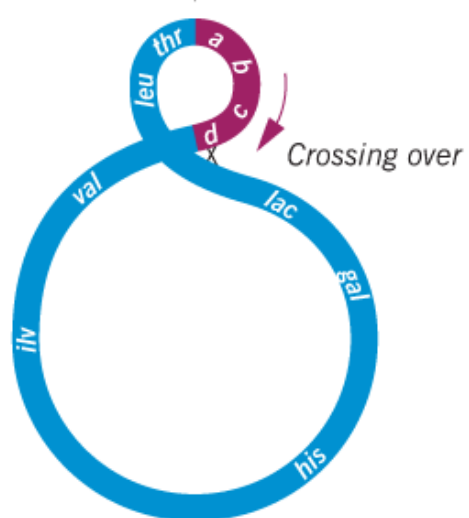


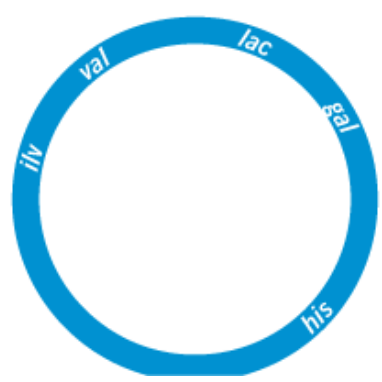
FIGURA 8.20 Elementos IS medeiam o fago de integração do fator F. **A.** Mapa abreviado da estrutura do fator F em cepa K12 de *E. coli*, com distâncias em quilobases (1.000 pares de nucleotídeos). As localizações dos genes necessários para transferência conjugada (genes *tra*), replicação (genes *rep*) 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 mediou 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
 1 O fator F faz uma alça externa ao cromossomo com os genes *thr* e *leu* na alça.



ETAPA 2
 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*.

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?

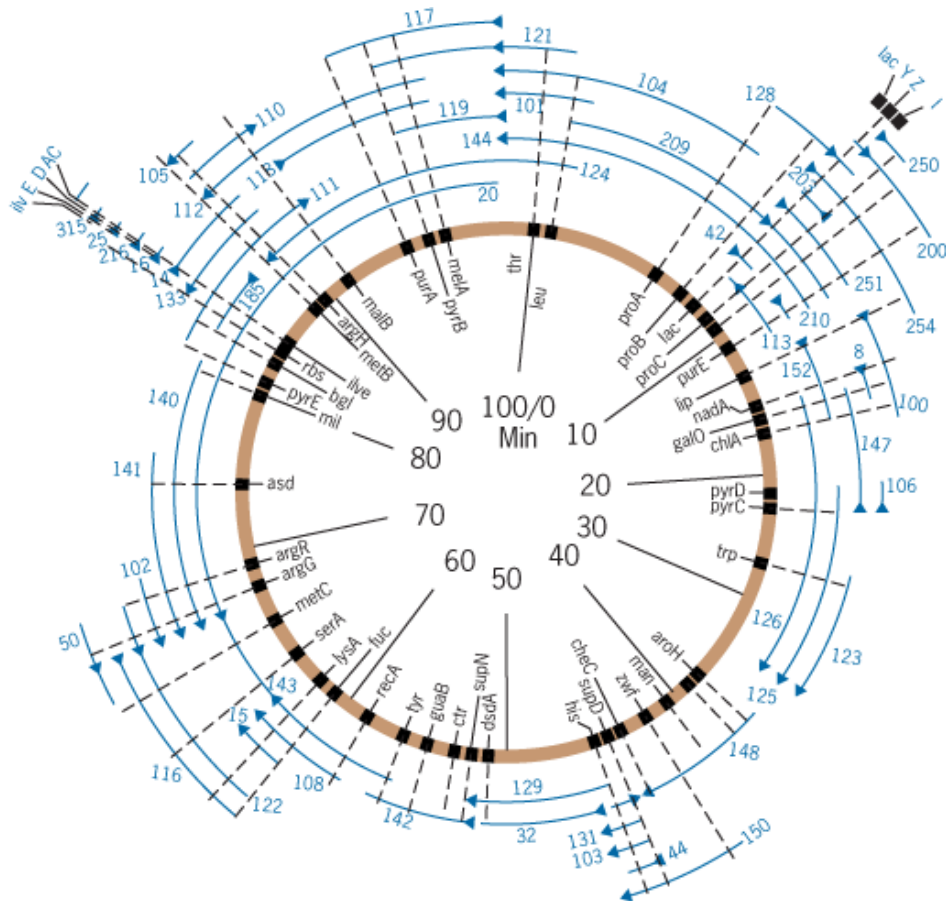


FIGURA 8.22 Fator F' em *E. coli*. Mapa do cromossomo de *E. coli* K12 mostrando os genes encontrados em F' representativos. Os fatores F' são desenhados como estruturas lineares para alinhá-los com os segmentos cromossômicos que contêm. Na realidade, são moléculas circulares de DNA – as estruturas formadas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

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, *λ defective phage carrying gal genes*; fago λ defeituoso carreador de genes *gal*) e λ_{dbio} (do inglês, *λ 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

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.

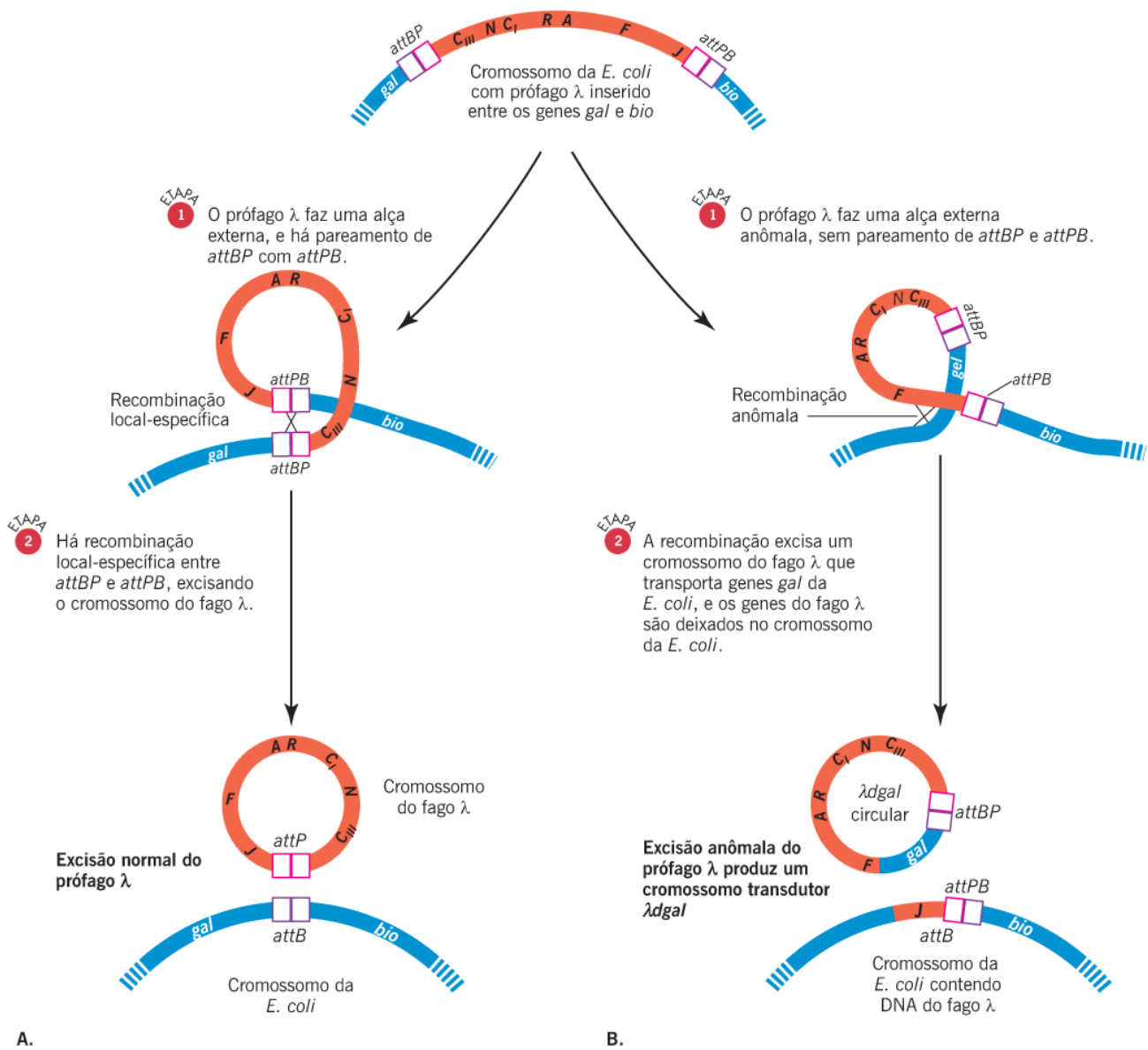


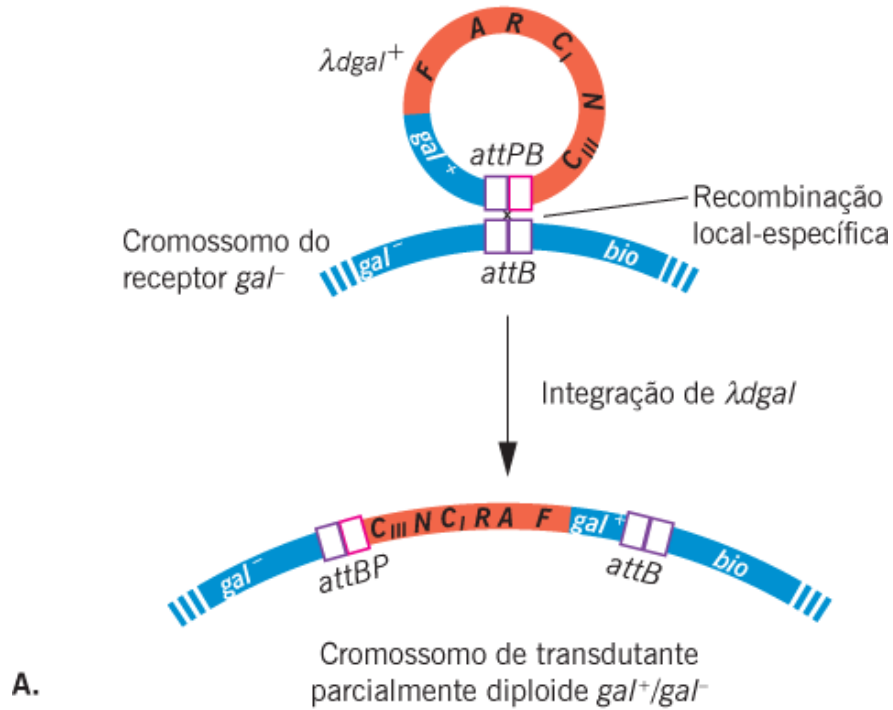
FIGURA 8.23 Excisão de prófago lambda. Comparação entre excisão normal do prófago λ (A) e excisão anômala com produção de cromossomos transdutores λ_{dgal} (B).

O destino das moléculas de DNA λ_{dgal} e *lbio* 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 líticamente 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 λ_{dgal}^+ infectar uma célula receptora *gal*⁻, a integração de λ_{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).

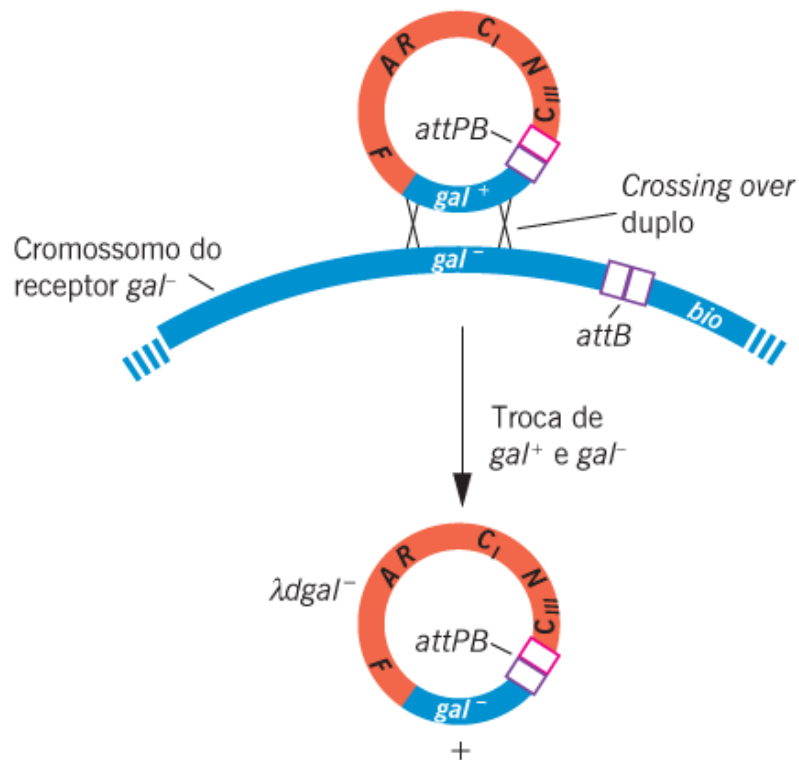
Se a razão fagos/bactérias for alta, as células receptoras serão infectadas tanto pelo fago λ de tipo selvagem quanto por λ_{dgal}^+ ; portanto, essas células serão lisogênicos duplos que transportam um prófago λ de tipo selvagem e um prófago

replicação com igual eficiência usando os produtos gênicos codificados pelo genoma λ^+ . Esses lisados são denominados *Hft* (do inglês, *high-frequency transduction*, transdução de alta frequência). Os lisados *Hft* aumentam substancialmente a frequência dos eventos de transdução; portanto, lisados *Hft* são usados preferencialmente em experimentos de transdução.

Integração de $\lambda dgal^+$ em *attB* produz um diploide parcial gal^+/gal^- .



Um *crossing over* duplo insere o alelo gal^+ de $\lambda dgal^+$ no cromossomo do hospedeiro.



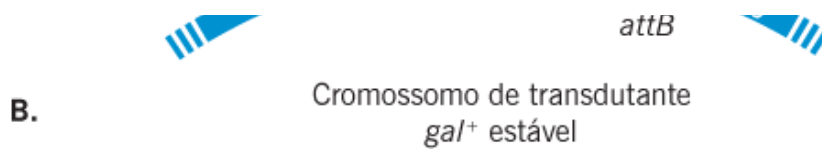


FIGURA 8.24 Recombinação em células receptoras gal^- infectadas por fago transdutor $\lambda dgal^+$. **A.** Integração de $\lambda dgal^+$ em $attB$ produz um diploide parcial instável gal^+ / gal^- . **B.** Um *crossover* duplo transfere o alelo gal^+ de $\lambda dgal^+$ para o cromossomo.

IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA DA TROCA GENÉTICA EM BACTÉRIAS

Os processos parassexuais (ou parassexuados) de transformação, transdução e conjugação possibilitam a troca de genes de bactérias. Os novos genótipos resultantes de tais trocas permitem que as bactérias lidem com condições dinâmicas, como várias fontes de energia, e se adaptem aos desafios ambientais, como o uso disseminado de antibióticos. Entretanto, o que é bom para as bactérias pode ser ruim para nós. O surgimento de bactérias multidrogarresistentes (MDR) em todo o mundo é uma ameaça significativa à saúde e ao bem-estar humanos. Para mais informações sobre essa questão, ver Em foco | Bactérias resistentes a antibióticos, disponível *on-line*.

As bactérias foram as primeiras formas de vida a surgir no planeta Terra, provavelmente há mais de 3 bilhões de anos. Durante sua longa história, evoluíram e diversificaram-se de modo a explorar uma imensa gama de ambientes, desde as profundezas do oceano até os topos das montanhas de gelo. Bactérias conseguem crescer nas paredes de cavernas ou nas reentrâncias do intestino humano. Em laboratório, podemos investigar o papel desempenhado pela troca genética na contínua evolução bacteriana. Para conhecer melhor esse tipo de análise, consulte Resolva | Como evoluem os genomas bacterianos?



Resolva!

Como evoluem os genomas bacterianos?

No cruzamento (cruzamento I) entre cepas de $F^+ met^+ ser^+ cys^+ str^s$ e $F^- met^- ser^- cys^- str^r$ de *E. coli* toda a progênie foi F^+ , sem recombinantes prototróficos $met^+ ser^+ cys^+ str^r$. Depois de várias gerações, fizeram-se novas culturas de cada cepa a partir de uma colônia, e o cruzamento foi repetido. Dessa vez (cruzamento II), foram produzidos recombinantes $met^+ ser^+ cys^+ str^r$, mas todos esses recombinantes foram F^- . Depois de várias outras gerações das cepas usadas no cruzamento II, cresceram novas culturas a partir de colônias isoladas, e o cruzamento foi repetido pela terceira vez (cruzamento III). Não foram produzidos recombinantes $met^+ ser^+ cys^+ str^r$ no cruzamento III; em vez disso, toda a prole que sobreviveu no meio contendo estreptomicina tinha o genótipo $met^+ ser^+ cys^- str^r$ e era fenotipicamente F^+ . Usando um mapa do cromossomo da *E. coli*, explique esses resultados.

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



PONTOS ESSENCIAIS

- Três processos parassexuados – transformação, conjugação e transdução – ocorrem em bactérias. Esses processos são distinguidos por dois critérios: a inibição da transferência gênica por desoxirribonuclease e a necessidade de contato celular
- A transformação implica a captação de DNA livre por bactérias
- A conjugação ocorre quando uma célula doadora faz contato com uma célula receptora e transfere DNA para a célula receptora
- A transdução ocorre quando um vírus leva genes bacterianos de uma célula doadora para uma célula receptora
- Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos autorreplicantes
- Os epissomos são replicados de maneira autônoma ou como componentes integrados de cromossomos bacterianos
- Os fatores F que contêm genes cromossômicos (fatores F') são transferidos para células F^- por sexodução
- Os mecanismos parassexuados de recombinação produzem novas combinações de genes em bactérias
- Os mecanismos parassexuados estimulam a capacidade de adaptação das bactérias às alterações no ambiente.



Aplique a análise genética básica

1. Quais as vantagens dos vírus em relação a organismos celulares e multicelulares para a pesquisa genética?

Resposta: As duas principais vantagens dos vírus em relação a organismos celulares e multicelulares para os estudos genéticos são (1) a simplicidade estrutural e (2) o ciclo de vida curto. Em geral, os vírus têm um único cromossomo, com um número relativamente pequeno de genes, e conseguem completar o ciclo de vida em um período que varia de cerca de 20 minutos a algumas horas.

2. Quais são as principais diferenças entre o *crossing over* em bactérias e eucariotos?

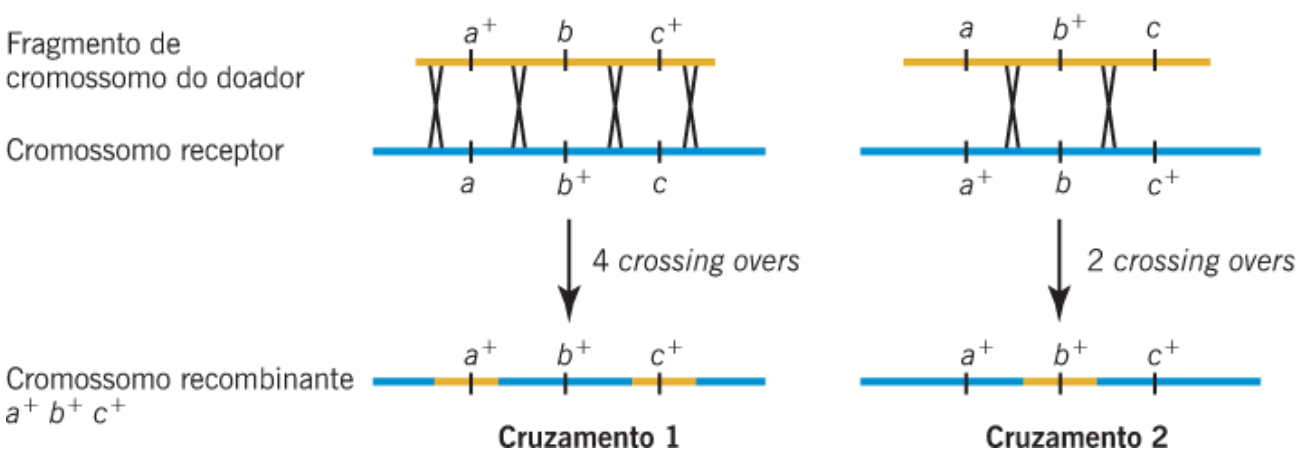
Resposta: O *crossing over* em bactérias geralmente ocorre entre um fragmento do cromossomo de uma célula doadora e um cromossomo circular intacto em uma célula receptora (Figura 8.7 A). Desse modo, os *crossing overs* têm de ocorrer em pares, que inserem segmentos do cromossomo da célula doadora no cromossomo da célula receptora. *Crossing over* único, ou qualquer número ímpar de *crossing overs*, destrói a integridade do cromossomo circular e deixa em seu lugar uma molécula linear de DNA (Figura 8.7 B).

3. Quando cultivadas juntas, duas cepas de *E. coli*, $a^+ b^+$ e $a^+ b^-$, trocam material genético, resultando na produção de recombinantes $a^+ b^+$. No entanto, quando essas duas cepas são cultivadas em ramos opostos de um tubo em U (Figura 8.9), não há produção de recombinantes $a^+ b^+$. Que processo parassexuado é responsável pela formação dos recombinantes $a^+ b^+$ quando essas cepas são cultivadas juntas?

Resposta: As duas cepas de *E. coli* estão trocando informações por conjugação, o único processo parassexuado em bactérias que requer contato celular. O filtro de vidro que separa os ramos do tubo em U impede o contato entre células nesses ramos.

4. Você identificou três marcadores genéticos com ligação próxima – a , b e c – em *E. coli*. Os marcadores são transferidos de uma cepa Hfr para uma F^- em menos de 1 minuto e são encontrados no cromossomo na ordem $a-b-c$. Você realiza experimentos de transdução do fago P1 utilizando cepas de genótipo $a^+ b^- c^+$ e $a^- b^+ c^-$. No cruzamento 1, as células doadoras são $a^+ b^- c^+$ e as receptoras são $a^- b^+ c^-$. No cruzamento 2, as células doadoras são $a^- b^+ c^-$ e as receptoras são $a^+ b^- c^+$. Para ambos os cruzamentos, você prepara placas com meio de cultura mínimo nas quais apenas recombinantes $a^+ b^+ c^+$ conseguem formar colônias. Em que cruzamento você esperaria observar a maioria dos recombinantes $a^+ b^+ c^+$?

Resposta: Você esperaria mais recombinantes $a^+ b^+ c^+$ no cruzamento 2 porque a formação de um cromossomo com os três marcadores de tipo selvagem só requer dois *crossing overs* (um par de *crossing overs*) nesse cruzamento, ao passo que são necessários quatro *crossing overs* (dois pares) para produzir um cromossomo $a^+ b^+ c^+$ no cruzamento 1. Os *crossing overs* necessários são mostrados no diagrama a seguir.



Autoavaliação

1. Você identifica uma cepa mutante de *E. coli* com que não consegue sintetizar histidina (his^-). Com o objetivo de determinar a localização da mutação his^- no cromossomo de *E. coli*, você faz experimentos de cruzamento interrompido com cinco cepas diferentes de Hfr. O quadro a seguir mostra o momento de entrada (minutos, entre parênteses) dos alelos selvagens dos cinco primeiros marcadores (genes mutantes) na cepa His^- .

Hfr A — *bio* (4) *glu* (20) *his* (27) *cys* (37) *tyr* (45)

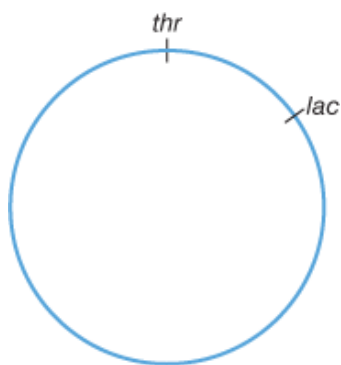
Hfr B — *xyl* (6) *met* (18) *tyr* (24) *cys* (32) *his* (42)

Hfr C — *his* (3) *cys* (13) *tyr* (21) *met* (27) *xyl* (39)

Hfr D — *xyl* (7) *thr* (25) *lac* (40) *bio* (48) *glu* (62)

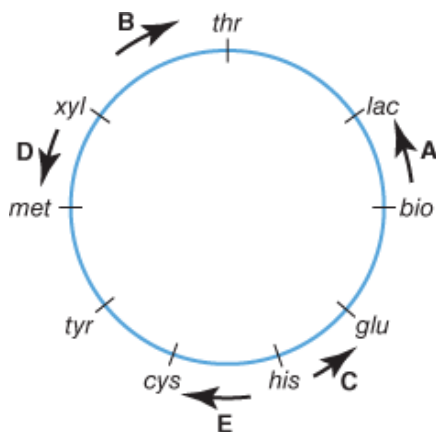
Hfr E — *his* (4) *glu* (11) *bio* (27) *lac* (35) *thr* (50)

- (a) No mapa a seguir do cromossomo circular da *E. coli*, indique (1) a localização relativa de cada gene, (2) a posição em que o fator F é integrado a cada um dos cinco Hfr e (3) o sentido da transferência de cromossomo para cada Hfr (indique o sentido com uma seta).



- (b) Para definir melhor a localização da mutação his^- no cromossomo, você usa a cepa mutante como receptora em um experimento de transdução com bacteriófago P1. Considerando-se que o fago P1 consegue acondicionar cerca de 1% do DNA cromossômico de *E. coli*, você esperaria que houvesse cotransdução de algum dos genes mostrados na figura anterior com o alelo his^+ de seu gene mutante his^- ? Em caso afirmativo, qual deles? Observe que o cromossomo de *E. coli* contém 4,6 milhões de pares de nucleotídios e que a transferência de todo o cromossomo durante a conjugação leva 100 minutos. Justifique sua resposta.

Resposta: (a) A ordem dos genes é mostrada no mapa adiante, e os locais de integração do fator F e a direção de transferência em cada Hfr são indicados pelas setas A a E.



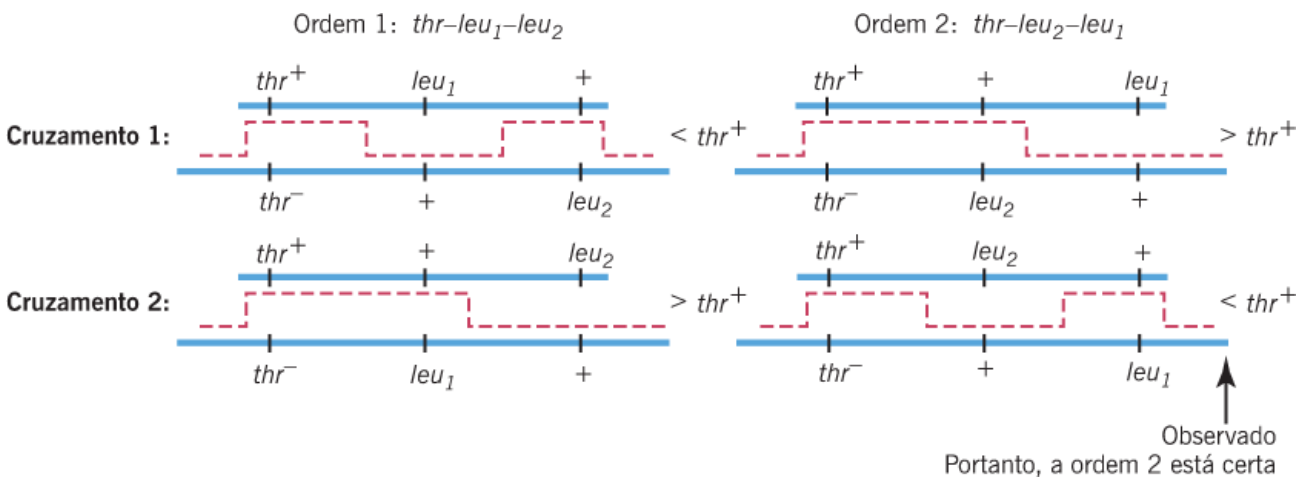
- (b) Não haveria cotransdução de nenhum marcador com his^+ porque o fago P1 só comporta 1% do cromossomo de *E. coli*, e nenhum dos outros genes está dentro de 1 minuto de *his*.

2. Cruzamentos recíprocos com transdução de três pontos foram usados para determinar a ordem de duas mutações, leu_1 e leu_2 , no gene *leuA* em relação ao gene ligado *thrA* da *E. coli*. Em cada cruzamento, recombinantes leu^+ foram selecionados em meio mínimo contendo treonina, mas não leucina, e testados para thr^+ ou thr^- por plaqueamento em réplica em placas sem treonina. Os resultados são apresentados na tabela a seguir:

marcadores do doador	marcadores do receptor	alelo <i>thr</i> em recombinantes <i>leu</i>	porcentagem de <i>thr</i>
1. <i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ₁	<i>thr</i> ⁻ <i>leu</i> ₂	350 <i>thr</i> ⁺ : 349 <i>thr</i> ⁻	50
2. <i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ₂	<i>thr</i> ⁻ <i>leu</i> ₁	60 <i>thr</i> ⁺ : 300 <i>thr</i> ⁻	17

Qual é a ordem de *leu*₁ e *leu*₂ em relação ao marcador externo *thr*?

Resposta: Os diagramas dos dois cruzamentos são apresentados, mostrando as duas ordens possíveis, e as linhas vermelhas tracejadas marcam as partes dos dois cromossomos que têm de estar presentes em recombinantes *thr*⁺-*leu*₁⁺-*leu*₂⁺ (+ + +). Note que se a ordem 1 estiver certa, a formação de recombinantes + + + exigirá 4 *crossing overs* (2 pares de *crossing overs*) no cruzamento 1 e apenas 2 *crossing overs* (1 par) no cruzamento 2, portanto, prevendo mais recombinantes + + + no cruzamento 2 e menos no cruzamento 1. Mas se a ordem 2 estiver certa, deve haver mais recombinantes + + + no cruzamento 1 e menos no cruzamento 2. Visto que foi observado o segundo resultado, a ordem certa é *thr-leu*₂-*leu*₁.



Avaliação adicional

Entenda melhor e desenvolva a capacidade analítica

- 8.1 Quais critérios consideram os vírus seres vivos? Não vivos?
- 8.2 Qual é a diferença entre bacteriófagos e outros vírus?
- 8.3 Quais são as diferenças entre o ciclo de vida dos bacteriófagos T4 e λ ? Quais são as semelhanças?
- 8.4 Quais são as diferenças entre as estruturas do prófago λ e do cromossomo do fago λ acondicionado na cabeça do fago λ ?
- 8.5 Qual é a diferença entre a integração do cromossomo do fago λ ao cromossomo do hospedeiro durante uma infecção lisogênica e o *crossing over* entre cromossomos homólogos?
- 8.6 Os geneticistas usaram mutações que causam fenótipos alterados como olhos brancos em *Drosophila*, flores brancas e sementes rugosas em ervilhas, e alteração da cor da pelagem em coelhos para determinar as localizações dos genes nos cromossomos desses eucariotos. Que tipos de fenótipos mutantes foram usados para mapear genes em bactérias?
- 8.7 Você identificou três mutações – *a*, *b* e *c* – em *Streptococcus pneumoniae*. As três são recessivas para seus alelos selvagens *a*⁺, *b*⁺ e *c*⁺. Você prepara o DNA a partir de uma cepa doadora de tipo selvagem e a usa para transformar uma cepa com genótipo *abc*. Você observa transformantes *a*⁺*b*⁺ e transformantes *a*⁺*c*⁺, mas não transformantes *b*⁺*c*⁺. Essas mutações apresentam ligação próxima? Em caso afirmativo, qual é sua ordem no cromossomo do *Streptococcus*?

alguns organismos da prole são capazes de crescer em meio mínimo que não contém timina nem leucina. Como é possível explicar esse resultado?

- 8.9** Suponha que você acabou de demonstrar a recombinação genética (p. ex., quando uma cepa de genótipo $a^+ b^+$ está presente em uma cepa de genótipo $a^+ b$, formam-se alguns genótipos recombinantes, $a^+ b^+$ e $a b$) em uma espécie de bactéria não estudada antes. Como você determinaria se a recombinação observada foi resultado de transformação, conjugação ou transdução?
- 8.10** (a) Quais são as diferenças genótípicas entre células F^- , células F^+ e células Hfr? (b) Quais são as diferenças fenotípicas? (c) Qual é o mecanismo de conversão das células F^- em células F^+ ? Das células F^+ em Hfr? Das células Hfr em F^+ ?
- 8.11** (a) Qual é a utilidade dos fatores F' em análise genética? (b) Como são formados os fatores F' ? (c) Qual é o mecanismo de sexuação?
- 8.12** Quais são as diferenças básicas entre transdução generalizada e transdução especializada?
- 8.13** Que função os elementos IS desempenham na integração de fatores F ?
- 8.14** Como é possível mapear os genes bacterianos por experimentos de cruzamento interrompido?
- 8.15** O que é *cotransdução*? Como se podem usar as frequências de cotransdução para mapear marcadores genéticos?
- 8.16** Em *E. coli*, a capacidade de usar lactose como fonte de carbono exige as enzimas β -galactosidase e β -galactosídeo permease. Essas enzimas são codificadas por dois genes próximos, *lacZ* e *lacY*, respectivamente. Outro gene, *proC*, controla, em parte, a capacidade das células de *E. coli* de sintetizar o aminoácido prolina. Os alelos str^r e str^s , respectivamente, controlam a resistência e a sensibilidade à estreptomicina. Sabe-se que Hfr H transfere os dois genes *lac*, *proC* e *str*, nessa ordem, durante a conjugação.
- Fez-se um cruzamento entre Hfr H de genótipo $lacZ^- lacY^+ proC^+ str^s$ e uma cepa F^- de genótipo $lacZ^+ lacY^- proC^- str^r$. Depois de aproximadamente 2 horas, a mistura foi diluída e plaqueada em meio que continha estreptomicina, mas não prolina. Quando se analisou a capacidade das colônias recombinantes $proC^+ str^r$ de crescer em meio contendo lactose como única fonte de carbono, pouquíssimas delas conseguiam fermentar a lactose. Quando se fez o cruzamento recíproco (Hfr H $lacZ^+ lacY^- proC^+ str^s \times F^- lacZ^- lacY^+ proC^- str^r$), muitos dos recombinantes $proC^+ str^r$ conseguiam crescer em meio contendo lactose como única fonte de carbono. Qual é a ordem dos genes *lacZ* e *lacY* em relação a *proC*?
- 8.17** Uma cepa F^+ , marcada em 10 *loci*, dá origem espontaneamente à prole Hfr sempre que o fator F é incorporado ao cromossomo da cepa F^+ . O fator F pode se integrar ao cromossomo circular em muitos pontos, de maneira que as cepas Hfr resultantes transfiram os marcadores genéticos em ordens diferentes. Em qualquer cepa Hfr, a ordem de marcadores que entram em uma célula receptora pode ser determinada por experimentos de cruzamento interrompido. A partir dos dados para várias cepas Hfr derivadas da mesma cepa F^+ , determine a ordem dos marcadores na cepa F^+ .

Cepa Hfr	Marcadores doados em ordem
1	-Z-H-E-R →
2	-O-K-S-R →
3	-K-O-W-I →
4	-Z-T-I-W →
5	-H-Z-T-I →

- 8.18** Os dados da tabela adiante foram obtidos a partir de testes de transdução de três pontos feitos para determinar a ordem de locais mutantes no gene *A* que codifica a subunidade α do triptofano sintetase em *E. coli*. *Anth* é um marcador ligado não selecionado. Em cada cruzamento, recombinantes trp^+ foram selecionados e, depois,

Cruzamento	Marcadores do doador	Marcadores do receptor	Alelo <i>anth</i> em recombinantes <i>trp</i> ⁺	Porcentagem de <i>anth</i> ⁺
1	<i>anth</i> ⁺ – A34	<i>anth</i> [–] – A223	72 <i>anth</i> ⁺ : 332 <i>anth</i> [–]	18
2	<i>anth</i> ⁺ – A46	<i>anth</i> [–] – A223	196 <i>anth</i> ⁺ : 180 <i>anth</i> [–]	52
3	<i>anth</i> ⁺ – A223	<i>anth</i> [–] – A34	380 <i>anth</i> ⁺ : 379 <i>anth</i> [–]	50
4	<i>anth</i> ⁺ – A223	<i>anth</i> [–] – A46	60 <i>anth</i> ⁺ : 280 <i>anth</i> [–]	20

8.19 O bacteriófago P1 medeia a transdução generalizada em *E. coli*. Um lisado transdutor de P1 foi preparado pelo cultivo do fago P1 em bactérias *pur*⁺ *pro*[–] *his*[–]. Os genes *pur*, *pro* e *his* codificam enzimas necessárias para a síntese de purinas, prolina e histidina, respectivamente. Permitiu-se que o fago e as partículas transdutoras nesse lisado infectassem células *pur*[–] *pro*⁺ *his*⁺. Depois de incubar as bactérias infectadas por um período suficiente para permitir que haja transdução, elas foram plaqueadas em meio mínimo suplementado com prolina e histidina, mas sem purinas para selecionar transdutantes *pur*⁺. As colônias *pur*⁺ foram transferidas para meio mínimo com e sem prolina e com e sem histidina para determinar as frequências de cada marcador externo. Em face dos resultados a seguir, qual é a ordem dos três genes no cromossomo de *E. coli*?

Genótipo	Número observado
<i>pro</i> ⁺ <i>his</i> ⁺	100
<i>pro</i> [–] <i>his</i> ⁺	22
<i>pro</i> ⁺ <i>his</i> [–]	150
<i>pro</i> [–] <i>his</i> [–]	1

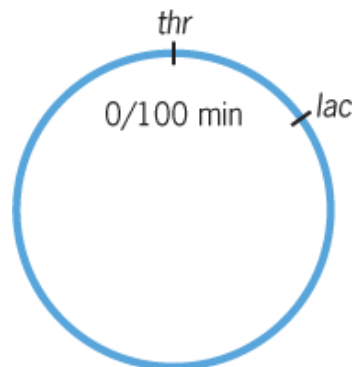
8.20 Duas outras mutações o gene *trp A* de *E. coli*, *trp A58* e *trp A487*, foram ordenadas em relação a *trp A223* e ao marcador externo *anth* por cruzamentos com transdução de três fatores, conforme descrito no Problema 8.18. Os resultados desses cruzamentos são resumidos na tabela a seguir. Qual é a ordem linear de *anth* e dos três locais mutantes no gene *trp A*?

Cruzamento	Marcadores do doador	Marcadores do receptor	Alelo <i>anth</i> em recombinantes <i>trp</i> ⁺	Porcentagem de <i>anth</i> ⁺
1	<i>anth</i> ⁺ – A487	<i>anth</i> [–] – A223	72 <i>anth</i> ⁺ : 332 <i>anth</i> [–]	82
2	<i>anth</i> ⁺ – A58	<i>anth</i> [–] – A223	196 <i>anth</i> ⁺ : 180 <i>anth</i> [–]	48
3	<i>anth</i> ⁺ – A223	<i>anth</i> [–] – A487	380 <i>anth</i> ⁺ : 379 <i>anth</i> [–]	50
4	<i>anth</i> ⁺ – A223	<i>anth</i> [–] – A58	60 <i>anth</i> ⁺ : 280 <i>anth</i> [–]	80

8.21 Você identificou uma cepa mutante de *E. coli* que não sintetiza histidina (*His*[–]). Com o objetivo de determinar a localização da mutação *his*[–] no cromossomo de *E. coli*, você faz experimentos de cruzamento interrompido com cinco cepas diferentes de Hfr. O quadro a seguir mostra o momento de entrada (minutos, entre parênteses) dos alelos selvagens dos cinco primeiros marcadores (genes mutantes) na cepa *His*.

Hfr A — <i>his</i> (1)	<i>man</i> (9)	<i>gal</i> (28)	<i>lac</i> (37)	<i>thr</i> (45)
Hfr B — <i>man</i> (15)	<i>his</i> (23)	<i>cys</i> (38)	<i>ser</i> (42)	<i>arg</i> (49)
Hfr C — <i>thr</i> (3)	<i>lac</i> (11)	<i>gal</i> (20)	<i>man</i> (39)	<i>his</i> (47)

No mapa a seguir do cromossomo circular de *E. coli*, indique (1) a localização de cada gene em relação a *thr* (localizado em 0/100 min), (2) a posição em que o fator F é integrado a cada uma das cinco células Hfr e (3) o sentido da transferência de cromossomo para cada Hfr (indique a direção com uma seta).



- 8.22** Sabe-se que as mutações *nrd 11* (gene *nrd B*, que codifica a subunidade beta da enzima ribonucleotídeo redutase), *am M69* (gene *63*, que codifica uma proteína que auxilia a fixação da fibra da cauda) e *nd 28* (*denA*, que codifica a enzima endonuclease II) estão localizadas entre os genes *31* e *32* no cromossomo do bacteriófago T4. As mutações *am N54* e *am A453* estão localizadas nos genes *31* e *32*, respectivamente. Em vista dos dados do cruzamento de três fatores na tabela a seguir, qual é a ordem linear dos cinco locais mutantes?

Dados do cruzamento de três fatores

Cruzamento	Porcentagem de recombinação ^a
1. <i>am A453–am M69</i> × <i>nrd 11</i>	2,6
2. <i>am A453–nrd 11</i> × <i>am M69</i>	4,2
3. <i>am A453–am M69</i> × <i>nd 28</i>	2,5
4. <i>am A453–nd 28</i> × <i>am M69</i>	3,5
5. <i>am A453–nrd 11</i> × <i>nd 28</i>	2,9
6. <i>am A453–nrd 28</i> × <i>nrd 11</i>	2,1
7. <i>am N54–am M69</i> × <i>nrd 11</i>	3,5
8. <i>am N54–nrd 11</i> × <i>am M69</i>	1,9
9. <i>am N54–nrd 28</i> × <i>am M69</i>	1,7
10. <i>am N54–am M69</i> × <i>nd 28</i>	2,7
11. <i>am N54–nrd 28</i> × <i>nrd 11</i>	2,9
12. <i>am N54–nrd 11</i> × <i>nd 28</i>	1,9

^aTodas as frequências de recombinação são calculadas como:

$$\frac{2 \text{ (prole de tipo selvagem)}}{\text{prole total}} \times 100.$$

- 1 Quantas cepas diferentes de *E. coli* tiveram os genomas sequenciados desde 1997?
2. Todos esses genomas têm o mesmo tamanho aproximado? Caso não tenham, qual é a variação de tamanho observada entre os genomas de diferentes cepas de *E. coli*?
3. Algumas cepas de *E. coli*, por exemplo, 0157:H7, são mais patogênicas para seres humanos e outros mamíferos que cepas como a K12. O genoma dessas cepas é maior ou menor que o de K12? As comparações dos genes nas cepas patogênicas e não patogênicas poderiam dar pistas sobre a razão de algumas cepas serem patogênicas e outras não?

Dica: no *site* do NCBI, na aba *Popular Resources*, clique em *Genome*. Escolha, então, *Escherichia coli* no box de pesquisa para acessar a informação acerca dos genomas das diferentes cepas de *E. coli*.