

8

Genética Microbiana

Praticamente todas as características microbianas sobre as quais você leu nos capítulos iniciais são controladas ou influenciadas pela hereditariedade. As características hereditárias dos micróbios incluem sua forma e características estruturais, seu metabolismo, sua habilidade de se mover ou de se comportar de vários modos e sua capacidade de interagir com outros organismos – talvez causando doenças. Os organismos individuais transmitem essas características à sua prole através dos genes.

Pesquisadores estão tentando resolver o difícil problema médico da resistência aos antibióticos. Os micro-organismos podem se tornar resistentes aos antibióticos de várias formas, e todas dependem da genética. O surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSAs) constitui uma séria ameaça no cuidado aos pacientes. Neste capítulo, você verá como os VRSAs adquirem esta característica.

As doenças emergentes são outra razão da importância de se conhecer a genética. Novas doenças são o resultado da mudança genética em alguns organismos existentes; por exemplo, *E. coli* O157:H7 adquire os genes codificadores da Shiga, a toxina da *Shigella*.

Atualmente, os microbiologistas estão utilizando a genética para descobrir a relação entre os organismos, explorar a origem de micro-organismos como o HIV e o vírus *West Nile* e estudar o potencial dos vírus *Influenza* de aves para infectar humanos.



SOB O MICROSCÓPIO

Cromossomos bacterianos. Um único cromossomo, em geral firmemente empacotado dentro de uma célula bacteriana, foi expelido de uma célula de *E. coli* após a parede celular e a membrana plasmática terem sido danificadas.

P&R

Uma menina de dois anos de idade foi levada a um setor de emergência com diarreia sanguinolenta, vômito, febre e falha renal. Ela foi diagnosticada com síndrome urêmica hemolítica causada por *E. coli* O157:H7. A *E. coli* é naturalmente encontrada no intestino grosso humano, onde é benéfica. Entretanto, a amostra designada *E. coli* O157:H7 produz a toxina Shiga, que causa doença grave e tem surgido como causa importante de infecções alimentares. Como a *E. coli* adquire este gene da *Shigella*?

Procure pela resposta neste capítulo.

Estrutura e função do material genético

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 8-1** Definir *genética, genoma, cromossomo, gene, código genético, genótipo, fenótipo e genômica*.
- 8-2** Descrever como o DNA serve de informação genética.
- 8-3** Descrever o processo da replicação do DNA.
- 8-4** Descrever síntese proteica, incluindo transcrição, processamento de RNA e tradução.
- 8-5** Comparar a síntese proteica em procarióticos e eucarióticos.

Genética é a ciência da hereditariedade; ela inclui o estudo do que são os genes, como eles transportam informação, como são replicados e passados para as gerações seguintes de células ou transmitidos entre organismos, e como a expressão de sua informação dentro de um organismo determina as características particulares daquele organismo. A informação genética em uma célula é chamada de **genoma**. O genoma de uma célula inclui seus cromossomos e plasmídeos. Os **cromossomos** são estruturas contendo DNA que transportam fisicamente a informação hereditária; os cromossomos contêm os genes. **Genes** são segmentos de DNA (exceto em alguns RNAs vírus) que codificam produtos funcionais. Vimos no Capítulo 2 que o DNA é uma macromolécula composta de unidades repetidas denominadas *nucleotídeos*. Lembre-se que cada nucleotídeo consiste em uma base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina), uma desoxirribose (um açúcar pentose) e um grupo fosfato (veja a Figura 2.16, página 48). O DNA dentro de uma célula existe como longos filamentos de nucleotídeos, retorcidos em pares, para formar uma hélice dupla. Cada filamento possui uma fileira alternando açúcar e grupo fosfato (seu *esqueleto de açúcar-fosfato*) e uma base nitrogenada aderida a cada açúcar no esqueleto. As duas fitas são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre suas bases nitrogenadas. Os **pares de bases** sempre ocorrem de modo específico: a adenina sempre pareia com a timina, e a citosina sempre pareia com a guanina. Devido a esse pareamento específico de bases, a sequência de bases de uma fita de DNA determina a sequência da outra fita. As duas fitas de DNA são, portanto, *complementares*.

A estrutura do DNA ajuda a explicar as duas características principais do armazenamento de informação biológica. Primeiro, a sequência linear de bases fornece a informação real. A informação genética é codificada pela sequência de bases ao longo do DNA, de modo muito similar a como nossa linguagem escrita utiliza uma sequência linear de letras para formar palavras e sentenças. A linguagem genética, entretanto, utiliza um alfabeto contendo somente quatro letras – os quatro tipos de bases nitrogenadas no DNA (ou RNA). Porém, mil dessas quatro bases, o número contido em um gene de tamanho médio, podem ser arranjadas de 4^{1000} formas diferentes. Esse número astronômico explica como os genes podem ter variações suficientes para fornecer toda a informação que uma célula necessita para crescer e realizar suas

funções. O **código genético**, o grupo de regras que determina como uma sequência de nucleotídeos é convertida na sequência de aminoácidos de uma proteína, será discutido em mais detalhes posteriormente neste capítulo.

Segundo, a estrutura complementar permite a duplicação precisa do DNA durante a divisão celular. Cada célula-filha recebe uma das fitas originais parentais, assegurando, então, uma das fitas que funcionará corretamente.

Boa parte do metabolismo celular está relacionada à tradução da mensagem genética dos genes em proteínas específicas. Um gene normalmente codifica uma molécula de RNA mensageiro (mRNA), que finalmente resulta na formação de uma proteína. Alternativamente, o produto do gene pode ser um RNA ribossômico (rRNA) ou um RNA de transferência (tRNA). Como veremos, todos estes tipos de RNA estão envolvidos no processo da síntese proteica. Quando a molécula final que um gene codifica (uma proteína, por exemplo) foi produzida, dizemos que o gene foi *expresso*.

Genótipo e fenótipo

O **genótipo** de um organismo é sua composição genética, a informação que codifica todas as características particulares do organismo. O genótipo representa as propriedades *potenciais*, mas não as propriedades em si. O **fenótipo** refere-se às propriedades *reais, expressas*, como a capacidade do organismo de realizar uma reação química em particular. O fenótipo, então, é a manifestação do genótipo.

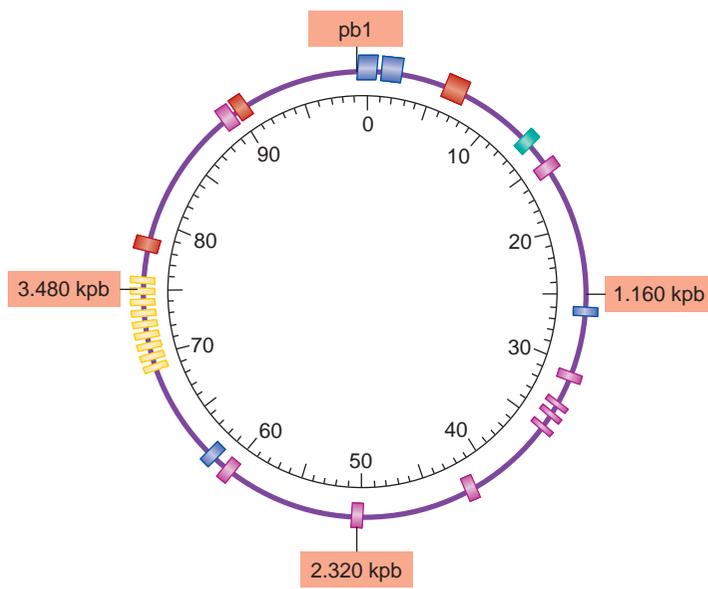
Em termos moleculares, o genótipo de um organismo é sua coleção de genes, todo o seu DNA. O que constitui o fenótipo do organismo em termos moleculares? Em um sentido, um fenótipo é sua coleção de proteínas. A maioria das propriedades da célula deriva das estruturas e funções de suas proteínas. Nos micróbios, a maioria das proteínas é *enzimática* (catalisa reações particulares) ou *estrutural* (participa em grandes complexos funcionais como as membranas ou os flagelos). Mesmo os fenótipos que dependem de outras macromoléculas estruturais que não as proteínas (como os lipídeos ou polissacarídeos) baseiam-se indiretamente nas proteínas. Por exemplo, a estrutura de uma molécula de lipídeo complexo ou polissacarídeo resulta das atividades catalíticas das enzimas que sintetizam, processam e degradam as moléculas. Portanto, embora não seja totalmente preciso dizer que os fenótipos são devidos somente às proteínas, essa é uma simplificação útil.

DNA e cromossomos

As bactérias tipicamente possuem um único cromossomo circular consistindo de uma única molécula circular de DNA com proteínas associadas. O cromossomo é recurvado e dobrado e está aderido à membrana plasmática em um ou vários pontos. O DNA da *E. coli*, a espécie bacteriana mais estudada, tem cerca de 4,6 milhões de pares de bases e possui cerca de 1 mm de comprimento – mil vezes maior que toda a célula (**Figura 8.1a**). Contudo, o cromossomo ocupa ape-



(a) A massa enovelada e os filamentos retorcidos de DNA emergindo dessa célula rompida de *E. coli* são parte de seu cromossomo único.



LEGENDA	
■	Metabolismo de aminoácidos
■	Metabolismo de carboidratos
■	Replicação e reparo do DNA
■	Síntese de membrana
■	Metabolismo de lipídeos

(b) Um mapa genético do cromossomo da *E. coli*. Os números dentro do círculo indicam os minutos gastos para transferir os genes durante o pareamento entre duas células; os números coloridos nos quadros indicam o número de pares de bases.

Figura 8.1 Um cromossomo procariontário.

P O que é um gene? O que é uma janela aberta de leitura (*open-reading frame*)?

nas cerca de 10% do volume celular uma vez que o DNA é torcido ou *superenovelado* – muito mais que uma corda de telefone quando colocado de volta na base.

A localização dos genes no cromossomo bacteriano pode ser determinada por experimentos envolvendo a transferência de genes de uma célula para outra. Esses processos serão discutidos mais adiante neste capítulo. O mapa do cromossomo bacteriano resultante é marcado em minutos que correspondem a quando os genes são transferidos de uma célula doadora para uma célula receptora (**Figura 8.1b**).

Em anos recentes, as sequências completas de base de vários cromossomos bacterianos foram determinadas. Computadores são utilizados para procurar pelas *janelas abertas de leitura*, que são as regiões do DNA que codificam as proteínas. Como você verá posteriormente, estas janelas são sequências de bases entre códons de iniciação (*Start codons*) e de parada (*Stop codons*). O sequenciamento e a caracterização molecular dos genomas são denominados **genômica**. O uso da genômica para rastrear o vírus *West Nile* é descrito no quadro da página 223.

O fluxo da informação genética

A replicação do DNA possibilita o fluxo de informação genética de uma geração para a seguinte. Como mostrado na **Figura 8.2**, o DNA de uma célula se replica antes da divisão celular, de modo que cada célula-filha recebe um cromossomo idêntico ao da original. Dentro de cada célula realizando metabolismo, a informação genética contida no DNA flui de outro modo: ela é transcrita em mRNA e então traduzida em proteína. Descreveremos os processos de transcrição e tradução mais adiante neste capítulo.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Dê uma aplicação clínica da genômica. **8-1**
- ✓ Por que o pareamento de bases no DNA é importante? **8-2**

Replicação do DNA

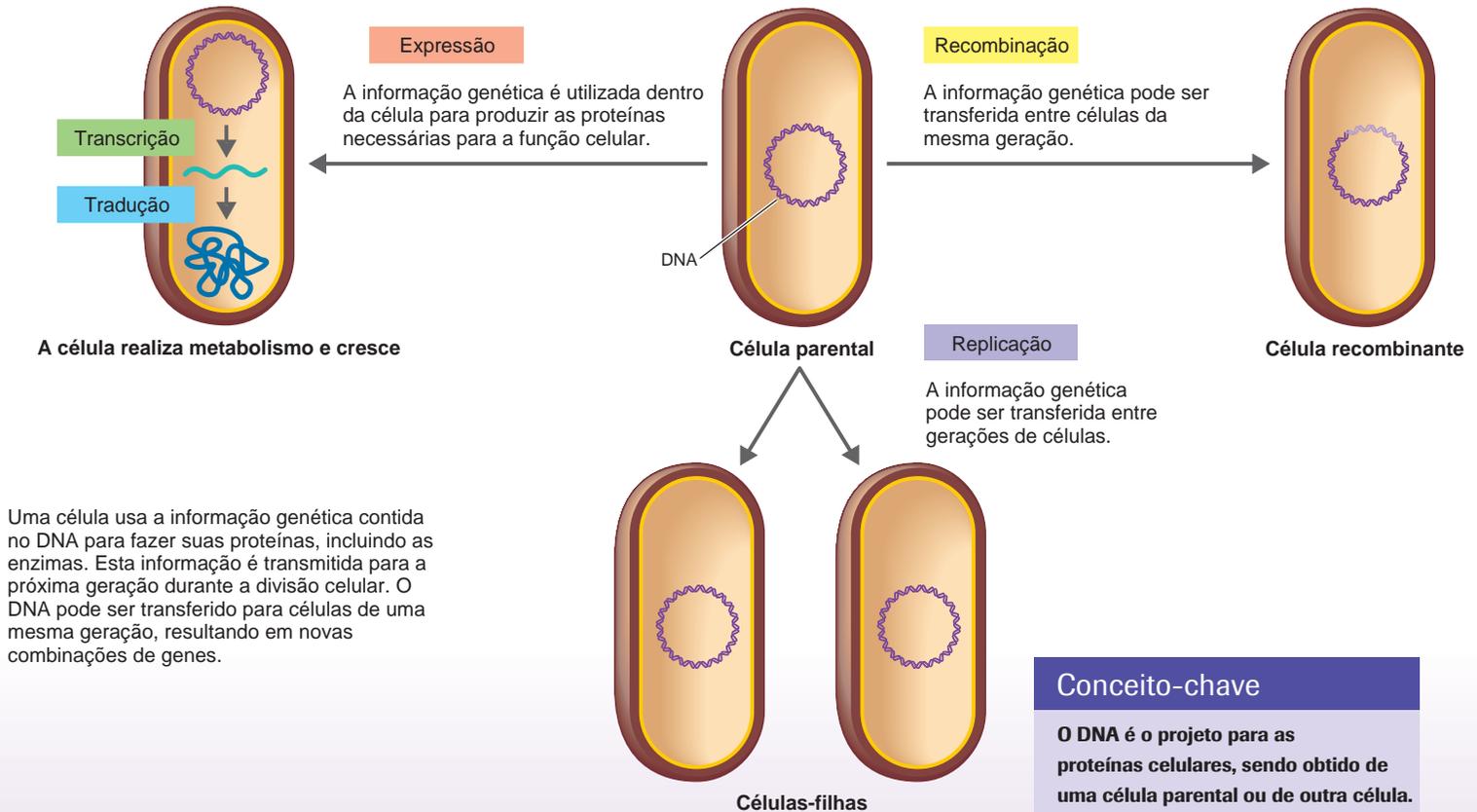
Na replicação do DNA, uma molécula de DNA de fita dupla “parental” é convertida em duas moléculas “filhas” idênticas. A estrutura complementar das sequências de bases nitrogenadas na molécula de DNA é a chave para a compreensão da replicação do DNA. Como as bases ao longo das duas fitas do DNA de hélice dupla são complementares, uma fita pode agir como molde para a produção da outra (**Figura 8.3a**).

A replicação do DNA requer a presença de muitas proteínas celulares que dirigem uma determinada sequência de eventos. Enzimas envolvidas na replicação do DNA e em outros processos são listadas na **Tabela 8.1**, na página 215. Quando a replicação se inicia, o superenovelamento é relaxado pela *topoisomerase* ou *girase*, e as duas fitas de DNA parental são desenroladas pela *helicase* e separadas uma da outra em um pequeno segmento de DNA após o outro. Os nucleotídeos livres presentes no citoplasma da célula são pareados das bases expostas da fita simples do DNA parental. Onde a timina está presente na fita original, somente a adenina pode se fixar na nova fita; onde a guanina está presente na fita parental, somente a citosina pode se encaixar, e assim por diante.

Figura 8.2

FIGURA FUNDAMENTAL O fluxo da informação genética

Utilizando o exemplo de uma bactéria com um cromossomo circular único, esta figura resume como a informação genética é usada e passada entre as células. Pequenas versões da parte principal desta figura de visão geral irão aparecer em outras figuras ao longo do capítulo para indicar a relação de diferentes processos.



Quaisquer bases incorretamente pareadas são removidas e substituídas pelas enzimas de replicação. Uma vez alinhado, o nucleotídeo recém-adicionado é unido à fita em crescimento por uma enzima denominada **DNA-polimerase**. Então, o DNA parental se desenrola mais um pouco para permitir a adição do próximo nucleotídeo. O ponto no qual a replicação ocorre é denominado *forquilha de replicação*.

À medida que a forquilha de replicação move-se ao longo da fita parental, cada uma das fitas simples desenroladas se combina ou pareia com novos nucleotídeos. A fita original e a fita-filha recém-sintetizada se enovelam. Uma vez que cada nova molécula de DNA de fita dupla contém uma fita original (conservada) e uma fita nova, o processo de replicação é descrito como **replicação semiconservativa**.

Antes de examinar em mais detalhe a replicação do DNA, observe com mais atenção a estrutura do DNA (veja a Figura 2.16, na página 48). É importante compreender o conceito de que as fitas de DNA pareadas estão orientadas em direções opostas uma em relação à outra. Observe na Figura 2.16 que os átomos de carbono do açúcar componente de cada nucleotídeo são numerados de 1 (pronunciado “um linha”) a 5'. Para que as bases pareadas fiquem ao lado uma da outra, os açúcares que compõem uma fita estão de cabeça para baixo um em relação ao outro. A extremidade que tem uma hidroxila aderida ao carbono 3' é denominada extremidade 3' da fita do DNA; a extremidade que tem um fosfato aderido ao carbono 5' é chamada de extremidade 5'. A forma como as duas fitas se encaixam decreta que a direção 5' → 3' de uma fita vai ao encontro da direção 5' → 3' da outra fita (**Figura 8.3b**). Essa estrutura de DNA

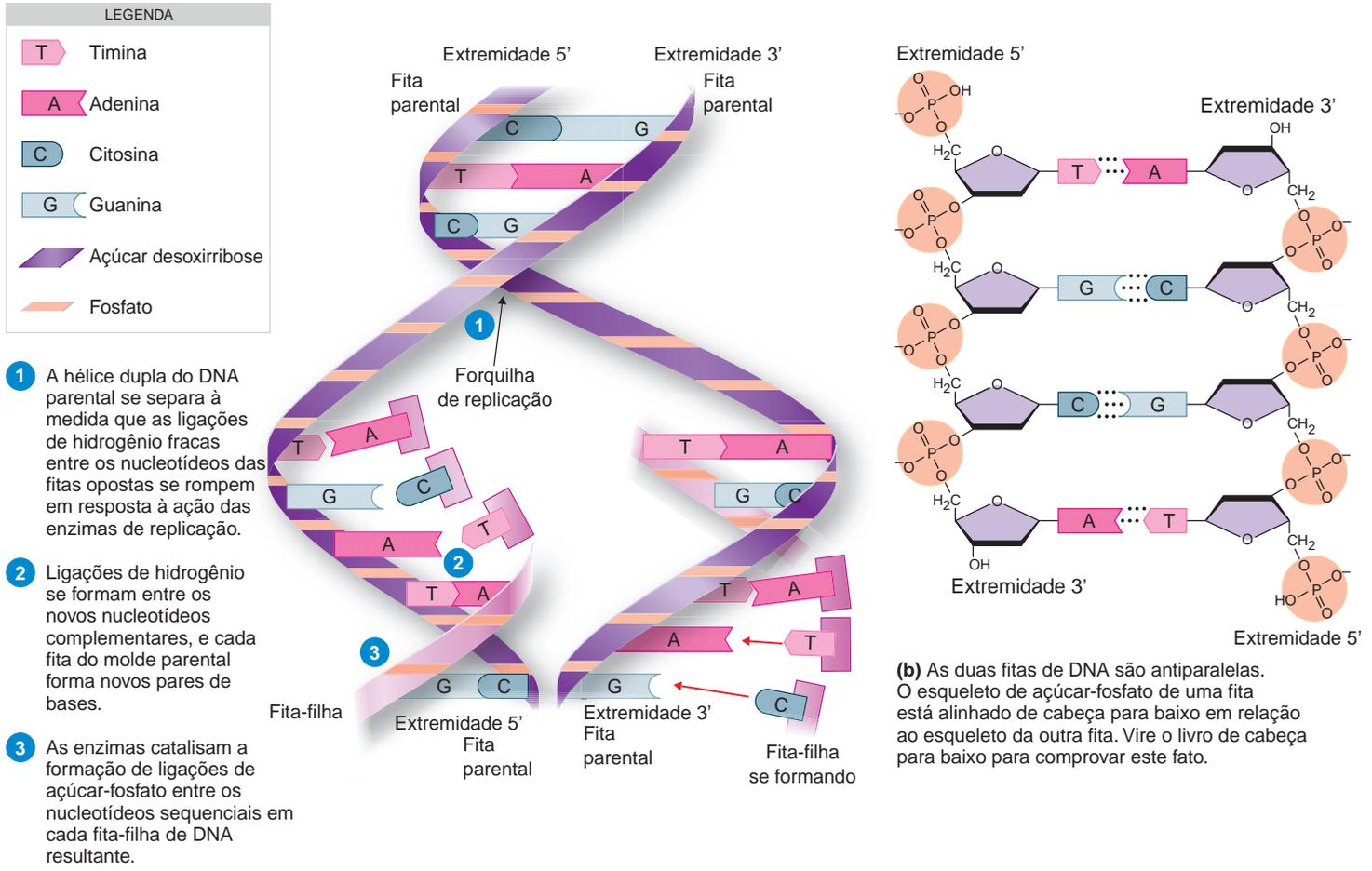


Figura 8.3 Replicação do DNA.

P O que significa replicação semiconservativa?

afeta o processo de replicação, pois as DNA-polimerases podem adicionar novos nucleotídeos somente à extremidade 3'. Portanto, enquanto a forquilha de replicação se movimenta ao longo do DNA parental, as duas novas fitas devem crescer em direções diferentes.

A replicação do DNA necessita de um grande gasto energético. Essa energia é fornecida pelos nucleotídeos, que são, na verdade, nucleosídeos trifosfato. Você já sabe sobre o ATP; a única diferença entre o ATP e o nucleotídeo adenina no DNA é o componente açúcar. A desoxirribose é o açúcar nos nucleosídeos trifosfato utilizados para sintetizar o DNA, e os nucleosídeos trifosfato com ribose são usados para sintetizar o RNA. Dois grupos fosfato são removidos para adicionar o nucleotídeo à fita de DNA em crescimento; a hidrólise do nucleosídeo é exergônica e fornece energia para criar novas ligações na fita de DNA (Figura 8.4).

A Figura 8.5 fornece mais detalhes sobre as muitas etapas que ocorrem nesse processo complexo.

A replicação do DNA de algumas bactérias, como a *E. coli*, segue *bidirecionalmente* ao redor do cromossomo (Figura 8.6). Duas

forquilhas de replicação movem-se em direções opostas, para longe da origem de replicação. Como o cromossomo bacteriano é uma alça fechada, as forquilhas eventualmente se encontram quando a replicação está completada. As duas alças precisam ser separadas por uma topoisomerase. Muitas evidências mostram uma associação entre a membrana plasmática bacteriana e a origem de replicação. Após a duplicação, se cada cópia da origem se ligasse à membrana em um polo oposto, então cada célula-filha receberia uma cópia da molécula de DNA – isto é, um cromossomo completo.

A replicação do DNA é um processo surpreendentemente acurado. Tipicamente, os erros são cometidos em uma taxa de somente 1 em cada 10¹⁰ bases incorporadas. Essa precisão em boa parte ocorre devido à capacidade de *correção (proofreading)* da DNA-polimerase. À medida que cada base nova é adicionada, a enzima avalia se a estrutura do pareamento formada está correta. Caso contrário, a enzima remove a base inapropriada e a substitui pela correta. Desse modo, o DNA pode ser replicado de maneira precisa,

Tabela 8.1 Enzimas importantes na replicação, na expressão e no reparo do DNA	
DNA-girase	Relaxa o superenovelamento acima da forquilha de replicação
DNA-ligase	Forma ligações covalentes para ligar as fitas de DNA; liga os fragmentos de <i>Okazaki</i> e os novos segmentos no reparo de excisão
DNA-polimerase	Sintetiza o DNA; corrige e repara o DNA
Endonuclease	Corta o esqueleto de DNA em uma fita de DNA; facilita o reparo e as inserções
Exonuclease	Corta o DNA em uma extremidade exposta; facilita o reparo
Helicase	Desenovela o DNA de fita dupla
Metilase	Adiciona o grupo metil às bases selecionadas na nova fita de DNA
Fotoliase	Utiliza a energia da luz visível para separar os dímeros de pirimidina induzidos pela luz UV
Primase	Produz iniciadores de RNA a partir de um molde de DNA
Ribozima	Enzima de RNA que remove íntrons e processa éxons conjuntamente
RNA-polimerase	Copia RNA a partir de um molde de DNA
snRNP	Complexo RNA-proteína que remove íntrons e processa éxons conjuntamente
Topoisomerase	Relaxa o superenovelamento acima da forquilha de replicação; separa DNA circular no final da replicação
Transposase	Corta o esqueleto de DNA, formando extremidades coesivas

permitindo que cada cromossomo-filho possa ser quase idêntico ao parental.

TESTE SEU CONHECIMENTO

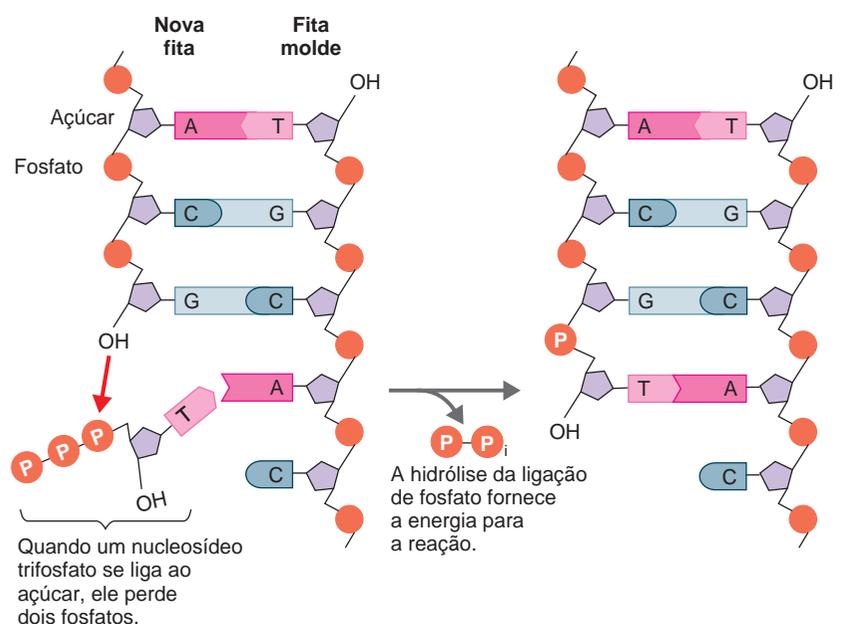
- ✓ Descreva a replicação do DNA, incluindo as funções da DNA-girase, da DNA-ligase e da DNA-polimerase. **8-3**

RNA e síntese proteica

Como a informação no DNA é utilizada para produzir as proteínas que controlam as atividades celulares? No processo de *transcrição*, a informação genética é copiada no DNA, ou transcrita, em uma sequência de bases de RNA. A célula usa, então, a informação codificada neste RNA para sintetizar proteínas específicas pelo processo de *tradução*. Observaremos agora como esses dois processos ocorrem na célula bacteriana.

Figura 8.4 Adicionando um nucleotídeo ao DNA.

P Por que uma fita está “de cabeça para baixo” em relação à outra fita? Por que as duas fitas não podem se alinhar no mesmo sentido?



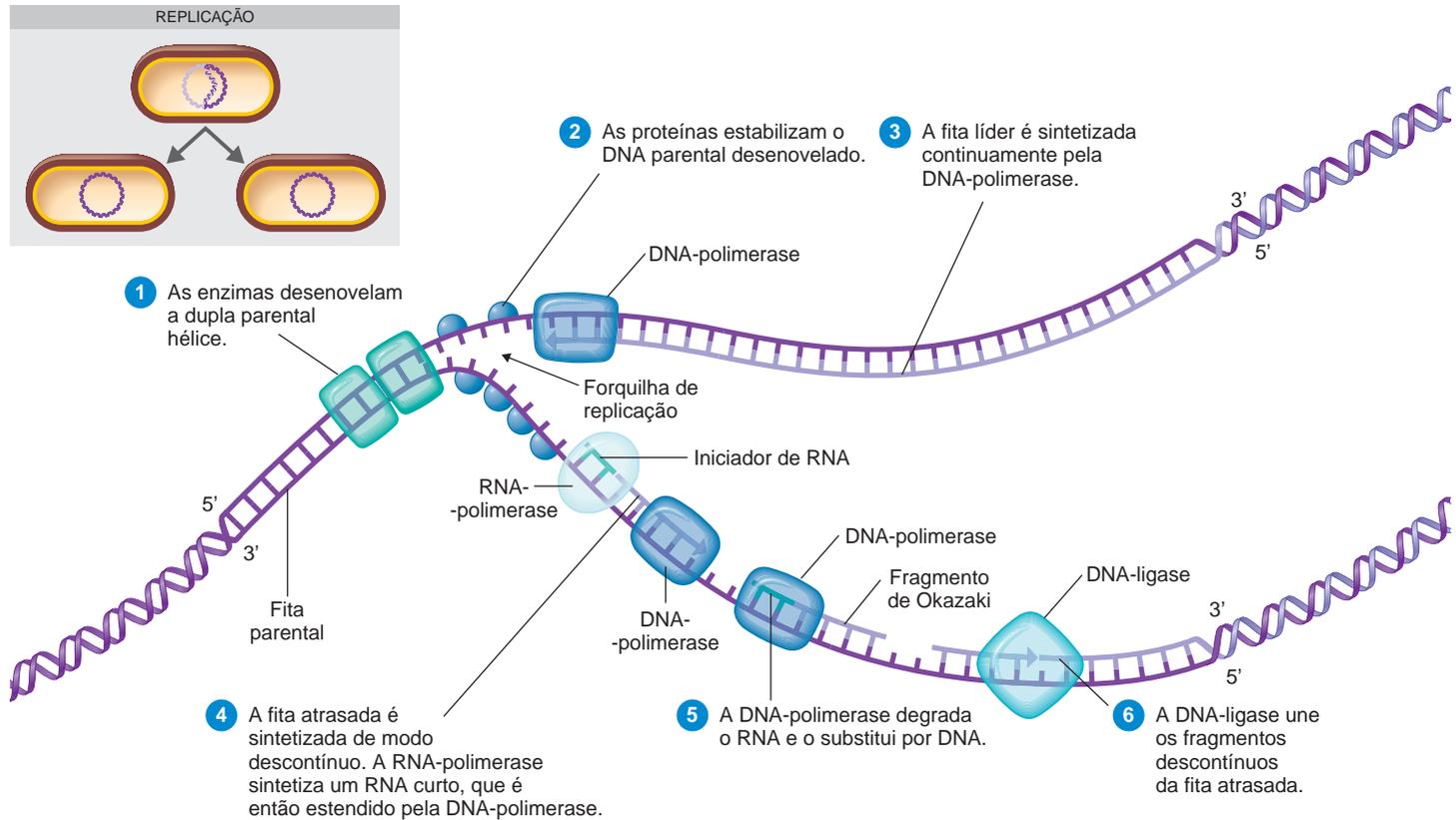


Figura 8.5 Um resumo dos eventos na forquilha de replicação.

P Por que uma fita de DNA é sintetizada de modo descontínuo?

Transcrição

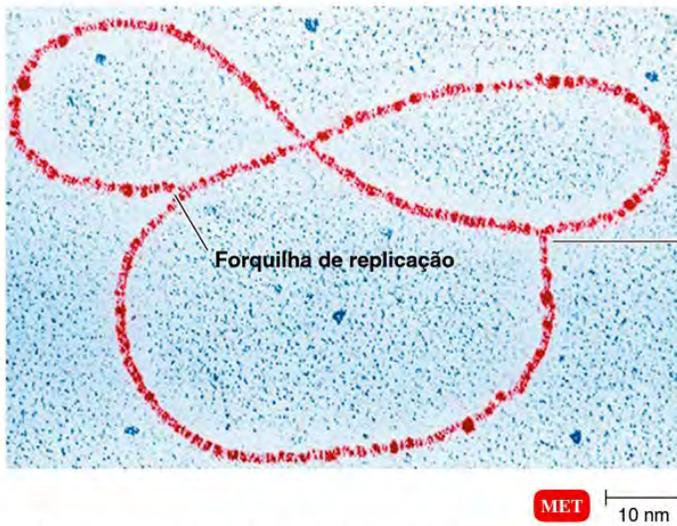
Transcrição é a síntese de uma fita complementar de RNA a partir de um molde de DNA. Discutiremos aqui a transcrição de células procarióticas; já a transcrição nos eucariotos é discutida na página 220. Como mencionado anteriormente, há três tipos de RNA nas células bacterianas: RNA mensageiro, RNA ribossômico e RNA de transferência. O RNA ribossômico forma uma parte integral dos ribossomos, a maquinaria celular para a síntese proteica. O RNA de transferência também está envolvido na síntese proteica, como veremos posteriormente. O **RNA mensageiro (mRNA)** transporta a informação codificada para produzir proteínas específicas do DNA aos ribossomos, onde as proteínas são sintetizadas.

Durante a transcrição, uma fita de mRNA é sintetizada utilizando uma porção do DNA da célula como molde. Em outras palavras, a informação genética estocada na sequência de bases nitrogenadas do DNA é reescrita, de modo que a mesma informação aparece na sequência de mRNA. Como na replicação do DNA, um G no molde de DNA determina um C no mRNA que está sendo feito; um C no molde de DNA determina um G no

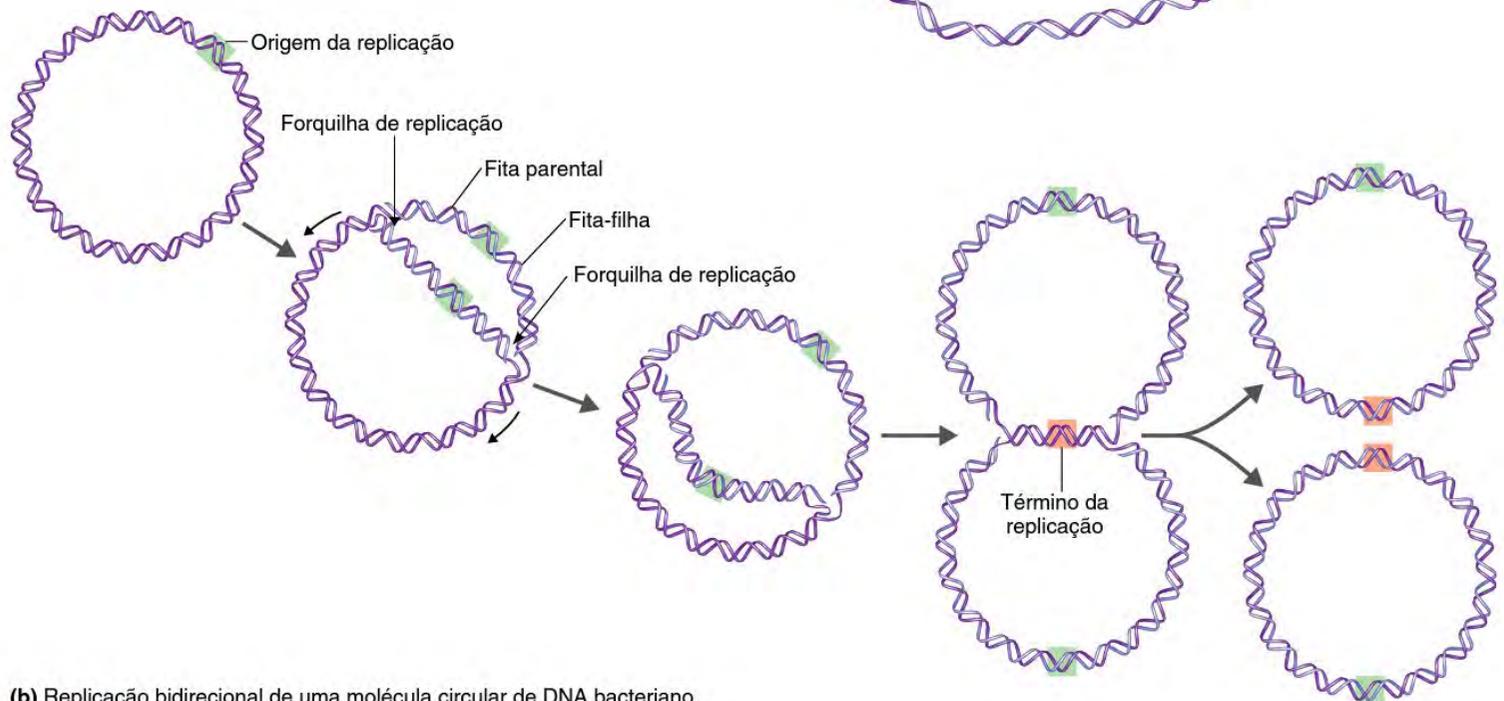
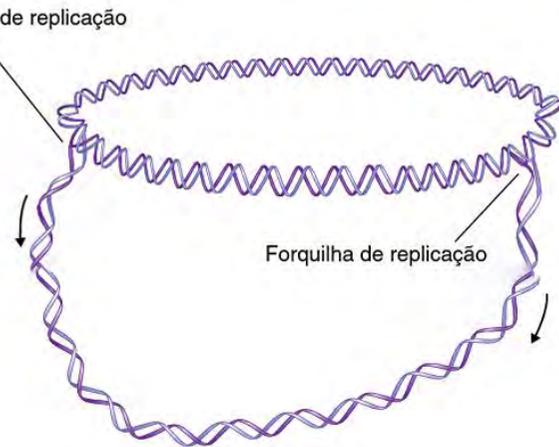
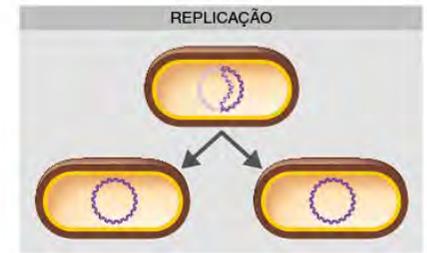
mRNA; e um T no molde de DNA determina um A no mRNA. Entretanto, um A no molde de DNA determina uma uracila (U) no mRNA, porque o RNA contém U no lugar de T. (U tem uma estrutura levemente diferente de T, mas pareia da mesma maneira.) Se, por exemplo, o molde de DNA possui a sequência de bases 3'-ATGCAT, o mRNA recém-sintetizado terá a sequência complementar de bases 5'-UACGUA.

O processo de transcrição requer uma enzima denominada **RNA-polimerase** e um suprimento de nucleotídeos RNA (**Figura 8.7**). A transcrição começa quando a RNA-polimerase liga-se ao DNA em um local denominado **promotor**. Somente uma das duas fitas de DNA serve como molde para a síntese de RNA para um dado gene. Como o DNA, o RNA é sintetizado na direção 5' → 3'. A síntese de RNA continua até que a RNA-polimerase atinja um local no DNA denominado **região de terminação**.

O processo de transcrição permite que a célula produza cópias de curta duração dos genes, que podem ser usadas como fonte direta de informação para a síntese proteica. O mRNA atua como um intermediário entre a forma de armazenamento permanente, o DNA, e o processo que usa a informação, a tradução.



(a) Um cromossomo de *E. coli* no processo de replicação.



(b) Replicação bidirecional de uma molécula circular de DNA bacteriano.

Figura 8.6 Replicação de DNA bacteriano.

P Qual é a origem da replicação?

Tradução

Já vimos como a informação genética no DNA é transferida ao mRNA durante a transcrição. Agora, veremos como o mRNA serve de fonte de informação para a síntese de proteínas. A síntese

proteica é denominada **tradução**, pois envolve a decodificação da “linguagem” dos ácidos nucleicos e a conversão da informação na “linguagem” das proteínas.

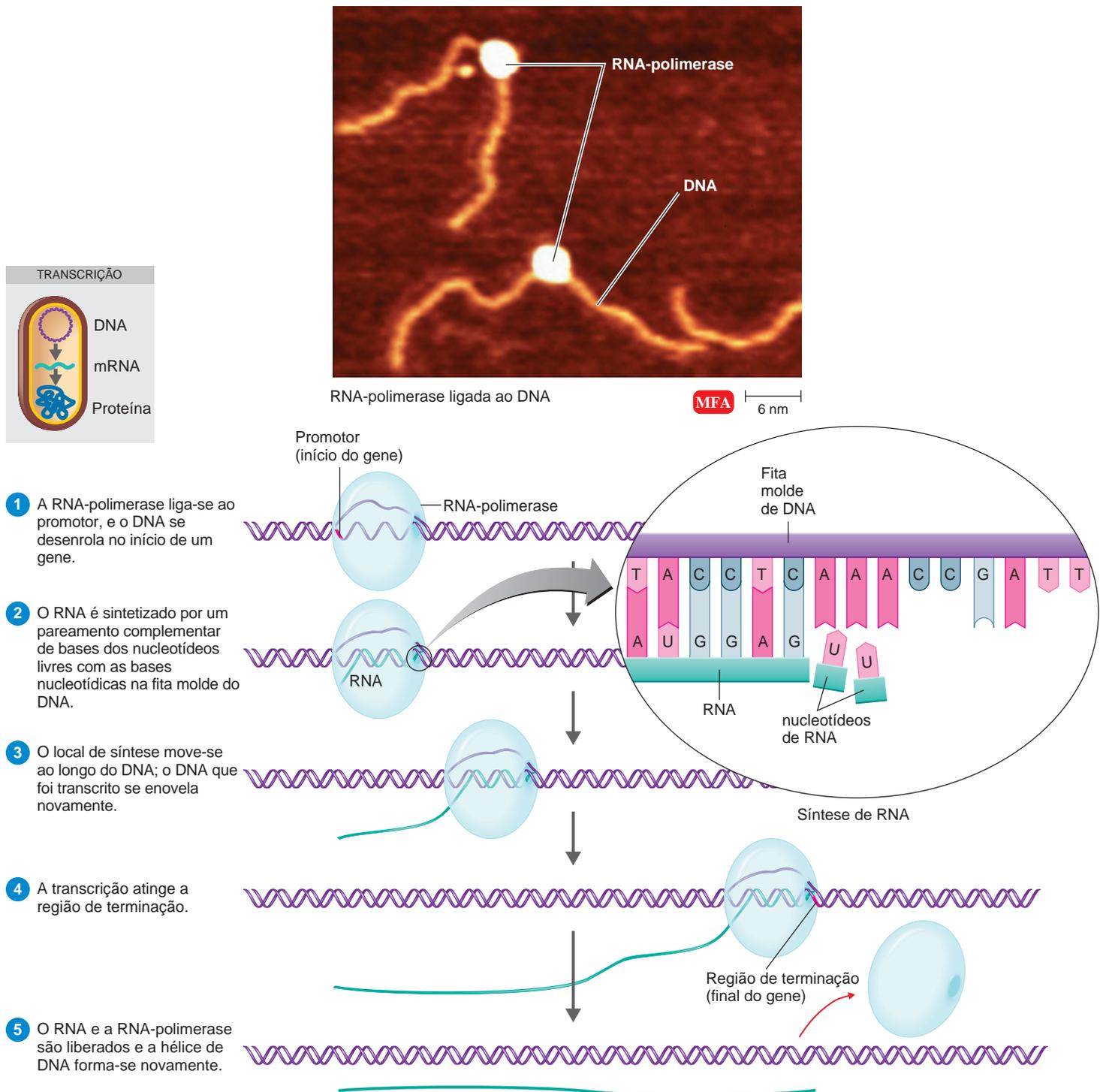


Figura 8.7 O processo de transcrição. O diagrama de orientação indica a relação da transcrição com o fluxo de informação genética completo dentro da célula.

P Na transcrição, o que é copiado e como isto é feito?

A linguagem do mRNA está em forma de **códons**, grupos de três nucleotídeos, como AUG, GGC ou AAA. A sequência de códons em uma molécula de mRNA determina a sequência de aminoácidos que estarão na proteína a ser sintetizada. Cada códon “codifica” um aminoácido específico. Este é o código genético (**Figura 8.8**).

Os códons são escritos em termos de sua sequência de bases no mRNA. Observe que existem 64 códons possíveis, mas somente 20 aminoácidos. Isso significa que a maioria dos aminoácidos é assinalada por vários códons alternativos, uma situação referida como **degeneração** do código. Por exemplo, a leucina tem seis códons e a alanina tem quatro. A degeneração permite que ocorra certa quantidade de alteração, ou mutação, no DNA sem afetar a proteína final produzida.

Dos 64 códons, 61 são códons de iniciação (*sense*) e 3 são códons de terminação (*nonsense*). Os **códons de iniciação** codificam os aminoácidos, e os **códons de terminação** (também chamados de *códons de parada*) não o fazem. Em vez disso, os códons de terminação – UAA, UAG e UGA – assinalam o fim da síntese da molécula de proteína. O códon de iniciação que inicia a síntese da molécula de proteína é AUG, que também é o códon da metionina. Nas bactérias, o códon de iniciação AUG codifica a formilmetionina em vez da metionina encontrada em outras partes da proteína. A metionina iniciadora com frequência é removida posteriormente; assim, nem todas as proteínas começam com metionina.

Os códons de mRNA são convertidos em proteína pelo processo de tradução. Os códons de um mRNA são “lidos” sequencialmente e, em resposta a cada códon, o aminoácido apropriado é montado em uma cadeia crescente. O local de tradução é o ribossomo, e as moléculas de **RNA de transferência (tRNA)** reconhecem os códons específicos e transportam os aminoácidos requeridos.

Cada molécula de tRNA possui um **anticódon**, uma sequência de três bases que é complementar ao códon. Dessa maneira, uma molécula de tRNA pode fazer pares de bases com seu códon associado. Cada tRNA também pode transportar em sua outra extremidade o aminoácido codificado pelo códon que o tRNA reconhece. As funções do ribossomo são dirigir ordenadamente a ligação do tRNA ao códon e montar os aminoácidos em uma cadeia, produzindo finalmente uma proteína.

A **Figura 8.9** mostra os detalhes da tradução. Os componentes necessários são montados: as duas subunidades ribossômicas, um tRNA com o anticódon UAC e a molécula de mRNA a ser traduzida, junto com vários fatores proteicos adicionais. Isso coloca o códon iniciador (AUG) na posição correta para permitir o início da tradução. Após o ribossomo se unir a dois aminoácidos por uma ligação peptídica, a primeira molécula de tRNA deixa o ribossomo, que então se move ao longo do mRNA até o códon seguinte.

À medida que os aminoácidos corretos são alinhados, ligações peptídicas são formadas entre eles, resultando em uma cadeia polipeptídica (veja a Figura 2.14, página 45). A tradução termina quando um dos três códons de terminação é alcançado no mRNA. O

		Segunda posição					
		U	C	A	G		
U	UUU	UCU } Phe	UCA } Ser	UAU	UGU } Tyr	UGA } Cys	U
	UUC			UAC			UGC
	UUA	UAA } Stop		UGA } Stop	A		
	UUG				UAG } Stop	UGG } Trp	G
C	CUU	CCU } Leu	CCA } Pro	CAU	CGU } His	CGA } Arg	U
	CUC			CAC			CGC
	CUA	CAA } Gln		CAG	CGG		A
	CUG			C			
A	AUU	ACU } Ile	ACA } Thr	AAU	AGU } Asn	AGA } Ser	U
	AUC			AAC			AGC
	AUA	AAA } Lys		AAG } Glu	AGA		A
	AUG } Met/start				ACG		AGG
G	GUU	GCU } Val	GCA } Ala	GAU	GGU } Asp	GGG } Gly	U
	GUC			GCC			GGC
	GUA	GCG } Glu		GAA	GGA		A
	GUG			GAG	GGG		G

Figura 8.8 O código genético. Os três nucleotídeos em um códon de mRNA são denominados, respectivamente, primeira posição, segunda posição e terceira posição do códon no mRNA. Cada conjunto de três nucleotídeos especifica um aminoácido, representado por uma abreviatura de três letras (veja a Tabela 2.4, página 44). O códon AUG, que especifica o aminoácido metionina, também é o início da síntese proteica. A palavra *Stop* (parada) identifica os códons de terminação que sinalizam o encerramento da síntese proteica.

P Por que o código genético é descrito como degenerado?

ribossomo, então, chega separado em suas duas subunidades, e o mRNA e a cadeia polipeptídica recém-sintetizada são liberados. O ribossomo, o mRNA e os tRNAs tornam-se, então, disponíveis para serem novamente utilizados.

O ribossomo se move ao longo do mRNA na direção 5' → 3'. Esse movimento do ribossomo permite a exposição do códon de iniciação. Os ribossomos adicionais podem então montar e começar a sintetizar proteína. Desse modo, normalmente há uma série de ribossomos unidos a um único mRNA, todos em vários estágios de síntese proteica. Nas células procarióticas, a tradução do mRNA em proteína pode começar antes mesmo de a transcrição estar completa (**Figura 8.10**). Como o mRNA é produzido no citoplasma, os códons de iniciação de um mRNA que estão sendo transcritos

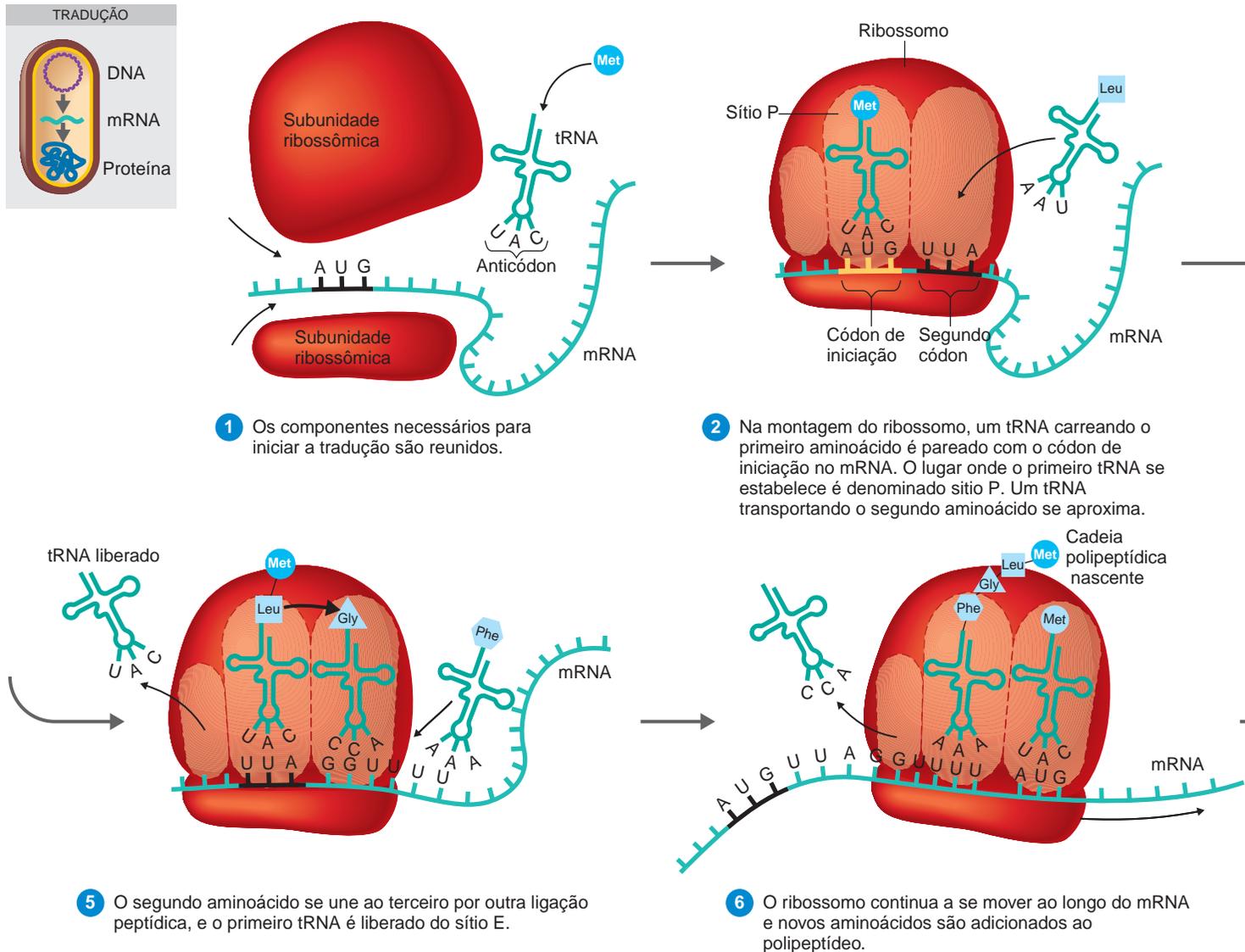


Figura 8.9 O processo de tradução. O objetivo geral da tradução é produzir proteínas utilizando mRNA como fonte de informação biológica. O ciclo complexo de eventos ilustrado aqui mostra o papel primário do tRNA e dos ribossomos na decodificação dessa informação. O ribossomo atua como o local onde a informação codificada pelo mRNA é decodificada, bem como o sítio onde os aminoácidos individuais são conectados em cadeias polipeptídicas. As moléculas de tRNA atuam como os verdadeiros “tradutores” – uma extremidade de cada tRNA reconhece um códon de mRNA específico, enquanto a outra transporta o aminoácido codificado para aquele códon.

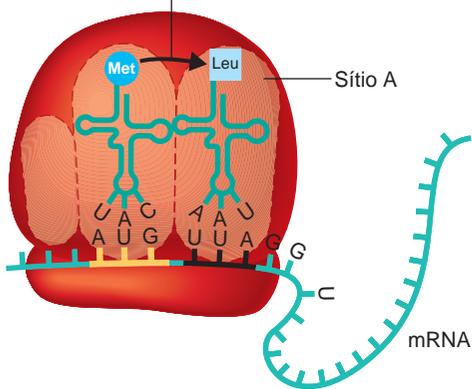
P Por que este processo é chamado de tradução?

estão disponíveis aos ribossomos antes mesmo que a molécula integral de mRNA seja feita.

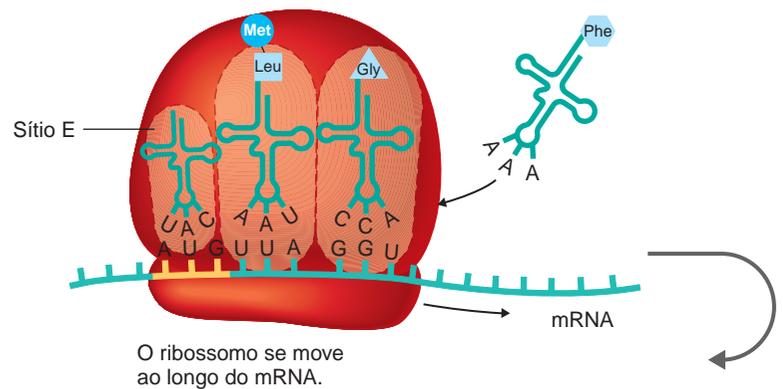
Nas células eucarióticas, a transcrição acontece no núcleo. O mRNA precisa ser completamente sintetizado e transportado através da membrana nuclear para o citoplasma antes da transcrição poder iniciar. Além disso, o RNA começa a ser processado antes de deixar o núcleo. Nas células eucarióticas, as regiões dos genes que codificam as proteínas são frequentemente interrompidas pelo DNA não codificante. Dessa forma, os genes eucari-

óticos são compostos de **éxons**, as regiões *expressas* do DNA, e de **íntrons**, as regiões *intermediárias* do DNA que não codificam proteína. No núcleo, a RNA-polimerase sintetiza uma molécula chamada de transcrito de RNA que contém cópias dos íntrons. Partículas denominadas **pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs, de small nuclear ribonucleoproteins)** removem os íntrons e conectam os éxons. Em alguns organismos, os íntrons agem como ribozimas que catalisam sua própria remoção (**Figura 8.11**).

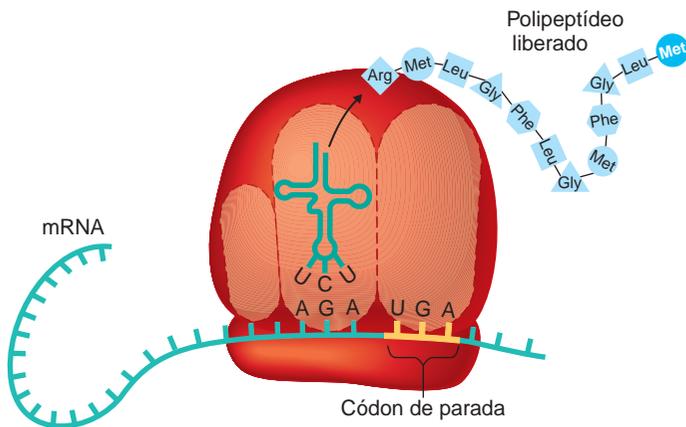
Formação da ligação peptídica



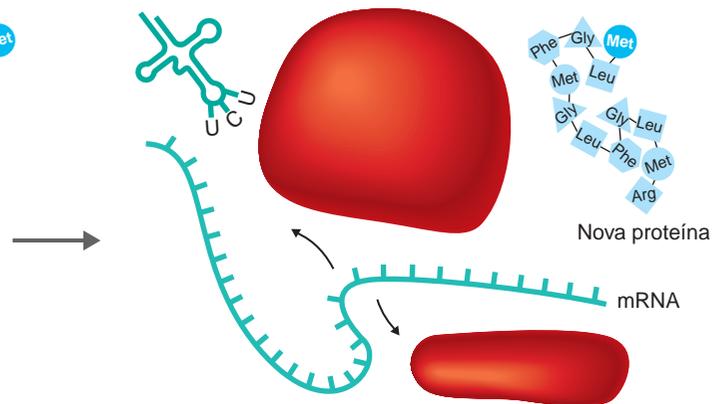
3 O segundo códon de mRNA pareia com o tRNA transportando o segundo aminoácido no sítio A. O primeiro aminoácido se une ao segundo por uma ligação peptídica. Este liga o polipeptídeo ao tRNA no sítio P.



4 O ribossomo se move ao longo do mRNA até o segundo tRNA estar no sítio P. O próximo códon a ser traduzido é conduzido ao sítio A. O primeiro tRNA ocupa agora o sítio E.



7 Quando o ribossomo alcança um códon de parada, o polipeptídeo é liberado.



8 Finalmente, o último tRNA é liberado e o ribossomo começa a se desligar. O polipeptídeo liberado forma uma nova proteína.

Figura 8.9 O processo de tradução. (continuação)

Em resumo, os genes são unidades de informação biológica codificada pela sequência de bases nucleotídicas no DNA. Um gene é expresso, ou transformado em um produto dentro da célula, pelos processos de transcrição e tradução. A informação genética transportada no DNA é transferida para uma molécula temporária de mRNA pela transcrição. A seguir, durante a tradução, o mRNA dirige a montagem dos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica: um ribossomo se fixa ao mRNA, os tRNAs enviam os aminoácidos ao ribossomo, conforme orientado pela sequência de códon do mRNA, e o ribossomo monta os aminoácidos na cadeia que será a proteína recém-sintetizada.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Qual o papel do promotor, da região de terminação e do mRNA na transcrição? 8-4

✓ Como a produção de mRNA em eucariotos difere do processo em procaríotos? 8-5

A regulação da expressão gênica bacteriana

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

8-6 Definir operon.

8-7 Explicar a regulação da expressão gênica em bactérias por indução, repressão e repressão catabólica.

As maquinarias genética e metabólica da célula são integradas e interdependentes. Lembre-se do Capítulo 5 que a célula bacteriana realiza um número enorme de reações metabólicas. A característica comum de todas as reações metabólicas é que elas são catalisadas por enzimas. Lembre-se também (página 120) que a inibição por retroalimentação impede uma célula de fazer reações químicas

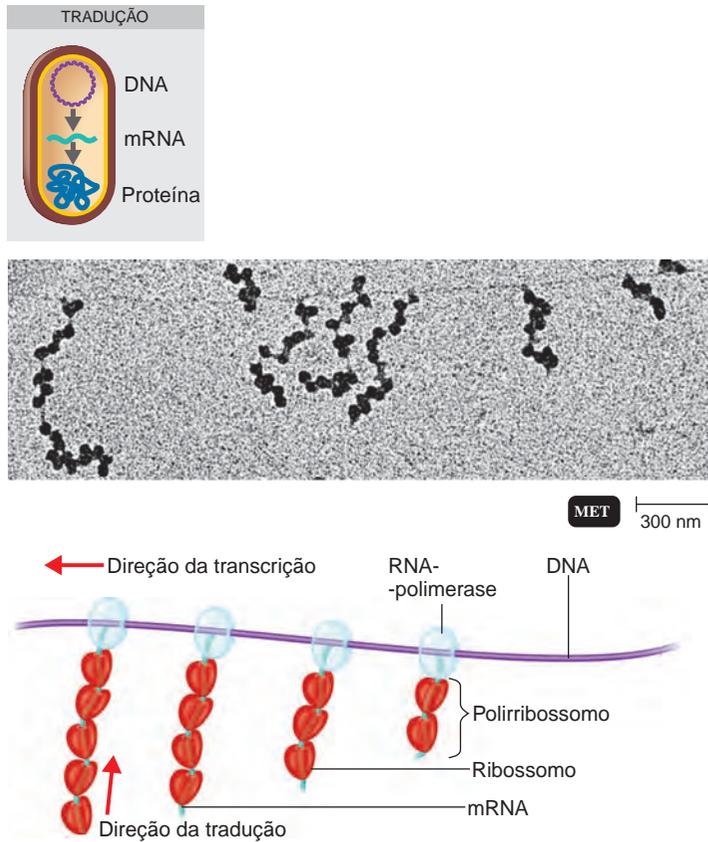


Figura 8.10 Transcrição e tradução simultânea em bactérias. A micrografia e o diagrama mostram esses processos em um único gene bacteriano. Muitas moléculas de mRNA estão sendo sintetizadas simultaneamente. As moléculas mais longas de mRNA foram as primeiras a serem transcritas no promotor. Observe os ribossomos aderidos ao mRNA recém-formado. Os polipeptídeos recém-sintetizados não são mostrados.

P Por que a tradução pode começar antes que a transcrição esteja completa em procarionotos, mas não em eucariotos?

desnecessárias. Essa inibição interrompe as enzimas que já foram sintetizadas. Examinaremos agora os mecanismos para prevenir a síntese de enzimas que não são necessárias.

Vimos que os genes, por meio da transcrição e da tradução, dirigem a síntese das proteínas, muitos das quais servem como enzimas – as próprias enzimas usadas no metabolismo celular. Como a síntese de proteínas requer um gasto tremendo de energia, a regulação da síntese proteica é importante para a economia energética celular. A célula conserva energia produzindo somente aquelas proteínas necessárias em um momento específico. Examinaremos a seguir como as reações químicas são reguladas pelo controle da síntese das enzimas.

Muitos genes, talvez 60 a 80%, não são regulados, mas são, ao invés, *constitutivos*, significando que seus produtos são constantemente produzidos em uma velocidade fixa. Normalmente esses genes, que estão ligados efetivamente todo o tempo, codificam as enzimas de que a célula necessita em quantidades muito grandes para seus principais processos vitais; as enzimas da glicólise são exemplos. A produção de outras enzimas é regulada de modo que elas estejam presentes somente quando necessário. O *Trypanosoma*, o protozoário parasita que causa a doença do sono africana, possui centenas de genes que codificam suas glicoproteínas de superfície. Cada célula do protozoário liga somente um gene de

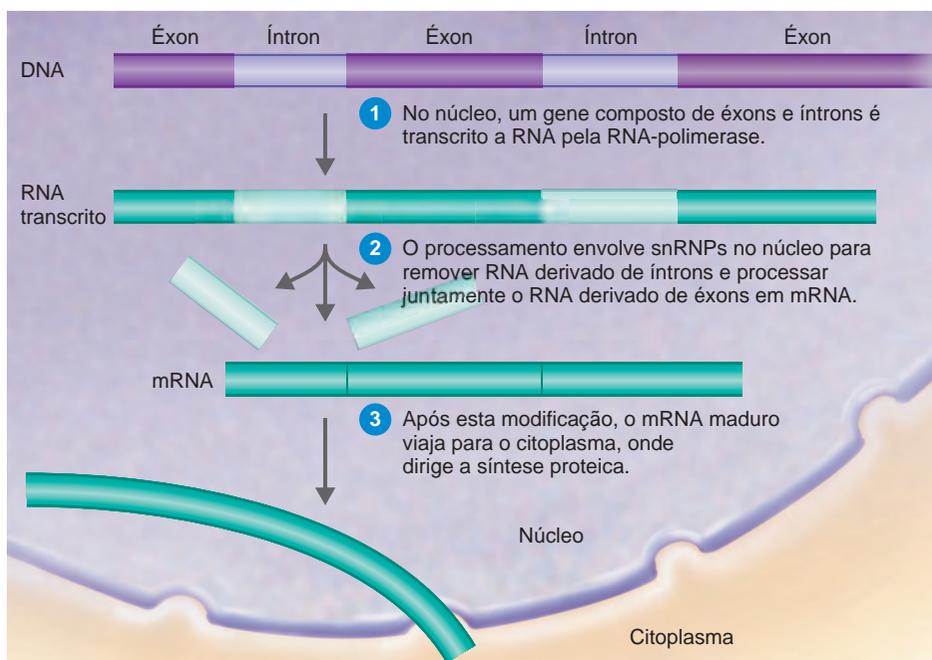


Figura 8.11 O processamento do RNA em células eucarióticas.

P Por que o RNA transcrito não pode ser usado para a tradução?



Rastreando o vírus do Oeste do Nilo (WNV, de *West Nile virus*)

Em 23 de agosto de 1999, um clínico especialista em doenças infecciosas de um hospital ao norte de Queens contactou o Departamento de Saúde da cidade de Nova York (NYCDOH) para relatar dois pacientes com encefalite. Na investigação, o NYCDOH identificou inicialmente um agrupamento de seis pacientes com encefalite, cinco dos quais apresentavam profunda fraqueza muscular e requeriam suporte respiratório. Nenhuma bactéria foi cultivada do sangue ou fluido cerebrospinal dos pacientes. Vírus transmitidos por mosquitos são causa comum de encefalite asséptica durante os meses de verão. Estes vírus são denominados arbovírus.

Arboviroses, doenças transmitidas por artrópodes, são viroses mantidas na natureza por transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por artrópodes que se alimentam de sangue, como os mosquitos.

Sequenciamentos do ácido nucleico desses isolados foram feitos no CDC em 23 de setembro. A comparação das sequências de ácido nucleico com outras anteriormente depositadas em bancos de dados indicou que os vírus eram estreitamente relacionados ao *vírus do Oeste do Nilo* (WNV, veja a foto), o qual nunca havia sido isolado no Hemisfério Ocidental.

Em 2007, o WNV foi encontrado em aves em todos os estados americanos, excetuando o Alaska e o Haváí. O reconhecimento do WNV no Hemisfério Ocidental no verão de 1999 marcou a primeira introdução em uma história recente de um flavivírus do Velho Mundo no Novo Mundo. Os casos nos Estados Unidos não são os únicos,

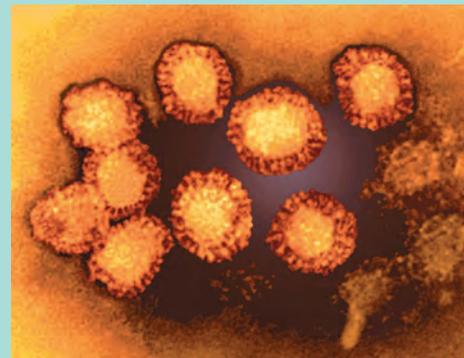
entretanto, relatando atividades virais novas ou intensificadas em humanos e outros animais. Como em 2007, WNV causou encefalite em humanos, no México e no Canadá, e incursões de flavivírus em novas áreas são ocorrências que podem aumentar devido ao aumento do comércio.

O WNV foi inicialmente isolado em 1937, no distrito do Oeste do Nilo, em Uganda. No início dos anos de 1950, cientistas reconheceram surtos de encefalite causada pelo WNV no Egito e em Israel. Inicialmente considerado um arbovírus de menor importância, o WNV tem sido relatado como um importante problema de saúde pública e veterinária no Sul da Europa, na bacia Mediterrânea e na América do Norte.

Recentemente, pesquisadores estão avaliando o genoma do vírus em busca de dicas sobre sua disseminação ao redor do mundo. O genoma dos flavivírus consiste em RNA de fita simples senso positivo, contendo 11.000 a 12.000 nucleotídeos (RNA positivo pode atuar como mRNA e ser traduzido). O vírus está adquirindo muitas mutações, e os pesquisadores estão avaliando estas ocorrências para determinar sua disseminação.

1. Utilizando uma parte do genoma (mostrada a seguir) que codifica proteínas virais, você pode determinar o quanto estes vírus são similares? Você pode entender sua dispersão no mundo?

Determine os aminoácidos codificados e os vírus com base na porcentagem de similaridade com a linhagem Uganda.



Vírus do Oeste do Nilo.



2. Com base nos aminoácidos, há dois grupos denominados clados.

Qual grupo é o mais velho?

3. Os isolados norte-americano e australiano acumularam muitas mutações, então mostram ser mais recentes.

Calcule a porcentagem de diferença entre os nucleotídeos para determinar como os vírus estão relacionados dentro do seu clado.

4. Embora grupos geneticamente correlacionados ou clados tenham sido observados, a atual disseminação do vírus permanece sem ser elucidada.

Fonte: Adaptado de dados do CDC.

Austrália	A	C	C	C	C	G	T	C	C	A	C	C	C	T	T	T	C	A	A	T	T
Egito	A	A	T	C	G	A	T	C	A	T	C	T	T	C	G	T	C	G	A	T	C
França	A	A	T	C	G	A	T	C	A	T	C	G	T	C	G	T	C	G	A	T	C
Israel	A	T	C	C	A	T	T	C	A	T	C	C	T	C	A	T	C	G	A	T	T
Itália	A	T	C	C	A	C	T	C	A	T	C	C	T	C	G	T	C	G	A	T	T
Kênia	A	T	C	C	A	C	T	C	A	T	C	C	T	C	G	T	C	G	A	T	T
México	A	A	C	C	C	T	T	C	C	T	C	C	C	C	T	T	C	G	A	T	T
Estados Unidos	A	A	C	C	C	C	T	C	C	T	C	C	C	C	T	T	C	G	A	T	T
Uganda	A	T	A	C	G	A	T	C	A	T	G	C	T	C	G	T	C	C	A	T	C

glicoproteína por vez. Como o sistema imune do hospedeiro mata os parasitas com um tipo de molécula de superfície, os parasitas que expressam glicoproteínas de superfície diferentes podem continuar a crescer.

Repressão e indução

Dois mecanismos de controle genético, conhecidos como repressão e indução, regulam a transcrição do mRNA e, conseqüentemente, a síntese de enzimas a partir dele. Esses mecanismos controlam a formação e as quantidades de enzimas na célula, e não a atividade das enzimas.

Repressão

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

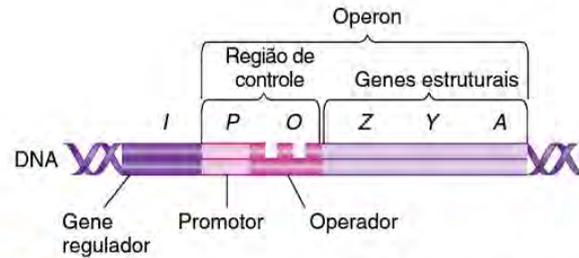
Indução

O processo que ativa a transcrição de um gene ou genes é a **indução**. Uma substância que atua induzindo a transcrição de um gene é denominada **indutor**, e as enzimas que são sintetizadas na presença de indutores são *enzimas indutíveis*. Os genes requeridos para o metabolismo da lactose na *E. coli* são um exemplo bem conhecido de sistema indutível. Um desses genes codifica a enzima β -galactosidase, que divide o substrato lactose em dois açúcares simples, glicose e galactose. (β refere-se ao tipo de ligação que une a glicose e a galactose.) Se a *E. coli* é colocada em um meio onde a lactose não está presente, o organismo quase não contém β -galactosidase; contudo, quando a lactose é adicionada ao meio, as células bacterianas produzem grande quantidade da enzima. Na célula, a lactose é convertida no composto relacionado alolactose, que é o indutor destes genes; assim, a presença de lactose induz a célula indiretamente a sintetizar mais enzima. A condição-padrão de um gene indutível é *desligado*.

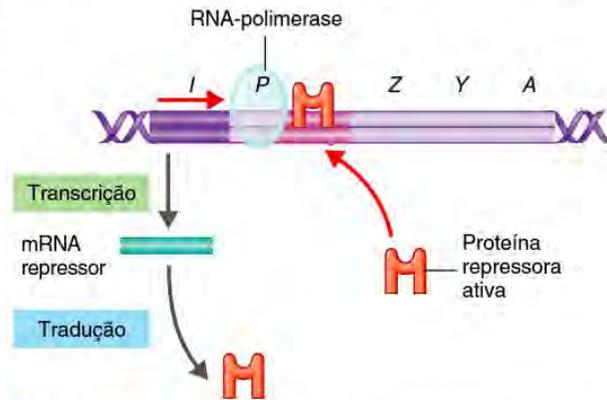
O modelo operon de expressão gênica

Os detalhes do controle da expressão gênica por indução e repressão são descritos pelo modelo operon. François Jacob e Jacques Monod formularam esse modelo geral em 1961, para explicar a regulação da síntese proteica. Eles basearam seu modelo em estudos da indução das enzimas do catabolismo da lactose na *E. coli*. Além da β -galactosidase, essas enzimas incluem a lac permease, que está envolvida no transporte de lactose para dentro da célula, e a transacetilase, que metaboliza outros dissacarídeos que não a lactose.

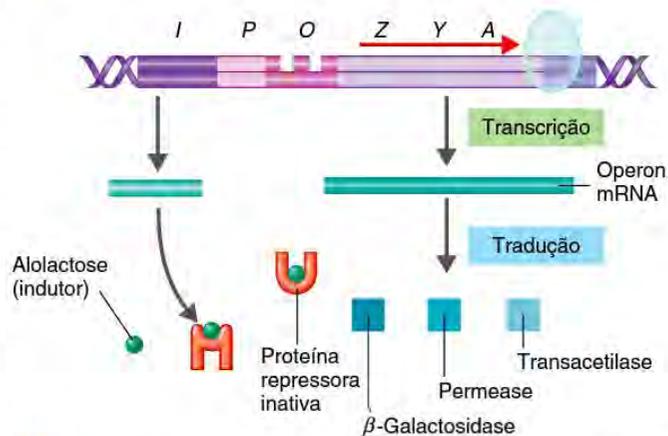
Os genes para as três enzimas envolvidas na captação e utilização da lactose estão em sequência no cromossomo bacteriano e são regulados em conjunto (Figura 8.12). Esses genes, que determinam



- 1 **Estrutura do operon.** O operon consiste em um sítio promotor (P) e um sítio operador (O) e genes estruturais que codificam as proteínas. O operon é regulado por produtos do gene regulador (I).



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



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

Figura 8.12 Um operon indutível. As enzimas que degradam lactose são produzidas na presença de lactose. Em *E. coli*, os genes para as três enzimas estão no operon *lac*. A β -galactosidase é codificada pelo *lacZ*. O gene *lacY* codifica a lac permease, e *lacA* codifica a transacetilase, cuja função no metabolismo da lactose ainda não está clara.

P O que promove a transcrição de uma enzima indutível?

as estruturas de proteínas, são denominados *genes estruturais*, para diferenciá-los de uma região de controle adjacente no DNA. Quando a lactose é introduzida no meio de cultura, os genes estruturais *lac* são todos transcritos e traduzidos rápida e simultaneamente. Veremos agora como ocorre esta regulação.

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

Um gene regulador denominado *gene I* codifica uma proteína **repressora** que torna os operons indutíveis ou repressíveis ligados ou desligados. O operon *lac* é um **operon indutível** (veja a Figura 8.12). Na ausência da lactose, a proteína repressora liga-se fortemente ao sítio do operador, prevenindo a transcrição. Se a lactose está presente, o repressor liga-se ao metabólito da lactose em vez de se ligar ao sítio operador, e as enzimas que degradam a lactose são transcritas.

Em **operons repressíveis**, os genes estruturais são transcritos até que sejam desligados, ou *reprimidos* (Figura 8.13). Os genes para as enzimas envolvidas na síntese do triptofano são regulados deste modo. Os genes estruturais são transcritos e traduzidos, levando à síntese do triptofano. Quando há triptofano em excesso, ele age como um **co-repressor**, ligando-se à proteína repressora, que pode então se ligar ao operador, impedindo a continuação da síntese de triptofano.

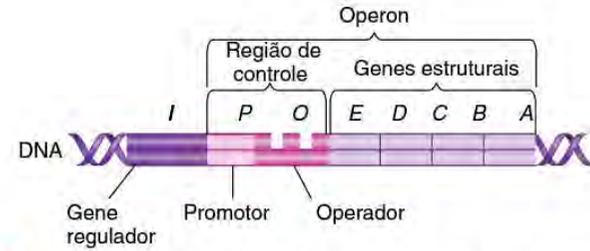
TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ O que é um operon? 8-6

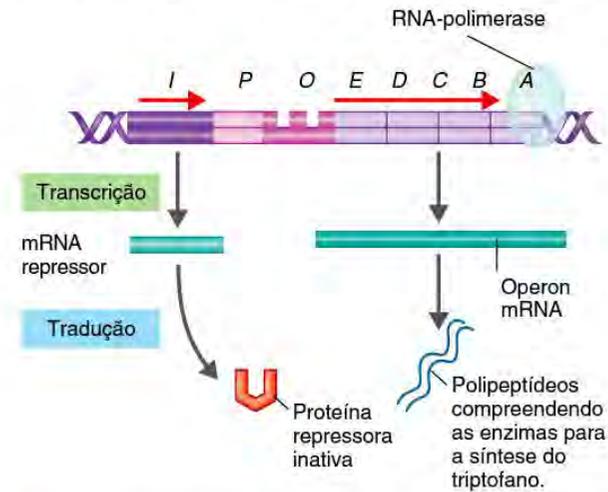
Regulação positiva

A regulação do operon da lactose também depende do nível de glicose no meio, que, por sua vez, controla o nível intracelular da pequena molécula **AMP cíclico (cAMP)**, uma substância derivada do ATP que serve como sinal de alarme celular. As enzimas que metabolizam a glicose são constitutivas, e as células crescem em sua velocidade máxima tendo a glicose como sua fonte de carbono, pois podem utilizá-la de modo mais eficiente (Figura 8.14). Quando a glicose não está mais disponível, o cAMP se acumula na célula. O cAMP se liga ao sítio alostérico da *proteína ativadora catabólica (CAP, de catabolic activator protein)*. A CAP liga-se, então, ao promotor *lac* que inicia a transcrição, facilitando a ligação entre a RNA-polimerase e o promotor. Portanto, a transcrição do operon *lac* requer tanto a presença de lactose quanto a ausência de glicose (Figura 8.15).

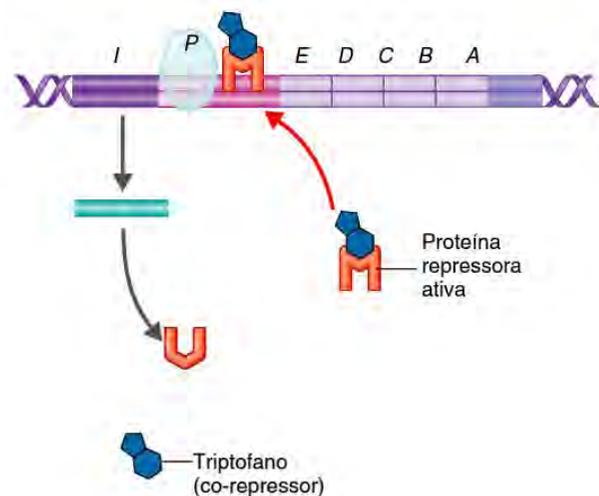
O cAMP é um exemplo de *alarmônio*, um sinal de alarme que a célula usa para responder ao estresse ambiental ou nutricional. (Nesse caso, o estresse é a falta de glicose.) O mesmo mecanismo envolvendo o cAMP permite que a célula cresça com outros açúcares. A inibição do metabolismo das fontes alternativas de carbono



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



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



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

Figura 8.13 Um operon repressível. O triptofano, um aminoácido, é produzido por enzimas anabólicas codificadas por cinco genes estruturais. O acúmulo do triptofano reprime a transcrição desses genes, prevenindo a continuação da síntese do triptofano. O operon *trp* da *E. coli* é mostrado aqui.

P O que causa a transcrição de uma enzima repressível?

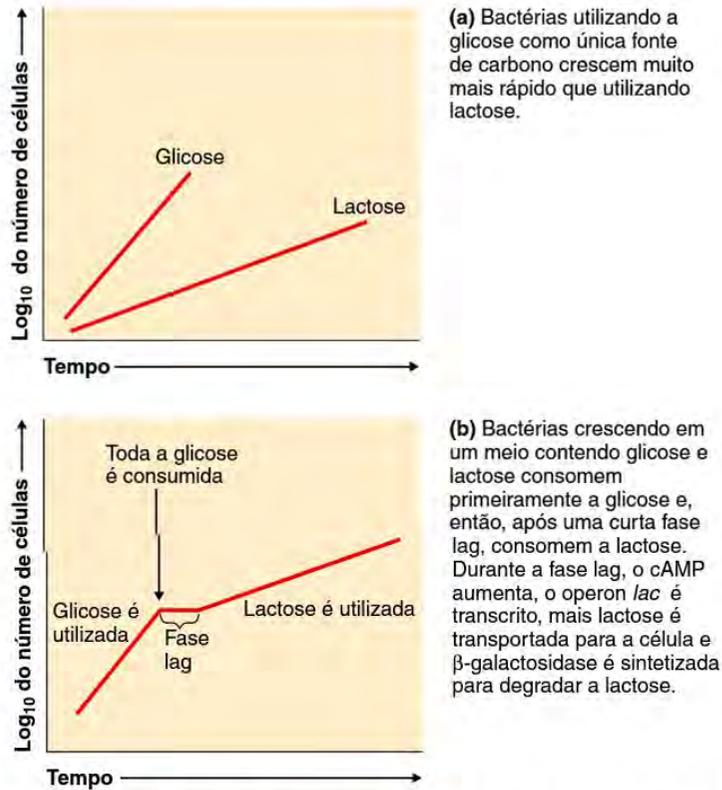


Figura 8.14 A taxa de crescimento da *E. coli* em glicose e lactose.

P Quando glicose e lactose estão presentes, por que as células utilizam primeiro a glicose?

pela glicose é denominada **repressão catabólica** (ou *efeito glicose*). Quando a glicose está disponível, o nível de cAMP na célula é baixo e, conseqüentemente, a CAP não está ligada.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Qual o papel do cAMP na repressão catabólica? 8-7

Mutação: alteração no material genético

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 8-8 Classificar as mutações por tipo.
- 8-9 Definir *mutagênico*.
- 8-10 Descrever duas maneiras de reparo as mutações.
- 8-11 Descrever o efeito dos mutagênicos sobre a taxa de mutação.
- 8-12 Delinear os métodos de seleção direta e indireta de mutantes.
- 8-13 Identificar e resumir as propostas dos procedimentos para o teste de Ames.

Uma **mutação** é uma alteração na seqüência de bases do DNA. Essa alteração na seqüência de bases de um gene poderá, algumas vezes, causar uma alteração no produto codificado por aquele gene.

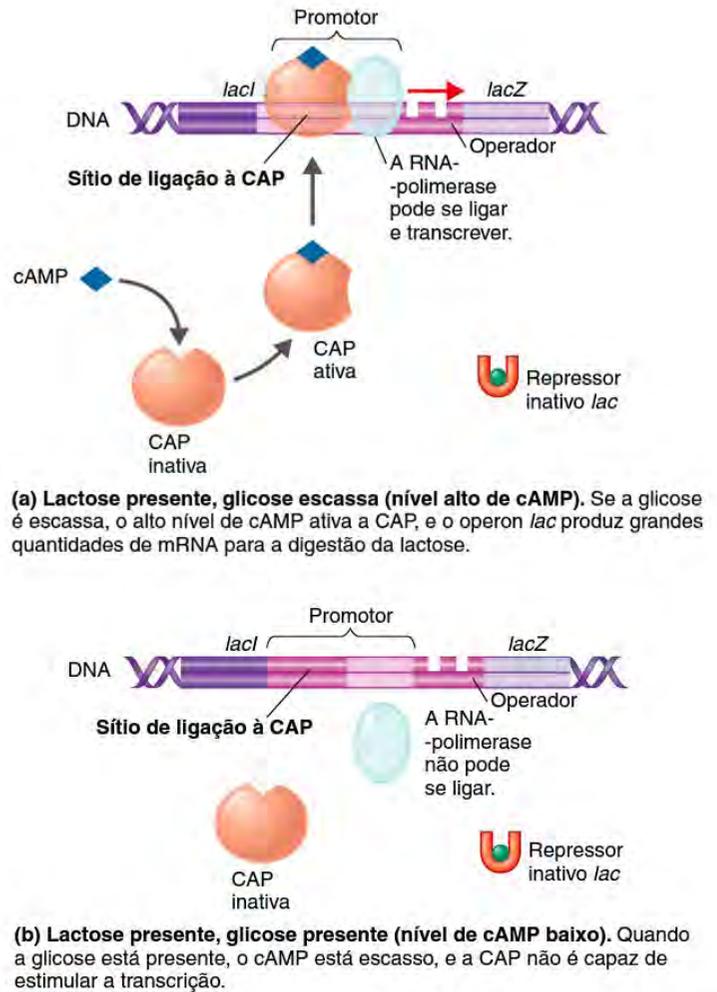


Figura 8.15 Regulação positiva do operon *lac*.

P A transcrição do operon *lac* ocorre na presença de lactose e glicose? Na presença de lactose e na ausência de glicose? Na presença de glicose e na ausência de lactose?

Por exemplo, quando o gene para uma enzima sofre mutação, a enzima codificada pelo gene pode se tornar inativa ou menos ativa, pois sua seqüência de aminoácidos foi alterada. Essa alteração no genótipo pode ser desvantajosa, ou mesmo letal, se a célula perder uma característica fenotípica de que ela necessita. Contudo, uma mutação pode ser benéfica se, por exemplo, a enzima alterada codificada pelo gene mutante possuir uma atividade nova ou intensificada que beneficie a célula.

Muitas mutações simples são silenciosas (neutras); a alteração na seqüência de bases do DNA não causa alterações na atividade do produto codificado pelo gene. As mutações silenciosas comumente ocorrem quando um nucleotídeo é substituído por outro no DNA, em especial em uma localização correspondente à terceira posição do códon do mRNA. Devido à degeneração do código genético, o novo códon resultante ainda pode codificar o mesmo aminoácido. Ainda que um aminoácido seja alterado, a função da proteína pode não se

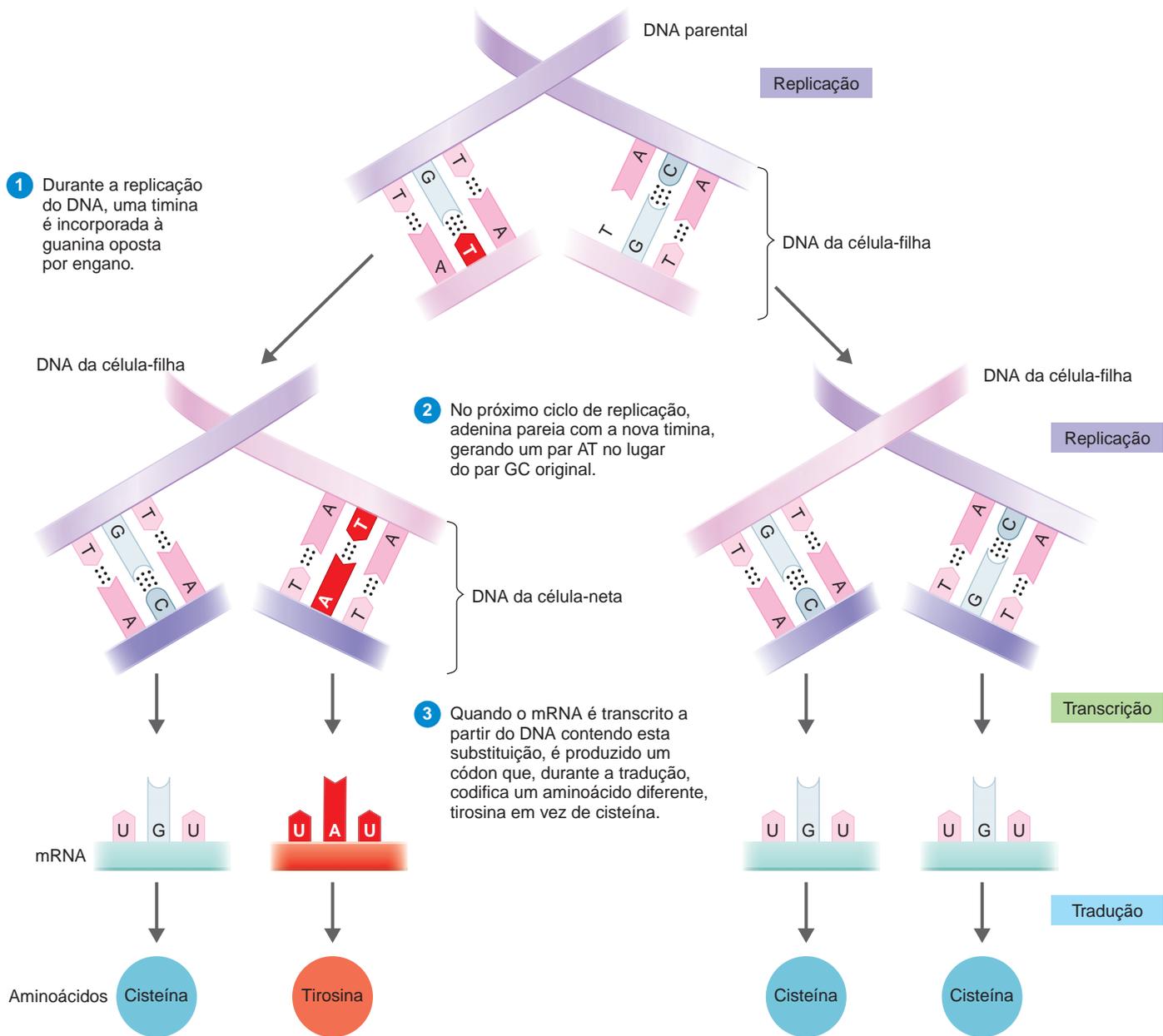


Figura 8.16 Substituição de bases. Essa mutação leva a uma proteína alterada em uma célula-neta.

P Uma substituição de base sempre resultará em um aminoácido diferente?

modificar se o aminoácido não estiver em uma porção vital da proteína, ou for muito semelhante quimicamente ao aminoácido original.

Tipos de mutações

O tipo mais comum de mutação envolvendo um único par de bases é a **substituição de bases** (ou *mutação de ponto*), em que uma única base em um ponto na sequência do DNA é substituída por uma base diferente. Quando o DNA se replica, o resultado é uma substituição de um par de bases (Figura 8.16). Por exemplo, AT pode

ser substituído por GC, ou CG por GC. Se a troca de bases ocorrer dentro de um gene que codifica uma proteína, o mRNA transcrito a partir do gene transportará uma base incorreta naquela posição. Se a substituição de base resultar em uma substituição de aminoácidos na proteína sintetizada, essa alteração no DNA é conhecida com **mutação missense** (Figuras 8.17a e 8.17b).

Os efeitos dessas mutações podem ser dramáticos. Por exemplo, a anemia falciforme é causada por uma única alteração no gene da globina, o componente proteico da hemoglobina. A hemoglo-

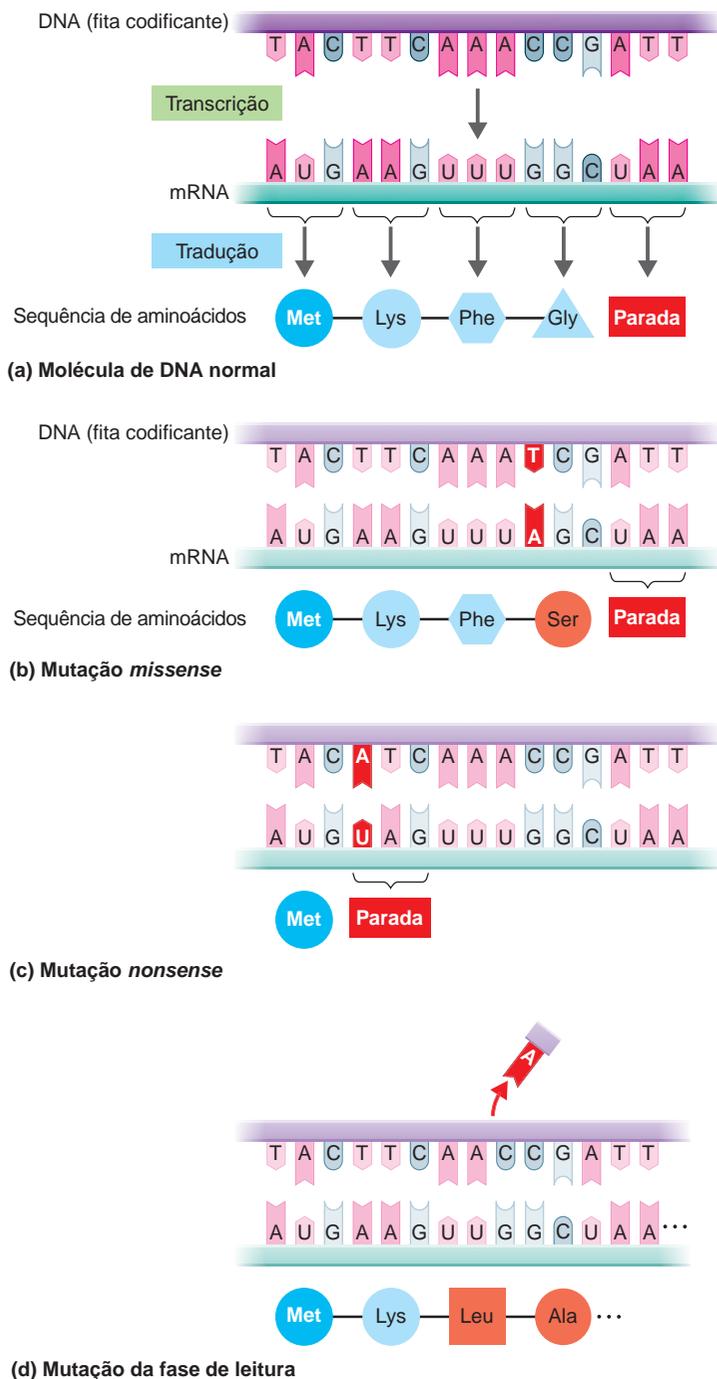


Figura 8.17 Tipos de mutações e seus efeitos nas sequências de aminoácidos das proteínas.

P Em que bases as mutações missense, nonsense e de fase de leitura são distinguidas?

bina é responsável principalmente pelo transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos. Uma única mutação missense, uma alteração de A para T em um local específico, resulta na alteração do ácido glutâmico para valina na proteína. O efeito dessa alteração é que a

forma da molécula de hemoglobina se modifica em condições de oxigênio baixo, alterando a forma das hemácias, de modo que o movimento das células por meio dos pequenos capilares é extensivamente impedido.

Ao criar um códon de parada (sem sentido, ou nonsense) no meio de uma molécula de mRNA, algumas substituições de base impedem efetivamente a síntese de uma proteína funcional completa; somente um fragmento é sintetizado. Assim, uma substituição de base que resulta em um códon sem sentido é denominada **mutação nonsense** (Figura 8.17c).

Além das mutações de pares de bases, existem também alterações no DNA denominadas **mutações de fase de leitura** (frameshift), em que um ou alguns pares de nucleotídeos são removidos ou inseridos no DNA (Figura 8.17d). Essas mutações podem alterar a “fase de leitura da tradução”, isto é, os agrupamentos de três nucleotídeos reconhecidos como códons pelo tRNA durante a tradução. Por exemplo, a deleção de um par de nucleotídeos no meio de um gene causa alterações em muitos aminoácidos a jusante do local da mutação original. As mutações de fase de leitura quase sempre resultam em uma longa sequência de aminoácidos alterados e na produção de uma proteína inativa do gene que sofreu mutação. Na maioria dos casos, um códon sem sentido será eventualmente encontrado, e assim, encerrará a tradução.

Ocasionalmente, ocorrem mutações em que números significativos de bases são adicionados (inseridos) em um gene. A doença de Huntington, por exemplo, é um distúrbio neurológico progressivo causado por bases extras inseridas em um gene específico. A razão para essas inserções ocorrerem nesse gene em particular ainda está sendo estudada.

As substituições de base e as mutações de fase de leitura podem ocorrer espontaneamente devido a erros ocasionais feitos durante a replicação do DNA. Essas **mutações espontâneas** aparentemente ocorrem na ausência da intervenção de agentes causadores de mutações. Os agentes no ambiente, como certos produtos químicos e a radiação, que produzem mutações direta ou indiretamente, são denominados **mutagênicos**. Quase todos os agentes que podem reagir química ou fisicamente com o DNA potencialmente causam mutações. Uma ampla variedade de substâncias químicas, muitas das quais são comuns na natureza ou nas residências, são mutagênicos conhecidos. Muitas formas de radiação, incluindo os raios X e a luz ultravioleta, também são mutagênicos, como será discutido em breve.

No mundo microbiano, certas mutações resultam em resistência a antibióticos (veja o quadro no Capítulo 26, página 751) ou patogenicidade alterada. Uma mutação em um gene que codifica a membrana externa pode aumentar a patogenicidade; por exemplo, *Salmonella typhimurium* com a membrana externa alterada pode sobreviver nos fagócitos. Uma mutação em um gene que codifique as cápsulas pode resultar na redução da patogenicidade, porque os fagócitos podem destruir as bactérias, como nos casos do *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Como uma mutação pode ser benéfica? 8-8

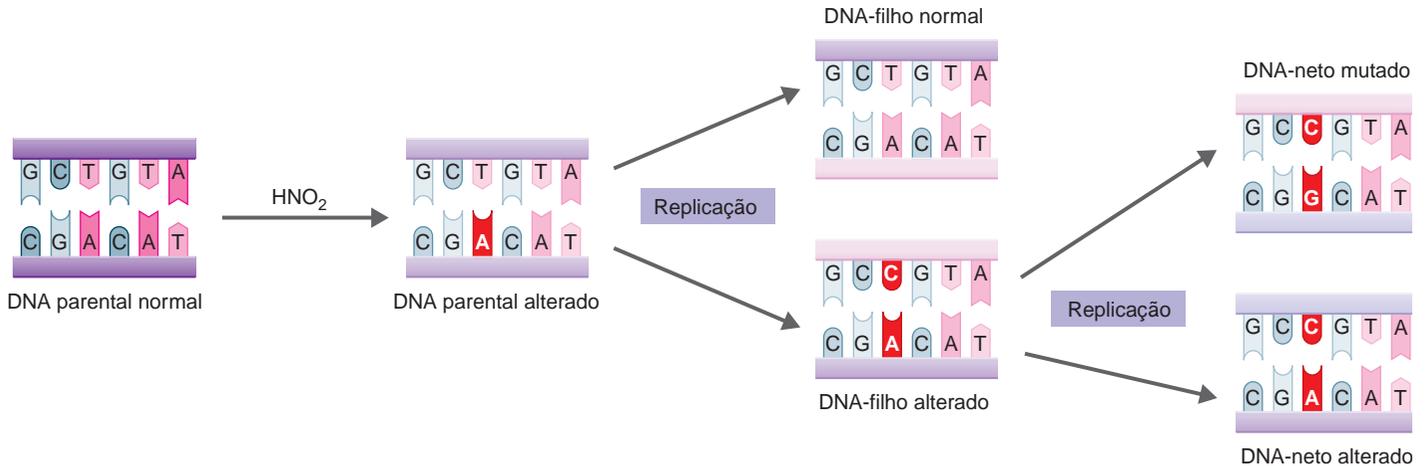


Figura 8.18 **Ácido nitroso (HNO₂) como mutagênico.** O ácido nitroso altera uma adenina, de modo que ela pareia com a citosina em vez da timina.

P O que é um mutagênico?

Mutagênicos

Mutagênicos químicos

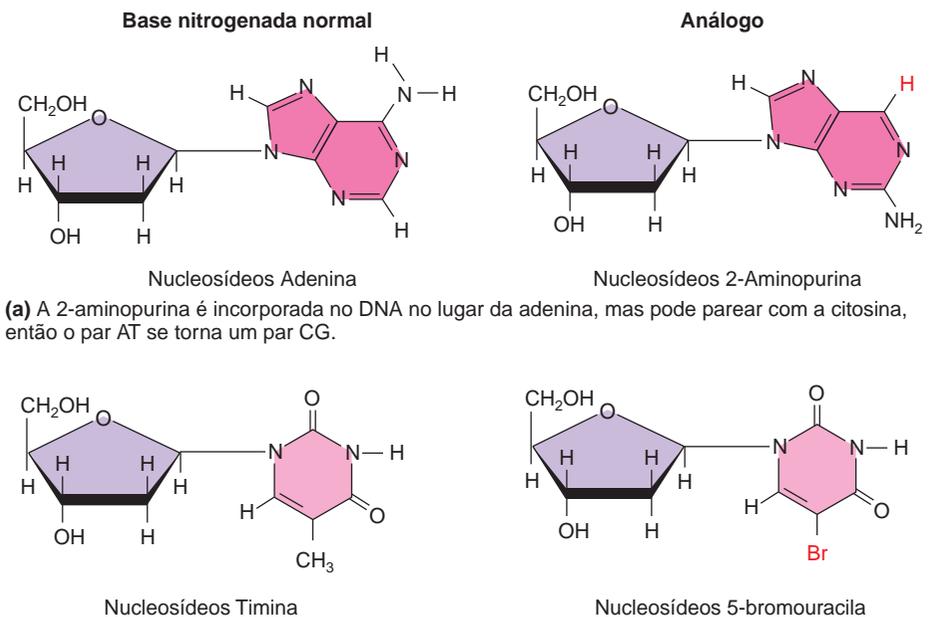
Uma das muitas substâncias químicas sabidamente mutagênicas é o ácido nitroso. A **Figura 8.18** mostra como a exposição do DNA ao ácido nitroso pode converter a base adenina (A) em uma forma que não mais pareia com a timina (T) e sim com a citosina (C). Quando o DNA contendo essas adeninas modificadas se replica, a molécula-filha do DNA terá uma sequência de pares de bases diferente do DNA parental. No final, alguns pares de bases AT da

célula-mãe serão alterados para pares de bases GC na célula-neta. O ácido nitroso realiza uma alteração de pares de bases específica no DNA. Assim como todos os mutagênicos, ele altera o DNA em localizações aleatórias.

Outro tipo de mutagênico químico é o **análogo de nucleosídeo**. Essas moléculas são estruturalmente similares às bases nitrogenadas normais, mas possuem propriedades de pareamento de bases levemente alteradas. Exemplos como a 2-aminopurina e a 5-bromouracila, são mostrados na **Figura 8.19**. Quando os análogos de nucleosídeo são dados às células em crescimento, eles são

Figura 8.19 **Análogos de nucleosídeos e as bases nitrogenadas que eles substituem.** Um nucleosídeo é fosforilado, e o nucleotídeo resultante é utilizado para sintetizar DNA.

P Por que estas drogas matam as células?



(a) A 2-aminopurina é incorporada no DNA no lugar da adenina, mas pode parear com a citosina, então o par AT se torna um par CG.

(b) A 5-bromouracila é utilizada como uma droga contra o câncer porque é trocada por timina pelas enzimas celulares. Na próxima replicação do DNA, um par AT se torna um par GC.

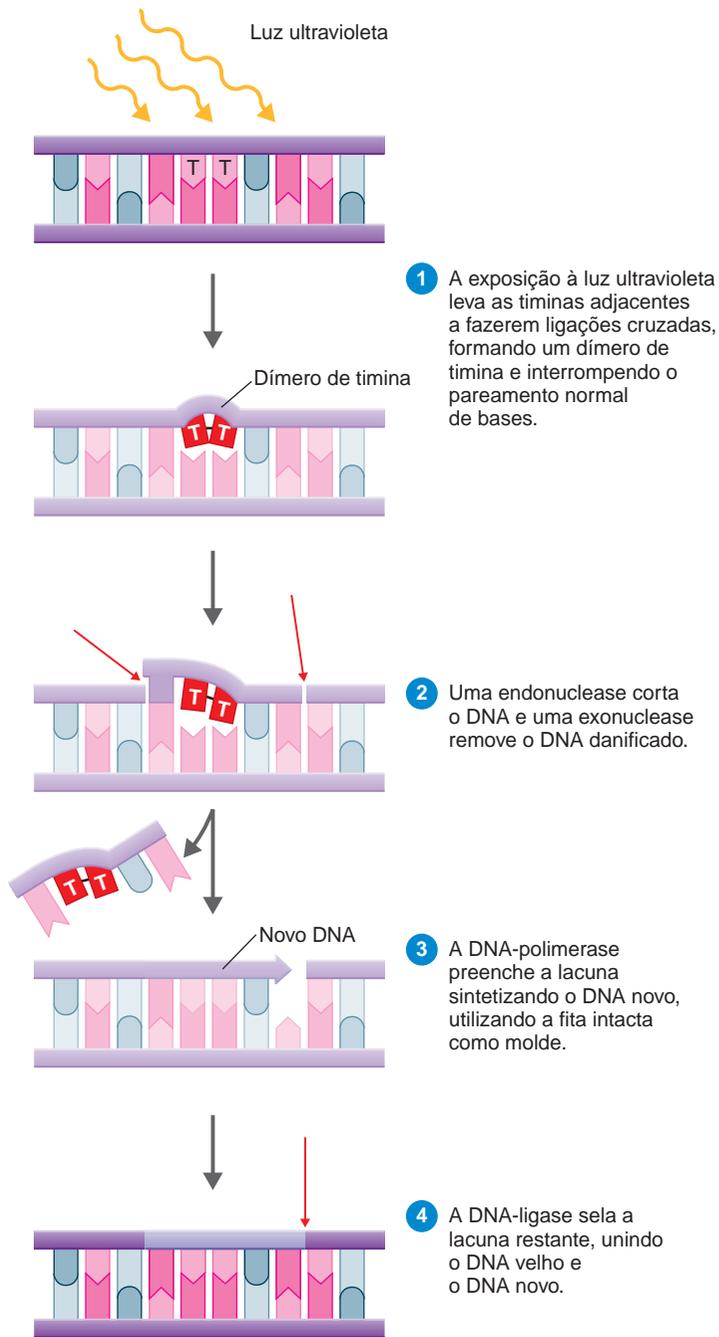


Figura 8.20 A criação e o reparo de um dímero de timina causado pela luz ultravioleta. Após a exposição à luz UV, as timinas adjacentes podem fazer ligações cruzadas, formando um dímero de timina. Na ausência de luz visível, o mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos é usado em uma célula para reparar o dano.

P Como as enzimas de reparo por excisão “sabem” qual é a fita incorreta?

incorporados aleatoriamente no DNA celular no lugar das bases normais. Então, durante a replicação do DNA, os análogos causam erros no pareamento de bases. As bases incorretamente pareadas serão copiadas durante a replicação subsequente do DNA, resultando em substituições de pares de bases nas células da progênie. Algumas drogas antivirais e antitumorais são análogos de nucleosídeo, incluindo a AZT (azidotimidina), uma das principais drogas usadas no tratamento da infecção por HIV.

Ainda outros mutagênicos químicos causam pequenas deleções ou inserções, que podem resultar em mutações de troca de fase de leitura. Por exemplo, em certas condições, o benzopireno, que está presente na fumaça e na fuligem, é um *mutagênico de troca de fase de leitura* efetivo. A aflatoxina – produzida pelo *Aspergillus flavus*, uma forma de bolor que cresce nos amendoins e nos grãos – é um mutagênico de troca de fase de leitura, assim como os corantes acridina usados experimentalmente contra as infecções por herpesvírus. Os mutagênicos de troca de fase de leitura geralmente possuem o tamanho e as propriedades químicas corretos para se inserir entre os pares de base da hélice dupla de DNA. Eles podem funcionar deslocando levemente as duas fitas de DNA, deixando um intervalo ou uma protuberância em uma das fitas. Quando as fitas de DNA deslocadas são copiadas durante a síntese de DNA, uma ou mais bases podem ser inseridas ou deletadas no novo DNA de dupla fita. De modo interessante, mutagênicos de fase de leitura frequentemente são carcinogênicos potentes.

Radiação

Os raios X e os raios gama são formas de radiação que são mutagênicos potentes, devido à sua capacidade de ionizar átomos e moléculas. Os raios penetrantes da radiação ionizante fazem os elétrons saltarem de suas camadas habituais (veja o Capítulo 2). Esses elétrons bombardeiam outras moléculas e causam mais dano, e muitos dos íons e radicais livres resultantes (fragmentos moleculares com elétrons não pareados) são altamente reativos. Alguns desses íons podem se combinar com bases no DNA, resultando em erros na replicação e no reparo do DNA, que produzem mutações. Um resultado ainda mais sério é a ruptura das ligações covalentes no esqueleto de açúcar-fosfato do DNA, que causa rupturas físicas nos cromossomos.

Outra forma de radiação mutagênica é a luz ultravioleta (UV), um componente não ionizante da luz solar comum. Contudo, o componente mais mutagênico da luz UV (comprimento de onda de 260 nm) é filtrado pela camada de ozônio da atmosfera. O efeito mais importante da luz UV direta sobre o DNA é a formação de ligações covalentes nocivas entre certas bases. As timinas adjacentes em uma fita de DNA podem fazer ligações cruzadas, formando dímeros de timina. Esses dímeros, a menos que reparados, podem causar graves danos ou morte celular, pois a célula não pode transcrever ou replicar corretamente este DNA.

As bactérias e outros organismos possuem enzimas que podem reparar o dano induzido por luz ultravioleta. As **fotoliasas**, também conhecidas como *enzimas de reparo em presença da luz*, utilizam energia da luz visível para separar o dímero novamente nas duas timinas originais. O **reparo por excisão de nucleotídeos**, mostrado na **Figura 8.20**, não é restrito ao dano induzido por luz UV; ele também pode reparar as mutações de outras causas. As enzimas retiram as bases incorretas e preenchem o intervalo com

DNA recém-sintetizado, que é complementar à fita correta. Por muitos anos, biólogos questionaram como a base incorreta poderia ser distinguida da base correta se esta não era fisicamente distorcida como um dímero de timina. Em 1970, Hamilton Smith respondeu esta questão com a descoberta das **metilases**. Essas enzimas adicionam um grupo metil às bases imediatamente selecionadas após a produção da fita de DNA. Uma endonuclease de reparo, então, corta a fita não metilada.

A exposição à luz UV em seres humanos, como no bronzeamento excessivo, causa um grande número de dímeros de timina nas células da pele. Os dímeros não reparados podem resultar em câncer de pele. Os seres humanos com xerodermia pigmentar, uma condição hereditária que resulta em aumento na sensibilidade à luz UV, possuem um defeito no reparo por excisão de nucleotídeos; consequentemente, eles têm um risco maior de câncer de pele.

A frequência de mutação

A **taxa de mutação** é a probabilidade de um gene sofrer mutação quando a célula se divide. A taxa normalmente é apresentada como uma potência de 10 e, como as mutações são muito raras, o expoente é sempre um número negativo. Por exemplo, se existe uma chance em 10 mil de que um gene sofra mutação quando a célula se divide, a taxa de mutação é 1/10.000, que é expresso como 10^{-4} . Os erros espontâneos na replicação do DNA ocorrem em taxas muito baixas, talvez somente uma vez em 10^9 pares de bases replicados (uma taxa de mutação de 10^{-9}). Como o gene médio tem cerca de 10^3 pares de bases, a taxa espontânea de mutação é cerca de uma vez a cada 10^6 (um milhão) de genes replicados.

As mutações normalmente ocorrem de modo relativamente aleatório ao longo de um cromossomo. A ocorrência de mutações aleatórias em baixa frequência é um aspecto essencial da adaptação das espécies ao seu ambiente, pois a evolução requer que a diversidade genética seja gerada aleatoriamente e em taxas reduzidas. Por exemplo, em uma população bacteriana de tamanho significativo – digamos, maior que 10^7 células – algumas células novas mutantes sempre serão produzidas a cada geração. A maioria das mutações é nociva e provavelmente removida do *pool* genético quando a célula individual morre, ou é neutra. Contudo, algumas mutações podem ser benéficas. Por exemplo, uma mutação que confere resistência aos antibióticos é benéfica para uma população de bactérias que seja regularmente exposta a antibióticos. Uma vez que essa característica surja através da mutação, as células que transportam o gene mutado têm mais probabilidade de sobreviver e se reproduzir contanto que o ambiente permaneça o mesmo. Em pouco tempo, a maioria das células na população terá o gene; uma alteração evolutiva terá ocorrido, embora em pequena escala.

Um mutagênico geralmente aumenta a taxa espontânea de mutação, que é cerca de uma vez a cada 10^6 genes replicados, por um fator de 10 a 1.000 vezes. Em outras palavras, na presença de um mutagênico, a taxa normal de 10^{-6} mutações por gene replicado torna-se uma taxa de 10^{-5} a 10^{-3} por gene replicado. Os mutagênicos são usados experimentalmente para aumentar a produção de células mutantes, para pesquisar as propriedades genéticas dos micro-organismos e para objetivos comerciais.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como as mutações são causadas pelos agentes químicos e pela radiação? **8-9**
- ✓ Como as mutações podem ser reparadas? **8-10**
- ✓ Como as mutações afetam a taxa de mutação? **8-11**

Identificando mutantes

Os mutantes podem ser detectados por seleção ou teste para um fenótipo alterado. Se nenhum mutagênico é usado, as células mutantes com mutações específicas sempre serão raras, comparado a outras células na população. O problema é detectar esse evento raro.

Os experimentos em geral são realizados com bactérias, pois elas se reproduzem rapidamente; assim, um grande número de organismos (mais de 10^6 por mililitro de caldo nutriente) pode facilmente ser usado. Além disso, como as bactérias em geral possuem somente uma cópia de cada gene por célula, os efeitos de um gene mutado não são mascarados pela presença de uma versão normal do gene, como em muitos organismos eucarióticos.

A **seleção positiva (direta)** envolve a detecção das células mutantes pela rejeição das células parentais não mutadas. Por exemplo, suponha que estivéssemos tentando descobrir bactérias mutantes resistentes à penicilina. Quando as células bacterianas são colocadas em um meio contendo penicilina, o mutante pode ser identificado diretamente. As poucas células na população que são resistentes (mutantes) crescerão e formarão colônias, enquanto as células parentais normais, sensíveis à penicilina, não poderão crescer.

Para identificar mutações em outros tipos de genes, a **seleção negativa (indireta)** pode ser usada. Esse processo seleciona uma célula que não pode realizar certa função, utilizando a técnica de **placas réplicas**. Por exemplo, suponha que desejássemos utilizar placas réplicas para identificar uma célula bacteriana que perdeu a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina (**Figura 8.21**). Primeiro, cerca de 100 células bacterianas são inoculadas em uma placa de ágar. Essa placa, denominada placa mestre, contém um meio com histidina em que todas as células irão crescer. Após 18 a 24 horas de incubação, cada célula se reproduz para formar uma colônia. Então, um coxim de material estéril, como látex, papel filtro ou veludo, é pressionado sobre a placa mestre, e algumas das células de cada colônia aderem-se ao veludo. A seguir, o veludo é pressionado sobre duas (ou mais) placas estéreis. Uma placa contém um meio com histidina, e a outra contém um meio sem histidina em que as bactérias originais, não mutantes, podem crescer. Qualquer colônia que crescer no meio com histidina na placa mestre, mas que não puder sintetizar sua própria histidina, não será capaz de crescer no meio sem histidina. A colônia mutante pode então ser identificada na placa mestre. É claro que, como os mutantes são muito raros (mesmo aqueles induzidos por mutagênicos), muitas placas precisam ser selecionadas com essa técnica para isolar um mutante específico.

A placa réplica é um meio muito efetivo de isolar mutantes que necessitam de um ou mais fatores novos de crescimento. Qualquer micro-organismo mutante com uma necessidade nutricional

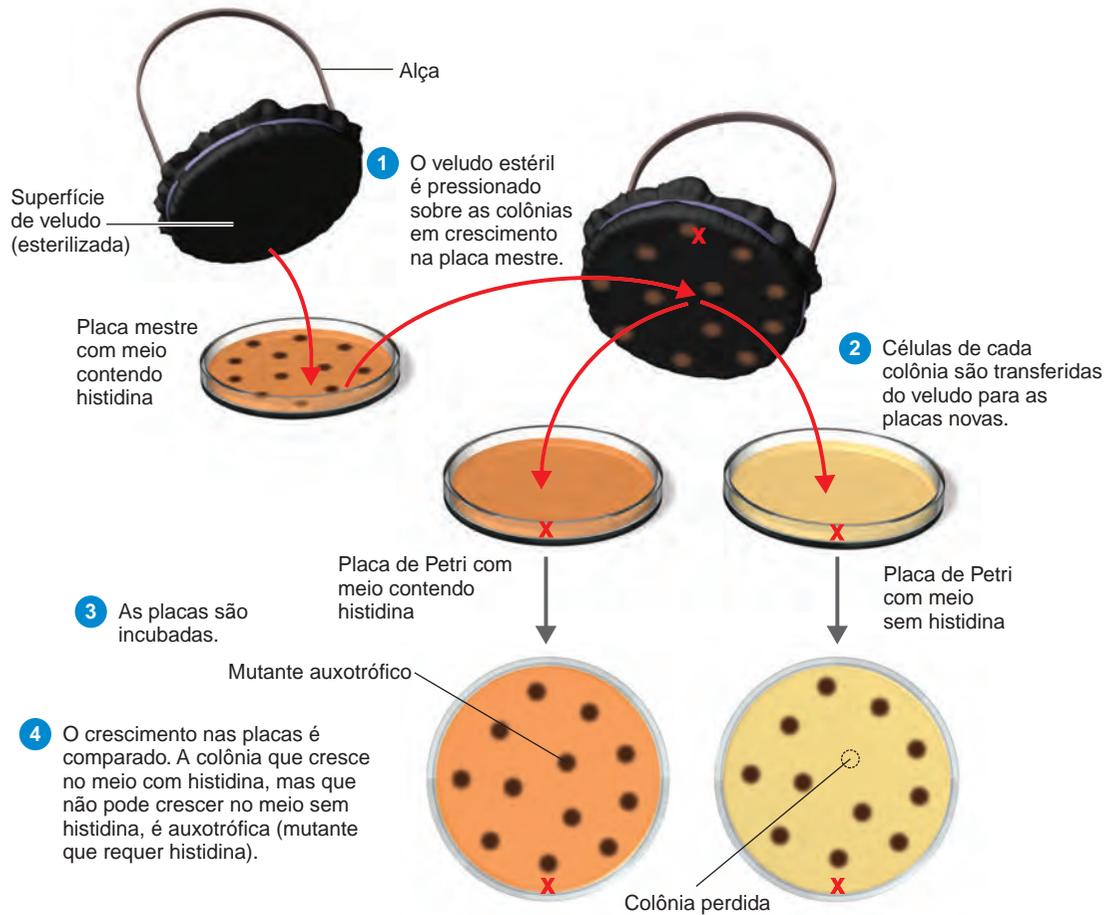


Figura 8.21 Placas réplicas. Nesse exemplo, o mutante auxotrófico não pode sintetizar histidina. As placas devem ser marcadas cuidadosamente (aqui, com um X) para manter a orientação, de modo que as posições das colônias sejam conhecidas em relação à placa mestre original.

P o que é um auxotrófico?

que esteja ausente na parental é conhecido como **auxotrófico**. Por exemplo, um organismo auxotrófico pode não ter a enzima necessária para sintetizar um aminoácido específico e, portanto, necessita daquele aminoácido como fator de crescimento em seu meio nutriente.

Identificando carcinógenos químicos

Muitos mutagênicos conhecidos foram reconhecidos como **carcinógenos**, substâncias que causam câncer em animais, incluindo os seres humanos. Em anos recentes, substâncias químicas no ambiente, no local de trabalho e na dieta foram implicadas como causa de câncer em seres humanos. As cobaias costumeiras dos testes para determinar os carcinógenos potenciais são animais, e os procedimentos de teste são demorados e caros. Atualmente, existem procedimentos mais rápidos e mais baratos para a triagem preliminar de carcinógenos potenciais. Um desses, denominado **teste de Ames**, utiliza bactérias como indicadores de carcinógenos.

O teste de Ames baseia-se na observação de que a exposição de bactérias mutantes a substâncias mutagênicas pode causar novas mutações que invertem o efeito (a alteração no fenótipo) da mutação original. Elas são denominadas *reversíveis*. Especificamente, o teste mede a reversão dos auxotróficos para histidina da *Salmonella* (células His⁻, mutantes que perderam a capacidade de sintetizar histidina) para células que sintetizam histidina (His⁺) após o tratamento com um mutagênico (Figura 8.22). As bactérias são incubadas tanto na presença quanto na ausência da substância a ser testada. Uma vez que as enzimas animais devem ativar muitos químicos em formas que são quimicamente reativas para que a atividade mutagênica ou carcinogênica apareça, a substância química a ser testada e as bactérias mutantes são incubadas junto com extrato de fígado de rato, uma fonte rica em enzimas de ativação. Se a substância a ser testada for mutagênica, causará a reversão das bactérias His⁻ para bactérias His⁺ em uma taxa maior que a taxa de reversão espontânea. O número de revertentes observados fornece

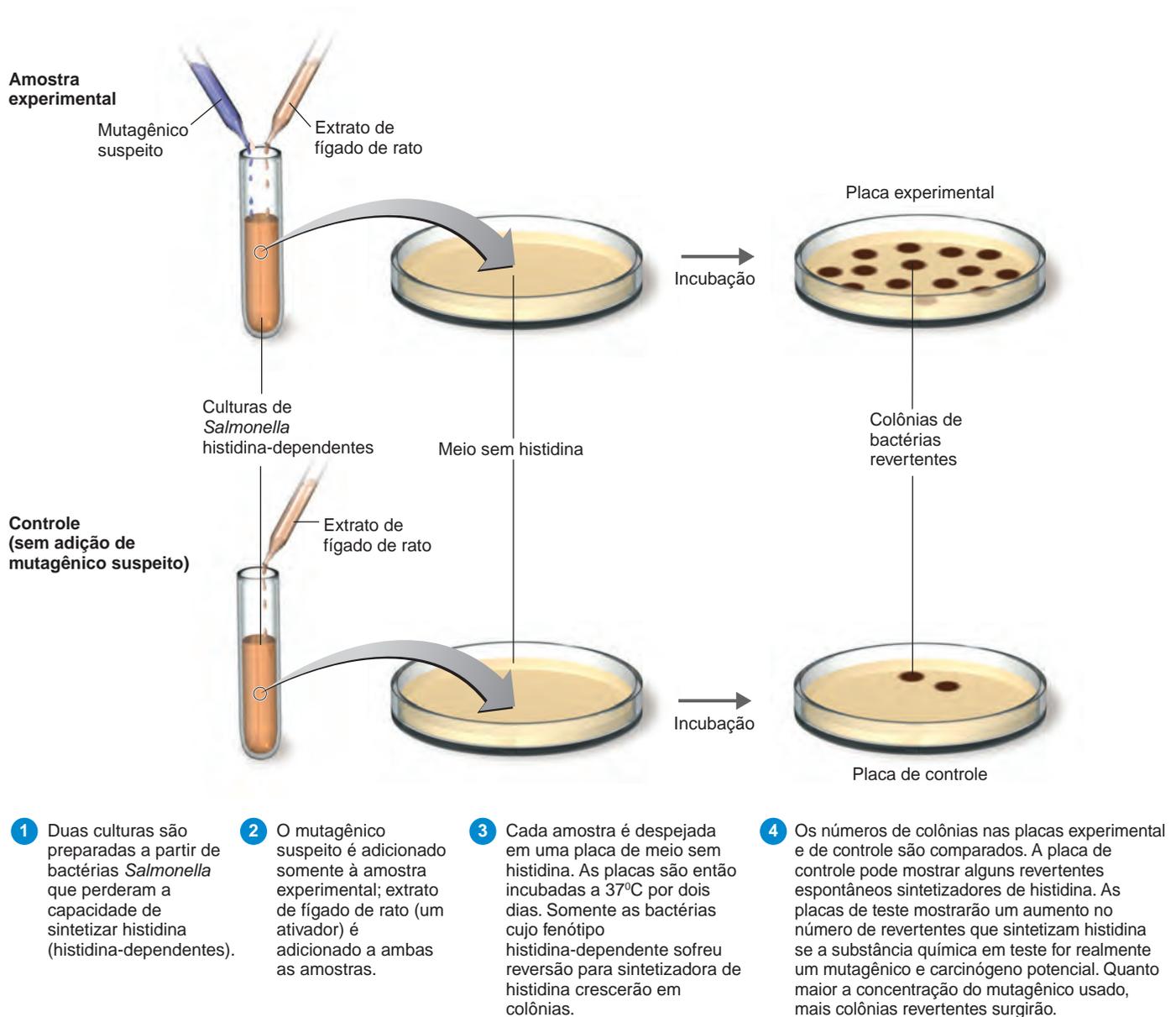


Figura 8.22 O teste de mutação reversa de Ames.

P Todos os mutagênicos causam câncer?

uma indicação do grau que uma substância é mutagênica, e assim, possivelmente carcinogênica.

O teste pode ser usado de muitas formas. Vários mutagênicos potenciais podem ser testados qualitativamente ao se colocar as substâncias químicas individuais em pequenos discos de papel em uma única placa inoculada com bactérias. Além disso, misturas como vinho, sangue, condensados de fumaça e extratos de alimentos também podem ser testadas para verificar se contêm substâncias mutagênicas. Cerca de 90% das substâncias que tiveram o seu papel mutagênico evidenciado pelos testes de Ames também mostraram ser carcinogênicas em animais.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como você poderia isolar uma bactéria antibiótico-resistente? **8-12**
- ✓ Qual o princípio por trás do teste de Ames? **8-13**

Transferência genética e recombinação

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 8-14** Diferenciar transferência gênica horizontal e vertical.
- 8-15** Comparar os mecanismos de recombinação genética nas bactérias.
- 8-16** Descrever as funções de plasmídeos e transposons.

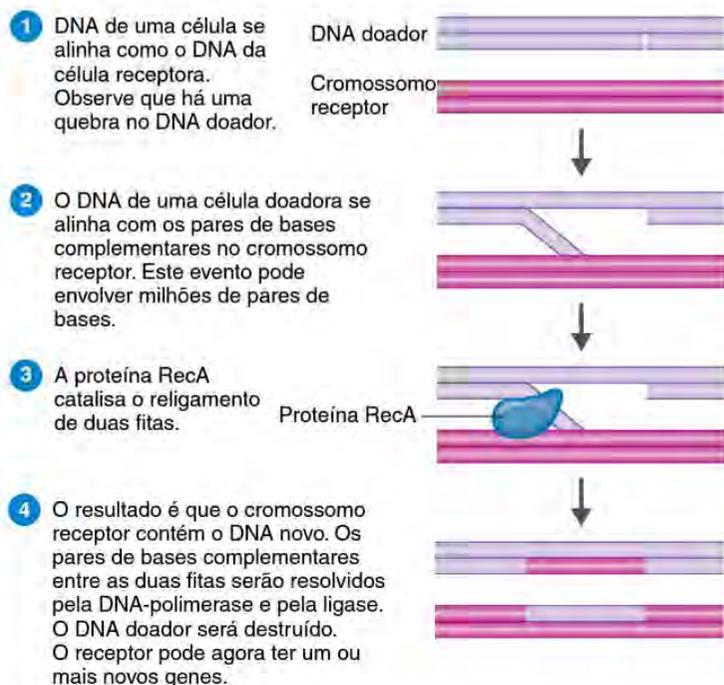


Figura 8.23 Recombinação genética por crossing over. DNA exógeno pode ser inserido no cromossomo por quebra e religamento. Este evento pode inserir um ou mais genes novos no cromossomo. Uma fotografia da proteína RecA é mostrada na Figura 3.11a.

P Que tipo de enzima quebra o DNA? Que enzima religa as peças do DNA?

A **recombinação genética** refere-se à troca de genes entre duas moléculas de DNA, para formar novas combinações de genes em um cromossomo. A **Figura 8.23** mostra um tipo de mecanismo de recombinação genética. Se a célula capturar um DNA exógeno (denominado DNA doador na figura), parte dele poderá ser inserida no cromossomo celular, um processo denominado **crossing over**, e alguns dos genes transportados por esses cromossomos serão trocados. O DNA recombinou, então o cromossomo carrega agora uma parte do DNA doador.

Se A e B representam o DNA de indivíduos diferentes, como eles são aproximados um do outro o suficiente para se recombinarem? Em eucariotos, a recombinação genética é um processo ordenado, que normalmente ocorre como parte do ciclo sexual do organismo. O **crossing over** geralmente ocorre durante a formação das células reprodutivas, de forma que elas contêm DNA recombinante. Em bactérias, a recombinação genética pode acontecer de diversas formas, discutidas nas próximas seções.

Assim como a mutação, a recombinação genética contribui para a diversidade genética de uma população, que é a fonte da variação evolutiva. Em organismos altamente evoluídos, como os micróbios atuais, a recombinação provavelmente seja mais benéfica que a mutação, pois a recombinação tem menos chance de destruir a função de um gene e pode unir combinações de genes que permitem ao organismo realizar uma função nova importante.

A principal proteína que constitui os flagelos da *Salmonella* também é uma das proteínas mais importantes que induzem nosso

sistema imune a responder. Contudo, estas bactérias têm a capacidade de produzir duas proteínas flagelares diferentes. Como nosso sistema imune monta uma resposta contra as células que contêm uma forma da proteína flagelar, os organismos que produzem a segunda forma não são afetados. O tipo de proteína flagelar produzido é determinado por um evento de recombinação que aparentemente ocorre de modo um tanto aleatório no DNA cromossômico. Portanto, ao alterar a proteína flagelar produzida, a *Salmonella* pode evitar as defesas do hospedeiro.

A **transferência gênica vertical** ocorre quando os genes são passados de um organismo para seus descendentes. As plantas e os animais transmitem seus genes através dessa forma de transmissão. As bactérias podem passar seus genes não somente para seus descendentes, como para outros micróbios da mesma geração. Esse fenômeno é conhecido como **transferência gênica horizontal** (veja a Figura 8.2). A transferência gênica horizontal entre bactérias ocorre de muitas formas. Em todos os mecanismos, a transferência envolve uma **célula doadora**, que dá uma parte de seu DNA total para uma **célula receptora**. Uma vez transferida, parte do DNA do doador geralmente é incorporada ao DNA do receptor; o restante é degradado por enzimas celulares. A célula receptora que incorpora o DNA doador em seu próprio DNA é denominada **recombinante**. A transferência de material genético entre as bactérias não é um evento frequente, podendo ocorrer em apenas 1% ou menos de toda uma população. Examinaremos em detalhe os tipos específicos de transferência genética.

Transformação em bactérias

Durante o processo de **transformação**, os genes são transferidos de uma bactéria para outra como DNA “nu” em solução. Esse processo foi demonstrado pela primeira vez há mais de 70 anos, embora não tenha sido compreendido na ocasião. Não somente a transformação mostrou que o material genético poderia ser transferido de uma célula bacteriana para outra, mas o estudo deste fenômeno acabou por levar à conclusão de que o DNA é o material genético. O experimento inicial sobre a transformação foi realizado em 1928 por Frederick Griffith, na Inglaterra, enquanto ele estava trabalhando com duas linhagens de *Streptococcus pneumoniae*. Uma delas, uma linhagem virulenta (patogênica), possui uma cápsula de polissacarídeo que previne a fagocitose. A bactéria cresce e causa pneumonia. A outra, uma linhagem avirulenta, não possui a cápsula e não causa doença.

Griffith estava interessado em determinar se injeções de bactérias mortas da amostra encapsulada poderiam ser utilizadas para vacinar camundongos contra pneumonia. Como ele esperava, as injeções de bactérias encapsuladas vivas mataram os camundongos (**Figura 8.24a**); as injeções de bactérias não encapsuladas vivas (**Figura 8.24b**) ou bactéria mortas (**Figura 8.24c**) não mataram os camundongos. Entretanto, quando a bactéria encapsulada morta foi misturada com a bactéria não encapsulada viva, e a mistura foi injetada nos camundongos, muitos deles morreram. No sangue dos camundongos mortos, Griffith encontrou bactérias encapsuladas vivas. Material hereditário (genes) das bactérias mortas tinha entrado nas células vivas, modificando-as geneticamente, de modo que sua progênie era encapsulada e virulenta (**Figura 8.24d**).

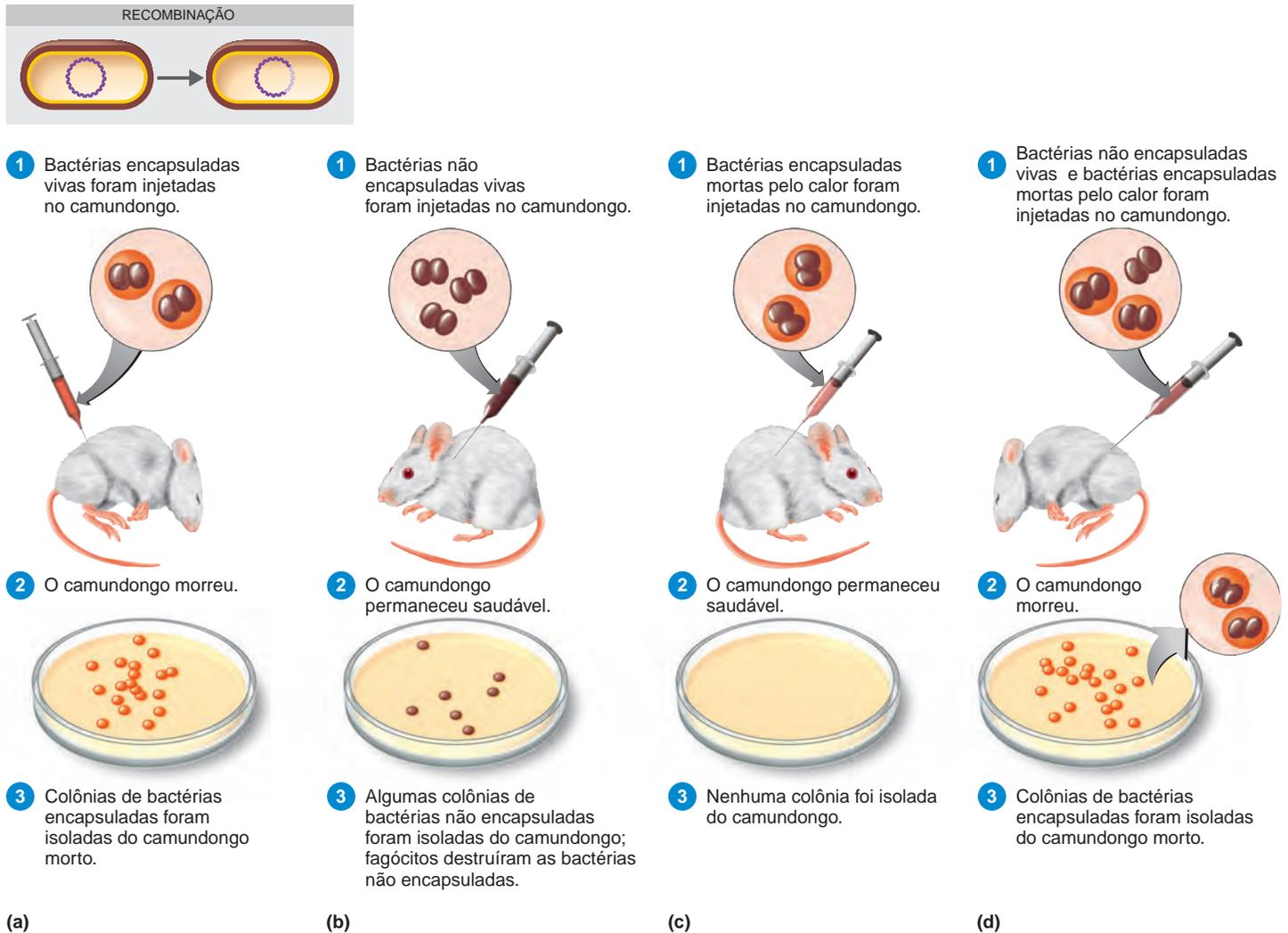


Figura 8.24 O experimento de Griffith, demonstrando a transformação genética. (a)

Bactérias encapsuladas vivas causaram doença e morte quando injetadas em um camundongo. **(b)** Bactérias não encapsuladas vivas são prontamente destruídas pelas defesas fagocíticas do hospedeiro, e assim o camundongo permaneceu saudável após a injeção. **(c)** Após serem mortas pelo calor, as bactérias encapsuladas perderam a capacidade de causar doença. **(d)** Entretanto, a combinação de bactérias não encapsuladas vivas e bactérias encapsuladas mortas pelo calor (nenhuma delas, isoladamente, causa doença) produziu doença. De alguma maneira, as bactérias não encapsuladas vivas foram transformadas pelas bactérias encapsuladas mortas, de modo que elas adquiriram a habilidade de formar uma cápsula, e assim, causar doença. Os experimentos posteriores provaram que o fator de transformação era o DNA.

P Por que as bactérias encapsuladas mataram o camundongo, enquanto as bactérias não encapsuladas não o fizeram? O que causou a morte do camundongo em (d)?

Investigações posteriores, com base na pesquisa de Griffith, revelaram que a transformação bacteriana poderia ser realizada sem os camundongos. Um caldo foi inoculado com bactérias não encapsuladas vivas. Bactérias encapsuladas mortas foram então adicionadas ao caldo. Após a incubação, descobriu-se que a cultura continha bactérias vivas encapsuladas e virulentas. As bactérias não encapsuladas foram transformadas; elas adquiriram uma nova característica hereditária incorporando os genes das bactérias encapsuladas mortas.

O próximo passo foi extrair vários componentes químicos das células mortas, para determinar que componente causou a transformação. Esses experimentos cruciais foram realizados nos Estados Unidos por Oswald T. Avery e seus colegas Colin M. MacLeod e Maclyn McCarty. Após anos de pesquisa, eles anunciaram em 1944 que o componente responsável pela transformação do *S. pneumoniae* inofensivo em linhagens virulentas era o DNA. Seus resultados forneceram uma das indicações conclusivas de que o DNA é realmente o transportador da informação genética.

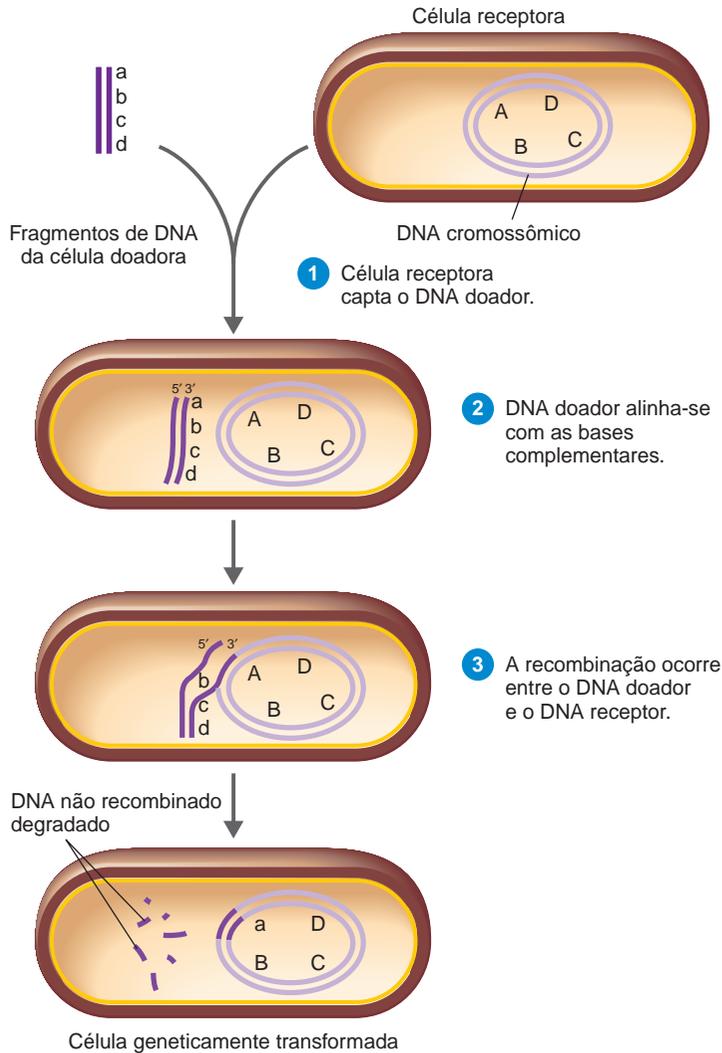


Figura 8.25 O mecanismo da transformação genética em bactérias. Alguma similaridade é necessária para o DNA doador e o DNA receptor se alinharem. Genes *a*, *b*, *c* e *d* podem ser mutações de *A*, *B*, *C* e *D*.

P Que tipo de enzima corta o DNA doador?

Desde a época do experimento de Griffith, informações consideráveis foram reunidas sobre a transformação. Na natureza, algumas bactérias, talvez após a morte e a lise celular, liberam seu DNA no ambiente. Então, outras bactérias podem encontrar o DNA e, dependendo da espécie e das condições de crescimento, captar fragmentos do DNA e os integrar em seus próprios cromossomos por recombinação. A proteína denominada RecA (veja a Figura 3.11a, página 65) liga-se ao DNA celular e, então, ao DNA doador, causando a troca de fitas. Uma célula receptora com essa nova combinação de genes é um tipo de híbrido, ou célula recombinante (Figura 8.25). Todos os descendentes desta célula recombinante serão idênticos a ela. A transformação ocorre naturalmente entre

poucos gêneros de bactérias, incluindo *Bacillus*, *Hemophilus*, *Neisseria*, *Acinetobacter* e certas linhagens dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*.

A transformação funciona melhor quando as células doadora e receptora são intimamente relacionadas. Mesmo que somente uma pequena porção do DNA de uma célula seja transferida ao receptor, a molécula que deve passar através da parede e da membrana celular do receptor ainda é muito grande. Quando uma célula receptora está em um estado fisiológico em que pode captar o DNA doador, é descrita como competente. A **competência** resulta de alterações na parede celular, tornando-a permeável a moléculas grandes de DNA.

A bactéria *E. coli*, bem compreendida e amplamente utilizada, não é naturalmente competente para a transformação. Porém, um simples tratamento laboratorial permite que a *E. coli* capte facilmente o DNA. A descoberta desse tratamento permitiu aos pesquisadores utilizarem a *E. coli* para engenharia genética, discutida no Capítulo 9.

Conjugação em bactérias

Outro mecanismo pelo qual o material genético é transferido de uma bactéria para outra é conhecido como **conjugação**. A conjugação é mediada por um tipo de *plasmídeo*, um fragmento circular de DNA que se replica de modo independente do cromossomo da célula (discutido na página 238). Entretanto, os plasmídeos diferem dos cromossomos bacterianos, pois os genes que eles transportam normalmente não são essenciais para o crescimento da célula sob condições normais. Os plasmídeos responsáveis pela conjugação são transmissíveis entre as células durante a conjugação.

A conjugação difere da transformação em dois aspectos principais. Primeiro, a conjugação requer o contato direto célula a célula. Segundo, as células em conjugação geralmente devem ser de tipos opostos de acasalamento; as células doadoras devem transportar o plasmídeo, e as células receptoras normalmente não. Em bactérias gram-negativas, o plasmídeo transporta genes que codificam a síntese de *pili sexuais*, projeções da superfície da célula doadora que entram em contato com a receptora e auxiliam a unir as duas células em contato direto (Figura 8.26a). As células bacterianas gram-positivas produzem moléculas aderentes de superfície, que fazem as células entrar em contato direto umas com as outras. No processo de conjugação, o plasmídeo é replicado durante a transferência de uma cópia do filamento simples do DNA do plasmídeo para o receptor, onde o filamento complementar é sintetizado (Figura 8.26b).

Como a maioria dos trabalhos experimentais sobre conjugação foi realizada com *E. coli*, descreveremos o processo neste organismo. Na *E. coli*, o **fator F (fator de fertilidade)** foi o primeiro plasmídeo observado a ser transferido entre as células durante a conjugação. Doadores transportando fatores F (células F⁺) transferem o plasmídeo aos receptores (células F⁻), que, como resultado, tornam-se células F⁺ (Figura 8.27a). Em algumas células transportando fatores F, o fator se integra ao cromossomo, convertendo a célula F⁺ em uma **célula Hfr** (alta frequência de recombinação,



Figura 8.26 Conjugação bacteriana.

P O que é uma célula F⁺?

de *High Frequency of recombination*) (Figura 8.27b). Quando a conjugação ocorre entre uma célula Hfr e uma célula F⁻, o cromossomo da célula Hfr (com seu fator F integrado) se replica, e uma fita parental do cromossomo é transferida para a célula receptora (Figura 8.27c). A replicação do cromossomo Hfr se inicia no meio do fator F integrado, e um pequeno fragmento do fator F conduz os genes cromossômicos para a célula F⁻. Normalmente, o cromossomo se rompe antes de ser transferido por completo. Uma vez dentro da célula receptora, o DNA doador pode se recombinar com o DNA receptor. (O DNA doador que não estiver integrado será degradado.) Desse modo, pela conjugação com uma célula Hfr, uma célula F⁻ pode adquirir novas versões de genes cromossômicos (assim como na transformação). Contudo, ela permanece uma célula F⁻, pois não recebeu um fator F completo durante a conjugação.

A conjugação é usada para mapear a localização de genes em um cromossomo bacteriano (veja a Figura 8.1b). Os genes para a síntese de treonina (*thr*) e leucina (*leu*) são os primeiros no sentido horário a partir do 0. Suas localizações foram determinadas por experimentos de conjugação. Imagine que uma conjugação é permitida por somente um minuto entre uma linhagem Hfr, que é his⁺, pro⁺, thr⁺ e leu⁺, e uma linhagem F⁻, que é his⁻, pro⁻, thr⁻ e leu⁻. Se F⁻ adquirir a habilidade de sintetizar a treonina, então o gene *thr* estará localizado no começo do cromossomo, entre 0 e 1 minuto. Se após 2 minutos a célula F⁻ se tornar thr⁺ e leu⁺, a ordem desses dois genes no cromossomo deve ser *thr*, *leu*.

Transdução em bactérias

Um terceiro mecanismo de transferência genética entre bactérias é a **transdução**. Nesse processo, o DNA bacteriano é transferido de uma célula doadora para uma célula receptora dentro de um vírus que infecta bactérias, denominado **bacteriófago**, ou **fago**. (Os fagos serão discutidos no Capítulo 13.)

Para compreender como a transdução funciona, vamos considerar o ciclo de vida de um tipo de fago transdutor de *E. coli*; este fago realiza uma **transdução generalizada** (Figura 8.28).

Durante a reprodução dos fagos, o DNA e a proteína são sintetizados pela célula bacteriana hospedeira. O DNA do fago deve ser empacotado dentro do capsídeo proteico que o recobre. Entretanto, o DNA bacteriano, o DNA plasmidial ou até mesmo o DNA de outro vírus podem ser empacotados dentro do capsídeo proteico.

P&R Todos os genes contidos dentro de uma bactéria infectada por um fago transdutor generalizado têm probabilidades iguais de serem empacotados em um revestimento de fago e transferidos. Em outro tipo de transdução, denominado **transdução especializada**, somente certos genes bacterianos são transferidos. Em um tipo de transdução especializada, o fago codifica certas toxinas produzidas por seus hospedeiros bacterianos, como a toxina diftérica para o *Corynebacterium diphtheriae*, a toxina eritrogênica para o *Streptococcus pyogenes* e a toxina Shiga para a *E. coli* O157:H7. A transdução especializada será discutida no Capítulo 13 (página 382). Além da mutação, da transformação e da conjugação, a transdução é outro mecanismo pelo qual as bactérias adquirem novos genótipos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Diferencie transferência gênica horizontal e vertical. **8-14**
- ✓ Compare a conjugação entre os seguintes pares: F⁺ × F⁻, Hfr × F⁻. **8-15**

Plasmídeos e transposons

Os plasmídeos e os transposons são elementos genéticos que fornecem mecanismos adicionais para a modificação genética. Eles ocorrem nos organismos procarióticos e eucarióticos, mas esta discussão focaliza seu papel na alteração genética em procariotos.

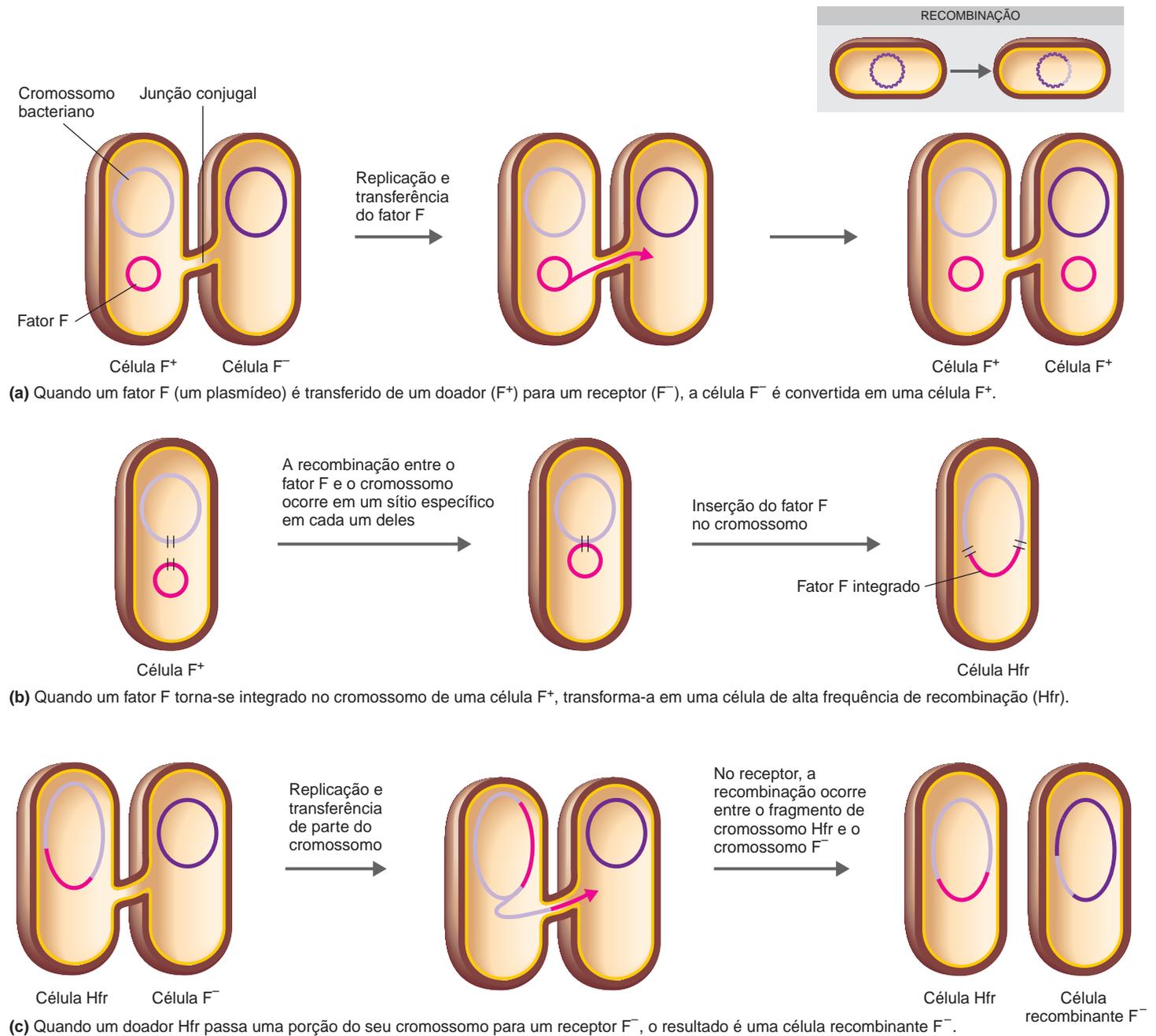


Figura 8.27 Conjugação em *E. coli*.

P Como a conjugação difere da transformação?

Plasmídeos

Lembre-se do Capítulo 4 (página 95) que os plasmídeos são fragmentos de DNA que são autorreplicantes, circulares, contendo genes, com cerca de 1 a 5% do tamanho do cromossomo bacteriano (Figura 8.29a). Eles são encontrados principalmente em bactérias, mas também em alguns micro-organismos eucarióticos, como *Saccharomyces cerevisiae*. O fator F é um **plasmídeo**

conjugativo que transporta os genes para os pili sexuais e para a transferência do plasmídeo para outra célula. Embora os plasmídeos geralmente sejam dispensáveis, em certas condições os genes transportados pelos plasmídeos podem ser cruciais para a sobrevivência e o crescimento da célula. Por exemplo, os **plasmídeos de dissimilação** codificam enzimas que ativam o catabolismo de certos açúcares e hidrocarbonetos incomuns. Algumas

espécies de *Pseudomonas* podem utilizar substâncias exóticas como o tolueno, a cânfora e os hidrocarbonetos do petróleo como fontes principais de carbono e energia, pois possuem enzimas catabólicas codificadas por genes transportados em plasmídeos. Essas capacidades especializadas permitem a sobrevivência dos micro-organismos em ambientes muito diversos e desafiadores. Devido à sua capacidade para degradar e detoxificar uma variedade de compostos incomuns, muitos deles estão sendo investigados para um possível uso na limpeza do lixo ambiental (veja o quadro no Capítulo 2, página 33).

Outros plasmídeos codificam proteínas que aumentam a patogenicidade de uma bactéria. A linhagem de *E. coli* que causa a diarreia infantil e a diarreia do viajante transporta plasmídeos que codificam a produção de toxinas e a fixação bacteriana às células intestinais. Sem esses plasmídeos, a *E. coli* é um residente inofensivo do intestino grosso; com eles, é patogênica. Outras toxinas codificadas por plasmídeos incluem a toxina esfoliativa do *Staphylococcus aureus*, a neurotoxina do *Clostridium tetani* e as toxinas do *Bacillus anthracis*. Outros plasmídeos contêm genes para a síntese de **bacteriocinas**, proteínas tóxicas que matam outras bactérias. Esses plasmídeos foram encontrados em muitos gêneros bacterianos, sendo marcadores úteis para a identificação de certas bactérias em laboratórios clínicos.

Os **fatores R (fatores de resistência)** são plasmídeos que possuem importância médica significativa. Eles foram descobertos no Japão, no final da década de 50, após várias epidemias de disenteria. Em algumas dessas epidemias, o agente infeccioso era resistente ao antibiótico costumeiro. Após o isolamento, descobriu-se também que o patógeno era resistente a uma série de antibióticos diferentes. Além disso, outras bactérias normais dos pacientes (como a *E. coli*) também demonstraram ser resistentes. Os pesquisadores logo descobriram que estas bactérias adquiriram resistência por meio da disseminação de genes de um organismo para outro. Os plasmídeos que mediam essa transferência são os fatores R.

Os fatores R transportam genes que conferem à célula hospedeira resistência a antibióticos, metais pesados ou toxinas celulares. Muitos fatores R contêm dois grupos de genes. Um grupo é denominado **fator de transferência de resistência (FTR)** e inclui genes para replicação do plasmídeo e conjugação. O outro grupo, o **determinante-r**, possui os genes de resistência; ele codifica a produção de enzimas que inativam certas drogas ou substâncias tóxicas (Figura 8.29b). Diferentes fatores R, quando presentes na mesma célula, podem se recombinar para produzir fatores R com novas combinações de genes em seus determinantes-r.

Em alguns casos, o acúmulo de genes de resistência dentro de um único plasmídeo é notável. Por exemplo, a Figura 8.29b mostra um mapa genético do plasmídeo de resistência R100. Há genes de resistência transportados neste plasmídeo para sulfonamidas, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina, bem como genes para a resistência ao mercúrio. Esse plasmídeo particular pode ser transferido entre uma série de espécies entéricas, incluindo *Escherichia*, *Klebsiella* e *Salmonella*.

Os fatores R apresentam problemas muito sérios no tratamento de doenças infecciosas com antibióticos. O uso disseminado de

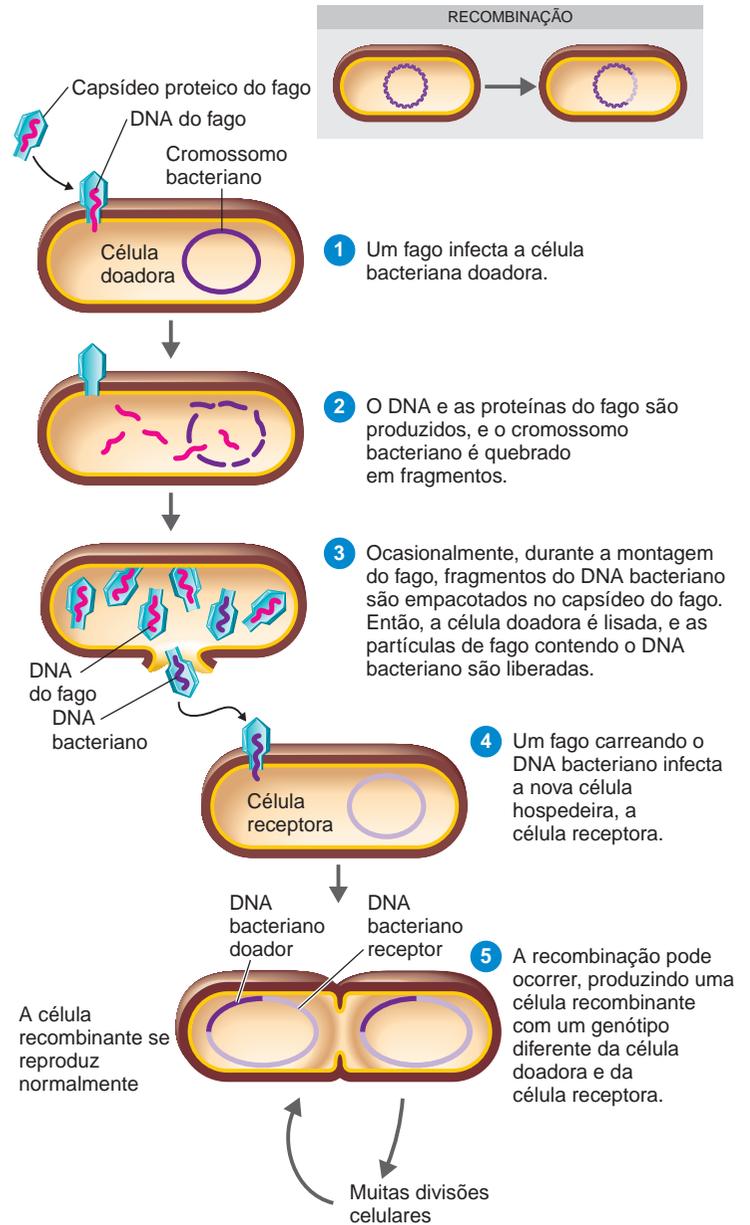


Figura 8.28 Transdução por um bacteriófago. É mostrada aqui a transdução generalizada, na qual o DNA bacteriano pode ser transferido de uma célula à outra.

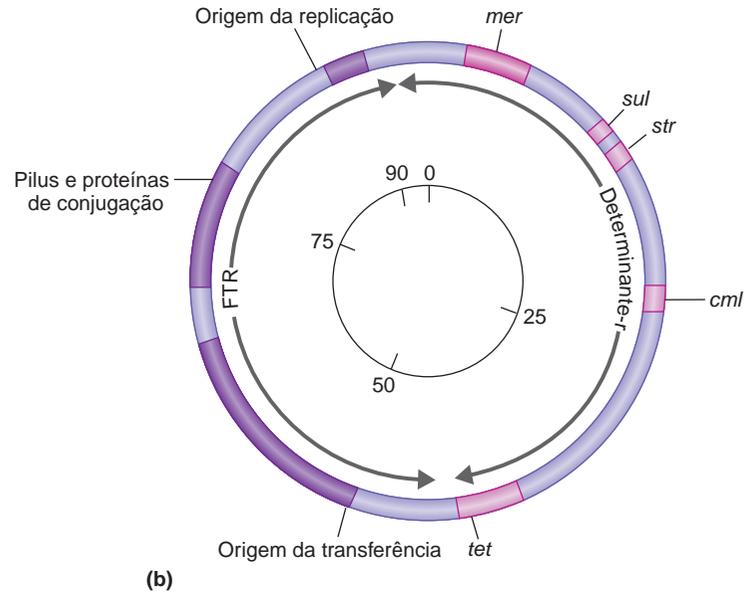
P O que é transdução?

antibióticos em medicina e agricultura (veja o quadro no Capítulo 20, página 577) levou à sobrevivência preferencial (seleção) de bactérias com fatores R; assim, as populações de bactérias resistentes crescem cada vez mais. A transferência de resistência entre as células bacterianas de uma população, e até mesmo entre as bactérias de diferentes gêneros, também contribui para o problema. A capacidade de se reproduzir sexualmente com membros de sua própria espécie define um eucarioto. Contudo, uma espécie bacteriana



(a)

MEV 20 nm



(b)

Figura 8.29 Fator R, um tipo de plasmídeo. (a) Plasmídeos isolados de bactérias *Bacteroides fragilis* que codificam a resistência ao antibiótico clindamicina. (b) Um diagrama de um fator R, que possui duas partes: o FTR contém genes necessários para a replicação e a transferência do plasmídeo por conjugação, e o determinante-*r* transporta os genes para a resistência a quatro antibióticos diferentes e mercúrio (*sul* = resistência à sulfonamida, *str* = resistência à estreptomicina, *cml* = resistência ao cloranfenicol, *tet* = resistência à tetraciclina, *mer* = resistência ao mercúrio); os números são pares de base x 1.000.

P Por que os fatores R são importantes no tratamento de doenças infecciosas?

pode conjugar e transferir plasmídeos para outras espécies. *Neisseria* pode ter adquirido seu plasmídeo produtor de penicilinase de *Streptococcus*, e *Agrobacterium* pode transferir plasmídeos para células vegetais (veja a Figura 9.20, página 265). Plasmídeos não conjugativos podem ser transferidos de uma célula para outra ao se introduzirem em um plasmídeo conjugativo ou em um cromossomo, ou por transformação quando são liberados de uma célula morta. A inserção é possível devido a uma sequência de inserção, que será discutida em breve.

Os plasmídeos são uma ferramenta importante na engenharia genética, discutida no Capítulo 9 (página 250).

Transposons

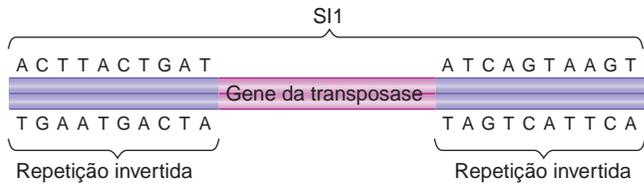
Os **transposons** são pequenos segmentos de DNA que podem se mover (ser “transpostos”) de uma região de uma molécula de DNA para outra. Esses fragmentos de DNA possuem de 700 a 40.000 pares de bases de comprimento.

Na década de 1950, a geneticista norte-americana Barbara McClintock descobriu transposons no milho, mas eles ocorrem em todos os organismos e têm sido estudados mais cuidadosamente em micro-organismos. Eles podem se mover de um local

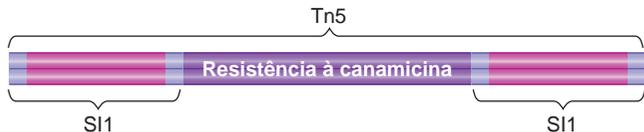
para outro no mesmo cromossomo, ou para outro cromossomo ou plasmídeo. Como você pode imaginar, o movimento frequente dos transposons poderia ter um efeito devastador dentro de uma célula. Por exemplo, à medida que os transposons se movem nos cromossomos, eles podem se inserir *dentro* dos genes, tornando-os inativos. Felizmente, a ocorrência da transposição é relativamente rara. A frequência da transposição é comparável à taxa de mutação espontânea que ocorre nas bactérias – isto é, de 10^{-5} a 10^{-7} por geração.

Todos os transposons contêm a informação para sua própria transposição. Como mostrado na Figura 8.30a, os transposons mais simples, também denominados **sequências de inserção (SI)**, contêm somente um gene que codifica uma enzima (*transposase*, que catalisa a clivagem e a remontagem do DNA que ocorre na transposição) e sítios de reconhecimento. Os **sítios de reconhecimento** são sequências curtas do DNA repetidas e invertidas, que a enzima reconhece como sítios de recombinação entre o transposon e o cromossomo.

Os transposons complexos também transportam outros genes não conectados ao processo de transposição. Por exemplo, os transposons bacterianos podem conter genes para enterotoxinas ou



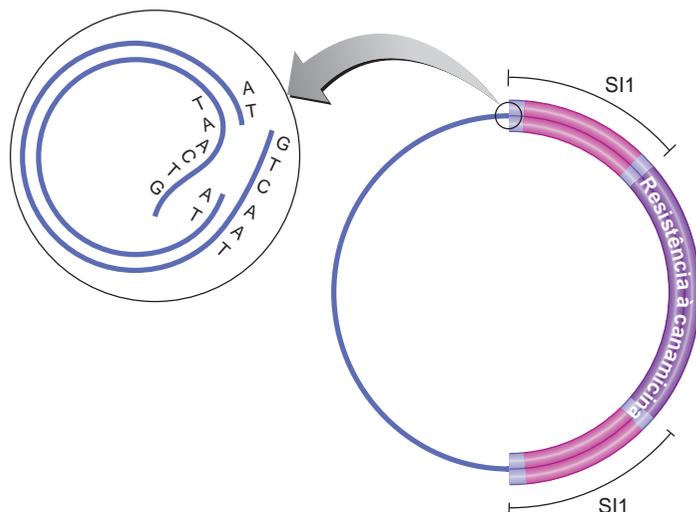
(a) Uma sequência de inserção (SI), o transposon mais simples, contém um gene para a transposase, a enzima que catalisa a transposição. O gene da transposase está ligado em cada extremidade a sequências de repetição invertidas (RI) que funcionam como sítios de reconhecimento para o transposon. SI1 é um exemplo de uma sequência de inserção, mostrada aqui com sequências RI simplificadas.



(b) Os transposons complexos transportam outros materiais genéticos além dos genes da transposase. O exemplo mostrado aqui, Tn5, carrega o gene para a resistência à canamicina e possui cópias completas da sequência de inserção SI1 em cada extremidade.



1 A transposase corta o DNA, deixando extremidades coesivas.



2 As extremidades coesivas do transposon e o DNA-alvo se anelam.

(c) A inserção do transposon Tn5 no plasmídeo R100.

Figura 8.30 Transposons e inserção.

P Por que os transposons algumas vezes são denominados genes saltadores?

para a resistência a antibióticos (Figura 8.30b). Plasmídeos como os fatores R frequentemente são compostos de um conjunto de transposons (Figura 8.30c).

Os transposons com genes de resistência a antibióticos são de interesse prático, mas não existe limitação nos tipos de genes que os transposons podem ter. Portanto, os transposons fornecem um mecanismo natural para o movimento de genes de um cromossomo para outro. Além disso, como podem ser transportados entre células em plasmídeos ou vírus, eles também podem se disseminar de um organismo para outro ou até mesmo de uma espécie para outra. Por exemplo, a resistência à vancomicina foi transferida de *Enterococcus faecalis* para *Staphylococcus aureus* via um transposon denominado Tn1546. Os transposons são, então, mediadores poderosos da evolução nos organismos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Que tipos de genes os plasmídeos transportam? 8-16

Genes e evolução

OBJETIVO DO APRENDIZADO

8-17 Discutir como a mutação genética e a recombinação fornecem material para a ocorrência da seleção natural.

Vimos como a atividade dos genes pode ser controlada pelos mecanismos reguladores internos da célula e como os genes em si podem ser alterados ou redistribuídos por mutação, transposição e recombinação. Todos esses processos fornecem diversidade aos descendentes das células. A diversidade fornece o material bruto para a evolução, e a seleção natural a perpetua. A seleção natural atuará em diversas populações para assegurar a sobrevivência dos indivíduos aptos àquele ambiente específico. Os diferentes tipos de micro-organismos que existem hoje são o resultado de uma longa história de evolução. Os micro-organismos têm continuamente sido modificados devido a alterações em suas propriedades genéticas e à aquisição de adaptações a muitos habitats diferentes.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ A seleção natural significa que o ambiente favorece a sobrevivência de alguns genótipos. De onde vem a diversidade nos genótipos? 8-17